

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Hradec Králové 2009

Veronika Macháčová

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

ZDRAVOTNICKÁ BIOANALYTIKA

**Monitorování hladin imunosupresiv u orgánových
transplantací**

**Monitoring of immunosuppressive drug levels in organ
transplantation**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Veronika Macháčová

Vedoucí práce: **Doc. MUDr. Ilja Stříž, CSc.**

HRADEC KRÁLOVÉ 2009

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato 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.“

Hradec Králové dne 21.7.2009

Veronika Macháčová

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych chtěla poděkovat Institutu klinické a experimentální medicíny, který mi umožnil studium oboru zdravotnická bioanalytika v Hradci Králové.

Mé velké poděkování patří také vedoucímu bakalářské práce Doc. MUDr. Iljovi Střížovi, CSc za jeho cenné připomínky a vedení při zpracování této práce.

Souhlasím, aby moje závěrečná práce byla půjčována ke studijním účelům. Žádám, aby byla citována podle platných norem.

V Hradci Králové, dne 21.7.2009

Veronika Macháčová

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Vypracovala:	Veronika Macháčová
Vedoucí bakalářské práce:	Doc. MUDr. Ilja Stříž, CSc.
Název bakalářské práce:	Monitorování hladin imunosupresiv u orgánových transplantací
Počet stran:	51
Rok obhajoby:	2009
Klíčová slova:	transplantace, imunosuprese, rejekce

Transplantace orgánů je někdy jedinou možností jak zachránit lidský život pacienta. Platí to pro ty orgány, jejichž funkci neumíme nahradit umělou cestou. Největším nedořešeným problémem transplantací je odhojovací reakce, která je indukována v těle příjemce. Ústřední úlohu v iniciaci poškození štěpu sehrávají rozdíly mezi HLA antigeny dárce a příjemce. Úspěšnost alogenních transplantací ovlivňuje imunosupresivní terapie. Mezi nejvíce používaná imunosupresiva patří kortikosteroidy, tacrolimus, který nahrazuje cyklosporin A (kvůli jeho vedlejším účinkům) a kyselina mykofenolová nahrazující léčbu azatioprinem. Cílem imunosupresivní léčby je snížit riziko akutní rejekce transplantátu, kdy je především nutné selektivním způsobem zamezit aktivaci T a B lymfocytů, které jsou hlavními nositeli imunitní odpovědi na cizí antigeny a vlastně hlavní příčinou odhojování transplantátu a reakce štěpu proti hostiteli. Na druhé straně by imunosupresí neměly být tlumeny buňky nespecifické imunity. Významné by bylo zavést do praxe takové metody, které by umožnily redukovat nebo dokonce vysadit imunosupresi, aniž by došlo k ohrožení štěpu rejekcí. V současné době jsou prováděny různé studie právě s touto problematikou, tak se snad v budoucnosti podaří tento problém vyřešit.

Abstract

Charles University in Prague

Fakulty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical science

Autor: Veronika Macháčová
Tutor: Doc. MUDr. Ilja Stříž, CSc.
Title: Monitoring of immunosuppressive drug levels in organ transplantation
Total of pages: 51
Session: 2009
Keywords: transplantation, immunosuppression, rejection

Organ transplantations are in some occasions the only possibility to save the patient's life. It applies especially for organs where the function cannot be restored artificially. The biggest unsolved problem of transplantations is the rejection reaction induced in the recipient body. The differences between the HLA antigens of donor and recipient play the key role in the initiation of the graft injury. The success of allogenic transplantations is influenced by the immunosuppressive therapy. Among the most frequently used immunosuppressives are corticosteroids, tacrolimus replacing cyclosporin A (due to its adverse effects), and mycophenolate mofetil replacing the treatment by azathioprin. The aim of the immunosuppressive therapy is to decrease the risk of acute graft rejection where it is necessary to selectively inhibit the activation of T and B lymphocytes which are the main carriers of immune response against foreign antigens and thus the main reason of graft rejection and graft versus host reaction. On the other hand, the immunosuppression should not affect the cells of nonspecific immunity. It might be important to introduce into clinical practice such methods which enable to reduce or even discontinue the immunosuppression without the risk of graft rejection. Recently, several studies targeting this problem are in progress and, hopefully, will solve it in the future.

Obsah

Obsah.....	8
Úvod.....	11
1 Transplantace a imunitní systém.....	12
1.1 Úvod.....	12
1.1.1 Základní pojmy	12
1.1.2 Aloimunitní reakce	13
1.1.3 Hlavní histokompatibilní komplex (MHC).....	13
1.2 Orgánové transplantace	16
1.2.1 Xenotransplantace.....	16
1.3 Transplantace hematopoetických kmenových buněk.....	17
2 Imunitní odpověď proti štěpu	18
2.1 Imunitní rozpoznání antigenu	18
2.1.1 Přímá dráha	18
2.1.2 Nepřímá dráha.....	19
2.1.3 Kostimulace	21
2.2 Odhojovací reakce.....	23
2.2.1 Úvod.....	23
2.2.2 Hyperakutní rejekce	23
2.2.3 Akutní buněčná rejekce	23
2.2.4 Chronická rejekce	24
3 Typy imunosupresiv a mechanismy jejich účinku.....	25
3.1 Úvod.....	25
3.1.1 Profylaktická imunosuprese.....	26
3.1.2 Antirejekční imunosuprese	26
3.2 Kortikosteroidy (CS).....	27

3.2.1	Azatioprin (AZA)	27
3.2.2	Mykofenolát mofetil (MMF)	28
3.2.3	Inhibitory kalcineurinu - Cyklosporin A a Tacrolimus	29
3.2.3.1	Cyklosporin A (CsA).....	29
3.2.3.2	Tacrolimus (FK 506).....	31
3.2.4	Inhibitory mTOR	32
3.2.5	Monoklonální protilátky	33
3.2.6	Polyklonální protilátky	34
3.2.7	Intravenózní imunoglobuliny (IVIG).....	34
4	Monitorování hladin imunosupresiv	35
4.1	Cyklosporin A - CMIA (Abbott).....	35
4.1.1	Hodnoty Cyklosporinu (léku Consupren, Sandimun) v LNM-IKEM	36
4.2	Tacrolimus - CMIA (Abbott).....	37
4.2.1	Hodnoty Tacrolimu (léku FK 506) v LNM-IKEM.....	37
4.3	Sirolimus - CMIA (Abbott).....	38
4.3.1	Hodnoty Sirolimu (léku Rapamune) v LNM-IKEM	38
4.4	Kyselina mykofenolová - EMIT (Dade Behring).....	39
4.4.1	Hodnoty Mykofenolátu (léku Cellcept, Mykofenolát mofetil) v LNM-IKEM.....	40
5	Režimy k navození transplantační tolerance	41
5.1	Mechanismy uplatňující se v transplantační toleranci	41
5.1.1	Regulační T-lymfocyty	42
5.1.2	Dendritické buňky.....	42
5.1.3	Kostimulace-blokáda-resistantní rejekce	43
5.1.4	Mezinárodní projekty k navození transplantační tolerance	43
	Diskuse.....	45

Závěr.....	46
Literatura a prameny.....	47
Seznam zkratek.....	49
Seznam obrázků.....	51

Úvod

Imunosupresiva jsou chemicky různorodé látky působící na rozdílných stupních rozvoje imunitní reakce, přičemž inhibují účinněji primární než sekundární fáze imunitní odpovědi. Cílem imunosupresivní léčby je zejména přerušování nežádoucí aktivace T a B lymfocytů, které jsou hlavními nositeli imunitní odpovědi na cizí antigeny. Naopak buňky zodpovědné za nespecifickou imunitní odpověď jako polymorfonukleáry, monocyty/makrofágy a NK (natural killer) buňky by měly být imunosupresí potlačeny co nejméně.

Významný rozvoj imunosupresivní terapie je těsně spojen s oborem transplantologie. Imunosupresivní léčba po transplantaci má zpočátku minimalizovat riziko akutní rejekce a následného vulnerabilního období, v pozdějších fázích pak udržovací imunosupresivní léčba působí profylakticky antirejekčně.

Dále jsou imunosupresiva používána u poruch imunity způsobených patologickou reaktivitou na vnitřní antigeny, tedy u autoimunitních onemocnění, a u některých závažných projevů alergie. Nezanedbatelné je využití imunosupresiv v hematologii a v kardiologii, či široké použití monoklonálních protilátek v diagnostice i léčbě.

Na druhé straně imunosupresivní léčbu provází celé spektrum nežádoucích účinků. Výrazná inhibice T a B lymfocytů je spojena s možným rozvojem virových, mykotických a protozoárních onemocnění a s vyšším výskytem malignit, zejména lymfoproliferací.

Imunosupresivní léčbu provází také celá řada nežádoucích účinků neimunitního původu. Např. nežádoucí účinky kalcineurinových inhibitorů zahrnují hypertenzi, hyperlipidemii a nefrotoxicitu, společně s kortikosteroidy i diabetogenní účinek. Většina antiproliferativních látek je do určité míry hepatotoxická, podávání rapamycinu vede u 20% pacientů k trombocytopenii atd.

Imunosupresiva dnes představují dynamicky se rozvíjející heterogenní skupinu léčiv, kde vývoj směřuje k substancím s maximální selektivitou účinku. Ta je někdy vyjadřována indexem imunitní účinnosti (ISE), který vyjadřuje relativní účinnost inhibice T a B lymfocytů v poměru k ovlivnění složek nespecifické imunity.

1 Transplantace a imunitní systém

1.1 Úvod

Transplantace neboli přenos tkání nebo orgánů představují terapeutické zákroky, které mají za cíl nahradit nefunkční tkáň nebo orgán příjemce zdravým ekvivalentem. U většiny z nich hrají imunitní děje zásadní roli. Experimentální transplantační systémy velmi významně přispěly k poznání mnoha imunologických principů.

Nejčastějším druhem transplantace v klinické praxi jsou krevní transfúze. Z orgánových transplantací jsou nejpočetnější transplantace ledvin (celosvětově cca 25 000 ročně), dále srdcí, jater a rohovky.

Klinické využití transplantací je limitováno omezenou nabídkou lidských orgánů vhodných k transplantaci. Lze očekávat, že v brzké budoucnosti dojde v této oblasti k podstatné změně. V současnosti se testují geneticky manipulovaná zvířata, která mohou být zdrojem orgánů pro klinické transplantace. Není vyloučeno, že technologický pokrok umožní i využití klonovacích technik.

1.1.1 Základní pojmy

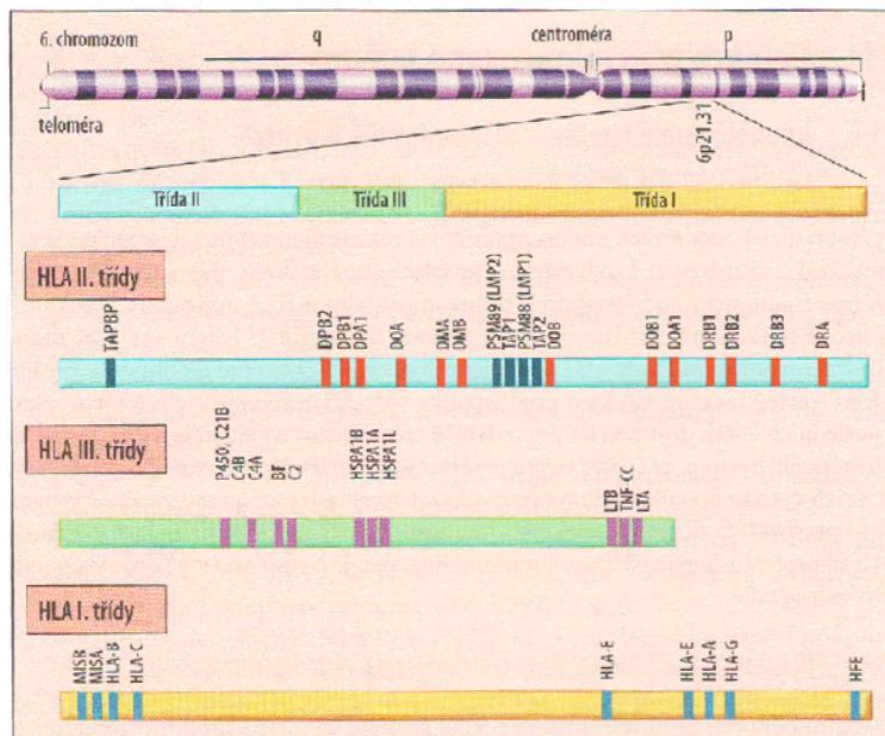
Jedinec, ze kterého pochází transplantovaný orgán nebo tkáň (štěp), je dárce. Reakce imunitního systému příjemce způsobují odhojení (rejekci) transplantátu, který je vnímán jako cizorodý. Je-li příjemce imunodeficitní, mohou imunokompetentní buňky ve štěpu reagovat s tkáněmi příjemce, a způsobit tak reakci štěpu proti hostiteli (GvH, graft versus host). Štěpy pocházející od dárce geneticky identického s příjemcem (identická dvojčata, jedinci inbredních kmenů zvířat) jsou syngenní, štěpy od geneticky neidentického dárce z téhož druhu živočišného druhu jsou alogenní, od jedince jiného živočišného druhu jsou xenogenní. Jako autologní transplantace se označuje přenos tkání nebo buněk jedince na jiné místo jeho organismu. Zvláštním druhem transplantace je použití umělých (syntetických) náhrad tkání, v tomto případě hovoříme o implantacích [1].

1.1.2 Aloimunitní reakce

Nejčastějším druhem transplantace je alogenní transplantace. Genetický polymorfismus jedinců téhož živočišného druhu způsobuje, že imunokompetentní buňky jednoho jedince zpravidla reagují na přítomnost antigenů tkání jiného jedince. To je příčinou hlavních problémů transplantací, tj. rejekce transplantovaného orgánu a reakce štěpu proti hostiteli. Hlavními antigeny zodpovědnými za tuto reaktivitu jsou MHC glykoproteidy (u lidí nazývané HLA). I v případě, že dárce a příjemce mají shodné alelické formy MHC gp, existuje celá řada dalších polymorfních tkáňových antigenů, které mohou být imunitním systémem rozpoznány. Tyto antigeny se souhrnně nazývají vedlejší histokompatibilní antigeny (minor histocompatibility antigens).

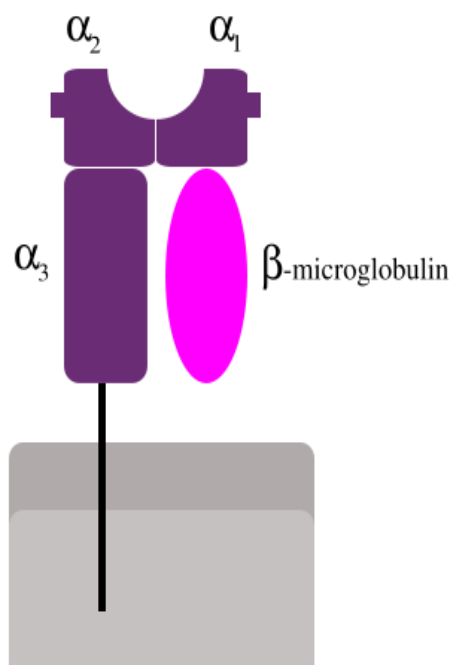
1.1.3 Hlavní histokompatibilní komplex (MHC)

Při alogenní transplantaci jsou příčinnou imunitní reakce rozdíly mezi dárce a příjemcem v hlavním histokompatibilním komplexu (MHC). Tento systém reprezentuje skupina genů lokalizována na 6. chromozomu buněčného jádra. Geny MHC (major histocompatibility complex) systému jsou organizovány do řady míst – lokusů nebo sublokusů – označených písmeny abecedy. Pro transplantaci mají význam lokusy A, B, a DR. Celý systém je značně polymorfní, na každém lokusu je možno u různých jedinců detekovat řadu odlišných molekul, antigenních specifíků (alel), označených vždy písmenem daného lokusu a číslem specifiky (např. A1). U člověka se tyto antigeny označují jako HLA (human leukocyte antigen). Každý jedinec dědí od každého z rodičů jeden chromozom, a tudíž jeden haploidní genotyp (haplotyp). Na každém lokusu má dva antigeny a celkem je na lokusech A, B, DR šest antigenů [13].



Obrázek 1: HLA komplex se nachází na 6.chromosomu

Antigeny z lokusů A, B, C jsou označovány jako HLA antigeny I. třídy, z lokusů DR, DQ, DP jako HLA antigeny II. třídy. Antigeny I. třídy jsou exprimovány na všech jaderných somatických buňkách, antigeny II. třídy pouze na povrchu antigen prezentujících buněk a B-lymfocytů. Tato distribuce HLA-antigenů má velký význam pro normální funkci imunitního systému.



Obrázek 2: HLA antigeny I.třídy

HLA-antigeny obou tříd se od sebe liší v uspořádání glykoproteinových řetězců, ale mají společnou důležitou vlastnost a to, vázat ve žlábků vytvořeném z těchto řetězců peptidy. Peptidy jsou fragmenty antigenů endogenního i exogenního původu. Peptidy endogenního původu jsou syntetizovány v buňce a společně s HLA-antigenem exprimovány na jejím povrchu. Peptidy exogenního původu jsou nejdříve získány štěpením antigenů a potom exprimovány do žlábků HLA-antigenů II. třídy na povrchu dendritické buňky nebo makrofágu. Komplex HLA - molekul a peptidu umožňuje rozpoznání takového komplexu buňkami imunitního systému [3].

1.2 Orgánové transplantace

Účelem transplantace orgánů nebo tkání je náhrada nefunkčního orgánu příjemce funkčním orgánem dárce. Dárci orgánů jsou především osoby zemřelé na následky úrazu. Pouze u párových orgánů (ledviny) je možné, aby dárce byla živá osoba, obvykle to bývá člen rodiny. Kritéria výběru příjemce u transplantací ledvin je shoda v krevním systému AB0, shoda nebo alespoň částečná shoda v HLA antigenech (především II. třídy) a negativní cross-match test na přirozené protilátky. U transplantací srdce a plic se HLA typizace z časových důvodů neprovádí a aloreaktivita se potlačuje silnou imunosupresivní léčbou.

1.2.1 Xenotransplantace

Velkým problémem u orgánových transplantací zůstává nedostatek vhodných dárců. Řešením by bylo použití vhodných xenogenních orgánů. Z fyziologických a jiných důvodů by optimálním druhem mohlo být prase. Lidské sérum však obsahuje značné množství přirozených protilátek, které se váží hlavně na sacharidové struktury prasečích endoteliálních buněk a aktivují komplement. To způsobuje hyperakutní odhojování těchto xenotransplantátů. Kupodivu intenzita xenoreakce T-lymfocytů je paradoxně do určité míry tlumena nekompatibilitou některých druhově specifických adhezivních a signalizačních molekul, takže je srovnatelná s intenzitou aloreakce.

V současné době se věnuje velké úsilí přípravě transgenních prasat, jejichž buňky by nesly méně antigenů rozeznávaných lidskými přirozenými xenoprotilátkami a naopak exprimovaly lidské membránové regulační proteiny inhibující působení komplementu. Po zvládnutí tohoto problému by měla být transplantace takto geneticky modifikovaných orgánů analogická alotransplantaci, a tudíž zvládnutelná běžnými imunosupresivními prostředky [1].

1.3 Transplantace hematopoetických kmenových buněk

Transplantace hematopoetických kmenových buněk nahrazuje původní termín transplantace kostní dřeně, neboť dnešní techniky umožňují získat kmenové buňky nejen z kostní dřeně, ale také z pupečnickové krve nebo periferní krve dárce po stimulaci růstovými faktory. Cílem je osídlit dřeň příjemce kmenovými buňkami dárce, které dají vznik krvetvorbě. Tento typ transplantace je léčebnou metodou u některých vrozených a získaných poruch krvetvorby, u imunodeficiencí postihujících lymfoidní nebo myeloidní řadu, některé druhy leukémií. Samotná transplantace kostní dřeně je technicky jednoduchá – suspenze směsi částečně čištěných dřeňových buněk se injikuje do periferní žíly příjemce a kmenové buňky si hledají cestu do kostní dřeně a usídlí se tam. V momentě, kdy je detekovatelná krvetvorba, hovoříme o přihojení (engraftment). Nejdříve se obvykle objevuje tvorba erytrocytů, potom granulocytů, trombocytů a nejspoději lymfocytů.

Před transplantací kmenových buněk je ve většině případů potřeba tzv. uvolnit prostor v kostní dřeni a zničit vadné kmenové buňky příjemce (např. ozářením – tzv. myeloablace).

Odvržení štěpu, rejekce, se projeví zástavou krvetvorby pocházející od dárce a obnovou krvetvorby příjemce. Mezi hlavní imunologický problém transplantace kmenových buněk je však reakce štěpu proti hostiteli [14].



Obrázek 3: Možnosti odběru krvetvorných buněk u dárců

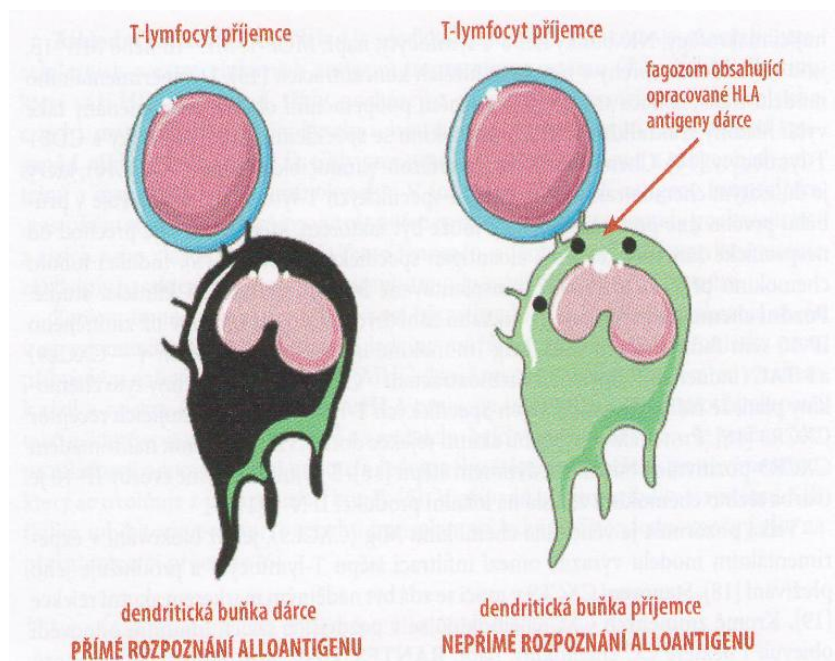
2 Imunitní odpověď proti štěpu

2.1 Imunitní rozpoznání antigenu

Imunitní potransplantační reakce je odpověď imunitního systému příjemce na neshodné aloantigeny dárce. Reakce je zprostředkována antigen prezentujícími buňkami (APC) a T-lymfocyty. V poslední době se rozšiřují poznatky o účasti protilátkové imunity, kdy na počátku těchto reakcí je rozpoznání aloantigenu. Jako aloantigen může vystupovat peptid z různých proteinů dárce včetně HLA nebo přímo HLA-antigen dárce. Jeho rozpoznání lymfocyty se může dít dvěma hlavními cestami, a to buď přímo, nebo nepřímo [3].

2.1.1 Přímá dráha

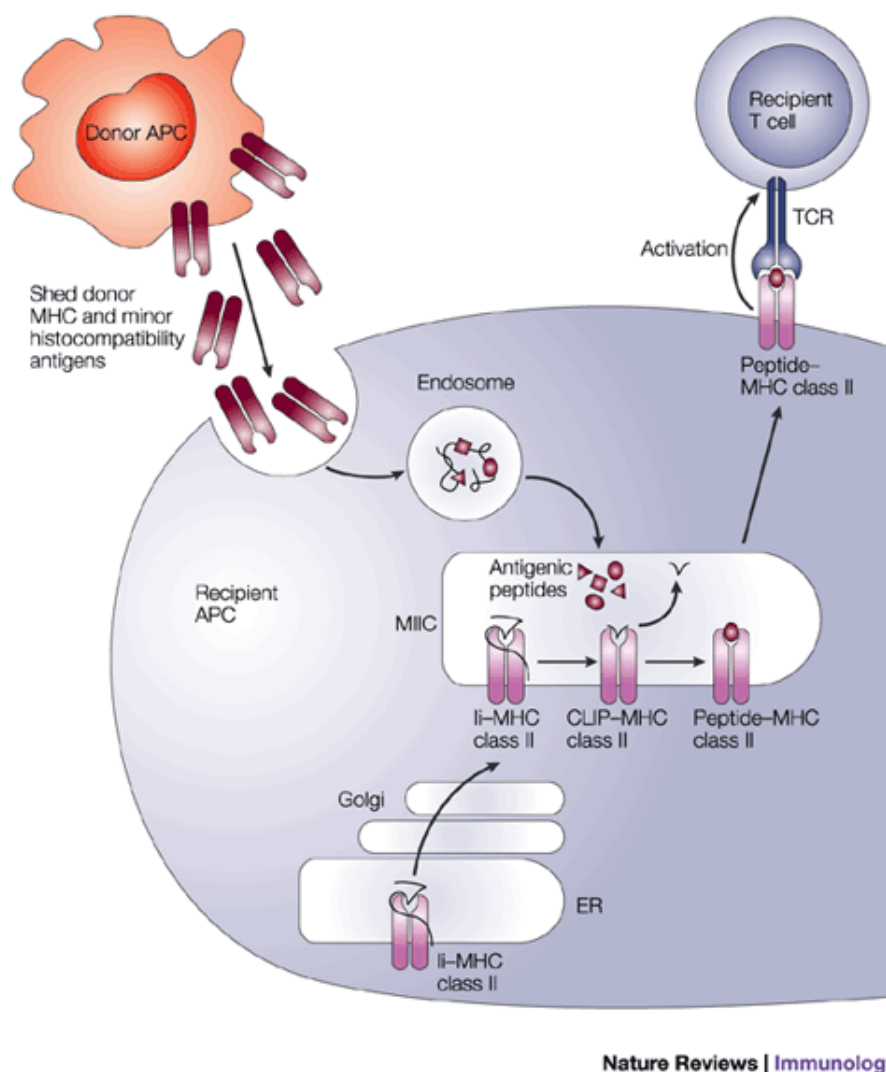
Přímá dráha (direct pathway) je unikátním mechanismem, se kterým se setkáme pouze u transplantací. Při této reakci T-lymfocyty prostřednictvím svého receptoru (TCR) rozeznávají intaktní HLA molekuly exprimované na dendritických buňkách dárce. HLA antigeny I. třídy jsou rozeznávány pomocí TCR na CD8+ T-lymfocytů, zatímco HLA antigeny II. třídy jsou rozeznávány pomocí TCR na CD4+ T-lymfocytech [15].



Obrázek 4: Mechanismy rozeznávání HLA antigenů příjemce

2.1.2 Nepřímá dráha

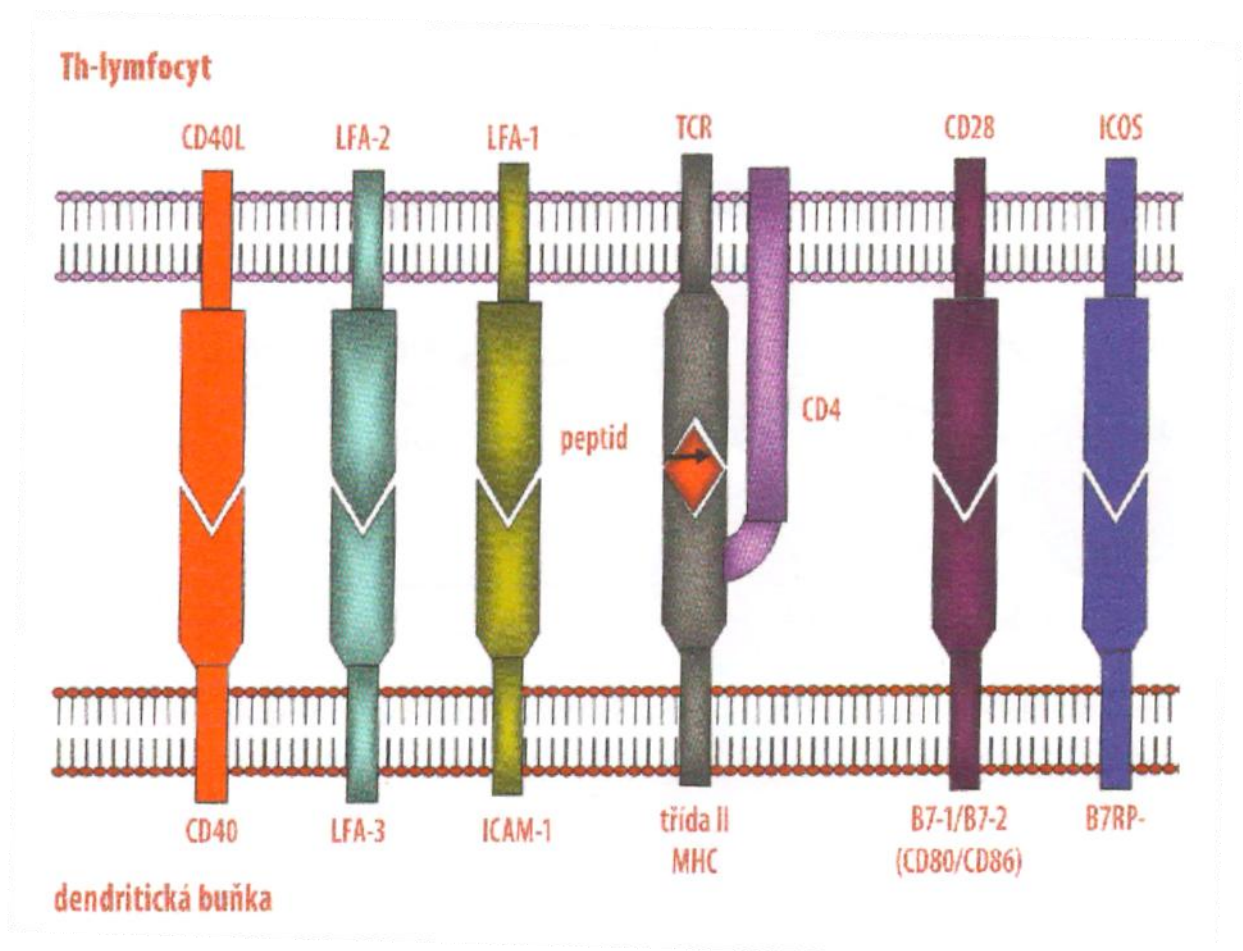
U tzv. nepřímé dráhy (indirect pathway), která se zásadně neliší od klasické prezentace jakéhokoliv cizorodého antigenu, jsou HLA antigeny dárce pohlceny antigen-prezentujícími buňkami příjemce migrující do štěpu. Antigen-prezentující buňky, nejčastěji dendritické buňky, pak migrují ze štěpu do lymfatických uzlin a do sleziny a zde jsou HLA antigeny dárce po intracelulárním opracování předkládány v komplexu s HLA antigeny II. třídy příjemce CD4⁺ T-lymfocytům. Tento mechanismus je identický s počáteční fází specifické imunitní odpovědi, tak jak fyziologicky probíhá i proti ostatním extracelulárním proteinům a u transplantací se uplatní zejména v patogenezi chronické rejekce štěpu [16].



Obrázek 5: Nepřímá stimulace-APC dárce uvolňují MHC, který je prezentován jako antigen skrz APC příjemce a stimuluje rejekci

V poslední době se někdy zmiňuje jako další možnost tzv. „semi-direct“ prezentace, při které dochází k membránové výměně HLA molekul po kontaktu mezi dendritickými buňkami dárce a příjemce.

U všech typů imunitního rozpoznávání je podstatou interakce nativních aloreaktivních T-lymfocytů a jejich receptorů (TCR) s MHC molekulou akcesorní buňky obsahující ve svém žlábků imunogenní peptid. Tato prezentace antigenu a s ní spojená mezibuněčná signalizace mezi T-lymfocitem a dendritickou buňkou má zcela zásadní význam nejen pro nasměrování, ale také intenzitu imunitní odpovědi. Kromě TCR/MHC signalizace jsou však nezbytné ještě další signály přenesené přes receptory a ligandy těchto buněk, tzv. kostimulace [4].



Obrázek 6: MHC/TCR signalizace a kostimulace

2.1.3 Kostimulace

Kostimulace je důležitá nejen pro aktivaci T-lymfocytů, ale i pro jejich přežití. Při přenosu signálu prostřednictvím TCR/MHC molekul bez dostatečné kostimulace k aktivaci T-lymfocytů nedochází, dojde naopak k nastartování pochodů vedoucích k jeho smrti mechanismem apoptózy. Hlavními kostimulačními dráhami jsou interakce mezi CD40 a CD154 (CD40L) a dále interakce mezi molekulami ze skupiny B7 a CD28. Vazba mezi molekulami B7-1 (CD80) a B7-2 (CD86) k CD28 může být účinně inhibována expresí antigenu CTLA4 (CD152). Jde o homolog CD28, který však má schopnost indukovat negativní signál, a tím tlumit kostimulaci. Další příbuznou molekulou k CD28 je tzv. ICOS (inducible costimulator) vážící další molekulu ze skupiny B7 označovanou jako B7RP-1.

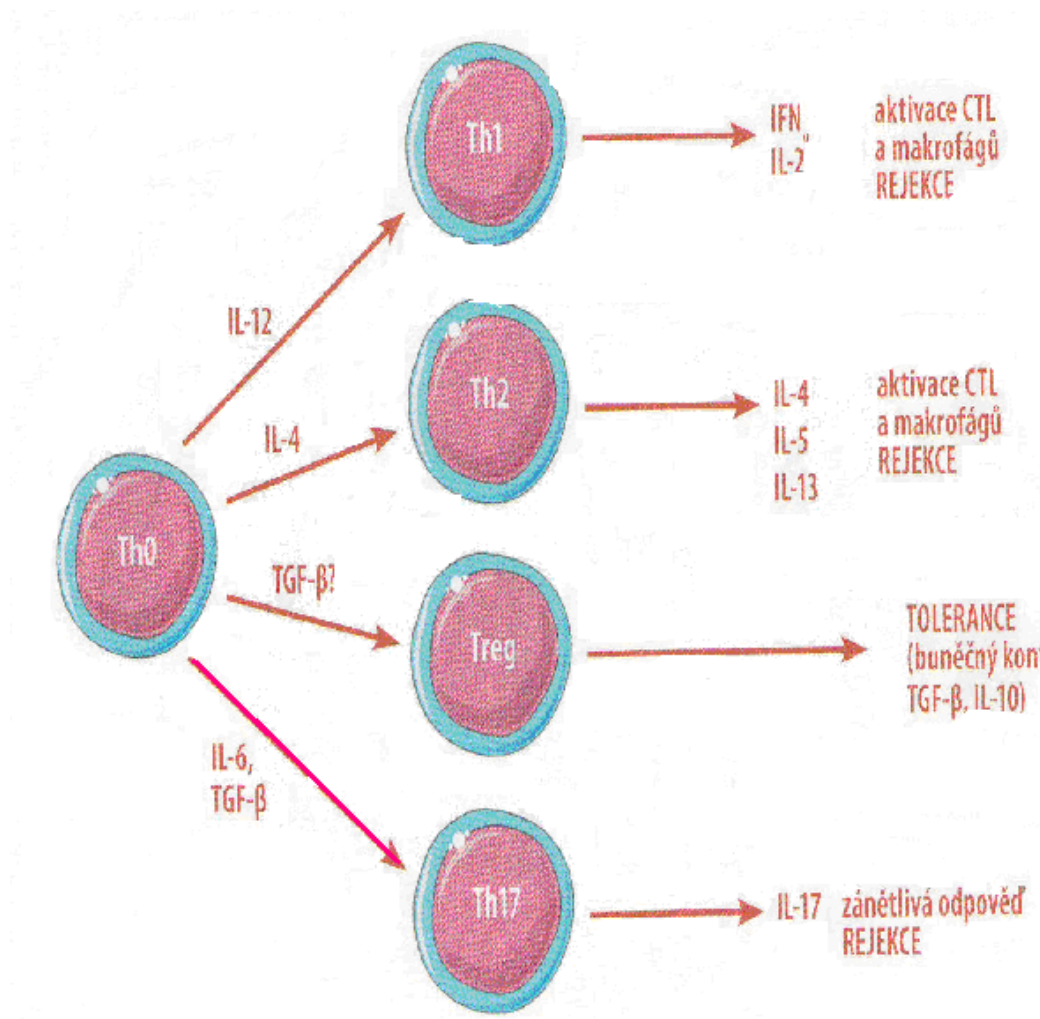
Experimentální studie potvrdily, že právě blokáda kostimulačních molekul nejen zabrání aktivaci alospecifických T-lymfocytů, ale dokonce může prostřednictvím inhibiční signalizace navodit stav anergie.

Na počátku alospecifické imunitní odpovědi má velký význam také profil secernovaných cytokinů jednotlivými subpopulacemi T-lymfocytů.

Jednoznačný význam hrají Th1-cytokiny IL-2 a IFN- γ v odpovědi proti štěpu. Tak jak tvorba IL-2 spojená s aktivací alospecifických lymfocytů a jejich klonální expanzí, tak produkce IFN- γ aktivujícího makrofágy a indukující expresi HLA antigenů II. třídy na buňkách parenchymu mají v rejekčních mechanismech zvláštní význam [4].

U Th2-cytokinů (IL-4, IL-5, IL-13) stále není shoda v jejich úloze při transplantačních reakcích. Zatímco v některých případech mohou rejekci bránit, v jiných studiích se přímo účastní odvržení štěpu, při kterém je štěp infiltrován eozinofilními leukocyty a žírnými buňkami. Cytokinové regulace nelze vymezit pouze na odpovědi Th1/Th2.

Mezi další patří nedávno popsané Th17-lymfocyty, které produkují IL-17 nezávisle na Th1/Th2 diferenciaci a související s neutrofilním zánětem, mohou přímo indukovat mechanismy související s rejekcí alotransplantátu. Kromě dalších cytokinů, které s problematikou Th1/Th2/Th17 rovnováhy přímo souvisejí (IL-12, IL-15, IL-18) je věnována velká pozornost také cytokinům, jejichž převažující účinek je protizánětlivý a imunosupresivní. Mezi nejvýznamnější patří zejména IL-10 a TGF- β jejichž činnost souvisí s populací regulačních T-buněk (Treg, Th3, Tr1, NKT), které tlumí imunitní odpovědi [4].



Obrázek 7: Profil cytokinů secernovaných jednotlivými subpopulacemi T-lymfocytů.

2.2 Odhojovací reakce

2.2.1 Úvod

Hlavním imunologickým problémem orgánových transplantací je rejekce. K poškození štěpu může dojít z několika důvodů, mezi které patří cytotoxicita, reakce opožděné přecitlivělosti indukované CD4 lymfocyty a mobilizující především prozánětlivé cytokiny a makrofágy. Dále pak aloreaktivní protilátky z aktivovaných B-lymfocytů, které po aktivaci komplementu mají za cíl působit především na buňky cévní stěny.

Důsledkem imunologické aktivity je rejekce štěpu. Rozlišujeme tři základní typy rejekčních reakcí: hyperakutní, akutní a chronické. Ty mohou vést k poškození nebo až zničení transplantovaného orgánu [2].

2.2.2 Hyperakutní rejekce

Hyperakutní rejekce je způsobena preformovanými cirkulujícími anti-HLA protilátkami. Pacienti s těmito protilátkami jsou vyloučeni z transplantace pozitivní křížovou zkouškou, proto by tato rejekce vůbec neměla nastat a její výskyt je zcela výjimečný. Jiným důvodem by mohlo být nedodržení kompatibility v krevních skupinách. Rozvíjí se během minut až několika hodin a projevuje se trombózou postihující arterie, arterioly a glomeruly a fibrinoidní nekrózu cévních stěn. Jediným řešením je zpravidla nefrektomie štěpu [3].

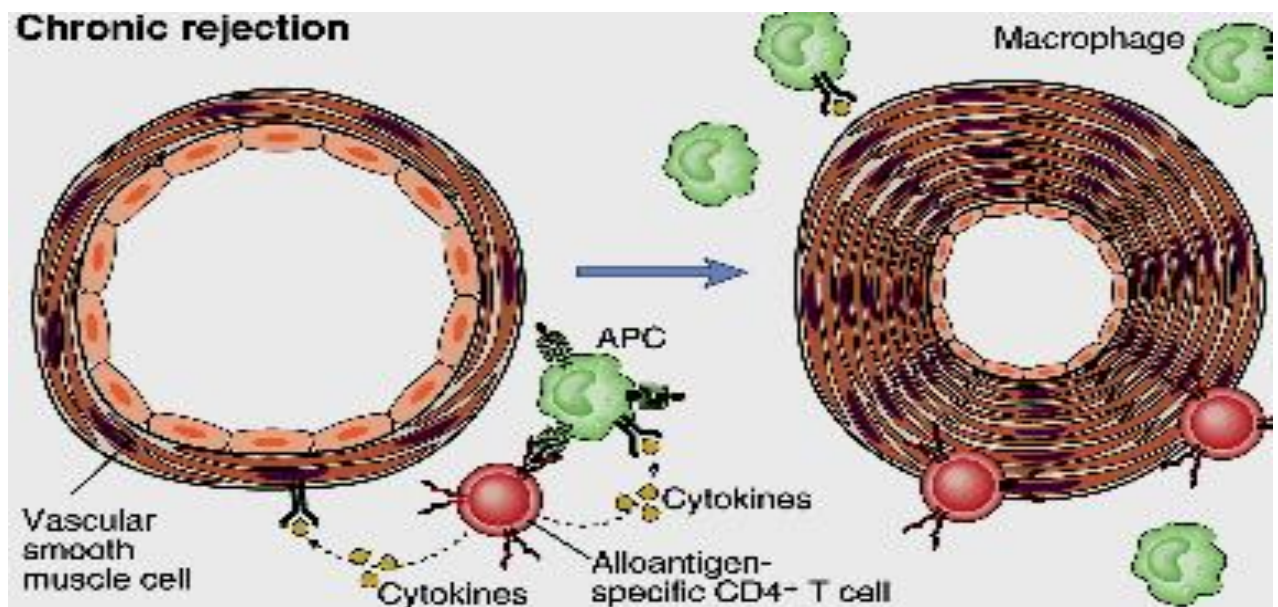
2.2.3 Akutní buněčná rejekce

Tato reakce je zprostředkována lymfocyty aktivovanými proti HLA antigenům dárce v lymfatické tkáni příjemce cestou přímé nebo nepřímé alostimulace dendritickými buňkami. Po primární aktivaci CD4⁺ buněk, jsou to zejména alosterické CD8⁺ T-lymfocyty, které se vrací do cirkulace a posléze reagují s endotelem štěpu, hlavními terčovými buňkami akutní buněčné rejekce. Při akutní buněčné rejekci dochází zpravidla k výrazné infiltraci ledvinného parenchymu jak CD4⁺, tak i CD8⁺ buňkami, jejichž cytolytický účinek je založen jednak na působení perforinu a granzymu, ale také na interakci mezi molekulami Fas a Fas-ligand vedoucí k apoptóze napadené buňky. Kromě přímého cytotoxického efektu se při rejekci štěpu mohou uplatnit i mechanismy pozdní přecitlivělosti s přísunem a aktivací makrofágů [4].

2.2.4 Chronická rejekce

Je považována za hlavní překážku dlouhodobého přežití alotransplantátu. Rizikovým faktorem je nejen neshoda v HLA antigenech, ale i předchozí zvládnutá akutní rejekce. I v tomto případě se může uplatnit buněčná odpověď, ale i mechanismy humorální. Důležitým znakem proti látkové odpovědi proti štěpu je průkaz deponované C4d složky komplementu v transplantované ledvině. Vzhledem k charakteru imunitní reakce s přítomností aktivovaných makrofágů secernujících fibrogenní cytokiny typu TGF- β se předpokládá i účast mechanismů oddálené přecitlivělosti.

Imunitní odpověď proti štěpu transplantované ledviny zahrnuje jak problematiku míry shody v HLA antigenech, tak složitou kaskádu buněčných interakcí, na nichž se kromě imunokompetentních buněk podílí i řada buněk mimo klasický rámec imunitního systému. Mezi významný zdroj cytokinů patří také buňky renálního epitelu, fibroblasty nebo svalové buňky. Pro účinnou prezentaci aloantigenů dendritickými buňkami je nezbytná jejich stimulace přes tzv. Toll-like receptory spojované spíše s antiinfekční imunitou buněk přirozené imunity [4] [17].



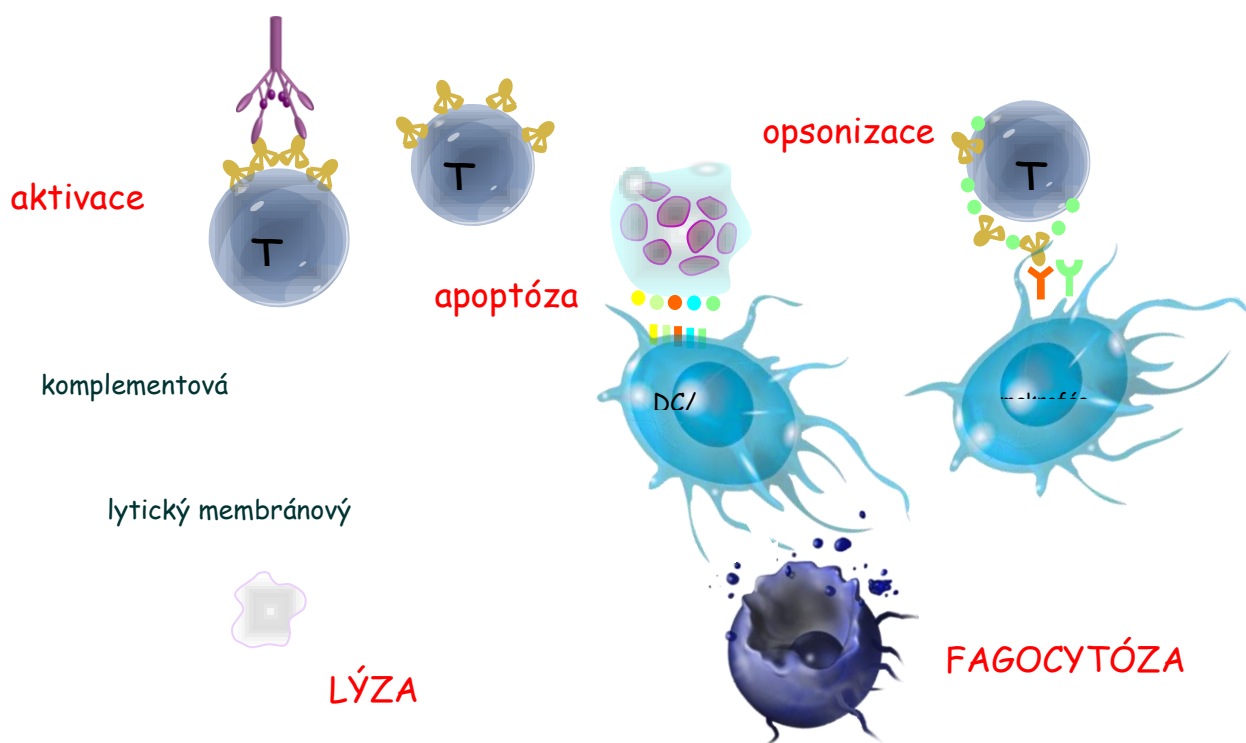
Obrázek 8: Chronická rejekce

3 Typy imunopresiv a mechanismy jejich účinku

3.1 Úvod

Imunosupresivní terapie je v současné době nescifická, tj. taková, která postihuje nejen nežádoucí autoreaktivní nebo aloreaktivní lymfocyty, ale i normální lymfocyty a další složky imunity, proto s sebou nese rizika snížení antiinfekční i protinorové imunity [1].

Imunosupresi lze dosáhnout několika mechanismy – deplecí lymfocytů, ovlivněním migrace lymfocytů nebo blokováním mechanismů spojených s odpovědí lymfocytů.



Obrázek 9: Příklad deplece T-lymfocytů protilátkami

Imunosupresivní režimy rozdělujeme podle doby jejich použití a indikaci na indukční, udržovací (profylaktická) a antirejekční.

3.1.1 Profylaktická imunosuprese

Indukční imunosuprese

Jde o velmi intenzivní léčbu imunosupresivy v časném období po transplantaci. Cílem je zabránit rejekci štěpu v období, kdy je imunitní odpověď na aloantigen nejintenzivnější.

Udržovací imunosuprese

Je méně intenzivní než indukční imunosuprese, jejímž cílem je profylaxe akutní rejekce. Jednotlivá imunosupresiva se kombinují do tzv. imunosupresivních režimů. Nejčastěji se jedná o trojkombinace imunosupresiv, která zahrnuje imunosupresivum z řady kalcineurinových inhibitorů (CsA nebo Tac), další kombinace je s přídatným antiproliferačně působícím imunosupresivem (MMF nebo Azatioprin) a s kortikosteroidy.

Ne u každého pacienta je trojkombinace nezbytná, častěji se využívá minimalizace imunosuprese (vysazení kalcineurinových inhibitorů a kortikosteroidů).

3.1.2 Antirejekční imunosuprese

Antirejekční terapie by se měla využívat se znalostí histologického nálezu, který je pro zvolení léčby rozhodující. V případě, že se jedná o akutní celulární rejekci, používají se dávky metylprednisolonu, v případě rezistence rejekce se ke steroidům přidávají antilymfocytární preparáty [4].

Hlavní imunosupresiva používaná v orgánových transplantacích zahrnují skupiny malých molekul (kortikosteroidů, azatioprinu, mykofenolát mofetilu, entericky potaženého mykofenolátu sodného, inhibitorů kalcineutrinu- takrolimu a cyklosporinu A, inhibitorů mTOR - sirolimu a everolimu) a skupinu biologických preparátů obsahujících proteiny (polyklonální a monoklonální protilátky, fúzní proteiny a intravenózní imunoglobuliny) [4].

3.2 Kortikosteroidy (CS)

Kortikosteroidy zastupují malé molekuly a představují základní preparáty pro udržovací i antirejekční imunosupresi. Prednison, prednisolon a metylprednisolon se rychle vstřebávají a mají krátký poločas v plazmě avšak dlouhý biologický poločas.

Patří mezi nejméně selektivní imunosupresiva, neboť působí na všechny fáze zánětlivé odpovědi. Cílovými buňkami v účinku CS jsou hlavně pomocné T lymfocyty a buňky monocyto/makrofágového systému. Kortikoidy působí tak, že se naváží na cytoplazmatický receptorový protein, tento komplex integruje v jádře s některými transkripčními faktory a blokuje jejich aktivitu. Tím se potlačuje exprese řady genů (např. pro některé cytokiny jako IL-2) v aktivovaných T-lymfocytech [5].

CS se podávají jako indukční preparáty v dávkách od 250 mg do 1g v perioperačním období, po té se podávají v sestupných dávkách. Řada transplantačních center CS z imunosupresivního režimu vysazuje s cílem omezit jejich vedlejší účinky. Na druhou stranu někteří nemocní na pozdní vysazení steroidů reagují rejekcí a my neumíme odlišit, kdo z nemocných bude na toho vysazení reagovat rejekcí štěpu, proto by CS neměly být vysazovány u nemocných po opakovaných transplantacích, při anamnéze akutní rejekce nebo ve vysokém imunologickém riziku [4].

Vedlejší účinky jsou časté a významné. Patří mezi ně katarakta, osteoporóza, žaludeční vředy, hypertenze, poruchy lipidového a glycidového metabolismu, poruchy spánku, psychické změny. Některé nežádoucí účinky se mohou objevit již po krátké době podávání, proto je pro možnost redukce dávky CS vhodná kombinovaná terapie s dalším imunosupresivem [5].

3.2.1 Azatioprin (AZA)

Azatioprin je tiopurinový derivát, jehož podstatou účinku je ovlivnění funkce B lymfocytů s následnou redukcí produkce γ globulinů a cytokinů. Snižuje citlivost B lymfocytů k signálům z T buněk, omezuje populaci NK buněk a snižuje jejich aktivitu, ovlivňuje i cytotoxicitu závislou na protilátkách. Po podání p.o. je velmi rychle resorbován, jeho biologická dostupnost se pohybuje okolo 50%, distribuce v tkáních je rovnoměrná. V transplantologii je AZA stále častěji nahrazován mykofenolát mofetilem, ale jeho využití trvá v léčbě autoimunitních onemocnění jako systémový lupus, revmatoidní artritida, vaskulitidy, ITP a další.

AZA se metabolizuje v játrech na 6-merkaptopurin a dále se mění na aktivní substanci-kyselinu tioinozickou.

Hlavním vedlejším účinkem je myelotoxicita, která vede k leukopenii, trombocytopenii, anémii. Akutní toxicita se zpravidla manifestuje nauzeou a zvracením nebo i supresí kostní dřeně. V případě výrazné leukopenie musí být podávání AZA zastaveno [5].

3.2.2 Mykofenolát mofetil (MMF)

Mykofenolát mofetil je ester kyseliny mykofenolové syntetizovaný s cílem zvýšit biologickou dostupnost kyseliny mykofenolové (MPA), která je vlastní účinnou látkou. MMF nahradil azatioprin a stal se standardním imunosupresivním preparátem. Základem jeho účinku je narušení syntézy nukleotidů cestou inhibice enzymu inosinmonofosfát dehydrogenázy (IMDPH), který facilituje konverzi inosinmonofosfátu (IMP) na xantozinmonofosfát. Inhibice IMP dehydrogenázy vede k depleci guanidinových nukleotidů a tím i k potlačení syntézy DNA.

Kyselina mykofenolová přednostně působí na proliferující lymfocyty, protože na rozdíl od většiny jiných buněk jsou lymfocyty plně závislé na de novo cestě syntézy purinů. Dále inhibuje tvorbu protilátek a generaci mitogenem anebo antigenem stimulovaných cytotoxických T-lymfocytů. Navíc během interference s formováním guanozinu potlačuje MPA glykosilaci adhezivních molekul, a tak může inhibovat různé chemotaktické procesy řídící buněčnou migraci navozené během zánětu a rejekce.

Podává se 1-1,5g 2krát denně, úvodní dávku se doporučuje podat co nejdříve po transplantaci, dávkování se řídí nežádoucími účinky.

Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří gastrointestinální projevy, např. nauzea, průjemy, zvracení. Poměrně často se vyskytují leukopenie a anémie. Všechny tyto vedlejší účinky se zmírní snížením dávky MMF [4] [5].

3.2.3 Inhibitory kalcineurinu- Cyklosporin A a Tacrolimus

3.2.3.1 *Cyklosporin A (CsA)*

Cyklosporin A byl zaveden do terapeutických schémat po orgánových transplantacích v osmdesátých letech minulého století a rychle se stal imunopresivem první volby, protože významně zlepšil jednorocní přežívání transplantovaných ledvin. Později byly indikace CsA rozšířeny i na některá autoimunitní onemocnění a primární renální onemocnění.

Cyklosporin A je lipofilní cyklický undekapeptid, který byl izolován z vláknité houby *Tolypocladium inflatum* [4].

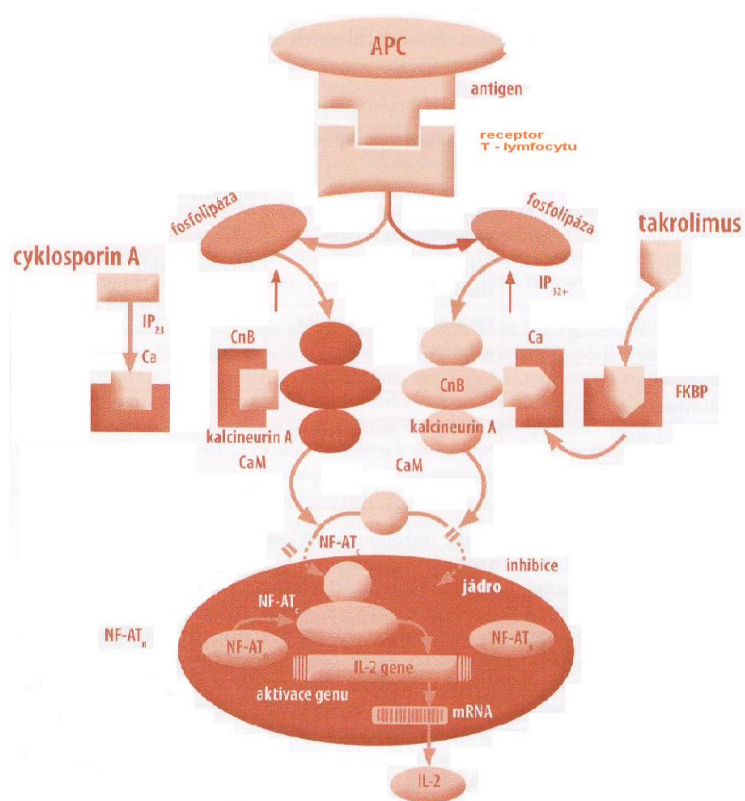
Jeho mechanismus účinku spočívá v interakci s cytoplazmatickým proteinem cyklofilinem. Tento komplex cyklosporin-cyklofilin inhibuje fosfatázu kalcineurin a následně pak dochází k zablokování defosforylace a transportu nukleárního faktoru aktivovaných T lymfocytů do jádra.

Tím se znemožní tvorba cytokinů pomocnými T buňkami, které jsou nezbytné pro aktivaci cytotoxických T lymfocytů a jejich následnou diferenciaci. Jedná se především o IL-2 a interferon γ . Inhibice produkce IL-4 a IL-5 ovlivní funkce i dalších buněčných populací. Chemotaktická a fagocytární aktivita neutrofilů není CsA ovlivněna. Z pohledu nežádoucích účinků CsA je důležitá jeho schopnost indukovat produkci TGF- β stimulujícího fibroblasty [5].

Terapie cyklosporinem značně zvýšila přežití po transplantaci orgánů (zejména srdce, ledviny, jater). Může být podáván intravenózně nebo perorálně. Jeho absorpce z gastrointestinálního traktu je proměnlivá, neodhadnutelná a neúplná. Biologická dostupnost CsA se v průběhu léčby zvyšuje, tudíž se perorální dávky musí postupně snižovat, aby byla zajištěna konstantní koncentrace cyklosporinu v krvi. Dávkování tohoto léku u pacientů se stanovuje na základě naměřených hodnot CsA v krvi. Tímto způsobem lze zabránit neúčinné léčbě způsobené nízkými dávkami cyklosporinu nebo toxicitě způsobené předávkováním. CsA se uplatňuje více u nemocných, kteří jsou po transplantaci v riziku vzniku nebo dekompenzace diabetu při léčbě tacrolimem.

Cyklosporin je kompletně odbouráván v játrech, jeho biologickou přeměnu a přeměnu jeho metabolitů zajišťuje enzym cytochrom P-450. Bylo identifikováno více než 30 metabolitů CsA a předběžné údaje naznačují jejich nižší imunopresivní účinky a cytotoxicitu než samotný cyklosporin.

Mezi nežádoucí účinky patří interference CsA a řadou farmakologických látek, hypertenze, po transplantační diabetes, nauzea, hirsutismus aj. [6].



Obrázek 10: Molekulární účinky tacrolimu a cyklosporinu A

3.2.3.2 Tacrolimus (FK 506)

Tacrolimus je největší makrolidové imunosupresivum, které bylo izolováno z houby *Streptomyces tsukubaensis* v osmdesátých letech 20. století. Pro svoji účinnost a menší interindividulní a intraindividuální farmakokinetickou variabilitu se stal upřednostňovaným preparátem.

Podobně jako CsA patří mezi látky s vazbou na imunofiliny. V cytoplazmě buněk obsahuje specifický receptor, v tomto případě na tzv. FK binding protein (FKBP-12, makrofilin). Komplex takrolimus-FKBP-12 se váže na kalcineurin a inhibicí této kinázy brání aktivaci transkripčních faktorů. V důsledku tohoto komplexu nedochází v T-buňce k produkci cytokinů, jako např. IL-2, IL-4, interferonu γ a destičkového růstového faktoru.

Tacrolimus je do jisté míry schopen potlačovat produkci potransplantačních protilátek proti HLA i non HLA antigenům, na rozdíl od cyklosporinu vykazuje výrazný inhibiční účinek na produkci IL-10 a tím může inhibovat infiltraci cytotoxických buněk štěpu a omezovat poškození těchto tkání [5].

Většina center používá FK 506 pro mladší nemocné s rizikem vzniku akutní rejekce, pro ty, kteří by neměli mít vyšší dávky kortikosteroidů a rovněž pro nemocné ve vyšším riziku kardiovaskulárních komplikací. Úspěšně nahradí cyklosporin A v případě opakovaných rejekčních epizod [4].

Spektrum nežádoucích účinků tacrolimu se částečně překrývá s nežádoucími účinky cyklosporinu. Podle několika studií má FK 506 nižší účinky na výšku krevního tlaku, méně zvyšuje v porovnání s CsA hodnoty celkového cholesterolu, triglyceridů, LDL cholesterolu, neovlivňuje HDL cholesterol. Rozdílný účinek na hladiny transformujícího růstového faktoru β (TGF β) vysvětluje nižší nefrotoxicitu tacrolimu a obecně nižší schopnost indukovat fibrotické změny orgánů a aterosklerózu. Tacrolimus nezvyšuje hladiny TGF, navíc tlumí transdukcii signálu přes receptor pro TGF β typu 1 [5].

Inhibitory kalcineurinu způsobují dvě formy nefrotoxicity - funkční (akutní) a strukturální (chronickou) nefrotoxicitu.

Funkční nefrotoxicita má vztah k její dávce, může být vratná, když se podávání léku zastaví a je spojena s poškozením renální hemodynamiky a glomerulární filtrace, která se vyvine brzy po zahájení léčby.

Strukturální nefrotoxicita nemusí být vratná a je často progresivní, zahrnuje poškození arteriol, tubulů a mechanismem může být odlišná od funkční nefrotoxicity.

Funkční a strukturální nefrotoxicita jsou děje, které se navzájem ovlivňují [4].

3.2.4 Inhibitory mTOR

Označení této skupiny vyplývá z mechanismu jejich účinku, kdy tyto preparáty v cytoplazmě váží kinázu označenou jako mTOR (mammalian target of rapamycin).

Sirolimus (rapamycin) je novější makrolidové imunosupresivum izolované z aktinomycety *Streptomyces hygroscopicus* nalezené v polovině 70. let minulého století. Derivát rapamycinu dostal označení everolimus.

Sirolimus se používá v rozličných imunosupresivních kombinacích, zpočátku byl doporučován spolu s kalcineurinovými inhibitory, ale již první studie ukázaly horší renální funkce, pokud byl sirolimus podáván spolu s cyklosporinem A. Z důvodu významné potence nefrotoxicity tak sirolimus představuje spíše alternativu k inhibitorům kalcineurinu. Přestože jsou jeho vedlejší účinky velmi četné a rovněž omezily jeho široké rozšíření, ukazuje se, že i tak má v imunosupresivních režimech své místo [18].

Mechanismus sirolimu (taktéž everolimu) spočívá ve vazbě na cytoplazmatický imunofilin FKBP, který se nenaváže na kalcineurin, ale na vazebné proteiny rapamycinu (mTOR). Vazba komplexu FKBP-sirolimus blokuje tzv. třetí signál od receptorů pro cytokiny, růstové faktory tím, že způsobí zablokování fosforylace ribozomálních proteinů, cyklin-dependentních kináz a některých dalších regulátorů buněčného cyklu, čímž dojde k zastavení buněčného cyklu v pozdní G1/S fázi. Sirolimus tak blokuje buněčnou proliferaci.

Vedlejší účinky sirolimu a everolimu jsou velmi rozličné. Četné jsou hematologické komplikace, leukopenie a trombopenie. Nejčastější popisovný nežádoucí účinek léčby je porucha metabolismu lipidů, způsobená zvýšením koncentrace inhibitoru lipoproteinové lipázy. Časté jsou také kožní změny připomínající akné. Sirolimus může opozdit rozvoj funkce štěpu po transplantaci z důvodu prodloužení hojení akutní tubulární nekrózy. Rovněž potencuje nefrotoxicitu cyklosporinu a takrolimu. Většina vedlejších účinků sirolimu je závislá na dávce [4].

Biologická léčba

V současné době se ukazuje, že udržovací imunosuprese je spojena s řadou vedlejších účinků, které omezují dlouhodobé výsledky transplantací ledvin. Jednou z mála možností, jak zlepšit výsledky, jsou nové přístupy v biologické léčbě a to léčbou proteiny.

3.2.5 Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky anti-CD3 (OKT3)

Muromonab-CD3 je první léčebně používanou monoklonální protilátkou. OKT3 je imunoglobulin IgG a je to protilátka myšího původu. OKT3 je namířena proti znaku CD3 a způsobuje endocytózu TCR, do jedné hodiny jsou tyto buňky opsonizovány a odstraněny z oběhu v retikuloendotelovém systému [19].

Z důvodu výrazných nežádoucích účinků (tzv. syndrom z uvolnění cytokinů), syndrom první dávky, kdy dochází k uvolnění cytokinů, které může vést až k otoku plic s následnými komplikacemi, vznik lymfomů, větší náklonnost k infekcím je možná jen krátkodobá léčba.

Monoklonální protilátky proti receptoru IL-2 (anti-CD25)

Ve srovnání s OKT3 jsou tyto protilátky velmi dobře snášeny, nemají velký počet nežádoucích účinků a jsou užívány jen k prevenci rejekce [8].

Monoklonální protilátka anti-CD20 (Rituximab)

Rituximab je vysokoafinitní monoklonální protilátka (MP) proti znaku CD20, což je transmembránový protein exprimovaný na pre-B a zralých B-lymfocytech. Tato MP má jednak přímé antiproliferační a apoptózu navozující účinky na některé CD20+ buněčné linie, jednak se váže na složku komplementu C1q a aktivuje i další, cytokiny zprostředkované cytotoxické reakce. Protilátka kombinovaná s konvenční chemoterapií zlepšuje její účinnost, aniž by zvyšovala její toxicitu [9].

Monoklonální protilátka anti-CD52 (Alemzumab)

MP proti znaku CD52, glykoproteinu, který exprimují cirkulující mononukleární buňky včetně T i B-lymfocytů a NK-buněk. Tato MP má silné depleční účinky na cirkulující lymfocyty. Alemzumab je určen jak pro léčbu chronické lymfatické leukémie z B-buněk, tak i pro léčbu revmatoidní artritidy, sklerodermie, roztroušené sklerózy a i jako imunosupresivum po orgánových transplantacích [4].

3.2.6 Polyklonální protilátky

Polyklonální protilátky (PP) se v současné době používají v indukční i antirejekční imunosupresivní léčbě. Získávají se imunizací králíků nebo koní lidskými lymfocyty odebranými z tymu. I když se v současnosti používá téměř výhradně antitymocyární globulin (ATG), nedávno byl poskytnut k dispozici ještě antilymfocyární globulin (ALG).

Mechanismem účinku ATG je především deplece T-lymfocytů. Podané protilátky se navážou na velké množství povrchových znaků lymfocytů, dojde k opsonizaci a po ní jsou lymfocyty lyzovány buď klasicky komplementem anebo prostřednictvím Fc receptoru buňkami retikuloendoelového systému [4].

3.2.7 Intravenózní imunoglobuliny (IVIG)

IVIG jsou svou funkcí protilátkami, které mají velmi významnou úlohu v regulaci imunitních reakcí a to zejména při obraně proti infekcím. Efektivně blokují humorální imunitní odpověď po transplantaci. Podávají se pomalou nitrožilní infuzí a jsou obvykle dobře snášeny. Mezi nežádoucí účinky patří alergické reakce, bolesti svalů a hlavy.

4 Monitorování hladin imunosupresiv

Monitorování koncentrací imunosupresiv se využívá ke kontrole optimálního nastavení terapie z různých důvodů. Mezi nejdůležitější patří stanovní hladin pro závažné nežádoucí účinky, úzké terapeutické rozmezí a interindividuální variabilitu farmakokinetických paramerů. Mezi imunosupesiva, která monitorujeme v laboratoři LNM (laboratoř neautomatizovaných metod) - IKEM (Institut klinické a experimentální medicíny), patří cyklosporin A, tacrolimus, sirolimus a kyselina mykofenolová.

4.1 Cyklosporin A – CMIA (Abbott)

Metoda Architect Cyklosporine je chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročasticích (CMIA) ke stanovení cyklosporinu v lidské plné krvi. Cyklosporin je cyklický oligopeptid složený z 11 aminokyselin, je fungálního původu a řadí se mezi účinné imunosupresivum.

Tato metoda je dvoukroková imunoanalýza ke kvantitativnímu stanovení cyklosporinu využívající technologii CMIA s tzv. flexibilními protokoly. Tato technologie se nazývá Chemiflex.

Před vlastním zpracováním je vzorek plné krve v rámci manuální přípravy lyzován solubilizační reagensií, extrahován precipitační reagensií a odstředěn. Vzniklý supernatant se slije do zkumavky pro předpřípravu potransplantačních testů, která se pak vloží do analyzátoru Architect. Proběhne chemiluminiscenční reakce a výsledek této reakce se měří v relativních světelných jednotkách (RLU). Množství CsA přítomného ve vzorku je nepřímo úměrné signálu v jednotkách RLU detekovanému optikou Architect i Systém [6].

V současné době stanovujeme dvě hladiny cyklosporinu, hladinu C-0 a hladinu C-2.

C-0: hladina látky v krvi zjištěna před podáním další dávky.

C-2: hladina cyklosporinu v krvi 2 hodiny po podání dávky.

Komplexní klinický stav pacientů spolu s individuálními rozdíly v senzitivitě vůči imunosupresivním účinkům cyklosporinu mají u jednotlivých pacientů za následek různé požadavky na optimální hladiny v plné krvi. U každého pacienta se před změnou léčby doporučuje provést důkladné klinické hodnocení. Ošetřující lékař by měl na základě tohoto klinického vyhodnocení stanovit pro každého pacienta individuální rozmezí hodnot. Léčebný režim pacienta nelze měnit pouze na základě hodnot cyklosporinu v plné krvi.

Monitorování hladiny C-2 je novým měřítkem úspěchu. Bylo zjištěno, že dochází ke sníženému výskytu akutních rejekcí, snížení závažnosti rejekčních příhod a snížení incidence akutní renální dysfunkce.

4.1.1 Hodnoty Cyklosporinu (léku Consupren, Sandimun) v LNM-IKEM

analyt	Cyklosporin - CyA	
lék	Consupren, Sandimun Neoral	
normální hodnoty	9 měsíců srdce	250-350 ug/l
	játra, ledviny, slinivka	150-250 ug/l
kritická mez	před dávkou	více než 450 ug/l

Tabulka 1: Hodnoty Cyklosporinu (léku Consupren, Sandimun) v LNM-IKEM

4.2 Tacrolimus – CMIA (Abbott)

Metoda Architect Tacrolimus je chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročástečích (CMIA) ke kvantitativnímu stanovení tacrolimu v lidské plné krvi. Metoda Architect se používá pro pacienty po alotransplantaci jater a ledvin podstupující terapii tacrolimem.

Tacrolimus se váže na proteiny ze skupiny označené jako vazebné proteiny FK 506. Ve velké míře je metabolizován v játrech a v mikrotomech tenkého střeva působením enzymů cytochromu P-450. Bylo identifikováno 9 různých metabolitů tacrolimu, některé byly zjištěny a testovány v plné krvi. Metoda Architect Tacrolimus je zpožděná jednokroková imunoanalýza ke kvantitativnímu stanovení tacrolimu v lidské plné krvi, která využívá technologii CMIA s tzv. flexibilními protokoly, Chemiflex.

Před zahájením vlastního automatického zpracování proběhne předpříprava jako u cyklosporinu, vzorek krve je extrahován precipitační reagensií a pak odstředěn. Takto připravený supernatan se slije do zkumavky pro předpřípravu potransplantačních testů, která se pak vloží do analyzátoru Architect. Množství tacrolimu ve vzorku je nepřímo úměrné signálu v jednotkách RLU, které je detekované optickým systémem Architect.

Pro hladiny tacrolimu v plné krvi neexistuje pevně stanovené terapeutické rozmezí. Optimální hladina se u jednotlivých pacientů liší vzhledem ke klinickému stavu pacientů, jejich individualitou v senzitivitě vůči imunosupresivní léčbě, souběžnému podávání dalších imunosupresiv (kombinace je možná se sirolimem nebo everolimem), nefrotoxicitou tacrolimu, typem transplantace [6].

4.2.1 Hodnoty Tacrolimu (léku FK 506) v LNM-IKEM

analyt	Tacrolimus- Tac	
lék	Prograf=FK 506	
normální hodnoty	0-2 měsíce	15-20 ug/l
	3-6 měsíců	10-15 ug/l
	6-9 měsíců	9-14 ug/l
	dále	5-10 ug/l
kritická mez	před dávkou	více než 40ug/l

Tabulka 2: Hodnoty Tacrolimu (léku FK 506) v LNM-IKEM

4.3 Sirolimus – CMIA (Abbott)

Metoda Architekt Sirolimus je chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročasticích (CMIA) ke kvantitativnímu stanovení sirolimu v lidské plné krvi na systému Architekt. Metoda se používá při péči o pacienty po transplantaci ledvin podstupující terapii sirolimem.

Sirolimus je makrocyclický lakton, který se váže na imunofilin FKBP12 a výsledný komplex se váže na specifický regulační protein buněčného cyklu mTOR a inhibuje jeho aktivaci.

Metoda Architekt je zpožděná jednokroková imunoanalýza. Před automatickým zpracováním dochází k manuální předpřípravě, stejně jako u stanovení CsA a Tac, s tím rozdílem, že vzorky plné krve po vysrážení precipitační reagensů se inkubují 10 min ve vodní teplé lázni a po té jsou odstředěny. Vzniklý supernatant se slijí do zkumavky pro předpřípravu potransplantačních testů a vloží se do analyzátoru. Množství sirolimu je nepřímo uměrné signálu v jednotkách RLU.

Optimální rozmezí hodnot závisí na klinickém stavu pacienta, individuálních rozdílech v senzitivitě, nežádoucích účincích sirolimu, souběžném užívání dalších imunosupresiv (s CsA nebo Tac), době uplynulé od transplantace a dalších faktorech. Z těchto důvodů nelze léčbu pacienta měnit pouze na základě hodnot sirolimu a u každého pacienta se při změně léčby doporučuje provést důkladné klinické hodnocení [6].

4.3.1 Hodnoty Sirolimu (léku Rapamune) v LNM-IKEM

analyt	Sirolimus-Siro	
lék	Rapamune, Rapamycin	
normální hodnoty	9 měsíců	4,5-14 ug/l
kritická mez	před dávkou	více než 25 ug/l

Tabulka 3: Hodnoty Sirolimu (léku Rapamune) v LNM-IKEM

4.4 Kyselina mykofenolová – EMIT (Dade Behring)

Mykofenolát mofetil je preparát, který je určen k profylaxi rejekce u pacientů po alogenní transplantaci ledviny, transplantaci srdce a dalších transplantovaných orgánů. MMF je 2-morfolinoethylester kyseliny mykofenolové (MPA) a byl vyvinut jako léčivo zlepšující využitelnost MPA, aktivní imunopresivní látky. Vzhledem k tomu, že se MMF rychle konvertuje na MPA, je souprava Emit vyvinuta pro měření celkové koncentrace MPA v plazmě.

Hladina MPA v plazmě je ovlivněna farmakokinetikou metabolismu MMF, typem transplantátu, věkem, rasou, dobou po transplantaci, klinickými komplikacemi a současně podávanými léky.

V naší laboratoři stanovujeme MPA ve třech časech. V čase 0, za 30 min a 120 min. po podání. Výsledky jsou vyhodnoceny v AUC, což je oblast pod křivkou vyjadřující závislost koncentrace MPA na čase. Množství dávky, které se dostane do krevního oběhu, pak stanovujeme. Index expozice se vypočítává ze vzorků krve odebraných v určitých intervalech po podání dávky.

Stanovení MPA je založeno na kompetici o vazebná místa na protilátce proti MPA. MPA ze vzorku kompetuje s MPA značenou enzymem glukoso-6-fosfát dehydrogenázou (G6PDH) obsaženou v enzymovém reagentu. Kinetická změna absorbance při této reakci je měřena spektrofotometricky. Enzymová aktivita klesá s vazbou protilátky, což umožňuje měřit koncentraci MPA ve vzorku prostřednictvím enzymové aktivity.

Pro MPA není stanoveno terapeutické rozmezí v plasmě. Požadavky na optimální hladinu se liší podle klinického stavu, v citlivosti k imunosupresivu, spoluúčinku jiných imunosupresiv (kombinace možná s jakýmkoliv imunosupresivem), typu transplantátu.

Jednotlivá změřená hodnota MPA by neměla být signálem ke změně léčebného režimu. Každý pacient by měl být klinicky vyšetřen před stanovením terapie a každá laboratoř by měla stanovit rozmezí na základě klinických zkušeností [7].

4.4.1 Hodnoty Mykofenolátu (léků Cellcept, Mykofenolát mofetil) v LNM-IKEM

analyt	Mykofenolát-MPA	
lék	Cellcept, Mykofenolát mofetil	
normální hodnoty	1-6 měsíce	2,5-4 mg/l
	6-dále	1,5-3,5 mg/l

Tabulka 4: Hodnoty Mykofenolátu (léků Cellcept, Mykofenolát mofetil) v LNM-IKEM

5 Režimy k navození transplantační tolerance

Transplantační, neboli imunologická tolerance slouží k potlačení imunitní odpovědi proti specifickému antigenu bez současné suprese celého imunitního systému a při zachování normálních imunitních mechanismů vůči ostatním antigenům.

Imunologická tolerance se dělí na centrální (indukovaná v thymu) a periferní (indukovaná v periferních lymfatických orgánech).

5.1 Mechanismy uplatňující se v transplantační toleranci

Tolerance v současné době není považována pouze za pasivní děj, který je založený na neschopnosti tolerantního jedince specificky reagovat, ale je to děj aktivní, zajišťovaný více mechanismy. Dnes už víme, že tolerantní jedinec reaguje na tolerovaný antigen zvláštní formou imunitní reakce, která se ve fenotypu projeví jako nereaktivita (tolerance). Mezi tři základní mechanismy imunologické tolerance patří klonální delece, buněčná anergie a aktivní suprese.

Klonální delece je proces, při kterém jsou eliminovány příslušné klony specificky aloreaktivních lymfocytů.

Anergie - v tomto procesu příslušný klon buněk zůstává v organismu, ale proti specifickému antigenu nereaguje.

Supresorové buňky se nachází ve všech popsaných modelech imunologické tolerance. T lymfocyty potlačují imunologickou reaktivitu jiných imunokompetentních buněk a tím způsobují toleranci adoptivně z tolerantních jedinců na netolerantní.

Mezi další mechanismy patří mikrochimerismus, kdy malé procento dárcovských hematopoetických buněk bývá nalezeno i u příjemců, kteří tolerují alogenní orgánový transplantát [10].

5.1.1 Regulační T-lymfocyty

Nejznámější populací regulačních T-lymfocytů jsou přirozené CD4⁺ a CD25⁺ T_{regs} tvořeny v thymu. Tyto buňky jsou namířeny proti vlastním antigenům a exprimují transkripční faktor foxp3, který je nezbytný pro jejich diferenciaci. Přirozené T_{regs} jsou podmínkou dlouhodobého přijetí transplantátu.

Bylo prokázáno, že lze uskutečnit i přenos tolerance dalším příjemcům bez dalších manipulací a že je tento přenos závislý pouze na CD4⁺ T-lymfocytech. Také je známo, že se T-lymfocyty u dalších příjemců mohou tzv. edukovat za přítomnosti původní populace tolerantních T-buněk. Tento proces se nazývá „infekční tolerance“ a vysvětluje, jak je možné, že jednou navozená tolerance může trvat po tak dlouhou dobu, co jsou přítomny antigeny dárce [4].

5.1.2 Dendritické buňky

Dendritické buňky nejsou jenom významné proto, že upozorňují imunitní systém na přítomnou infekci, ale také proto, že jsou schopné cirkulovat mezi tkáněmi a udržovat toleranci proti vlastním antigenům. Zatím není známo, jestli existují přirozené dendritické buňky, které zajišťují toleranci, nebo jestli se nezralé dendritické buňky uplatňují v toleranci.

Ví se, že řada farmak např. kyselina acetylsalicylová, dexametazon, IL-10 a další, je schopna změnit reaktivitu dendritických buněk pocházejících z kostní dřeně tak, aby se pak mohly uplatnit v toleranci. Změněné buňky exprimují na svém povrchu méně MHC antigenů II. třídy a kostimulačních ligand (CD40, CD80, CD86) a také současně sekretují méně prozánětlivých cytokinů (IL-12) [4].

5.1.3 Kostimulace-blokáda-resistentní rejekce

O mechanismech indukce tolerance prostřednictvím kostimulační blokády bylo publikováno velmi mnoho článků. Hlavním zjištěním bylo, že kostimulační blokáda s CTLA4Ig a anti – CD154 je účinnější při inhibici CD4 buněk než při inhibici CD8 buněk. Tento jev byl vyzorován u kožních štěpů, střevních a srdečních štěpů. Aloreaktivní buňky CD4 se zdají být závislé na CD40-CD154 ve větší míře než CD8 buňky, které mohou být aktivovány nezávislým mechanismem. Je známo, že léčba CTLA4Ig může být schopna indukovat toleranci CD8 buňky buď přímo, nepřímo nebo jen do určité míry, ale velmi často pouze částečně. Jedním ze způsobů jak zabránit vzniku rejekce po kostimulační blokádě CD8 buněk, je zablokovat cestu IL-15/IL-15R pomocí inhibitorů syntézy bílkovin.

Nedávné výzkumy prokazují existenci dalšího receptoru pro CD80/CD86, jímž není ani CD28 ani CTLA4. Tento antigen je signálem pro T-buňky a jeho potlačení by mohlo přispět k ovlivnění rejekčních mechanismů [11].

5.1.4 Mezinárodní projekty k navození transplantační tolerance

Nedávné ojedinělé pokroky klinicky využívající princip navození tolerance transplantovaného orgánu vedoucí k trvalému přijetí alogenního transplantátu bez použití běžné imunosupresivní léčby iniciovaly založení mezinárodní sítě transplantačních center v rámci projektů RISET a ITN.

RISSET (Reprogramming the Immune System for Establishment of Tolerance)

Jedná se o nadnárodní evropský projekt financovaný Evropskou komisí v rámci šestého rámcového programu, který se zaměřuje na pokrok ve výzkumu tolerance v klinické praxi. V současné době studuje také laboratorní testy k určení tolerance v transplantaci. Byly nashromážděny vzorky z různých studií, které budou posouzeny jako potenciální biomarkery k předpovědi indukční tolerance transplantací u ledvin nebo kostní dřeně.

RISSET je současně centrem evropského klinického hodnocení celkové imunosuprese u dospělých příjemců transplantace jater k posouzení bezpečnosti této strategie u velké skupiny příjemců a identifikací biomarkerů spojovaných s tolerancí.

Při jedné studii, která byla prováděna u pacientů tři roky po transplantaci jater, nedošlo u některých příjemců během 18-ti měsíců k rejekci a ti byli označeni za tolerantní. Během této studie byla vysazena veškerá imunosupresivní terapie po dobu 12-ti měsíců, 6-ti měsíčních etapách [12].

ITN (Immune Tolerance Network)

Jde o mezinárodní spolupráci s převahou severoamerických pracovišť a cílem urychlit rozvoj klinické imunitní tolerance. V současné době je prováděno klinické hodnocení smíšených chimér, se snahou nahradit potřebu dlouhodobého užívání imunosupresiv po transplantaci ledvin. Vzorky z této a dalších studií budou tvořit základ pro testování biologické tolerance, nejen transplantační. V současnosti ITN sponzoruje v USA dvě klinické studie, které se zaměřují na transplantace jater u dětí a dospělých.

Ve snaze podpořit objev nových biomarkerů spojených s transplantační tolerancí jater, RISSET a ITN podepsaly smlouvu o spolupráci, která zahrnuje dohodu o výměně vědeckých výsledků a biologických vzorků mezi oběma společnostmi. Tato popsaná spolupráce umožní získat informace o tolerantních a ne-tolerantních příjemcích vhodných k vyšetření u obou institucí, což zvýší jejich schopnost identifikovat potencionální užitečné biomarkery [12].

Diskuse

Ze světových statistik vyplývá, že v současné době je přežívání transplantované ledviny od žijících dárců v prvním roce po transplantaci až 98%, od zemřelých dárců jen asi 93%. V prvním případě je průměrná doba funkce orgánu až 20 let, avšak ve druhém případě pouze 8-12 let. I z tohoto důvodu jsou výsledky příjmu orgánu od živého dárce z dlouhodobého hlediska lepší.

Transplantace poskytuje ve srovnání s jinými metodami náhrady funkce ledvin nejvyšší kvalitu života. V ČR se v minulém roce transplantovalo celkem 355 ledvin, z toho kolem 200 ledvin v IKEMU. Přijetí orgánu od žijícího dárce tvoří kolem 8 % z celkového počtu. Trendem se stává transplantace ledviny od žijících dárců, zejména v USA, ale i v ČR se toto daří rozvíjet.

Část pacientů, kteří čekají na transplantaci orgánu, se kvůli nedostatku dárců operace nedočká a bohužel umírá. Nedostatek dárců není dán jen tím, že umírá málo lidí, ale velmi často i tím, že nefunguje rychlá spolupráce resuscitačních jednotek, jednotek intenzivní péče a transplantačních center.

Od poloviny 60. let provedli čeští lékaři okolo 5000 transplantací.

Ve své práci jsem věnovala pozornost nejen transplantacím, ale i imunosupresivní léčbě, která je velmi důležitá právě po transplantaci a umožňuje přijetí transplantátu. Mezi nejzákladnější imunosupresiva patří kortikosteroidy. Léčba steroidy není překvapivě spojena s rizikem vzniku tumorů a je možno je podávat i v těhotenství. Základní stavební složky po orgánových transplantacích představují CsA a Tac. Cyklosporin se začal používat v 80. letech minulého století a stal se rychle imunosupresivem první volby. Kvůli svým vedlejším, nefrotoickým účinkům je v současnosti nahrazován Tac, což je novější makrolidové imunosupresivum, které se do klinické praxe dostalo v polovině 90. let. Právě pro svoji účinnost a menší farmakologickou variabilitu se stal upřednostňovaným preparátem. MMF nahradil v léčbě azatioprin, řada studií prokázala snížený výskyt akutní rejekce s prodloužením přežití transplantovaných ledvin.

Významné by bylo zavést do praxe takové metody, které by umožnily redukovat nebo dokonce vysadit imunosupresi, aniž by došlo k ohrožení štěpu rejekcí. V současné době jsou prováděny různé studie právě s touto problematikou, díky nimž se snad v budoucnosti podaří tento problém vyřešit.

Závěr

Ve své práci jsem se pokusila o přiblížení důležitosti transplantační medicíny, díky níž se podařilo zachránit a prodloužit životy tisíce lidí. Cílem transplantace je navrátit nemocného zpět do aktivního života.

Česká republika je na velmi vysoké úrovni v transplantační medicíně ve srovnání s jinými západními zeměmi. Co se týká počtu dárců orgánů, je na tom dokonce lépe než např. sousední Německo.

Byla dokonce umístěna na třetím místě v Evropě v počtu kombinovaných transplantací slinivky břišní a ledvin u diabetiků. Jediným centrem v ČR, kde se transplantace slinivky břišní provádí je pražský IKEM, kde kombinovanou transplantací ledviny a slinivky břišní loni podstoupilo 22 lidí, samotnou slinivku dostalo pět lidí.

Od 80. let minulého století se výsledky transplantací všech orgánů významně zlepšily. Pomohlo k tomu zdokonalení metody odběru, uchování orgánů a operační techniky, stejně tak vývoj moderních léků (imunopresiv), které pomáhají organismu lépe přijmout cizí orgán.

I přes tento pokrok v medicíně trpí jak ČR tak vyspělý svět stálým nedostatkem orgánů k transplantacím.

Lidé, kteří potřebují nový orgán, jsou zařazeni na čekací listinu. Transplantace ledviny od žijícího dárce je výhodná, protože jde o plánovanou operaci, na kterou je jak dárce tak, příjemce připraven. V tom je hlavní rozdíl od transplantace od zemřelých dárců, kdy je výkon nutné provést v relativně krátké době, aby nedošlo k poškození funkce orgánu.

Výzkum buněk avšak ukazuje nové cesty budoucího zdravotnictví a my si možná budeme schopni vypěstovat nové orgány přímo v těle, kdo ví...

Literatura a prameny

- [1] Hořejší, V., Bartůňková, J.: Základy imunologie, 3.vyd., Triton, Praha 2005, ISBN 80-7254-686-4
- [2] Krejsek, J., Kopecký, O.: Klinická imunologie, Nukleus HK, 2004, ISBN 80-83225-50-X
- [3] Teplan, V. a kolektiv: Praktická nefrologie, Grada, 2006
- [4] Viklicý, O., Janoušek, L., Baláž, P. a kolektiv: Transplantace ledviny v klinické praxi, 1.vyd., Grada, Praha 2008, ISBN 978-80-247-2455-3
- [5] Suchý,D., Kozáková, I., Grundmann, M.: Základní charakteristiky vybraných Imunosupresiv, Klin Farmakol Farm : dostupné na www.tribune.cz, [červenec 2009]
- [6] <http://www.abbottdiagnostics.cz/nove-produkty/rok-2008/imunoanaliza/architect.html>, [červenec 2009]
- [7] <http://www.dadebehring.com>, [červenec 2009]
- [8] <http://www.biology.estranky.cz/clanky/imunologie/imunosupresiva-v-transplantologii>, [červenec 2009]
- [9] <http://www.avicena.cz/clanky/leky/leky33.htm>, [červenec 2009]
- [10] Stříž,I.: Přednášky- Transplantační tolerance
- [11] Wekerle,T., Kurtz,J., Bigenzahn,S.,Takeuchi,Y.,Sykes,M.: Mechanismus of transplant tolerance induction using costimulatory blockade, Current Opinion in Immunology 2002, Publisher online July 2002
- [12] <http://www.risetfp6.org>, <http://www.immunotolerance.org>
- [13] Sheldon, S., Poulton,K.: HLA Typing and its influence on organ transplantation. Methods. Mol. Biol., 2006
- [14] Mullally,R., Daviess,SM. : Tissue Typing for hematopoietic cell transplantation. Pediatr. Transplant., 2005
- [15] Clarkson,MR., Sayegh,MH. : T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance. Transplantation, 2005

- [16] Mirenda,V., Berton,I., Read,J., Cook,T., Smith,J., Dorling,A., Lechler,RI.:Modified dendritic cells coexpressing self and allogeneic major HLA molecules: an efficient way to induce indirect pathway regulation.J. Am. Soc. Nephrol., 2004
- [17] Solez,K., Colvin,RB., Racusen,LC., SIS,B., Halloran,PF., Birk,PE., et al. BANff 05 meeting report : Differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropthy. Am. J. Transplant., 2007
- [18] Viklický, O.: Sirolimus a jeho místo v současné transplantační medicíně, Remedia, 2003
- [19] A randomized clinical trial of OKT3 monoclonal antipody for acute rejection of cadaveric renal transplants. Ortho Multicenter Transplant Study Group.N. Engl.J.Med., 1985

Seznam zkratek

ALG	antilymfocytární globulin
ATG	antitymocytární globulin
APC	antigen prezentující buňka
AUC	oblast pod křivkou
AZA	azatioprin
C4	C4 složka komplementu
CD	cluster of differentiation
CMIA	chemiluminiscenční imunoanalýza
CS	kortikosteroidy
CsA	cyklosporin A
CTLA	cytotoxic T-lymfocyte associated antigen (CD 152)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EMIT	enzym imunoanalýza
Fas	apoptotický receptor
FK 506	tacrolimus
GvH	graft versus host
G6PDH	glukoso-6-fosfát dehydrogenáza
HLA	human leukocyte antigen
IFN γ	interferon γ
IL	interleukin
IMP	inosinmonofosfát
IMDPH	inosinmonofosfát dehydrogenáza
IKEM	Institut klinické a experimentální medicíny
ITN	immune tolerance network
IVIG	intravenózní imunoglobulin

LNM	laboratoř neaumatizovaných metod
MHC	major histocompatibility komplex
MMF	mykofenolát mofetil
MPA	kyselina mykofenolová
MP	monoklonální protilátka
mTOR	mammalian target of rapamycin
NK	natural killer
PP	polyklonální protilátka
RISSET	reprogramming the immune systém for establishment of tolerance
Tac	tacrolimus
TCR	T buněčný receptor
Th	T helper
TGF β	transformující růstový faktor β
Treg	T regulační bunka

Seznam obrázků

Obrázek 1: HLA komplex se nachází na 6.chromosomu	14
Obrázek 2: HLA antigeny I.třídy	15
Obrázek 3: Možnosti odběru krvetvorných buněk u dárců.....	17
Obrázek 4: Mechanismy rozeznávání HLA antigenů příjemce.....	18
Obrázek 5: Nepřímá stimulace-APC dárce uvolňují MHC, který je prezentován jako antigen skrz APC příjemce a stimuluje rejekci.....	19
Obrázek 6: MHC/TCR signalizace a kostimulace	20
Obrázek 7: Profil cytokinů secernovaných jednotlivými subpopulacemi T-lymfocytů...22	
Obrázek 8: Chronická rejekce.....	24
Obrázek 9: Příklad deplece T-lymfocytů protilátkami	25
Obrázek 10: Molekulární účinky takrolimu a cyklosporinu A	30