

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Šárka Valhová

**Humorální rejekce po transplantaci ledviny a vyšetřování
protilátek proti HLA a non HLA antigenům**

**Humoral rejection after kidney transplantation and
investigation of antibodies against HLA and non HLA
antigens**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: doc. MUDr. Antonij Slavčev, CSc.

Praha 2013

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

V Praze dne 1. 8. 2013

Děkuji svému školiteli doc. MUDr. Antonij Slavčevovi, CSc. za věnovaný čas a odborné vedení při psaní diplomové práce. Vřelé poděkování patří také mému konzultantovi RNDr. Liborovi Kolesárovi, Ph.D. Své rodině děkuji za velkou dávku pochopení.

Abstrakt

Transplantace ledviny představuje nejlepší způsob léčby pacientů s terminálním ledvinným selháním, je spojena s delším přežitím nemocných a lepší kvalitou života než dlouhodobá dialýza. Současně však s sebou nese imunologická rizika vedoucí k odhojení štěpu. U pacientů po transplantaci orgánu je závažnou imunologickou komplikací humorální rejekce, která je nejčastěji spojena s výskytem protilátek specifických proti HLA antigenům, obzvláště proti neshodným HLA antigenům dárce orgánu. Protilátky mohou mít v některých případech specifitu proti antigenům exprimovaným na endoteliálních buňkách, ne na lymfocytech, například proti MICA, MICB, ICAM a zatím neidentifikovaným tkáňově specifickým antigenům.

Humorální rejekce má výrazně horší prognózu pro transplantovanou ledvinu než celulární rejekce, a proto její včasná diagnostika má značný význam pro následnou volbu adekvátní léčby. Diagnostika humorální rejekce je založena jednak na bioptickém průkazu C4d depozitů v kapilárách transplantovaných ledvin a současně na laboratorním nálezu protilátek proti neshodným antigenům dárce (donor specifické protilátky, DSA).

Cílem naší retrospektivní studie bylo přispět ke zlepšení diagnostiky akutní a chronické humorální rejekce u pacientů po transplantaci ledviny. Dále porovnat diagnostické hodnoty odlišných metodik pro detekci a charakterizaci protilátek proti HLA antigenům a přispět k objasnění klinické relevance HLA a non HLA specifických protilátek definovaných metodikou Luminex.

Naše výsledky potvrdily významný vliv protilátek stanovených metodou Luminex před transplantací a 3 měsíce po transplantaci na predikci vývoje humorální rejekce a přežití transplantované ledviny.

Klíčová slova: donor specifické protilátky, transplantace ledviny, stanovení protilátek, Luminex, akutní humorální rejekce, HLA protilátky

Abstract

Kidney transplantation is the treatment of choice for patients with end stage renal failure and is associated with prolonged survival of patients and better quality of life than long-term dialysis. Simultaneously, however, transplantation carries the risk of immunological complications leading to graft rejection. A serious problem in patients after organ transplantation is the development of humoral rejection, which is most often associated with the presence of antibodies specific to HLA antigens, particularly against mismatched HLA antigens of the organ donor. In certain cases antibodies may be specific to antigens expressed on endothelial cells, not on lymphocytes, like MICA, MICB, ICAM, and up till now unidentified tissue-specific antigens.

Humoral rejection has significantly worse prognosis for the transplanted kidney than cellular rejection, and therefore its timely diagnosis is of great importance for the subsequent choice of appropriate therapy. The diagnosis of humoral rejection is based on the simultaneous detection of C4d deposits in the peritubular capillaries of the transplanted kidney and the finding of antibodies specific to the mismatched antigens of the donor (donor specific antibodies, DSA).

The aim of our retrospective study was to contribute to improvement of the diagnosis of acute and chronic humoral rejection in kidney transplant patients. Furthermore, our goal was to compare the relevance of different diagnostic methods for the detection and characterization of HLA specific antibodies and to help clarify the clinical relevance of HLA and non HLA specific antibodies as defined by the Luminex method.

Our results confirm the clinical significance of antibodies as detected by the Luminex technology before and 3 months after transplantation for the prediction of development of humoral rejection and survival of the transplanted kidney.

Keywords: donor specific antibodies, kidney transplantation, antibody detection, Luminex, acute antibody mediated rejection, HLA antibodies

Obsah

Seznam zkratek	7
1 Teoretická část	10
1.1 Úvod	10
1.2 Imunobiologie rejekce	10
1.2.1 HLA komplex	10
1.2.2 Mechanismus rozpoznání HLA antigenů	12
1.2.3 Akutní a chronická rejekce	15
1.2.4 Akutní T-buňkami zprostředkovaná (celulární) rejekce	15
1.2.5 Protilátkami zprostředkovaná (humorální) rejekce	16
1.3 Diagnostika humorální rejekce	19
1.4 HLA specifické protilátky	21
1.4.1 HLA specifické protilátky před transplantací	21
1.4.2 HLA specifické protilátky po transplantaci	23
1.4.3 HLA specifické protilátky ve vztahu k chronické rejekci	24
1.4.4 MICA protilátky	26
2 Cíle diplomové práce	27
3 Materiál a metody	28
3.1 Soubor pacientů	28
3.2 xMAP metodika (Luminex)	28

3.3	Izolace buněk ze sleziny a z uzliny	32
3.4	Zmrazování buněk.....	34
3.5	Rozmrazování buněk.....	34
3.6	Komplement dependentní cytotoxický test (CDC)	36
3.7	Panel reaktivní protilátky (PRA).....	38
3.8	Flow cytometry crossmatch (FCXM)	39
3.9	PCR – SSP (Sequence specific primers).....	41
3.10	Statistické vyhodnocení	44
4	Výsledky	45
4.1	Demografická data	45
4.2	Diagnostika rejekce	46
4.3	Stanovení protilátek a určení jejich specificity	48
4.4	Vztah mezi PRA a vznikem akutní rejekce.....	51
4.5	Vliv HLA shody na incidenci akutní rejekce a přežití štěpu	52
4.6	Souvislost mezi výskytem HLA specifických protilátek a incidencí rejekce ..	54
4.7	MICA protilátky a přežití transplantovaných ledvin	57
4.8	Vztah mezi incidencí humorální a celulární rejekce	58
5	Diskuze	60
6	Závěr	66
7	Citace	68

Seznam zkratek

ADCC	Buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách
AMR	Protilátkami zprostředkovaná rejekce
APC	Antigen prezentující buňky
ATG	Antithymocytární globulin
BCR	B buněčný receptor
CD	Diferenciační antigen
CDC	Komplement dependentní cytotoxický test
CR	Celulární rejekce
CTL	Cytotoxický lymfocyt
dATP	Deoxyadenosintrifosfát
dCTP	Deoxycytosintrifosfát
dGTP	Deoxyguanosintrifosfát
DMSO	Dimethyl sulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DSA	Donor specifické protilátky
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Deoxythymidintrifosfát
EBSS	Earle's Balanced Salts
EDTA	Kyselina ethylendiaminotetraoctová
EFI	Evropská asociace pro imunogenetiku
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
Fab	Fab část imunoglobulinu

FAS	Povrchová molekula
Fc	Fc část imunoglobulinu
FCXM	Crossmatch test pomocí průtokové cytometrie
FTS	Fetální bovinní sérum
FITC	Fluorescein thioisokyanát
HLA	Hlavní lidský histokompatibilitní antigen
HR	Vysoké rozlišení
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulin
IgG	Imunoglobulin G
IgM	Imunoglobulin M
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IVIG	Intravenózní globulin
LR	Nízké rozlišení
LS	LABScreen
LS SA1	LABScreen Single antigen HLA Class I
LS SA2	LABScreen Single antigen HLA Class II
MAC	Komplementový komplex atakující membránu
MFI	Střední intenzita fluorescence
MHC	Hlavní histokompatibilitní komplex
MIC	MHC Class I chain related
MICA	MHC class I polypeptide-related sequence A
MICB	MHC class I polypeptide-related sequence B
NDSA	Non donor specifické protilátky
NK	Negativní kontrola nebo Natural killer, dle kontextu

PBS	Fosfátový pufr s příměsí chloridu sodného
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PC5	Phycoerythrin - Cyanin 5,1
PE	Phycoerytrin
PK	Pozitivní kontrola
PPV	Prediktivní hodnota testu
PRA	Panel reaktivní protilátky
Rh	Krevně skupinový antigen
SA	Single antigen
SSOP	Sequence Specific Oligonucleotide Probes
SSP	Sequence Specific Primers
STD	Směrodatná odchylka
TCR	T buněčný receptor
TNF	Faktor nekrotizující nádory
Tx	Transplantace
UV	Ultrafialové záření
xMAP	x-multianalyte profiling

1 Teoretická část

1.1 Úvod

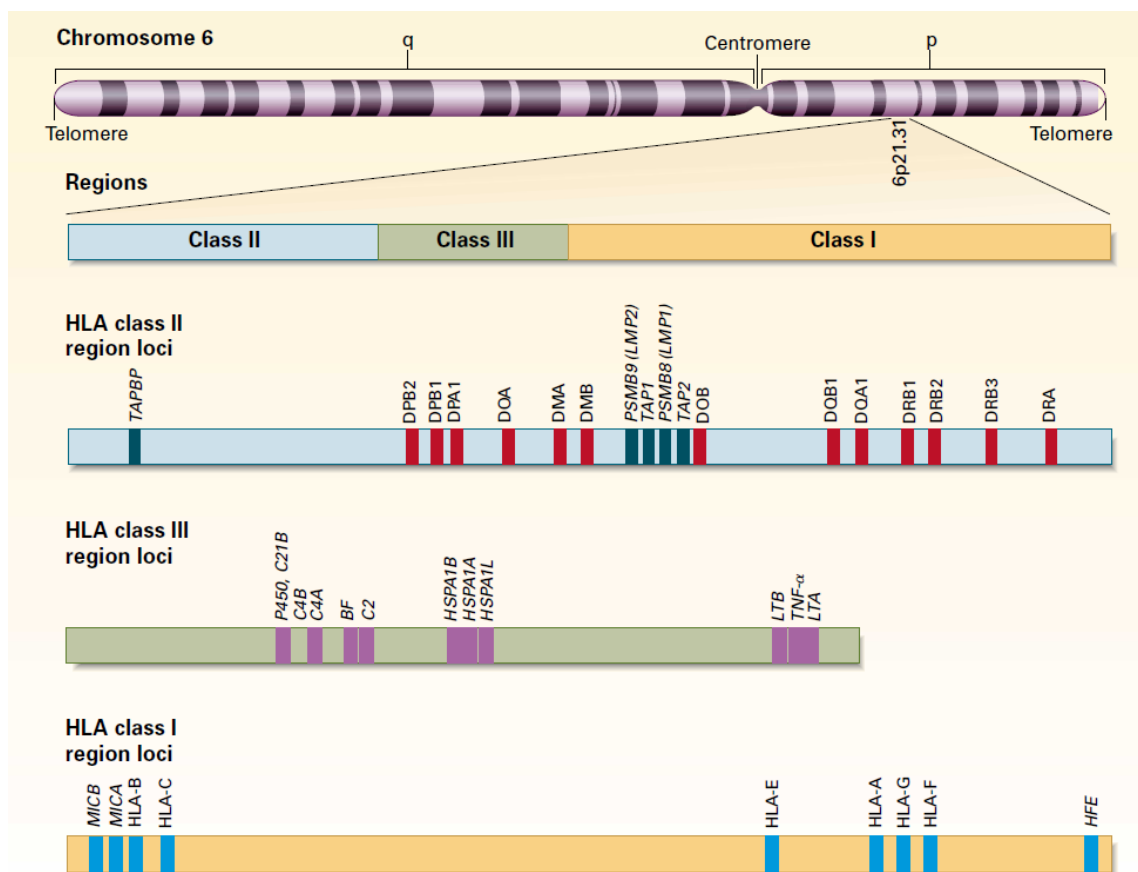
Transplantace ledviny je momentálně nejlepším způsobem léčby chronického selhání ledvin (Viklicky 2008). Na jedné straně znamená pro pacienty se selháním ledvin účinnou léčbu, která je méně riziková a také méně finančně náročná, než je dlouhodobá hemodialýza, a značně zlepšuje kvalitu života pacientům. Na druhé straně se pacienti po transplantaci musí potýkat s vedlejšími účinky imunosupresivní léčby, která je nezbytná k potlačení imunitní reakce proti ledvinnému štěpu dárce. Předpověď rizika vývoje imunologických komplikací po orgánové transplantaci je velmi důležitá pro správné stanovení vhodné léčby. Zatímco neadekvátně nízká imunosuprese po transplantaci může způsobit akutní rejekci, která nezvratně poškodí transplantovaný orgán, naopak nasazení příliš silné imunosupresivní léčby by mohlo ohrozit život pacienta oportunními infekcemi a rakovinou. Cílem mé diplomové práce je přispět k včasnému stanovení imunologického rizika vznikající rejekce transplantované ledviny pomocí stanovení a charakterizace HLA specifických protilátek metodou Luminex.

1.2 Imunobiologie rejekce

1.2.1 HLA komplex

Hlavní histokompatibilní komplex (Major Histocompatibility Complex – MHC) je genetický systém, který je u člověka označován jako Human Leukocyte Antigen (HLA) komplex. HLA komplex obsahuje více než 200 genů, které jsou umístěny na krátkém raménku šestého chromozomu, a představuje nejlépe prostudovaný úsek lidského genomu (obr. 1). HLA antigeny jsou transmembránové glykoproteiny, jejichž hlavní

úlohou je předkládání peptidových fragmentů imunitnímu systému, tzv. fenomén MHC restrikce (Zinkernagel et al. 1997). Podle tohoto fenoménu MHC restrikce je určen základní směr imunitní reakce. Při transplantacích má však odlišnost mezi HLA antigeny dárce a příjemce orgánu důležitý dopad. Rozdíly v hlavním histokompatibilním komplexu mezi dárce a příjemcem jsou zodpovědné za rozpoznání transplantované tkáně imunitním systémem příjemce jako cizí a za silnou imunologickou reakci vůči transplantovanému orgánu. Imunitní odpověď po transplantaci je namířena především proti HLA antigenům dárce.



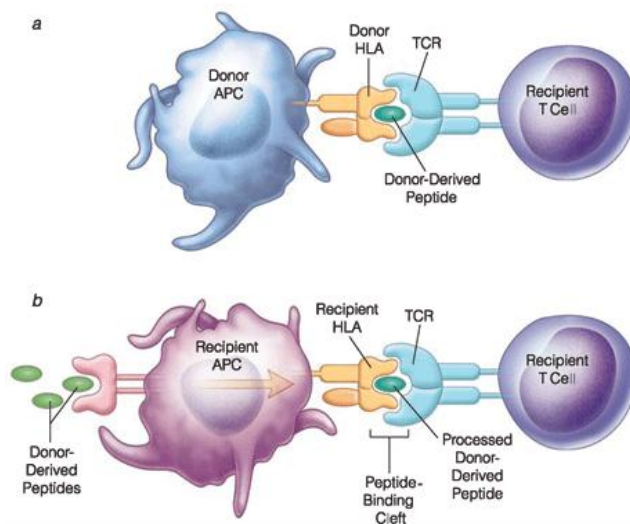
Obr. 1: Schematické znázornění HLA komplexu na chromozomu 6 (Klein et al. 2000).

HLA antigeny uplatňující se při transplantačních reakcích se dělí podle exprese, struktury a funkce do dvou základních tříd. HLA antigeny I. třídy (HLA-A, B a C) jsou exprimovány na všech jaderných buňkách a slouží k prezentaci peptidů pocházejících

z endogenních nebo virových proteinů, zatímco antigeny II. třídy (HLA-DR, DQ, DP) se vyskytují na antigen prezentujících buňkách (dendritické buňky, monocyty/makrofágy, B lymfocyty atd.), které prezentují imunitnímu systému peptidové fragmenty pocházející z exogenních antigenů.

1.2.2 Mechanismus rozpoznání HLA antigenů

Alogenní molekuly HLA ze štěpu jsou prezentovány k rozpoznání T buňkám příjemce dvěma základními způsoby, zvanými přímé a nepřímé rozpoznání (obr. 2).



Obr. 2: a) Přímé rozpoznání – T buňky rozpoznávají neshodné HLA antigeny na APC dárce. b) Nepřímé rozpoznání – vyžaduje zpracování a prezentaci neshodných HLA antigenů příjemcovými APC. HLA = human leukocyte antigen; TCR = T buněčný receptor. (Převzato z oddílu 10/kapitola 12 Transplantační imunologie: Základy imunologie a klinické praxe).

Při **přímém rozpoznání** T lymfocyty příjemce rozeznají intaktní HLA molekuly na antigen prezentujících buňkách dárce. Přímé rozpoznání aktivuje jak CD4+ tak CD 8+ T buňky a je časově omezené vzhledem k poměrně rychlé eliminaci dárcovských APC imunitním systémem příjemce. Může však vést ke vzniku paměťových buněk, které mohou vyvolat akutní rejekci i delší dobu po transplantaci.

Při **nepřímém rozpoznání** jsou neshodné HLA molekuly dárce pohlceny endocytózou a zpracovány příjemcovými APC. Peptidy takto získané z dárcových HLA molekul jsou

prezentovány vlastními HLA molekulami. Ty jsou pak rozpoznány příjemcovými T lymfocyty jako cizí. Nepřímé rozpoznání HLA antigenů dárce se ve své podstatě shoduje s rozpoznáním jiných extracelulárních antigenů, APC dárce migrují do sekundárních lymfatických orgánů, kde dochází k endocytóze a prezentaci zpracovaných HLA peptidů dárce. Nepřímá prezentace antigenu má za důsledek aktivaci CD4+ T buněk, protože peptidy pocházející z neshodných HLA molekul jsou prezentovány na HLA antigenech II. třídy. Pokud je při této prezentaci antigenu díky fenoménu křížové prezentace (cross-presentation) použita molekula HLA I. třídy, dojde také k aktivaci CD8+ T lymfocytů. Nepřímý způsob prezentace aloantigenů je funkční prakticky stále, dokud je štěp přítomen v těle příjemce.

Relativní význam přímé a nepřímé prezentace HLA antigenů dárce při vzniku rejekce není definitivně stanoven. Předpokládá se, že přímé rozpoznání HLA antigenů dárce je spojeno spíše s časnou akutní rejekcí, kde se účastní hlavně cytotoxické mechanismy, zatímco CD4+ efektorové T buňky stimulované nepřímou cestou a produkce donor specifických protilátek hrají větší roli při chronické rejekci.

Vysokoafinitní protilátky jsou produkovány hlavně B buňkami po aktivaci T pomocnými lymfocyty. Nejčastěji jsou cílovými antigeny pro protilátky HLA molekuly jak první, tak druhé třídy. Naivní B lymfocyt rozpozná cizí MHC molekulu po aktivaci pomocným CD4+ T lymfocylem, když je současně dříve aktivován stejným antigenem prezentovaným dendritickými buňkami. Anti HLA protilátky přispívají ke vzniku humorální rejekce štěpu.

Byl popsán ještě třetí způsob prezentace aloantigenů tzv. semi-direct rozpoznání, na základě schopnosti příjemcových APC získat významné množství intaktních HLA

molekul dárce přímým buněčným kontaktem s dárcovými APC nebo endotelovými buňkami.

Kromě HLA antigenů může být příjemcův imunitní systém aktivován také jinými tkáňovými antigeny, jako jsou tzv. non-HLA antigeny např. MHC Class I chain related (MIC) molekuly - MICA (MHC class I polypeptide-related sequence A) a MICB a další známé i ještě neznámé tkáňově specifické antigeny (tab. 1).

Tab. 1: Antigeny, které hrají roli v transplantačních reakcích (Slavcev 2013).

	Buňky / tkáňová distribuce
Human Leukocyte Antigens (HLA)	I. třída (všechny nukleární buňky)
	II. třída (antigen-prezentující buňky, aktivované B lymfocyty, atd.)
Non-HLA antigeny	AB0 antigeny (erytrocyty, endoteliální buňky)
	MICA, MICB (endoteliální buňky, keratinocyty, fibroblasty, monocyty, atd.)
	Vimentin (cytoskelet), K- α 1 tubulin (plíce)
	Angiotensin II Type 1 (AT ₁) receptor (cévy, mozek, srdce, ledviny, atd.)
	Tkáňově-specifické antigeny (ledviny, srdce, játra atd.)

MHC Class I chain related (MIC) molekuly mají analogickou strukturu s klasickými HLA antigeny, nevážou ale β 2-mikroglobulin a neprezentují peptidy. Jsou to stresové molekuly a jsou exprimovány na endotelových a epitelových buňkách, keratinocytech,

monocytech a fibroblastech, ale nejsou exprimovány na lymfocytech. MICA lokus má omezený polymorfismus, má přibližně 60 alel a je v úzké vazebné nerovnováze s HLA B lokusem.

1.2.3 Akutní a chronická rejekce

Rejekce je hlavní překážkou úspěšné transplantace ledviny (orgánu). Rejekce štěpu je výsledkem působení jak přirozené, tak adaptivní imunitní odpovědi vůči transplantovanému orgánu zprostředkované NK buňkami, monocyty, makrofágy, eozinofily, aloreaktivními T lymfocyty a protilátkami. Aloantigeny mohou vyvolat jak buněčnou, tak protilátkovou imunitní odpověď. Rozeznáváme rejekci celulární, způsobenou T lymfocyty, i humorální, zprostředkovanou protilátkami. Oba typy rejekce se však mohou vyskytovat i společně. Nejčastějším cílem při probíhající akutní rejekci ve štěpu je cévní endotel transplantované ledviny. Výsledkem probíhající rejekce je postupné zhoršení a zánik funkce štěpu.

1.2.4 Akutní T-buňkami zprostředkovaná (celulární) rejekce

Akutní celulární rejekci zprostředkují T lymfocyty tím, že rozpoznávají neshodné antigeny dárce (přednostně HLA molekuly) přítomné na endotelu cév nebo prezentované APC, buď příjemce nebo dárce. Po primární aktivaci CD4⁺ buněk dárčovými APC v lymfatických orgánech nebo ve štěpu, dochází pod vlivem cytokinů typu Th1 produkovaných CD4⁺ T lymfocyty k aktivaci CD8⁺ T lymfocytů a jejich migraci do štěpu. Pouze CD8⁺ cytotoxické T lymfocyty, které jsou indukovány přímou cestou rozpoznání aloantigenů štěpu, mohou zabíjet buňky štěpu, které exprimují tyto stejné antigeny. Takto aktivované alospecifické CD8⁺ lymfocyty příjemce uplatňují cytotoxické mechanismy jako degranulaci cytoplazmatických cytotoxických granul obsahujících perforin a granzymy, mezibuněčné interakce FAS-FAS ligand a sekreci lymfotoxinu k navození apoptózy buněk štěpu. Pokud jsou aloreaktivní T buňky

stimulovány nepřímou cestou, princip mechanismu rejekce není CTL zprostředkované zabíjení buněk štěpu, ale zánět zapříčiněný cytokiny, produkoványými buď CD8+ nebo CD4+ efektorovými T buňkami (Abbas 2012). CD8+ CTL, které byly aktivovány nepřímou cestou vlastní MHC restrikce, nejsou schopné zabít buňky štěpu, protože tyto buňky neexprimují vlastní MHC alely vystavující alogenní peptidy (Abbas 2012). Rovněž se uplatňují mechanismy pozdní přecitlivělosti, kdy makrofágy stimulované Th1 buňkami infiltrují štěp a používají mechanismy jako produkce toxického oxidu dusnatého, reaktivní kyslíkové radikály, produkují TNF-alfa. Celulární infiltráty mononukleárních buněk v biopsiích ledvinného štěpu jsou známkou probíhající akutní celulární rejekce ve štěpu.

1.2.5 Protilátkami zprostředkovaná (humorální) rejekce

1.2.5.1 Hyperakutní rejekce

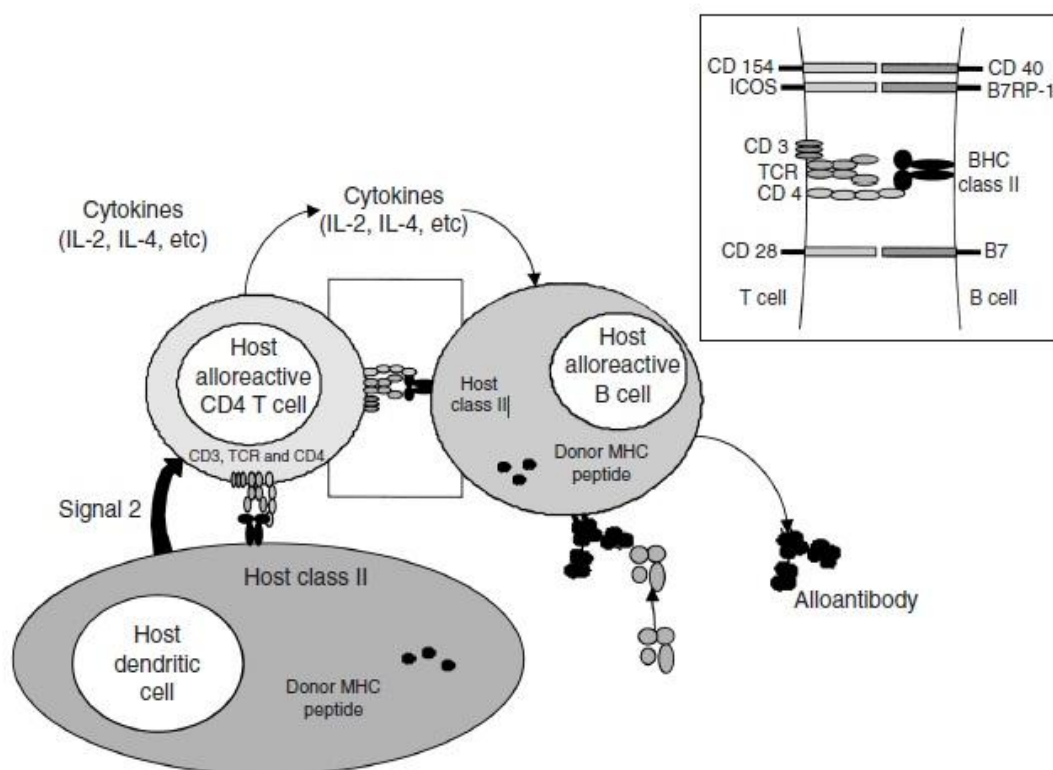
Bývá nejčastěji způsobena preformovanými protilátkami proti neshodným (nejčastěji HLA) antigenům dárce. Preformované protilátky vznikají po krevních transfúzích, těhotenstvích nebo po předchozích transplantacích. Při hyperakutní rejekci, která vzniká v krátkém časovém úseku po transplantaci, dochází k vazbě těchto preformovaných protilátek na endotelové buňky štěpu, k aktivaci komplementového systému s následkem trombóz v mikrocirkulaci a nekrózy štěpu.

Vzniku hyperakutní rejekce předcházíme detekcí preformovaných donor specifických HLA protilátek přítomných v séru příjemce ledviny před transplantací provedením komplement dependentního cytotoxického (CDC) crossmatch testu. Pozitivní crossmatch test je považován ve většině center za kontraindikaci k transplantaci. Transplantace ledviny se provádí ve shodě s krevní skupinou a tím se také zabrání

vzniku hyperakutní rejekce z důvodu přítomnosti preformovaných protilátek proti neshodným erytrocytárním AB0 antigenům.

1.2.5.2 Akutní protilátkami zprostředkovaná (humorální) rejekce

Akutní protilátkami zprostředkovaná rejekce vzniká 1 - 2 týdny, ale i déle po transplantaci, nejčastěji v prvních 3 měsících, a bývá zprostředkována protilátkami proti neshodným antigenům dárce, tzv. donor specifickými protilátkami (DSA). Naivní B lymfocyty rozpoznají vazbou svých imunoglobulinových receptorů neshodné HLA antigeny štěpu. Následně jsou tyto antigeny pohlceny endocytózou, zpracovány a prezentovány jako peptidy HLA molekulami II. třídy. Dochází k interakci mezi T a B buňkami, která je zesílena kostimulační vazbou CD40 a CD40 ligandy a má za následek produkci Th2 cytokinů a diferenciaci B lymfocytů v plazmatické buňky produkující donor specifické protilátky (obr. 3). Vazbou donor specifických protilátek na aloantigeny na povrchu endotelových buněk může (ale nemusí) dojít k místní aktivaci komplementové kaskády. To vede k infiltraci a aktivaci neutrofilů, formování trombů a k lýze buněk prostřednictvím MAC komplexu. Navíc mohou aloprotilátky svou vazbou na antigen změnit funkci endotelu indukováním intracelulárních signálů, které zvyšují povrchovou expresi prozánětlivých a prokoagulačních molekul, čímž dochází k dalšímu poškození endotelu.



Obr. 3: Tvorba aloprotilátek: Dendritické buňky vycitávají a zpracovávají neshodné HLA molekuly (MHC), které jsou předkládány hostitelovým aloreaktivním CD4+ T buňkám. Aktivace CD4+ T buněk směřuje k expresi kostimulačních molekul a produkci protilátek B buňkami. Hostitelské aloreaktivní B buňky vážou intaktní HLA molekuly dárců pomocí jejich membránově specifických receptorů (mIg) a komplex Ig-MHC je internalizován a zpracován pro antigenní prezentaci na HLA molekulách II. třídy. Dárcovy HLA-peptidy jsou prezentovány T buňkám, které poskytují pomoc B buňkám pro produkci aloprotilátek. (Vongwiwatana et al. 2003) (Pozdní selhání štěpu v důsledku tvorby aloprotilátek).

V poslední době je stále více zřejmé, že vazba DSA na antigeny na povrchu endotelu může spustit mikrovaskulární zánět ve štěpu i bez aktivace komplementu. K poškození endoteliálních buněk pak dochází prostřednictvím NK buněk a makrofágů mechanismem cytotoxické reakce závislé na protilátkách (ADCC), kdy po vazbě DSA na antigeny endotelu dochází k vazbě protilátek na Fc receptory NK buněk a makrofágů s následným uvolňováním mediátorů způsobujících apoptózu (Sis et al. 2010; Haas 2012).

1.2.5.3 Chronická rejekce

Hlavní příčinou selhání transplantované ledviny v dlouhodobém období po transplantaci je chronická rejekce (Viklicky 2008). Chronická rejekce je způsobena imunologickými a neimunologickými faktory. Následkem imunologických procesů ve štěpu, jak buněčných tak protilátkových, vlivem toxického působení imunosupresivních léků i chronických virových infekcí dochází k poškození endotelu cév a ke stimulaci proliferace intimy arterií. Pokles krevního průtoku a prokrvení štěpu a s tím spojená hypoxemie vedou k nahrazování funkční tkáně ve štěpu nefunkční fibrotickou tkání. Hlavními rizikovými faktory vzniku chronické rejekce je neshoda v HLA antigenech a také dříve prodělané epizody akutní rejekce. Chronická rejekce se rozvíjí v průběhu měsíců až několik let po transplantaci.

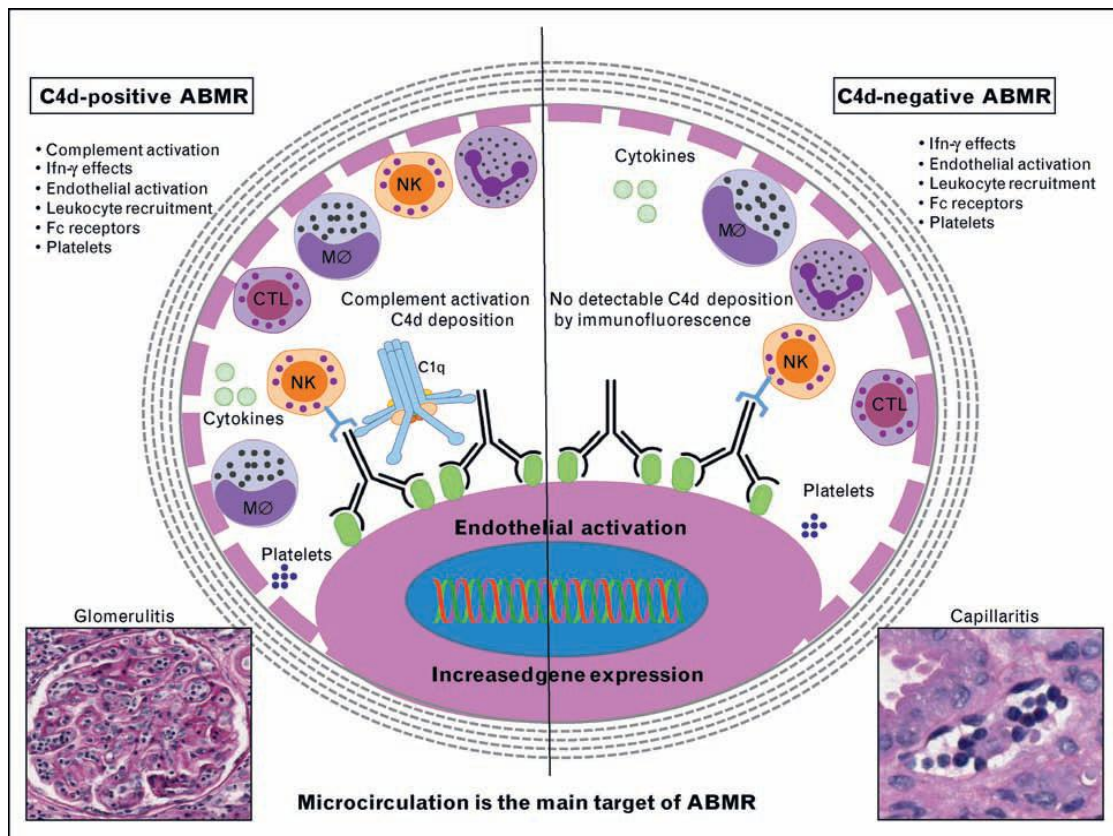
1.3 Diagnostika humorální rejekce

Akutní humorální rejekci prokazujeme přítomností donor specifických protilátek v séru příjemce ledviny. V současnosti nejcitlivější metodikou umožňující detekci HLA specifických protilátek je xMAP metodika (Luminex). Dalšími používanými metodami je komplement dependentní cytotoxický (CDC) test a crossmatch test za použití průtokové cytometrie (FCXM).

Důležitým diagnostickým znakem je průkaz (imunohistochemický nebo imunofluorescenční) C4d fragmentů komplementu, které se ukládají jako štěpné produkty komplementu v peritubulárních kapilárách štěpu (Feucht et al. 2005). C4d fragmenty potvrzují předchozí vazbu protilátek na antigen a aktivaci komplementové kaskády. C4d složka komplementu je neaktivní štěpný produkt, váže se ve tkáni kovalentní vazbou a přetrvává jako otisk po aktivaci komplementu. V některých případech se ale C4d depozita nedají detekovat, protože některé subtřídy IgG (IgG2 a

IgG4) nemají schopnost aktivovat komplement. Naopak falešně pozitivní nález je při aktivaci komplementu lektinovou cestou vlivem některých patogenů a/nebo ischemicko-reperfúzním stresem.

Průkaz C4d je nutno doplnit histologickým nálezem z biopsie štěpu, který má morfologické známky akutního poškození typické pro AMR: neutrofilů a monocytů/makrofágů v peritubulárních kapilárách a/nebo glomerulech, kapilární trombóza a transmurální nekróza ve stěně cév (obr. 4). K hodnocení rejekčních změn v histologickém řezu z ledvinné biopsie se používá jednotná Banffská klasifikace diagnostických kritérií, kde jsou změny charakterizující humorální rejekci přesně popsány (Mengel et al. 2012). Při diagnostice protilátkami zprostředkované rejekce posuzujeme současně také známky klinické dysfunkce štěpu (zvýšené hladiny sérového kreatininu, citlivost a bolestivost v oblasti štěpu).



Obr. 4: Mikrovaskulární zánět (peritubulárních kapilár a glomerulitida), poškození bazální membrány – přerušované čáry ve schématu kapiláry - a/nebo dvojkontury glomerulární bazální membrány jsou typickými histologickými nálezy AMR, AMR - protilátkami zprostředkovaná rejekce, CTL - cytotoxické T lymfocyty, Mo – monocyty - makrofágy, $\text{IFN}\gamma$ - interferon-gama, NK - natural killer (Sis et al. 2010).

1.4 HLA specifické protilátky

1.4.1 HLA specifické protilátky před transplantací

HLA protilátky, které jsou přítomné u pacientů před transplantací jako důsledek krevních transfusí, těhotenství nebo předchozí transplantace, znamenají pro příjemce ledviny zvýšené riziko vzniku akutní rejekce po transplantaci a horší prognózu přežití štěpu. Přítomnost preformovaných protilátek specifických proti HLA antigenům dárce vede ve většině případů ke vzniku hyperakutní rejekce a ztrátě štěpu (Patel et al. 1969). Ke stanovení DSA těsně před transplantací provádíme komplement dependentní (CDC) test, jehož pozitivita je považována za kontraindikaci k transplantaci. U pacientů

zařazených do transplantačního programu se provádí v pravidelných intervalech (4x ročně) stanovení panel reaktivních protilátek PRA, kdy zjišťujeme hladiny HLA protilátek přítomných v séru pacienta. Určíme tak vysoce rizikové, tzv. hypersenzibilizované pacienty, kteří těsně před transplantací musí podstoupit desenzibilizační léčbu k odstranění přítomných protilátek. Rovněž vyšetření FCXM (crossmatch za využití průtokové cytometrie) umožňuje detekovat donor specifické protilátky. Toto vyšetření je až 100 x citlivější než klasický CDC test a detekuje protilátky aktivující i neaktivující komplement. Ve většině případů je AMR zapříčiněna donor specifickými protilátkami izotypu IgG. Protilátky izotypu IgM specifické proti HLA antigenům mohou také vyvolat AMR, ale většinou jsou tyto IgM protilátky autoreaktivní a nejsou namířeny proti HLA antigenům dárce. Autoreaktivní cytotoxické protilátky izotypu IgM mohou způsobovat falešnou pozitivitu CDC testu a nejsou považovány za kontraindikaci k transplantaci. Některé studie uvádějí souvislost mezi přítomností protilátek HLA I. třídy u pacientů před transplantací a opožděným nástupem funkce štěpu i vyšším výskytem AMR (Susal et al. 2009; Riethmuller et al. 2010; Susal et al. 2011). Přítomnost protilátek specifických proti HLA I. a II. třídy současně, které jsou detekované senzitivními testy – ELISA a Luminex, výrazně zvyšuje riziko vzniku rejekce (Susal et al. 2009) a zhoršuje desetileté přežití štěpu. (Otten et al. 2012). Pro orgánové transplantace se při výběru dárce ledviny přihlíží ke shodě v HLA antigenech I. třídy - A, B a II. třídy - DR.

Nedávné studie uvádějí, že nejen protilátky proti HLA antigenům A, B a DR mohou být spojeny se vznikem AMR a odhojením štěpu. Také donor specifické protilátky proti HLA antigenům DP a DQ mohou způsobit akutní humorální rejekci a selhání štěpu (Billen et al. 2010).

Přítomnost HLA protilátek před transplantací však nemusí nutně vést ke ztrátě štěpu. U pacientů, kteří mají před transplantací vysoké hladiny protilátek, se provádí desenzibilizační léčba, jejímž cílem je zabránit rejekci štěpu v časném období po transplantaci a skládá se z plazmaferéz, podání metylprednizolonu, polyklonálních protilátek proti T lymfocytům (antithymocytární globulin) a intravenózních globulinů. Pro alokaci vhodného dárce se u těchto vysoce rizikových pacientů určují povolené antigeny dárce, tj. HLA antigeny, proti kterým dotyčný pacient nemá protilátky.

1.4.2 HLA specifické protilátky po transplantaci

S ohledem na dárce HLA fenotyp se HLA protilátky specifikuji jako donor specifické (DSA) a non donor specifické (NDSA).

HLA specifické protilátky vznikají až u 25 % transplantovaných příjemců ledviny a jsou namířeny proti epitopům HLA molekul I. a II. třídy. U pacientů po transplantaci ledvin je přítomnost donor specifických HLA protilátek spojena s vývojem AMR. Tyto DSA jsou zodpovědné za rozvoj humorální rejekce a jejich přítomnost znamená možnost vývoje klinického poškození končícího chronickými změnami. Zatímco role NDSA je nejasná, v některých případech se mohou účastnit i tyto NDSA při rozvoji AMR vzhledem ke zkřížené reaktivitě proti sdíleným epitopům různých HLA molekul (Cross-Reactivity Groups, CREG), (Cai et al. 2006; Briggs et al. 2009).

Myšlenku, že produkce de novo DSA po transplantaci je spojena s rozvojem akutní humorální rejekce štěpu, podporuje celá řada publikací (Scornik et al. 2007; Cooper et al. 2011). Pacienti s vysokými hladinami DSA (detekovatelné citlivými metodikami ELISA nebo Luminex) před a po transplantaci jsou mnohdy vystaveni podstatně vyššímu riziku vývoje rejekce než pacienti s vysokými hladinami DSA před

transplantací a nízkými hladinami DSA po transplantaci (Burns et al. 2008). Rovněž riziková pacienta, kteří podstoupili desenzibilizační léčbu před transplantací, a tím došlo k výraznému poklesu DSA, měli po transplantaci nižší riziko vývoje rejekce než ti, kteří nepodstoupili léčbu a přetrvávají u nich vysoké hladiny DSA (Reinsmoen et al. 2008). Změny v hladinách DSA také vypovídají o průběhu AMR a používají se pro monitorování vývoje a léčby AMR. Pacienti po stanovení diagnózy AMR provázené vysokými hladinami DSA mají po prodělání příslušné desenzibilizační imunopresivní léčby výrazně lepší přežití štěpu než ti, u kterých i přes zahájení příslušné imunopresivní léčby vysoké hladiny DSA přetrvávají (Everly et al. 2009). Akutní humorální rejekce se léčí kombinací plazmaferéz a podáváním intravenózních globulinů. K výrazné redukci protilátek a potlačení humorální rejekce přispívá také podání monoklonálních protilátek proti B lymfocytům např. anti-CD20 (rituximab).

1.4.3 HLA specifické protilátky ve vztahu k chronické rejekci

Výskyt donor specifických HLA protilátek v krevním oběhu příjemce je pravděpodobně ukazatelem zvýšeného rizika vzniku chronické rejekce, i když někdy může mezi vznikem DSA a ztrátou štěpu uplynout rozdíl i několika let (Everly et al. 2009). Kdykoliv se v krevním oběhu pacienta po transplantaci DSA objeví, je vhodné tyto protilátky odstranit a tím předejít vzniku chronické rejekce (Cai et al. 2006). Je pravděpodobné, že protilátky způsobují poškození štěpu, aniž by došlo k naměření patologických laboratorních hodnot, protože ledviny mají značnou schopnost kompenzovat poškození, což je z krátkodobého hlediska prospěšný opravný proces, ale v dlouhodobé perspektivě vede k postupné fibrotizaci tkáně a nevratnému snížení funkce štěpu (Lee et al. 2009).

Nejen výskyt DSA, ale také přítomnost protilátek NDSA je spojena se zvýšeným rizikem selhání štěpu a výskytem chronické rejekce, ve srovnání s pacienty bez těchto protilátek, což není dosud dostatečně vysvětleno. Mechanismus poškozujícího účinku těchto protilátek na štěp je nejasný (Lachmann et al. 2009). Endotel štěpu je poškozován DSA různými způsoby: aktivací komplementu a jeho cytotoxicitou, migrací zánětlivých buněk vlivem rozpustných fragmentů komplementu, na protilátkách závislou cytotoxicitou bez zapojení komplementu s následnou zvýšenou fibrotizací a endoteliální proliferací. Samotná vazba protilátek na antigeny endotelu vede k aktivaci endotelu a k indukování intracelulárních signálů a následnému zvýšení exprese povrchových prozánětlivých a prokoagulačních molekul. Poškození způsobené HLA protilátkami a celulárními rejekčními epizodami může vést k odhalení skrytých vlastních antigenů, dosud utajených příjemcovu imunitnímu systému, což může mít za následek autoimunitní reakci. U transplantace ledviny to bývají např. antigeny angiotensinového receptoru I. typu a kolagenu IV a VI. Dokonce i přechodný výskyt anti HLA protilátek někdy předchází rozvoji protilátek proti vlastním antigenům. (Nath et al. 2010; Seetharam et al. 2010).

Zatímco relativní riziko ztráty štěpu způsobené celulární rejekcí je nejvyšší 6 až 24 měsíců po transplantaci a s postupem času klesá, produkce de novo DSA a relativní riziko ztráty štěpu v důsledku protilátkami zprostředkované chronické rejekce se s časem po transplantaci neustále zvyšuje (Lachmann et al. 2009).

Evropská Společnost pro Imunogenetiku (EFI) doporučuje monitorování protilátek u pacientů po transplantaci ledvin a to zejména u vysoce senzitivovaných pacientů, také po provedení desenzibilizační léčby vedoucí k odstranění protilátek. Monitorování DSA u všech pacientů v prvním roce po transplantaci je doporučeno provést dvakrát,

v intervalu tři měsíce a dvanáct měsíců po transplantaci (Terasaki 2003; Lachmann et al. 2009).

1.4.4 MICA protilátky

Protilátky namířené proti non HLA antigenům MICA mohou být izotypu IgG i IgM. Klinický význam MICA specifických protilátek dosud není dostatečně vyjasněn.

MICA protilátky jsou schopny poškozovat endotel štěpu mechanismem aktivace komplementu a s tím spojené cytotoxicity, protilátkami zprostředkované buněčné cytotoxicity (ADCC) a také nepřímo vazbou na antigeny buněk endotelu. MICA protilátky nacházíme i u pacientů před transplantací, frekvence výskytu MICA protilátek se zvyšuje po transplantaci. Stastny a spol. publikovali ve svém článku vysokou incidenci MICA protilátek při rejekci štěpu, tyto výsledky však zatím nebyly potvrzeny (Stastny et al. 2009). Tyto antigeny nejsou exprimovány na lymfocytech a jejich diagnostika je obtížná.

2 Cíle diplomové práce

Cílem mé diplomové práce je v souboru pacientů transplantovaných v IKEM:

1. Vyhodnotit klinický význam HLA a non HLA specifických protilátek definovaných pomocí senzitivních „solid phase assays“ (LABScreen Mixed a Single Antigen Beads) pro předpověď rizika vývoje celulární a protilátkami zprostředkované rejekce po transplantaci ledviny.
2. Retrospektivně porovnat incidenci donor specifických protilátek před a po transplantaci se sedmiletým přežitím a funkcí transplantované ledviny.
3. Na základě získaných dat sestavit doporučení pro testování sér pacientů před a po transplantaci ledviny za využití metodiky Luminex.

3 Materiál a metody

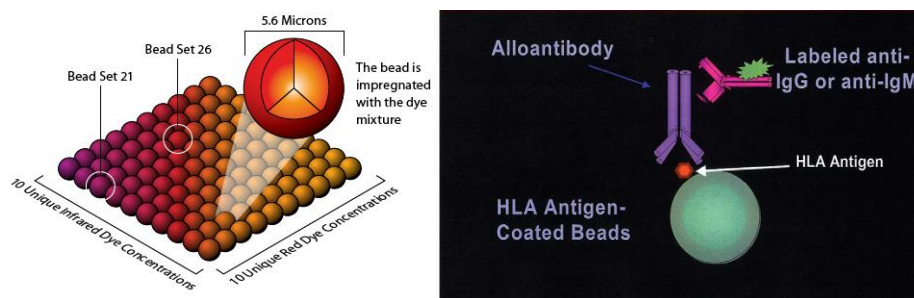
3.1 Soubor pacientů

Náš soubor tvořilo 132 příjemců ledviny, kteří byli transplantováni v IKEM v letech 2004 a 2005. U těchto pacientů jsme vyšetřili HLA specifické protilátky v séru z odběru těsně před transplantací a dále 3 měsíce, 6 měsíců a 12 měsíců po transplantaci. Sérum jsme získali centrifugováním z plně sražené krve. Přítomnost protilátek jsme prokázali metodami crossmatch – komplement dependentním cytotoxickým testem (CDC) a testem za využití průtokové cytometrie (FCXM). Hladiny a specifitu protilátek jsme analyzovali metodou Luminex (LABScreen Mix a Luminex LABScreen Single antigen I. a II. třídy). K posouzení zda jsou HLA protilátky namířené proti neshodným antigenům dárce, bylo nutno znát typizace HLA antigenů dárce i příjemce ledviny. Tato vyšetření se prováděla v naší laboratoři rutinně v běžném provozu metodou PCR-SSP (dárce orgánů) a PCR-SSOP (pacienti). DNA jsme získali izolací z nesrážlivé krve (většinou s EDTA). Lymfocyty zemřelého dárce pro CDC test jsme izolovali ze sleziny nebo uzliny dárce. FCXM test jsme prováděli před transplantací od živých dárců a k monitorování rizikových pacientů po transplantaci. Tento test jsme použili u vzorků s podezřením na humorální rejekci.

3.2 xMAP metodika (Luminex)

xMAP (Luminex) technologie je momentálně nejcitlivější metodou, která detekuje i velmi nízké hladiny HLA specifických protilátek. Práh detekce hladin anti HLA protilátek je ve srovnání s CDC a ELISA testy výrazně nižší. Metoda využívá k detekci

protilátek fluorescenčně značené polystyrenové kuličky potažené HLA antigeny I. nebo II. třídy, které jsou vyrobené rekombinantní technologií a definované na úrovni alel (subtypů HLA antigenů). Kuličky obsahují 2 fluorescenční barvy (v různém poměru) a tak je každá kulička s HLA antigeny na povrchu snadno identifikovatelná. Pokud se protilátka ze séra naváže na HLA antigen na povrchu kuličky, je detekována sekundární anti lidskou IgG protilátkou značenou phycoerytrinem (PE), (obr. 5).



Obr. 5: Princip xMap (Luminex) metodiky (OneLambda Inc., vysvětlení v textu).

Výslednou fluorescenci měříme pomocí dvoulaserového cytometru Luminex 200 IS 2.3. První laser, červený, detekuje fluorescenční barvivo uvnitř kuličky a definuje, o jakou kuličku se konkrétně jedná, druhý laser, zelený, excituje signál fluorescenčního barviva PE na sekundární protilátce, která detekuje IgG protilátky v séru pacienta, pokud jsou navázány na povrchu kuličky. S každým vyšetřením testujeme negativní kontrolní sérum, tím stanovíme pozadí ke každé kuličce.

Luminex LABScreen Mix umožňuje provést screeningové vyšetření séra, kdy zjišťujeme přítomnost nebo nepřítomnost HLA specifických protilátek. Tímto vyšetřením dokážeme určit, zda jsou protilátky namířené proti HLA antigenům I. či II. třídy. Rovněž tímto vyšetřením zjistíme přítomnost MICA specifických protilátek.

Luminex LABScreen Single antigen HLA Class I a Class II Antibody detection umožňuje přesné stanovení specificity anti HLA protilátek. Každá fluorescenční kulička má na povrchu jen jeden HLA antigen a vlastní intenzitu fluorescence a tak je snadno identifikovatelná.

Provedení testu:

Před započítím práce důkladně rozmícháme LabSreen kuličky na vortexu. Pracujeme v 96 jamkových destičkách, 5 μ l kuliček inkubujeme s 20 μ l vyšetřovaného séra 30 minut ve tmě při laboratorní teplotě za velmi mírného třepání na třepačce. Pro každý test souběžně provádíme negativní kontrolu - 5 μ l kuliček a 20 μ l negativního kontrolního séra. Pokud byly v séru přítomny protilátky proti HLA antigenům, navázaly se během inkubace na HLA antigeny na povrchu kuliček. Mikrokuličky negativní kontroly na sobě nemají žádný HLA antigen.

Po inkubaci 3 x propláchneme, ke každému vzorku přidáme při prvním promytí 150 μ l pracovního roztoku promývacího pufru a při dalších dvou promytích 200 μ l, mezi jednotlivými kroky promývání centrifugujeme 5 minut při 1300 g a vždy odstraníme supernatant rychlým vyklepnutím a odsátím na filtračním papíře.

Před další inkubací si připravíme potřebné množství pracovního roztoku anti IgG protilátky značené PE (zásobní roztok naředíme 100 x promývacím pufrem). Každý vzorek séra dále inkubujeme se 100 μ l pracovního roztoku anti lidské IgG značené PE a inkubujeme 30 minut ve tmě, opět za velmi mírného třepání.

Po inkubaci opět vzorky stočíme a 2 x propláchneme promývacím pufrem (po centrifugování vždy odstraníme supernatant).

V posledním kroku přidáme 80 μ l PBS do každého vzorku a vzorky jsou připraveny k analýze, lze je i uchovat při 2 – 8 °C ve tmě do 24 hodin. Měříme pomocí dvoulaserového cytometru Luminex 200 IS 2.3.

Vyhodnocení provádíme softwarem HLA-FUSION, cut-off pro vyhodnocení výsledku je vypočítán na základě analýzy negativního kontrolního séra a zároveň intenzity fluorescence negativních a pozitivních kontrolních kuliček. Fluorescenční signál PE, kterým je značená sekundární protilátka, vyjadřujeme jako MFI (mean fluorescence intensity) – vyjadřujeme intenzitu fluorescence sekundární protilátky. Hodnota negativní kontroly (NK) by měla být nižší než 500 MFI, hodnota pozitivní kontroly (PK) by měla být vyšší než 500 MFI a současně hodnota poměru PK/NK by měla být vyšší než 2,5. Počet analyzovaných kuliček při měření by měl být 100, minimálně 50. Výhodou tohoto testu je, že nejsou zapotřebí živé buňky dárce.

Materiál a přístroje použité při stanovení protilátek pomocí LABScreen:

Sérum na vyšetření protilátek jsme získali centrifugováním z plné sražené krve.

Použité soupravy výrobce One Lambda, dodavatel firma Biomedica:

LABScreenMixed kat. č. OL-LSM12

LABScreen Single Antigen Class I Antibody detection kat. č. OL-LS1A04

LABScreen Single Antigen Class II Antibody detection kat. č. OL-LS2A01

LABScreen PE-Conj. Goat anti Human, kat. č. OL-LS-ABS2PE

LABScreen Neg. Control serum, kat. č. OL-LS-NC

Sheath fluid

Uniplate 96-jamkové V bottom, white polystyrene, Whatman

Folie na PCR destičky

Luminex 200 IS 2,3, One Lambda

Centrifuga CL 30 s rotorem na PCR desky, Thermo electron

Centrifuga Minispin+, Eppendorf

Analyzační program HLA-Fusion

Pipety, Špičky

3.3 Izolace buněk ze sleziny a z uzliny

Izolaci buněk provádíme pro získání suspenze lymfocytů dárce (k provedení testů CDC a FCXM).

Injekční stříkačkou s jehlou vyplavíme pomocí PBS buňky z uzliny nebo ze sleziny zemřelého dárce ledviny. Pokud jsme suspenzi získali ze sleziny, přefiltrujeme suspenzi přes silonové sítko. Vyplavenou suspenzi buněk navrstvíme na separační medium a centrifugujeme 20 minut při 700 g. Prstence lymfocytů po gradientové centrifugaci sebereme Pasteurovou pipetou a ještě 2 x promyjeme PBS s 10% FTS. Suspenzi lymfocytů získanou z uzliny spočítáme v Bürkerově komůrce a naředíme na koncentraci 1×10^6 lymfocytů pro FCXM (pro CDC test 2 - 3×10^6). Suspenzi buněk získanou ze sleziny dále izolujeme pomocí magnetické separace kitem EasySep pro negativní selekci T a B lymfocytů. K buňkám přidáme 50 μ l směsi monoklonálních protilátek, protřepeme a inkubujeme 10 minut. Po inkubaci přidáme 100 μ l kuliček a opět

inkubujeme 10 minut. Doplníme 1,5 ml PBS 2% FTS, umístíme zkumavku do magnetu a ponecháme inkubovat dalších 5 minut. Nakonec magnet nakloníme a opatrně vylijeme obsah zkumavky, který obsahuje T nebo B lymfocyty. Spočítáme množství lymfocytů v Bürkerově komůrce a naředíme na koncentraci 1×10^6 nebo $2 - 3 \times 10^6$ lymfocytů. Buňky jsou tak připraveny k použití k provedení CDC a FCXM testu.

Materiál a přístroje použité při stanovení izolaci lymfocytů:

Uzlina nebo část sleziny dárce

Lymphocyte Separation Medium LSM 1077, kat.č. J15-004, BioTech

PBS pH 7,2 – 7,4, Lékárna IKEM

IMDM kat.č. E15-819, BioTech

Fetální bovinní sérum kat.č. A15-101, BioTech

EasySep, Negative selection Human T cell enrichment Kit, Scintilla

EasySep, Negative selection Human B cell enrichment Kit, Scintilla

Trypanová modř 0,3% roztok, Lékárna IKEM

Aqua pro injectione, kat.č. 3500080, B. Braun Medical s.r.o.

Centrifuga Thermo CL30, Trigon plus

Centrifuga Minispin+, Eppendorf

Bürkerova komůrka

Mikroskop Olympus BX 41s fázovým posunem

Zkumavky

Pasteurovy pipety

3.4 Zmrazování buněk

Nezpracované lymfocyty dárce izolované ze sleziny nebo uzliny uchováváme pro další použití na kryokonzervaci v tekutém dusíku.

Buňky určené k zmrazení resuspendujeme v IMDM s 20% FTS, spočítáme množství buněk v Bürkerově komůrce a naředíme na koncentraci 15×10^6 / ml. Do označených mrazicích ampulí napipetujeme 0,5 ml buněčné suspenze a předchladíme v lednici alespoň po dobu 20 minut. Připravíme si mrazicí médium IMDM s 20% FTS a DMSO v poměru 4:1 (20% roztok DMSO). Roztok připravujeme za neustálého chlazení v lázni s ledem a před použitím se uloží po dobu 20 minut v lednici v ledové lázni. Těsně před uložením vzorku do tekutého dusíku k vychlazené buněčné suspenzi pomalu přikapáváme mrazicí roztok o stejném objemu, jako má buněčná suspenze v mrazicí ampuli (0,5 ml). Stále pracujeme v ledové lázni. Uzavřené ampulky důkladně promícháme a předáme na kryokonzervaci, kde jsou vzorky postupným snižováním teploty převedeny k uskladnění do tekutého dusíku.

3.5 Rozmrazování buněk

Ampule se zmrazenými buňkami vyzvedneme z kryokonzervace z tekutého dusíku a uložíme ve speciálním kontejneru nebo v polystyrenové nádobě s kapalným dusíkem. Potom opatrně vložíme do vodní lázně předehřáté na 37°C , současně předehříváme i pracovní médium IMDM s 20% FTS. Obsah ampulí rozmrazujeme, až zůstane pouze

malá tzv. pecička buněk. Ampule opatrně protřepeme a obsah přeneseme do zkumavky. K buňkám pomalu po kapkách přidáváme pracovní médium IMDM s 20% FTS do celkového objemu 10 ml. Buňky inkubujeme ve tmě 30 minut při laboratorní teplotě, kdy dojde k postupnému vyloučení DMSO z buněk. Zkumavky s buňkami centrifugujeme 10 minut při 400g. Následně odlijeme supernatant, protřepeme sediment buněk a přidáme 10 ml pracovního media IMDM s 20% FTS. Opět centrifugujeme 10 minut při 400g. Buňky takto promyjeme celkem dvakrát. Po závěrečné centrifugaci protřepeme buněčnou suspenzi a naředíme na požadovanou koncentraci. Buňky nesmíme po celou dobu vystavovat náhlým změnám teplot.

Materiál a přístroje použité při zamrazování a rozmrazování lymfocytů:

Buněčná suspence lymfocytů dárce

PBS pH 7,2 – 7,4, Lékárna IKEM

IMDM kat.č. E15-819, BioTech

Fetální bovinní sérum kat.č. A15-101, BioTech

DMSO kat. č. D5879, Sigma Aldrich

Trypanová modř 0,3% roztok, Lékárna IKEM

Centrifuga Thermo CL30, Trigon plus

Vodní lázeň Selecta

Dewarova nádoba

Bürkerova komůrka

Mikroskop Olympus BX 41s fázovým posunem

Zkumavky

Pasteurovy pipety

3.6 Komplement dependentní cytotoxický test (CDC)

Jedním z nejstarších a nejběžnějších testů využívajících serologickou reakci je mikrolymfocytotoxický test (CDC - complement-dependent cytotoxic test), (Terasaki a McClelland, 1964). Tento test slouží k detekci preformovaných komplement aktivujících cytotoxických protilátek proti neshodným HLA antigenům dárce a tím k vyloučení vývoje hyperakutní rejekce. Test se provádí před každou transplantací a pozitivita testu je kontraindikací k transplantaci ledviny.

Buňky dárce (1 μ l/jamku) inkubujeme na Terasakiho mikrotitračních destičkách se sérem příjemce (1 μ l/jamku), po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. V dalších jamkách inkubujeme současně buňky dárce s pozitivním a negativním kontrolním sérem (PK a NK). Po inkubaci přidáme do všech jamek komplement (5 μ l) a inkubujeme opět při laboratorní teplotě 60 minut. Nakonec přidáme eosin (1 μ l/jamku) a po 5 minutách krátké inkubace zastavíme reakci přidáním formolu (1 μ l/jamku). Pokud se navázala protilátka přítomná v testovaném séru, pak dojde v přítomnosti komplementu k poškození buněčné membrány a k lýze buňky. Jako zdroj buněk testovaného dárce používáme lymfocyty izolované z periferní krve (u živého dárce), lymfatických uzlin nebo ze sleziny (u zemřelých dárců). Zdrojem komplementu je králičí sérum, testované na nepřítomnost anti HLA protilátek. Po obarvení mrtvých buněk eosinem (nebo Trypanovou modří) reakci odečítáme pod mikroskopem s fázovým kontrastem. Výsledky uzavíráme podle procenta mrtvých buněk jako silně pozitivní, pozitivní, slabě

pozitivní a negativní (0 - 10% mrtvých buněk). Hodnoceno vždy s ohledem na reakci pozitivní a negativní kontroly. PK je sérum obsahující anti HLA protilátky (směs sér několika matek po více porodech). NK je sérum bez anti HLA protilátek (sérum muže krevní skupiny AB Rh faktor negativní, který nikdy neměl transfúzi, není imunizován – testováno).

Materiál a přístroje použité k provedení CDC testu:

Sérum na vyšetření protilátek jsme získali centrifugováním z plné sražené krve.

Lymfocyty dárce izolované ze sleziny nebo z uzliny

PBS pH 7,2 – 7,4, Lékárna IKEM

IMDM kat.č. E15-819, BioTech

Fetální bovinní sérum kat.č. A15-101, BioTech

Králičí komplement kat.č. FUAVCR001, RC1Z, FU AVCR

Eosin 5% vodný roztok, Lékárna IKEM

Trypanová modř 0,3% roztok, Lékárna IKEM

Aqua pro injectione, kat.č. 3500080, B. Braun Medical s.r.o.

Formol 30% roztok, Lékárna IKEM

Medicínální olej bílý W505, kat.č. DAB10, FUCHS oil

Centrifuga Thermo CL30, Trigon plus

Centrifuga Minispin+, Eppendorf

Bürkerova komůrka

Hamiltonovy pipety

Mikroskop Olympus BX 41s fázovým posunem

Zkumavky

Pasteurovy pipety

3.7 Panel reaktivní protilátky (PRA)

Tímto testem na principu komplement dependentního cytotoxického testu provádíme screening protilátek proti HLA antigenům v séru pacientů - potenciálních příjemců orgánů.

Testováním panel reaktivních protilátek zjišťujeme hladiny preformovaných HLA protilátek přítomných v séru pacienta před zařazením do transplantačního programu a v pravidelných intervalech 4 x ročně po dobu čekání na transplantaci. PRA testujeme na panelu 50 buněk o známých antigenech získaných od zdravých dárců krve. Panel svým složením odpovídá výskytu HLA antigenů v české populaci. Specificitu protilátek určujeme statistickou analýzou jednotlivých reakcí. Hodnotu PRA vyjádříme v procentech, podle počtu pozitivních buněk v panelu. Pro vyloučení falešné positivity CDC testu způsobené autoprotiilátkami třídy IgM inkubujeme séra s dithiotreitem (DTT), který štěpením S-S vazeb mezi jednotlivými molekulami IgM protilátky tyto IgM inaktivuje.

3.8 Flow cytometry crossmatch (FCXM)

Jedná se o crossmatch test za použití průtokové cytometrie. Tento test je mnohonásobně (až 100 x) citlivější než CDC test, detekuje i komplement nevážící donor specifické protilátky. Je založen na principu vazby donor specifických protilátek na membránové antigeny dárce (HLA antigeny). Test jsme použili u pacientů s podezřením na akutní humorální rejekci.

Provedení testu:

Sérum příjemce (50 μ l) inkubujeme ve zkumavkách s lymfocyty dárce ($1 - 1,5 \times 10^6$ lymfocytů) po dobu 30 minut, ve tmě, při laboratorní teplotě. Dále ke každému vyšetřovanému vzorku vyšetřujeme za stejných podmínek negativní kontrolu (50 μ l negativní kontrolní sérum a lymfocyty dárce). Současně s vyšetřovanými séry provádíme pozitivní kontrolu (pozitivní kontrolní sérum a pool lymfocytů od různých dárců) a blank (PBS a opět pool lymfocytů). Po inkubaci buňky 3 x promyjeme pomocí PBS (vždy stočíme na centrifuze 5 minut při 400 g a po každém stočení opatrně slijeme supernatant). Po propláchnutí přidáme 10 μ l anti CD3 protilátky značené Phycoerythrinem (PE), 10 μ l anti CD19 protilátky značené Phycoerythrin-Cyaninem 5,1 (PC5) a 10 μ l kozí anti lidské IgG protilátky ((Fab)₂ fragment) značené FITC.

Inkubujeme 30 minut ve tmě při laboratorní teplotě a potom 3 x propláchneme. Po poslední centrifugaci přidáme 350 μ l cellfixu, který buňky zafixuje. Vzorek analyzujeme na průtokovém cytometru FC500 (Beckman Coulter).

Hodnotíme vždy s ohledem na pozitivní a negativní kontrolu. Cut-off pro pozitivitu vzorků byl stanoven jako medián fluorescence negativního kontrolního vzorku plus dvě směrodatné odchylky (2 x STD negativních vzorků).

Pokud jsou přítomny v séru příjemce protilátky třídy IgG proti antigenům dárce, dochází při inkubaci k jejich navázání na buňky. Tyto protilátky pak detekujeme pomocí kozí polyklonální protilátky proti těžkým imunoglobulinovým řetězcům, která je fluorescenčně značená FITC. T buňky dárce detekujeme pomocí anti-CD3 monoklonální protilátky značenou PE, pozitivita T buněk znamená přítomnost donor specifických protilátek proti HLA antigenům I třídy. B buňky dárce detekujeme vazbou anti-CD19 monoklonální protilátkou značenou PC5 a pozitivita B buněk znamená přítomnost donor specifických protilátek proti HLA antigenům jak I. tak II. třídy nebo jen II třídy.

Falešně pozitivní reakce může vzniknout vlivem léčby pacientů pomocí humanizovaných monoklonálních protilátek (např. Rituximab, Campath).

Materiál a přístroje použité k provedení FCXM testu:

Sérum na vyšetření protilátek jsme získali centrifugováním z plné sražené krve.

anti-CD3-PE kat. č. 347647, Becton-Dickinson

anti-CD19-PC5 kat. č. A07771, Beckman Coulter

Goat anti human IgG-FITC F(ab')₂, kat. č. 109-096-098, Jackson Immunoresearch Lab.

EBSS (Earle's Balanced Salts), kat. č. E6263, Sigma Aldrich

PBS pH 7,2 – 7,4, Lékárna IKEM

IMDM kat.č. E15-819, BioTech

Fetální bovinní sérum kat.č. A15-101, BioTech

CellFix, kat. č. 340181, Becton-Dickinson

Zkumavky Falcon, kat. č. 352054, Becton-Dickinson

Pipeta na 1 – 10 µl, 10 – 100 µl, na 20 – 200 µl, Špičky

Centrifuga Thermo CL30, Trigon plus

Centrifuga Minispin+, Eppendorf

Třepačka ZX3, Velp Scientifica

3.9 PCR – SSP (Sequence specific primers)

Metodu PCR – SSP používáme k typizaci HLA antigenů A, B, DR a někdy i DQ antigenů u příjemců a u dárců orgánů. Principem metody je amplifikace jednotlivých alel nebo skupiny alel daného lokusu s použitím primerů, které jsou syntetizované na základě komplementarity a sekvenční specifity jen k jedné určité alele nebo skupině alel daného lokusu. Na principu této metody byly vyvinuty testy, umožňující HLA typizaci jak na úrovni s nízkým rozlišením (LR), tak s vysokým rozlišením (HR), sloužícím k upřesnění konkrétní alely. Celý postup při typizaci zahrnuje více PCR reakcí.

PCR - polymerázová řetězová reakce

Princip PCR spočívá v navození procesu podobnému replikaci DNA, ale v in vitro podmínkách. Při PCR však nedochází k amplifikaci celé molekuly, ale jen určitého úseku. Syntézu komplementárního vlákna katalyzuje DNA polymeráza (termostabilní DNA polymeráza z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*). Denaturace dosáhneme zvýšením teploty a celá reakce probíhá in vitro. K vymezení úseku určeného

k amplifikaci se používají dva oligonukleotidové primery, uměle syntetizované jednovláknové úseky DNA, jejichž sekvence je komplementární k sekvencí bazí 3' konců obou vláken cílového úseku DNA. Primery slouží jako startovací místa pro amplifikaci. Primery hybridizují k denaturovaným vláknům DNA a vytvářejí krátké dvouvláknové úseky, na které je DNA polymeráza schopná připojovat další nukleotidy. Celý průběh amplifikace DNA metodou PCR využívá změny reakční teploty směsi. Změny teploty se uskutečňují v těchto krocích:

Rozvinutí dvojvlákna DNA – denaturace při teplotě 90 až 95 °C v časovém rozmezí 15 sekund až 2 minuty. Annealing – komplementární hybridizace primerů k oběma denaturovaným vláknům DNA při teplotě 40 až 60 °C v čase 30 – 60 sekund. Syntéza druhého vlákna DNA pomocí DNA polymerázy při teplotě 72 – 74 °C 1 – 2 minuty. Tyto tři kroky se cyklicky opakují 20 – 40 x. Systém PCR-SSP se skládá z několika nezávislých PCR reakcí, každá se specifickým párem primerů.

Reakční směs obsahuje všechny čtyři deoxynukleotidtrifosfáty (dTTP, dGTP, dCTP, dATP), oligonukleotidové primery, PCR pufr, Mg^{2+} ionty. Podmínky PCR reakce musí být optimalizované (koncentrace templátové DNA, koncentrace Mg^{2+} iontů, oligonukleotidových primerů, PCR pufru).

Následuje elektroforetické dělení amplifikovaných úseků DNA a vizualizace PCR produktu pomocí barvičky Gelred, která je obsažena v agarozovém gelu, váže se na DNA a je viditelná v UV záření. Hodnocení spočívá v identifikování přítomnosti či nepřítomnosti PCR produktu v dráze gelu. Vyhodnocení pomocí softwaru Score (Genovision). Používáme komerčně vyráběnou soupravu obsahující všechny potřebné chemikálie a 96-jamkové destičky s lyofilizovanými primery. K nim se přidává reakční

směs obsahující DNA izolovanou z vyšetřovaného vzorku krve, směs deoxynukleotidtrifosfátů, PCR pufr s Mg^{2+} ionty a DNA polymerázu.

Materiál a přístroje k provedení DNA typizace:

DNA vyizolovaná soupravou MPC Nucleic Acid Isolation Kit I. (Roche) automatickou izolací přístrojem MagNA Pure Compact z plné krve na principu magnetické izolace

Typizační souprava Olerup SSP Typing Kit – Genovision (Qiagen) obsahující typizační

destičky s lyofilizovanými primery a PCR Master Mix without Taq

Taq polymeráza koncentrace 5 U/ μ l, TOP BIO

Aqua pro injectione, kat.č. 3500080, B. Braun Medical s.r.o.

DNA žebříček - GeneRuler™ 50bp DNA Ladder, Biogen Praha s.r.o.

TBE pufr, Lékárna IKEM

Gel Red nucleic acid, kat.č. Biot41003, Lab Mark

Elektroforetická souprava, BioRad

Laminární box biohazard HS 18, Haereus

Centrifuga Minispin+, Eppendorf

Třepačka ZX3, Velp Scientifica

Termocykler GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems

Celospektrální spektrofotometr ASP 3700 Avans Biotechnology pro měření koncentrace a čistoty vyizolované DNA

3.10 Statistické vyhodnocení

Při statistickém vyhodnocení jsme výsledky zpracovali pomocí statistického softwaru MedCalc a BMDP statistical software release 8.1.

Skupiny pacientů jsme porovnávali chi-kvadrát testem nebo chi-kvadrát testem s Yatesovou korekcí. Za statisticky významné jsme považovali hodnoty $p < 0,05$.

Vyjádřili jsme pozitivní prediktivní hodnotu testu (PPV) vypovídající o pravděpodobnosti, že pokud stanovíme přítomnost protilátek, dojde k vývoji rejekce. Pro srovnání Kaplan-Meierovy kumulativní křivky doby do selhání štěpu u pacientů, kteří měli v séru před transplantací MICA, s pacienty, kteří neměli MICA protilátky, jsme použili Mantel-Coxův test.

4 Výsledky

V diplomové práci jsme pracovali se souborem 132 pacientů, kteří podstoupili transplantaci ledviny v IKEM v letech 2004 a 2005.

U pacientů jsme vyšetřili z odběrů před transplantací hladiny panel reaktivních protilátek metodou CDC. Před každou transplantací jsme provedli CDC test - křížovou zkoušku mezi dárcem a příjemcem. Negativita crossmatch testu byla podmínkou pro provedení transplantace ledviny. U všech dárců a příjemců jsme provedli typizaci HLA antigenů I. a II. třídy A, B a DR. Na výše uvedených vyšetřeních jsem se podílela v rámci běžného denního provozu laboratoře.

V rámci diplomové práce jsme v celém souboru pacientů retrospektivně detekovali v odběrech v pravidelných časových intervalech od provedené transplantace HLA a MICA specifické protilátky a u všech 132 pacientů jsme sledovali klinický stav, výskyt akutní celulární a humorální rejekce a přežívání transplantovaného orgánu ve vztahu k výskytu a specifitě těchto protilátek v krvi.

4.1 Demografická data

V souboru bylo zastoupeno 82 mužů a 50 žen, zaznamenali jsme 18 selhání funkce štěpu z imunologických příčin, 29 akutních celulárních rejekcí (CR) a 21 případů akutní humorální rejekce (AMR), (tab. 2). Výsledky statistické analýzy nepotvrdily vztah pohlaví k vývoji CR, AMR ani selhání štěpu z imunologických příčin.

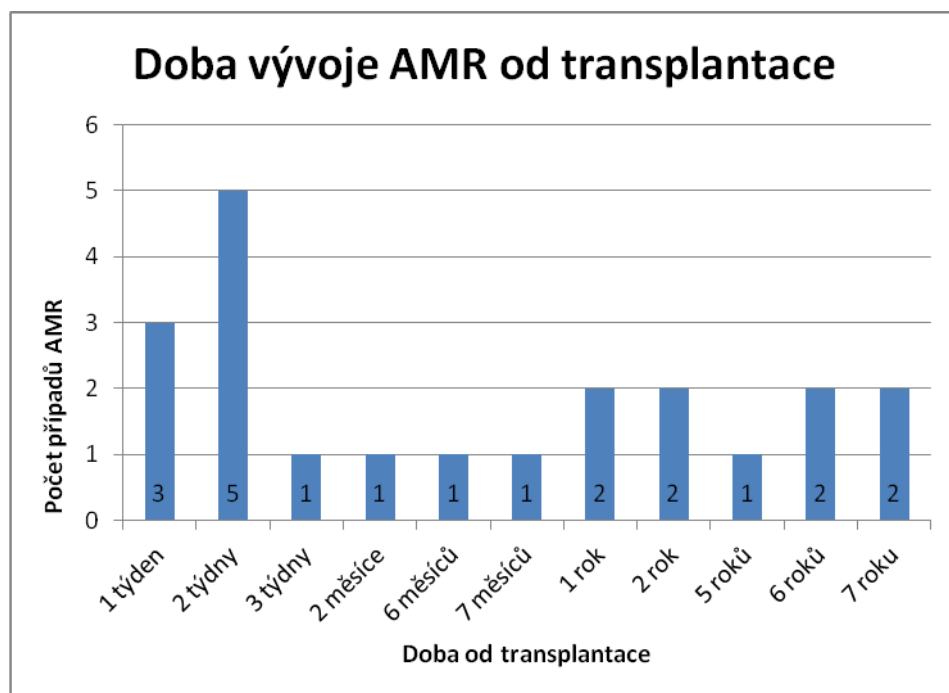
Tab. 2: Demografická data.

Pohlaví	Celkem (n=132)	CR (n=29)	AMR (n=21)	Ztráta štěpu z imunologických příčin (n=18)
mužské	82	15	13	15
ženské	50	14	8	3

4.2 Diagnostika rejekce

Diagnostika AMR a CR byla stanovena na základě posouzení klinického stavu pacienta, laboratorních vyšetření svědčících pro zhoršující se funkci ledvinného štěpu (např. vysoké hladiny sérového kreatininu) a tento nálezn byl potvrzen histologickým vyšetřením (určení typu rejekce podle BANFF klasifikace).

Nejvíce případů AMR se vyskytlo hned po prvním a druhém týdnu po transplantaci (graf 1).



Graf 1: Doba vývoje AMR od transplantace.

Pokud byla u pacientů potvrzena rejekce nebo selhání funkce štěpu a měli jsme k dispozici kryokonzervované lymfocyty dárce, doplnili jsme nález provedením testů CDC a FCXM. Ve všech případech tyto testy potvrdily přítomnost donor specifických protilátek.

Přežití transplantované ledviny v našem souboru 132 pacientů jsme sledovali po dobu 7 let. V této době jsme retrospektivně posuzovali u pacientů vývoj akutní celulární a humorální rejekce a selhání funkce štěpu z imunologických příčin. Snažili jsme se najít souvislost mezi hladinami detekovaných protilátek a vývojem imunologických komplikací u transplantované ledviny. Hodnotili jsme vliv shody v HLA antigenech dárce a příjemce na přežití transplantované ledviny.

Od záměru posoudit vliv imunosupresivní léčby na stav transplantované ledviny jsme museli upustit, protože léčebné protokoly se v průběhu 7 let v souvislosti s aktuálním zdravotním stavem pacientů několikrát měnily. Proto nebylo možné z dohledaných záznamů vytvořit v souboru skupiny se stejnými kombinacemi imunosupresivních léků.

U 21 pacientů s vysokými hladinami PRA před transplantací byla nasazena indukční léčba (velmi intenzivní imunosuprese) ihned po transplantaci. Většina pacientů byla léčena trojkombinací různých inhibitorů kalcineurinu (Cyklosporin A, Takrolimus), antiproliferačně působících imunosupresivních léků (Mykofenolát mofetil, Azathioprin) a kortikosteroidů (Prednison). V případě probíhající rejekce byla nasazena antirejekční terapie (kortikosteroidy, antilymfocytární preparáty atd.).

4.3 Stanovení protilátek a určení jejich specifity

Séra k průkazu protilátek jsme získali z odběrů těsně před transplantací a 3, 6 a 12 měsíců po transplantaci. Ve všech sérech jsme prokazovali přítomnost protilátek proti HLA antigenům a protilátky MICA (tab. 3).

Tab. 3: Počty pacientů a specifity naměřených protilátek v časových intervalech v celém souboru.

HLA protilátky	Před Tx (n=132)	3 měsíce po Tx (n=128)	6 měsíců po Tx (n=110)	12 měsíců po Tx (n=103)
Class I.	59	50	20	19
DSA class I.	17	15	8	9
Class II.	21	29	20	14
DSA class II.	7	5	5	5
MICA	15	19	NT	NT
bez protilátek	62	65	81	78
Class I. + Class II.	19	16	11	8

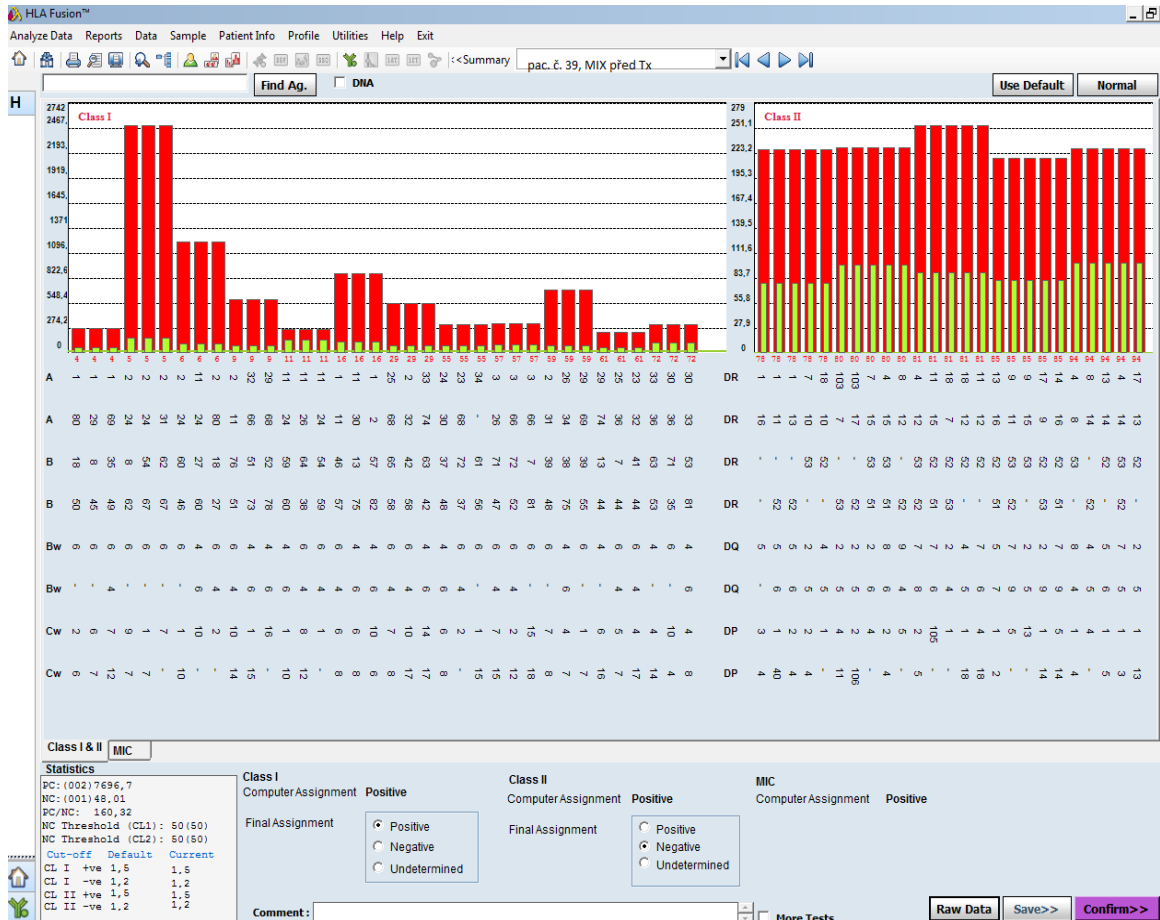
NT= netestováno

Nejdříve jsme pomocí vyšetření LABScreen Mix určili orientačně přítomnost nebo nepřítomnost HLA a MICA specifických protilátek. V případě zachycení positivity protilátek proti I. třídě HLA jsme pokračovali ve vyšetření Luminex LABScreen Single antigen HLA Class I. antibody detection, abychom stanovili přesnou specifitu protilátek proti HLA antigenům I. třídy. Definované protilátky jsme porovnali s antigeny dárce, abychom určili, zda se jedná o donor specifické protilátky. Pokud jsme vyšetřením Luminex LABScreen Mix zachytili protilátky proti II. třídě HLA, pokračovali jsme stejným způsobem vyšetřením Luminex LABScreen Single antigen HLA Class II. antibody detection.

Příklad vyhodnocení specificity protilátek proti HLA antigenům pomocí programu

HLA-FUSION:

Při vyšetření Luminex LABScreen MIX (LS-MIX) jsme v séru pacienta před transplantací zachytili protilátky proti HLA antigenům I. třídy (obr. 6).



Obr. 6: Luminex LABScreen MIX před Tx.

PK = 7 696 MFI

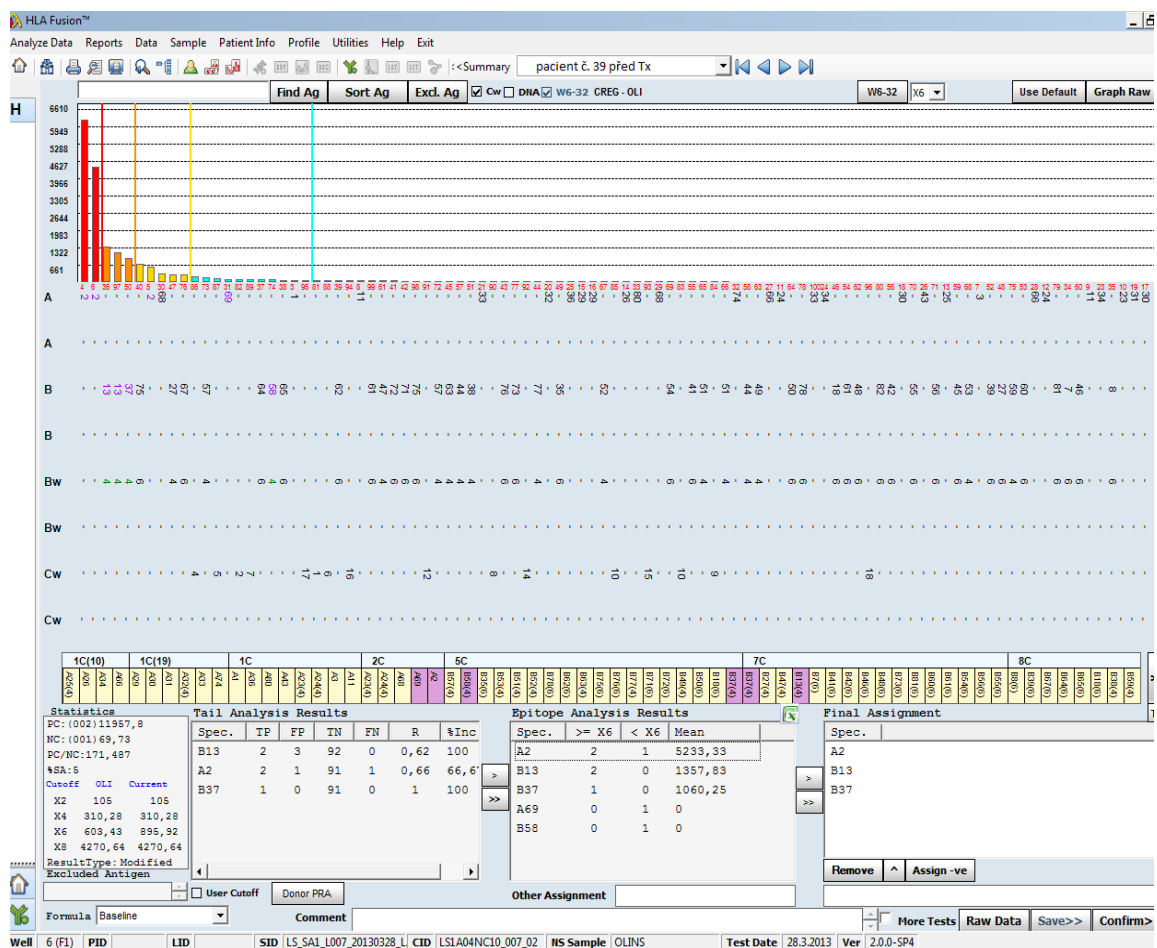
NK = 48 MFI

PK/NK = 160

Cut off pro LS-MIX jsme stanovili 500 MFI. Naměřené hodnoty nad tuto hranici jsme považovali za pozitivní.

Hodnoty protilátek specifických proti I. třídě HLA naměřené v séru před transplantací dosahovaly 2 493 MFI. Protilátky proti II. třídě a MICA byly negativní (MFI nepřesáhlo 255).

Na základě pozitivního výsledku vyšetření Luminex LABScreen Mix jsme provedli vyšetření Luminex LABScreen Single antigen HLA Class I. Antibody detection (LS-SA1).



Obr. 7: Luminex LABScreen Single Antigen class I. před Tx.

PK = 11 957 MFI

NK = 69 MFI

PK/NK = 171

Jako cut off jsme u LS-SA1 stanovili hodnoty nad 1 000 MFI.

Po vyhodnocení softwarem HLA-FUSION byly v měřeném vzorku před transplantací potvrzeny specifické protilátky proti HLA antigenům :

A2 (MFI = 5 233), B13 (MFI = 1 357), B37 (MFI = 1 060).

Porovnáním protilátek přítomných v séru příjemce s typizací HLA antigenů dárce ledviny jsme u tohoto pacienta určili přítomnost donor specifických protilátek proti HLA – A2.

HLA antigeny příjemce:

A3, 24

B35, 51

DR1, 14

HLA antigeny dárce:

A2, 3

B35, 51

DR7, 14

U tohoto pacienta byla jedna neshoda v DR a druhá v A lokusu (DR7, A2).

4.4 Vztah mezi PRA a vznikem akutní rejekce

V našem souboru jsme nenalezli souvislost mezi vysokými hladinami panel reaktivních protilátek (PRA) nad 50% před transplantací s horším přežíváním štěpu nebo s vývojem AMR. To platilo také v případě, kdy jsme za pozitivní posuzovali hladiny PRA už nad 10%.

Porovnali jsme hladiny HLA protilátek před transplantací stanovených metodikou Luminex LABScreen s hladinami panel reaktivních protilátek stanovenými pomocí CDC testu. Pro porovnání obou metodik jsme považovali hladiny PRA 0 – 10% za negativní.

Pomocí koeficientu kappa shody dvou metod jsme v našem souboru významnou shodu neshledali. Pokud jsme do porovnávané skupiny Luminex LABScreen započítali všechny pacienty, kteří měli stanovenou pozitivitu protilátek buď proti první nebo proti druhé třídě HLA, dosáhli jsme pouze slabé shody $\kappa = 0,324$.

4.5 Vliv HLA shody na incidenci akutní rejekce a přežití štěpu

Zaměřili jsme se také na posouzení vlivu shody v HLA antigenech dárce a příjemce (tab. 4) na funkci a přežití transplantovaných orgánů.

Neprokázali jsme spojitost mezi počtem shod v HLA antigenech dárce a příjemce a ztrátou štěpu z imunologických příčin $p = 0,7544$.

Tab. 4: Přehled počtu neshod v ABDR antigenech mezi dárce a příjemcem ledviny.

Počet neshod v ABDR	0 - 1	2	3	4	5	6
Počet pacientů s neshodami (n = 132)	8	23	33	34	19	14

Velmi zajímavý nálezn jsme zaznamenali při posuzování vlivu shody v ABDR antigenech mezi dárce a příjemcem ledviny ve vztahu k vývoji AMR (tab. 5). Pacienti, kteří přijali ledvinu od dárce s úplnou shodou nebo s jednou neshodou v HLA antigenech neměli žádnou rejekci, zatímco 10% pacientů, kteří měli 2 až 4 HLA

neshody, vyvinuli rejekci. Ve skupině pacientů, kteří měli 5 nebo 6 rozdílů s HLA antigeny dárce, se u 35% vyvinula AMR. Statistické porovnání počtu neshod ve vztahu k humorální rejekci v těchto skupinách naznačuje trend k vyšší náchylnosti ke vzniku AMR při 5 a 6 neshodách $p = 0,0600$.

Tab. 5: Počet neshod v ABDR antigenech mezi dárce a příjemcem ledviny ve vztahu k humorální rejekci.

Počet neshod v ABDR	Pacienti bez AMR (n = 111)	Pacienti s AMR (n= 21)	Pacienti s AMR (vyjádřeno v %)
0 - 1	8	0	0
2 - 4	19	2	10
5 - 6	14	5	35

Podobný vztah byl zaznamenán také u celulární rejekce, kdy ve skupině pacientů s úplnou shodou nebo jednou neshodou v HLA antigenech nebyla žádná celulární rejekce. 26% pacientů s 2 až 4 neshodami vyvinulo celulární rejekci a u pacientů s 5 a 6 rozdíly byla incidence celulárních rejekcí 35%.

Statisticky významný se ukázal vztah při jedné nebo dvou neshodách v antigenech HLA II. třídy (DR) v porovnání s pacienty s úplnou shodou v DR antigenech ve vztahu k celulární rejekci (tab. 6). Ve skupině 82 pacientů s 1 až 2 neshodami mělo 24 z nich celulární rejekci, zatímco ve skupině 50 pacientů s úplnou shodou v DR vzniklo jen 5 celulárních rejekcí $p = 0,0292$.

Tab. 6: Počet neshod v DR antigenech ve vztahu k CR, AMR a selhání štěpu.

Neshody v DR	Pacientů celkem (n=131)	CR (n=29)	AMR (n=21)	Ztráta štěpu z imunologických příčin (n=18)
0	81	5	6	7
1 – 2	50	24	15	11

4.6 Souvislost mezi výskytem HLA specifických protilátek a incidencí rejekce

Významnou souvislost mezi protilátkami proti HLA antigenům určenými metodou Luminex LABScreen v séru z odběru před i po transplantaci a vývojem akutní celulární rejekce jsme neprokázali.

Statisticky signifikantní výsledky v souvislosti s detekcí protilátek proti HLA antigenům a vývojem akutní humorální rejekce jsme získali v séru před transplantací a 3 měsíce po transplantaci.

Před transplantací (tab.7) jsme detekovali metodou Luminex u 59 pacientů protilátky proti HLA antigenům I. třídy. Při posuzování souvislostí se vznikem AMR jsme prokázali statisticky významný vztah $p = 0,0272$, pozitivní prediktivní hodnota testu (PPV) vypovídající o pravděpodobnosti, že pokud stanovíme přítomnost protilátek, dojde k vývoji AMR, je 24%.

Signifikantní vztah se potvrdil také mezi výskytem donor specifických protilátek v séru před transplantací a vývojem AMR na hladině významnosti pro DSA I. třídy $p = 0,0070$, PPV 41%, a pro DSA II. třídy $p = 0,0003$, PPV 71,4%.

Přítomnost protilátek před transplantací rovněž významně souvisela s vývojem ztráty funkce štěpu z imunologických příčin, u donor specifických protilátek HLA třídy I. byla prokázána významnost na $p = 0,0160$, PPV 35%.

Nejvýznamnější souvislost mezi protilátkami ve vztahu ke ztrátě funkce štěpu z imunologických příčin byla zjištěna u MICA protilátek, na hladině významnosti $p = 0,0058$, PPV 40%. Ve skupině 15 pacientů s detekovanými MICA protilátkami došlo u 6 z nich k selhání funkce štěpu. Je zde patrný sklon k častější ztrátě funkce štěpu u pacientů s MICA protilátkami před transplantací.

Tab. 7: Protilátky stanovené Luminex LABScreen v odběru před transplantací a souvislost s výskytem akutní celulární a humorální rejekce.

Protilátky před Tx	CR (n=29)	AMR (n=21)	Ztráta štěpu z imunologických příčin (n=18)
class I. (n=59)	NS	$p=0,0272^*$	NS
class II. (n=20)	NS	NS	NS
class I.+ class II. (n=19)	NS	NS	NS
MICA (n=15)	NS	NS	$p=0,0058^{**}$
DSA class I. (n=17)	NS	$p=0,0070^{**}$	$p=0,0160^*$
DSA class II. (n=7)	NS	$p=0,0003^{***}$	NS

NS = není signifikantní

U 128 pacientů se podařilo získat sérum 3 měsíce po transplantaci (tab. 8). U 50 pacientů jsme určili protilátky proti HLA antigenům I. třídy a v této skupině byla v 15 případech prokázána akutní humorální rejekce. Ve skupině zbývajících 72 pacientů, kteří neměli HLA protilátky, pouze u 6 byla diagnostikována AMR. Zachytili jsme tak velmi významnou souvislost $p = 0,0009$, PPV 30%.

Mezi 29 pacienty s protilátkami proti HLA antigenům II. třídy byla prokázána v 9 případech AMR, zatímco ve skupině 99 pacientů bez protilátek byla AMR určena u 12 pacientů. Nalezli jsme tak významný vztah mezi přítomností protilátek proti HLA antigenům II. třídy 3 měsíce po transplantaci a výskytem AMR $p = 0,0329$, PPV 31%.

U 24 pacientů jsme detekovali současně protilátky proti první i druhé třídě HLA antigenů. Zde byl nalezen statisticky významný vztah k vývoji AMR na $p = 0,0053$, PPV testu je 37,5%.

Signifikantně vyšla rovněž souvislost mezi přítomností donor specifických protilátek proti HLA antigenům II. třídy 3 měsíce po transplantaci a vývojem AMR $p = 0,0014$, PPV 80%.

Prokázali jsme vliv protilátek proti HLA antigenům I. třídy, detekovaných 3 měsíce po transplantaci, na vývoj ztráty funkce štěpu z imunologických příčin $p = 0,0200$, PPV 40%.

Tab. 8: Protilátky stanovené Luminex LABScreen v odběru 3 měsíce po transplantaci a souvislost s výskytem akutní celulární a humorální rejekce.

Protilátky 3 měsíce po Tx (n=128)	CR (n=29)	AMR (n=21)	Ztráta štěpu z imunologických příčin (n=18)
class I. (n=50)	NS	p=0,0009	p=0,0200
class II. (n=29)	NS	p=0,0329	NS
class I.+ class II. (n=24)	NS	p=0,0053	NS
MICA (n=19)	NS	NS	NS
DSA class I. (n=15)	NS	NS	NS
DSA class II. (n=5)	NS	p=0,0014	NS

NS = není signifikantní

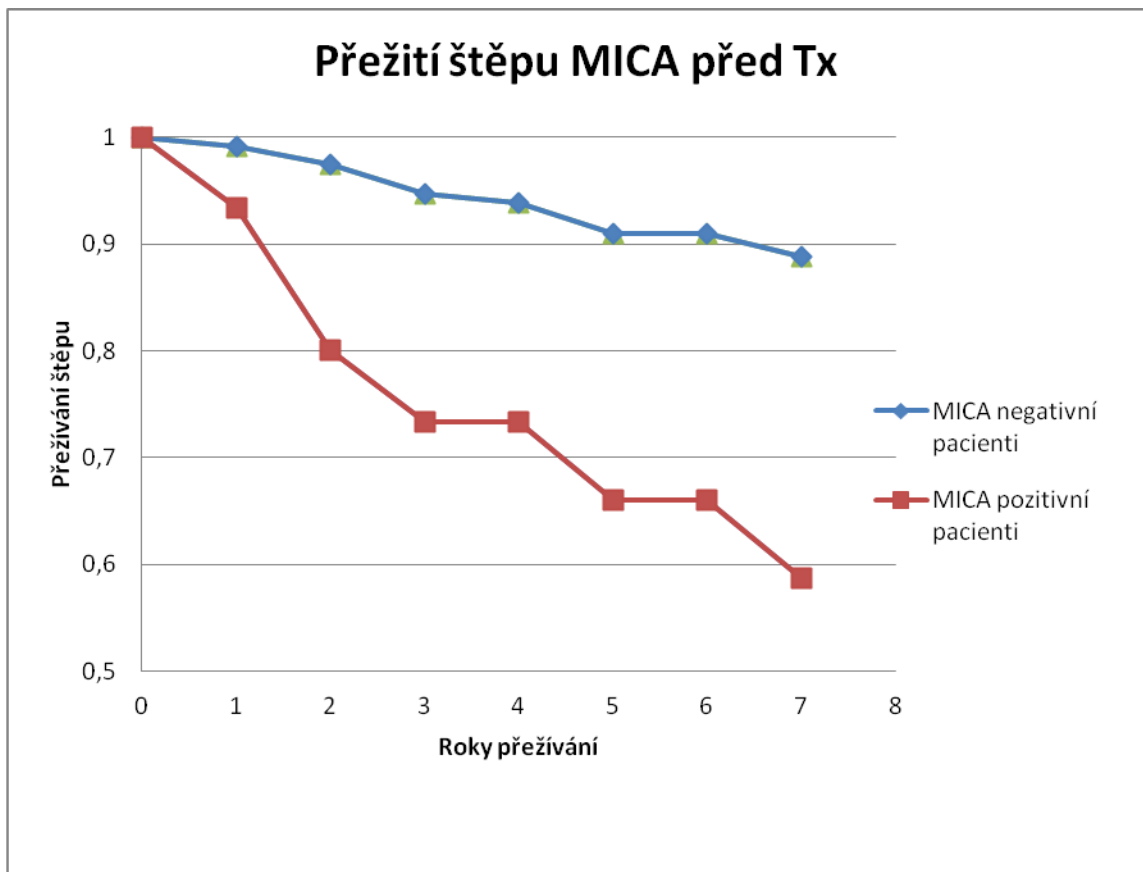
U 110 pacientů ze souboru se podařilo získat séra z odběru 6 měsíců po transplantaci. Šest měsíců po transplantaci byla shledána statisticky významná souvislost mezi nálezem donor specifických protilátek proti II. třídě HLA a rizikem selhání štěpu z imunologických příčin $p = 0,0214$, PPV 60%. Z celkového počtu 110 pacientů vyšetřených 6 měsíců po transplantaci jsme u 5 určili donor specifické protilátky. Z těchto 5 pacientů u 3 došlo ke ztrátě funkce štěpu z imunologických příčin, tzn. 3/5 pacientů s prokázanými DSA.

4.7 MICA protilátky a přežití transplantovaných ledvin

Význam MICA specifických protilátek detekovaných před transplantací se ukázal signifikantní pro imunologické selhání transplantované ledviny. Ze 132 pacientů jsme u 15 stanovili pozitivní MICA protilátky. Z celkového počtu 18 selhání štěpu z imunologických příčin mělo 6 pacientů MICA protilátky před transplantací.

Pro srovnání Kaplan-Meierovy kumulativní křivky doby do selhání štěpu u pacientů, kteří měli v séru před transplantací MICA, s pacienty, kteří neměli MICA protilátky (graf 2), jsme použili Mantel-Coxův test. Křivka přežívání štěpu u pacientů s MICA je statisticky výrazně horší než u pacientů bez těchto protilátek na hladině významnosti $p = 0,0006$. Po sedmi letech bylo přežívání štěpu u pacientů s detekovanými MICA protilátkami před transplantací 59%, zatímco přežívání transplantované ledviny pacientů bez MICA protilátek bylo po sedmi letech 89%.

Výsledky u pacientů s prokázanými protilátkami MICA v odběru 3 měsíce po transplantaci již významný rozdíl nenaznačují.



Graf 2: Závislost přežití štěpu v souvislosti s nálezem MICA protilátek před transplantací.

4.8 Vztah mezi incidencí humorální a celulární rejekce

Je známo, že celulární a humorální rejekce mohou probíhat současně, což může vést k diagnostickým komplikacím. Proto jsme posoudili vztah mezi výskytem celulární a humorální rejekce. U pacientů, kterým byla prokázána akutní celulární rejekce se s pravděpodobností na hladině významnosti $p = 0,0007$ vyvinula také akutní humorální rejekce.

Z celého souboru nemělo rejekci 93 pacientů tj. 70,5% pacientů, 28 pacientů tj. 21% mělo buď CR nebo AMR a u 11 pacientů tj. 8,3% se rozvinuly oba typy rejekcí jak CR tak AMR. 10 pacientů mělo pouze AMR tj. 7,6% a 18 pacientů mělo pouze CR tj. 13,6%.

Další souvislost jsme prokázali na hladině významnosti $p = 0,0001$, PPV 43%, mezi vývojem akutní humorální rejekce a současně ztrátou funkce štěpu z imunologických příčin. Ve skupině 21 pacientů s AMR došlo k 9 ztrátám funkce štěpu z imunologických příčin, zatímco ve skupině 111 pacientů bez AMR bylo zachyceno také 9 ztrát funkce štěpu (tab. 9).

Nebyl nalezen statisticky významný vztah mezi vznikem celulární rejekce a selháním funkce štěpu z imunologických příčin.

Tab. 9: AMR, CR a selhání štěpu z imunologických příčin.

	Pacientů se selháním (n=18)	Pacientů bez selhání (n=114)
AMR (n=21)	9	12
CR (n=29)	7	22

5 Diskuze

Jedním z hlavních imunologických faktorů ovlivňujících výsledek transplantace ledviny jsou HLA specifické protilátky přítomné v krevním oběhu příjemce. Po více než čtyři desetiletí byl jediným testem, který se používal k detekci preformovaných donor specifických protilátek, CDC crossmatch test. Později byly vyvinuty i mnohem citlivější techniky detekce protilátek, jako je ELISA, FCXM a v poslední době xMAP technologie (Luminex). Právě v souvislosti s protilátkami detekovanými metodou Luminex a vlivem těchto protilátek na osud transplantovaného orgánu se v literatuře objevilo nejvíce protichůdných názorů. Některé studie (Lefaucheur et al. 2010; Willicombe et al. 2011) potvrzují vliv takto detekovaných DSA protilátek na přežití transplantované ledviny. Jiné studie (Couzi et al. 2011; Susal et al. 2011) nenalezly souvislost mezi protilátkami definovanými metodou Luminex a rizikem rejekce a selháním štěpu.

V mé diplomové práci jsme chtěli přispět k objasnění klinické relevance HLA a non HLA specifických protilátek definovaných metodikou Luminex.

Přistoupili jsme proto k porovnání HLA protilátek v sérech před transplantací stanovených metodikou Luminex LABScreen s hladinami panel reaktivních protilátek stanovených CDC testem.

Skutečnost, že jsme nenalezli v našem souboru významnou shodu při porovnání těchto dvou testů, se dá vysvětlit odlišností obou metodik. PRA - CDC test zachytí pouze komplement dependentní protilátky, zatímco metodikou Luminex jsme mohli detekovat navíc IgG protilátky neaktivujících komplement (IgG2 a IgG4). Výsledek stanovení hladin PRA záleží na složení panelu buněk, na kterém jsou testovány a který svým

složením odpovídá zastoupení HLA antigenů v určité (české) populaci. Nemusí však zachytit protilátky právě skutečně přítomné ve vyšetřovaném séru.

Naopak u metodiky Luminex můžeme z důvodu zvýšené senzitivity získat falešně pozitivní výsledek, související s problémem technologie výroby SA kuliček. Na povrchu kuliček jsou navázány jak neporušené molekuly HLA I. třídy s β 2-microglobulinem, tak denaturované molekuly HLA I. třídy bez β 2-microglobulinu. To může mít za následek vazbu protilátek se specificitou k denaturované HLA molekule, které by se za normálních fyziologických podmínek nenašly a nemají klinickou hodnotu. Navíc množství HLA molekul přítomných na povrchu polystyrenových kuliček se může lišit od skutečné exprese HLA molekul na buňkách, např. u molekul DQ se předpokládá, že jejich hustota na kuličkách je vyšší, než je ve skutečnosti na povrchu buněk.

Diagnostika humorální rejekce je obtížná, v současné době dosud platí pro transplantace ledvin, že diagnóza AMR požaduje přítomnost DSA v krevním oběhu příjemce současně s nálezem C4d depozit v peritubulárních kapilárách.

Teprve nedávno se potvrdilo, že existují případy, kdy probíhá AMR bez tvorby těchto C4d depozit (bez známek aktivace komplementu). Ukázala se tak nutnost změnit diagnostická kritéria pro AMR. Až v roce 2012 byla vytvořena nová pravidla pro určování humorální rejekce, kdy se bere v potaz také možnost negativity při průkazu C4d složky komplementu. Dosud ale nejsou jasně stanovena kritéria pro diagnostiku a jednotná pravidla pro reprodukovatelnost relevantních znaků k diagnostice AMR nezávislé na C4d v ledvinách se teprve připravují (Mengel et al. 2012). Zde je jednoznačně výhodou metodika Luminex, která detekuje i protilátky neaktivující komplement.

Další komplikaci v diagnostice humorální rejekce může způsobit falešná pozitivita C4d deponit. K pozitivnímu nálezu C4d složky komplementu v biopsiích dochází nejen následkem spuštění klasické cesty aktivace komplementové kaskády tvorbou imunokomplexů antigen-protilátka, ale také lektinovou cestou aktivace komplementu, skrze manosa vázající lektin nebo fikoliny na povrchu různých patogenů. Pozitivita C4d složky komplementu pak nesouvisí s diagnózou AMR.

Naše výsledky potvrdily známý fakt, tj. důležitost významu shody mezi HLA antigeny dárce a příjemce. Shodu jsme posuzovali na základě známé typizace A, B a DR antigenů. Ve statistické analýze není zahrnuta shoda v HLA antigenech Cw, DQ a DP, které v současné době nehrají roli při alokaci dárce ledviny v České republice.

Vzhledem k tomu, že některé studie uvádějí, že také donor specifické protilátky proti HLA antigenům Cw, DP a DQ mohou způsobit akutní humorální rejekci a selhání štěpu (Gilbert et al., 2011), vyvolává to také otázku, zda je dostačující současný způsob alokace dárce podle shody v HLA antigenech A, B a DR. Ve státech patřících pod Eurotransplant a ve Velké Británii se k přítomnosti protilátek proti Cw a DQ přihlíží (virtual crossmatch).

Naše výsledky potvrdily důležitost stanovení protilátek metodou Luminex LABScreen před transplantací. HLA protilátky stanovené před transplantací mají signifikantní výpovědní hodnotu pro předpověď rizika vývoje AMR, obzvláště se pak v naší práci ukázal význam detekovaných donor specifických protilátek HLA I. třídy ($p = 0,0070$) a II. třídy ($p = 0,0003$). Určení těchto protilátek souvisí s rozvojem akutní humorální rejekce, může vést až k selhání funkce štěpu. Při alokaci dárce by se mělo přihlídnout k těmto stanoveným donor specifickým protilátkám a předejít tak rejekci z důvodu, že vybraný dárce má HLA antigeny, proti kterým jsou protilátky namířeny.

Pokud by u pacienta před transplantací byly zjištěny donor specifické protilátky, bylo by vhodné buď tohoto dárce úplně vyloučit, nebo k pacientům s DSA přistupovat s přihlédnutím většího rizika vývoje AMR a podobně jako u hypersenzibilizovaných pacientů, vytipovaných pomocí PRA – CDC testu, připravit pro ně speciální imunosupresivní kombinovanou léčbu, která má u vysoce senzibilizovaných pacientů kladný vliv na přežití a funkci ledviny.

V našem souboru nebyl sledán u pacientů s vysokými hladinami PRA před transplantací vyšší výskyt vývoje imunologických komplikací, jak bychom očekávali. Pro hypersenzibilizované pacienty existuje několik léčebných postupů, plazmaferéza se často kombinuje s používáním antithymocytárních globulinů (ATG), intravenozních globulinů (IVIG), Rituximab, Eculizumab (humanizované monoklonální protilátky) a tato kombinovaná terapie bývá velmi účinná. Proto paradoxně u vysoce senzitivizovaných pacientů, kteří jsou od začátku před a po transplantaci léčeni speciálním režimem, často nemusí vůbec dojít k rozvoji akutní rejekce.

Dalším zjištěním diplomové práce je skutečnost, že v době před transplantací má klinickou výpovědní hodnotu pro přežití štěpu i určení přítomnosti MICA protilátek. Pacienti s MICA protilátkami jsou vystaveni častější ztrátě funkce štěpu než pacienti bez těchto protilátek. Podobný klinický význam MICA protilátek zatím nebyl v literatuře potvrzen.

Naše výsledky rovněž dokazují důležitost nově vytvořených protilátek detekovaných technikou Lumindex 3 měsíce po transplantaci. V této době často dochází k vývoji protilátek jak proti I. tak i II. třídě HLA a význam těchto protilátek se potvrdil v souvislosti s rozvojem akutní humorální rejekce. Protilátky proti I. třídě HLA navíc signifikantně souvisejí se selháním funkce štěpu. Rozhodně má smysl v této době

monitorovat hladiny protilátek, určit včas nově se tvořící (de novo) protilátky a upozornit tak na zvýšenou aktivaci imunitního systému a zvýšené riziko AMR.

Naše výsledky potvrzují, že nejen DSA, ale i non DSA, mohou sloužit po transplantaci jako biomarker rizika vývoje AMR ústící až v selhání štěpu. HLA protilátky non DSA I. třídy ($p = 0,0009$) a II. třídy ($p = 0,0329$) se mohou formovat proti křížově reagujícím epitopům a pak by mohly být považovány za donor specifické. Další možné vysvětlení, proč v séru detekujeme non DSA je, že DSA jsou absorbovány ve štěpu, a tak nemohou být detekovány v séru. Zatímco non DSA cirkulují v krvi, DSA poškozující štěp nemohou být detekovány v krevním oběhu, ale našli bychom je eventuálně v eluátu z rejekovaného orgánu (Cai et al. 2006).

Signifikantní vztah DSA prokázaných metodou Luminex 6 měsíců po transplantaci jsme potvrdili v souvislosti se selháním štěpu.

Protože jsme v našem souboru zaznamenali nejvíce případů výskytu AMR už po prvním a druhém týdnu od transplantace, bylo by vhodné zaměřit se na detekci protilátek už v této časně době po transplantaci.

Jak je známo z literatury, také v našem souboru jsme prokázali, že u pacientů, kteří mají akutní celulární rejekci, je současně vysoké riziko vývoje akutní humorální rejekce.

Přítomnost celulární rejekce znamená zvýšenou aktivitu imunitního systému a zvýšené riziko vývoje AMR.

Potvrdili jsme závažnost akutní humorální rejekce, která signifikantně často končí až selháním funkce štěpu. Že se totéž neprokázalo u diagnostikované akutní celulární rejekce naznačuje, že imunosupresivní léčba zacílená na T buňky, hlavní příčinu probíhající celulární rejekce, je efektivní a v České republice je dobře léčena. Zatímco v léčbě a včasné diagnostice AMR jsou ještě rezervy. AMR se velmi obtížně

diagnostikuje a léčí, terapie pacientů je velmi nákladná a svými vedlejšími účinky někdy může i ohrozit životy pacientů.

Protože naše práce byla prováděna retrospektivně, nebylo možné reagovat na detekované nově vytvořené protilátky nasazením odpovídající léčby a sledovat tak reakce pacientů na cílenou léčbu.

6 Závěr

Naše retrospektivní studie byla zaměřena na vyhodnocení klinické relevance detekce a definice HLA a non HLA specifických protilátek u pacientů před a po transplantaci ledviny metodou Luminex.

1. Detekce a definice protilátek proti HLA antigenům je přínosná pro predikci vývoje protilátkami zprostředkované rejekce po transplantaci ledviny. Potvrdili jsme vztah mezi přítomností donor specifických protilátek proti HLA antigenům I. i II. třídy před transplantací určených pomocí metody Luminex se zvýšenou incidencí protilátkami zprostředkované rejekce po transplantaci.
2. Pacienti s MICA specifickými protilátkami i s donor specifickými protilátkami proti HLA antigenům II. třídy před transplantací mají významně vyšší výskyt selhání štěpu z imunologických příčin.
3. Nově vytvořené protilátky proti HLA antigenům I. i II. třídy a donor specifické protilátky namířené proti HLA antigenům II. třídy detekované technikou Luminex ve třech měsících po transplantaci signifikantně souvisí s vyšším rizikem vývoje AMR. Protilátky proti I. třídě HLA jsou asociovány také s imunologickým selháním štěpu.
4. Detekované protilátky mohou být signálem zvýšené aktivity imunitního systému a horší prognózy pacientů po transplantaci.

Použití metody Luminex pro detekci a definici protilátek proti HLA antigenům je klinicky přínosné pro predikci vývoje protilátkami zprostředkované rejekce jak před transplantací, tak v prvních měsících po transplantaci ledviny.

Na základě našich výsledků můžeme vyvodit doporučení pro praxi:

- Sledování incidence a specificity HLA protilátek metodou Luminex u všech pacientů, kteří podstupují transplantaci ledviny, má značný klinický význam. Největší relevanci má detekce protilátek před transplantací a 3 měsíce po transplantaci.
- U všech pacientů před transplantací by měly být určeny MICA protilátky a výsledek v případě positivity sdělen klinickému pracovišti vzhledem k vyššímu riziku selhání štěpu z důvodu imunologických komplikací.

7 Citace

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S. (2012). Cellular and Molecular Immunology, Elsevier Saunders.
- Billen, E. V., Christiaans, M. H., Doxiadis, II, Voorter, C. E. and van den Berg-Loonen, E. M. (2010). "HLA-DP antibodies before and after renal transplantation." *Tissue Antigens* **75**(3): 278-285.
- Briggs, D., Zehnder, D. and Higgins, R. M. (2009). "Development of non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation: frequency and clinical implications." *Contrib Nephrol* **162**: 107-116.
- Burns, J. M., Cornell, L. D., Perry, D. K., Pollinger, H. S., Gloor, J. M., Kremers, W. K., Gandhi, M. J., Dean, P. G. and Stegall, M. D. (2008). "Alloantibody levels and acute humoral rejection early after positive crossmatch kidney transplantation." *Am J Transplant* **8**(12): 2684-2694.
- Cai, J., Terasaki, P. I., Mao, Q., Pham, T., El-Awar, N., Lee, J. H. and Rebellato, L. (2006). "Development of nondonor-specific HLA-DR antibodies in allograft recipients is associated with shared epitopes with mismatched donor DR antigens." *Am J Transplant* **6**(12): 2947-2954.
- Cooper, J. E., Gralla, J., Chan, L. and Wiseman, A. C. (2011). "Clinical significance of post kidney transplant de novo DSA in otherwise stable grafts." *Clin Transpl*: 359-364.
- Couzi, L., Araujo, C., Guidicelli, G., Bachelet, T., Moreau, K., Morel, D., Robert, G., Wallerand, H., Moreau, J. F., Taupin, J. L. and Merville, P. (2011).

- "Interpretation of positive flow cytometric crossmatch in the era of the single-antigen bead assay." *Transplantation* **91**(5): 527-535.
- Everly, M. J., Everly, J. J., Arend, L. J., Brailey, P., Susskind, B., Govil, A., Rike, A., Roy-Chaudhury, P., Mogilishetty, G., Alloway, R. R., Tevar, A. and Woodle, E. S. (2009). "Reducing de novo donor-specific antibody levels during acute rejection diminishes renal allograft loss." *Am J Transplant* **9**(5): 1063-1071.
- Feucht, H. E. and Mihatsch, M. J. (2005). "Diagnostic value of C4d in renal biopsies." *Curr Opin Nephrol Hypertens* **14**(6): 592-598.
- Haas, M. (2012). "Pathologic features of antibody-mediated rejection in renal allografts: an expanding spectrum." *Curr Opin Nephrol Hypertens* **21**(3): 264-271.
- Klein, J. and Sato, A. (2000). "The HLA system. First of two parts." *N Engl J Med* **343**(10): 702-709.
- Lachmann, N., Terasaki, P. I., Budde, K., Liefeldt, L., Kahl, A., Reinke, P., Pratschke, J., Rudolph, B., Schmidt, D., Salama, A. and Schonemann, C. (2009). "Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts." *Transplantation* **87**(10): 1505-1513.
- Lee, P. C., Zhu, L., Terasaki, P. I. and Everly, M. J. (2009). "HLA-specific antibodies developed in the first year posttransplant are predictive of chronic rejection and renal graft loss." *Transplantation* **88**(4): 568-574.
- Lefaucheur, C., Loupy, A., Hill, G. S., Andrade, J., Nochy, D., Antoine, C., Gautreau, C., Charron, D., Glotz, D. and Suberbielle-Boissel, C. (2010). "Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation." *J Am Soc Nephrol* **21**(8): 1398-1406.

- Mengel, M., Sis, B., Haas, M., Colvin, R. B., Halloran, P. F., Racusen, L. C., Solez, K., Cendales, L., Demetris, A. J., Drachenberg, C. B., Farver, C. F., Rodriguez, E. R., Wallace, W. D. and Glotz, D. (2012). "Banff 2011 Meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection." *Am J Transplant* **12**(3): 563-570.
- Nath, D. S., Basha, H. I. and Mohanakumar, T. (2010). "Antihuman leukocyte antigen antibody-induced autoimmunity: role in chronic rejection." *Curr Opin Organ Transplant* **15**(1): 16-20.
- Otten, H. G., Verhaar, M. C., Borst, H. P., Hene, R. J. and van Zuilen, A. D. (2012). "Pretransplant donor-specific HLA class-I and -II antibodies are associated with an increased risk for kidney graft failure." *Am J Transplant* **12**(6): 1618-1623.
- Patel, R. and Terasaki, P. I. (1969). "Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation." *N Engl J Med* **280**(14): 735-739.
- Reinsmoen, N. L., Lai, C. H., Vo, A., Cao, K., Ong, G., Naim, M., Wang, Q. and Jordan, S. C. (2008). "Acceptable donor-specific antibody levels allowing for successful deceased and living donor kidney transplantation after desensitization therapy." *Transplantation* **86**(6): 820-825.
- Riethmuller, S., Ferrari-Lacraz, S., Muller, M. K., Raptis, D. A., Hadaya, K., Rusi, B., Laube, G., Schneiter, G., Fehr, T. and Villard, J. (2010). "Donor-specific antibody levels and three generations of crossmatches to predict antibody-mediated rejection in kidney transplantation." *Transplantation* **90**(2): 160-167.
- Scornik, J. C., Guerra, G., Schold, J. D., Srinivas, T. R., Dragun, D. and Meier-Kriesche, H. U. (2007). "Value of posttransplant antibody tests in the evaluation of patients with renal graft dysfunction." *Am J Transplant* **7**(7): 1808-1814.
- Seetharam, A., Tiriveedhi, V. and Mohanakumar, T. (2010). "Alloimmunity and autoimmunity in chronic rejection." *Curr Opin Organ Transplant* **15**(4): 531-536.

- Sis, B. and Halloran, P. F. (2010). "Endothelial transcripts uncover a previously unknown phenotype: C4d-negative antibody-mediated rejection." *Curr Opin Organ Transplant* **15**(1): 42-48.
- Slavcev, A. (2013). "Prediction of organ transplant rejection by HLA-specific and non-HLA antibodies--brief literature review." *Int J Immunogenet* **40**(2): 83-87.
- Stastny, P., Ring, S., Lu, C., Arenas, J., Han, M. and Lavingia, B. (2009). "Role of immunoglobulin (Ig)-G and IgM antibodies against donor human leukocyte antigens in organ transplant recipients." *Hum Immunol* **70**(8): 600-604.
- Susal, C., Dohler, B. and Opelz, G. (2009). "Presensitized kidney graft recipients with HLA class I and II antibodies are at increased risk for graft failure: a Collaborative Transplant Study report." *Hum Immunol* **70**(8): 569-573.
- Susal, C., Ovens, J., Mahmoud, K., Dohler, B., Scherer, S., Ruhstroth, A., Tran, T. H., Heinold, A. and Opelz, G. (2011). "No association of kidney graft loss with human leukocyte antigen antibodies detected exclusively by sensitive Luminex single-antigen testing: a Collaborative Transplant Study report." *Transplantation* **91**(8): 883-887.
- Terasaki, P. I. (2003). "Humoral theory of transplantation." *Am J Transplant* **3**(6): 665-673.
- Viklicky, O., Janoušek, L., Baláž, P., a kolektiv (2008). *Transplantace ledviny v klinické praxi*, Grada Publishing, a.s.
- Vongwiwatana, A., Tasanarong, A., Hidalgo, L. G. and Halloran, P. F. (2003). "The role of B cells and alloantibody in the host response to human organ allografts." *Immunol Rev* **196**: 197-218.
- Willicombe, M., Brookes, P., Santos-Nunez, E., Galliford, J., Ballow, A., McLean, A., Roufousse, C., Cook, H. T., Dorling, A., Warrens, A. N., Cairns, T. and Taube,

D. (2011). "Outcome of patients with preformed donor-specific antibodies following alemtuzumab induction and tacrolimus monotherapy." *Am J Transplant* **11**(3): 470-477.

Zinkernagel, R. M. and Doherty, P. C. (1997). "The discovery of MHC restriction." *Immunol Today* **18**(1): 14-17.