

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie

Obor Imunologie



Mgr. Kateřina Rybáková

**METODIKA ELISPOT A PREDIKCE REJEKCE
PO TRANSPLANTACI LEDVINY**

**ELISPOT METHODOLOGY AND PREDICTION OF REJECTION
AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION**

Diplomová práce

Praha 2014

Vedoucí práce: doc. MUDr. Antonij Slavčev, CSc.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala 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

Podpis

Kateřina Rybáková

Poděkování

Děkuji svému školiteli doc. MUDr. Antonij Slavčevovi, CSc. za možnost vypracování diplomové práce. Mé poděkování mu náleží za jeho odborné vedení a věnovaný čas při psaní této závěrečné práce. Děkuji také Mgr. Jeleně Skibové za pomoc se statistickým vyhodnocením výsledků. Vřelé díky patří rovněž Mgr. Evě Svobodové za její cenné rady a Bc. Jitce Brožové nejen za technickou pomoc při pokusech. Zároveň bych chtěla poděkovat své rodině za významnou podporu na studiích.

ABSTRAKT

Nejlepším terapeutickým řešením pro pacienty s chronickým selháním ledvin je transplantace. Celkové přežívání transplantovaných orgánů i pacientů je díky velkému pokroku v imunosupresivní terapii značně vysoké. Na druhou stranu na funkci transplantovaného orgánu se může imunosupresivní léčba podepsat svými nežádoucími vedlejšími účinky – příliš silná imunosuprese se může projevit infekcí či novotvarem, naopak nedostatečná odhojením štěpu. Vzhledem k závažnosti akutní rejekce je hlavním cílem spolupráce klinických lékařů s transplantačními imunology rozdělit pacienty na základě hodnocení imunologických rizikových faktorů do skupin s nízkým, středním a vysokým rizikem rejekce. V literatuře se uvádí, že počty (frekvence) buněk produkujících interferon gama ($IFN\gamma$) před transplantací umožňují identifikovat pacienty s vysokým rizikem akutní celulární rejekce a zároveň predikovat dlouhodobé přežívání štěpu.

V této práci jsme z periferní krve pacientů odebrané před transplantací stanovovali pomocí metody ELISpot (*Enzyme-linked immunosorbent spot assay*) frekvence aktivovaných T lymfocytů specifických vůči antigenům dárce, které během krátké stimulace (24 hodin) produkovaly $IFN\gamma$. Výsledky jsme korelovali s výskytem akutní celulární (ACR) a humorální (AMR) rejekce a dalšími rizikovými faktory.

U našeho souboru pacientů ($n = 47$) s transplantovanou ledvinou od živého dárce se nepodařilo prokázat statisticky významnou korelaci počtů aloreaktivních buněk před transplantací s výskytem akutní rejekce (ACR ani AMR). Přesto naše výsledky naznačují vyšší frekvenci buněk produkujících $IFN\gamma$ u pacientů s ACR i AMR než u pacientů bez rejekce (98 ± 81 a 126 ± 81 vs. 72 ± 70 spotů/50 000 mononukleárních buněk). Tento trend byl ještě výraznější u pacientů s těžší formou ACR (stupeň II), (134 ± 95 vs. 72 ± 70 spotů/50 000 mononukleárních buněk). Pozitivní korelace frekvence buněk produkujících $IFN\gamma$ s počtem neshod v lidských leukocytárních (HLA) antigenech mezi příjemcem a dárcem potvrzuje, že imunitní reakce je převážně namířená proti neshodným HLA antigenům dárce.

Z našich předběžných výsledků vyplývá, že předtransplantační určení počtu aloreaktivních buněk pomocí metody ELISpot je užitečné a může podat důležité informace o stavu T buněčné imunity pacientů před transplantací od živých dárců.

Klíčová slova

HLA antigeny, transplantace ledviny, akutní rejekce, ELISpot, interferon gama.

ABSTRACT

Transplantation is the best therapeutic solution for patients with chronic renal failure. Due to the great advances in immunosuppressive therapy in the last decades, graft and patient survival have improved significantly. On the other hand, immunosuppressive therapy has serious side effects – too strong immunosuppression may lead to infection or malignancies, conversely insufficient immunosuppression may lead to graft rejection. Due to the grave consequences of acute rejection, the main goal of cooperation of clinicians and transplant immunologists is to stratify patients into groups with low, moderate and high risk of rejection based on the evaluation of various immunologic risk factors. There are reports in the literature that the numbers (frequencies) of interferon gamma (IFN γ) producing cells before transplantation may be helpful to identify patients with high risk of acute cellular rejection and to predict long-term survival of the graft.

In this retrospective study we determined the pre-transplant frequencies of activated donor specific T lymphocytes producing IFN γ after short stimulation (24 hrs) by ELISpot (Enzyme-linked immunosorbent spot assay). The results were correlated with the incidence of acute cellular (ACR) and antibody-mediated (AMR) rejection and with other risk factors.

In our cohort of patients ($n = 47$) after kidney transplantation from living donors we did not find a significant correlation between the numbers of alloreactive cells before transplantation and the incidence of acute rejection (neither ACR nor AMR). Nevertheless, our data indicated higher frequencies of IFN γ producing cells in patients with ACR and AMR than in patients without rejection (98 ± 81 a 126 ± 81 vs. 72 ± 70 spots/50 000 mononuclear cells). This tendency was even stronger in patients with the serious form of ACR (grade II), (134 ± 95 vs. 72 ± 70 spots/50 000 mononuclear cells). We found also a positive correlation between the frequencies of IFN γ producing cells and the number of HLA (Human Leukocyte Antigens) mismatches between recipients and donors which confirms that the immune reaction is aimed mostly against mismatched HLA antigens of the donor.

In conclusion, our preliminary results indicate that the pre-transplant determination of the numbers of alloreactive cells by the ELISpot methodology might be useful and may provide important information about patient's T cell immunity before kidney transplantation from living donors.

Key words

HLA antigens, kidney transplantation, acute rejection, ELISpot, interferon gamma.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	3
1 ÚVOD	5
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	7
2.1 HLA antigeny.....	7
2.1.1 HLA antigeny I. třídy (HLA I)	7
2.1.2 HLA antigeny II. třídy (HLA II)	7
2.2 Mechanismus rozpoznání HLA antigenů	8
2.3 Biologie rejekce a mechanismy poškození štěpu	9
2.3.1 Celulární rejekce	10
2.3.1.1 Role pomocných T lymfocytů v rejekci	12
2.3.1.2 Role cytotoxických T lymfocytů v rejekci	13
2.3.2 Rejekce zprostředkovaná protilátkami	14
2.3.2.1 Hyperakutní rejekce.....	15
2.3.2.2 Akutní humorální rejekce	15
2.3.3 Diagnostika rejekce	16
2.4 Imunosupresivní léčba a její rizika	16
2.4.1 Indukční imunosuprese	16
2.4.2 Udržovací imunosuprese.....	17
2.5 Hodnocení rizika rejekce.....	17
2.5.1 Molekulární a solubilní biomarkery rejekce.....	18
2.5.1.1 Solubilní CD30	18
2.5.1.2 Dipeptidylpeptidasa IV (CD26)	18
2.5.1.3 Intracelulární koncentrace ATP	19
2.5.2 Detekce B buněčné senzitivace	19
2.5.2.1 Panel-reaktivní protilátky (PRA).....	19
2.5.2.2 Protilátky specifické vůči antigenům dárce (DSA)	19
2.5.2.3 Protilátky proti non-HLA antigenům.....	20
2.5.3 Detekce T buněčné senzitivace	20
2.5.3.1 Proliferace T buněk	20
2.5.3.2 Cytotoxická aktivita	21

2.5.3.3	Cytokiny jako biomarkery rejekce	21
2.5.3.3.1	Průtoková cytometrie v detekci cytokinů	22
2.5.3.3.2	ELISpot v detekci cytokinů	22
3	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	24
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
4.1	Schéma pokusu	25
4.2	Použité chemikálie, materiál a přístroje	26
4.2.1	Chemikálie.....	26
4.2.2	Přístroje.....	26
4.3	Metody.....	27
4.3.1	Příprava odpovídajících a stimulujících buněk	27
4.3.1.1	Izolace buněk z periferní krve	27
4.3.1.2	Výroba směsi kontrolních buněk (POOL)	27
4.3.1.3	Zmrazování buněk	28
4.3.1.4	Rozmrazování buněk	28
4.3.1.5	Smíšené lymfocytární kultury (MLC)	28
4.3.2	<i>Enzyme-linked Immunosorbent spot (ELISpot) assay</i>	29
4.3.3	Statistické zpracování dat	30
5	VÝSLEDKY	31
5.1	Rizikové faktory a výskyt akutní celulární rejekce	31
5.2	Rizikové faktory a výskyt akutní humorální rejekce.....	36
5.3	ELISpot ve srovnání s dalšími rizikovými faktory rejekce.....	41
6	DISKUZE	43
7	ZÁVĚRY	47
8	KLASIFIKACE CD MOLEKUL	48
9	SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK.....	49
10	LITERATURA	50

SEZNAM ZKRATEK

<i>Zkratka</i>	<i>Anglický název</i>	<i>Český název</i>
ACR	Acute cellular rejection	Akutní celulární rejekce
Ag	Antigen	Antigen
ALP	Alcaline phosphatase	Alkalická fosfatasa
AMR	Acute antibody mediated rejection	Akutní rejekce zprostředkovaná protilátkami (humorální rejekce)
APC	Antigen presenting cell	Buňka prezentující antigen
ATG	Antithymocyte globuline	Antithymocytární globulin
ATN	Acute tubular necrosis	Akutní tubulární nekróza
ATP	Adenosine triphosphate	Adenosintrifosforečná kyselina
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát / nitrotetrazoliová modř
CDC	Complement dependent cytotoxicity assay	Komplement dependentní cytotoxický test
CTL	Cytotoxic T lymphocyte	Cytotoxický T lymfocyt
ČR	Czech Republic	Česká republika
DC	Dendritic cell	Dendritická buňka
DL	Kidney donor	Dárce ledviny
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonukleová kyselina
DSA	Donor specific antibodies	Donor-specifické protilátky
DTH	Delayed type hypersensitivity	Přecitlivělost oddáleného typu
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	
ELISpot	Enzyme-linked immunosorbent spot assay	
FACS	Fluorescence-activated cell sorting	Průtoková cytometrie
FCS	Fetal calf serum	Fetální telecí sérum
FCXM	Flow cytometry crossmatch	Křížová zkouška využívající průtokové cytometrie
GPI	Glycosylphosphatidylinositol	Glykosylfosfatidylinositol

HLA (I/II)	Human leukocyte antigen (class I/II)	Lidské leukocytární antigeny (I./II. třídy)
IFNγ	Interferon gamma	Interferon gama
Ig	Immunoglobulin	Imunoglobulin
IKEM	Institute for Clinical and Experimental Medicine	Institut klinické a experimentální medicíny
IL	Interleukin	Interleukin
IS	Immunosuppressive	Imunosupresivní
IVIG	Intravenous immunoglobulin	Intravenózní imunoglobulin
LDA	Limiting dilution assay	Analýza limitního ředění
MHC	Major histocompatibility complex	Hlavní histokompatibilní komplex
MICA/MICB	MHC class I polypeptide-related sequence A/B	
MLC	Mixed lymphocyte cultures	Smíšené lymfocytární kultury
NK	Natural killer cell	Přirozený zabijáč
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell	Mononukleární buňky v periferní krvi
PBS	Phosphate buffered saline	Fosfátový pufr
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerázová řetězová reakce
PCR-SSP	PCR-Sequence-specific primer	PCR se sekvenčně specifickým primerem
PCR-SSOP	PCR-Sequence-specific oligonucleotide probe	PCR se sekvenčně specifickou oligonukleotidovou sondou
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce
PL	Kidney recipient	Příjemce ledviny
PRA	Panel reactive antibodies	Panel-reaktivní protilátky
SI	Stimulation index	Stimulační index
TCR	T cell receptor	T buněčný receptor
Th	Helper T lymphocyte	Pomocný T lymfocyt
TGFβ	Transforming growth factor beta	Transformující růstový faktor beta
TNFα/β	Tumour necrosis factor	Faktor nekrotizující nádory
Treg	Regulatory T lymphocyte	Regulační T lymfocyt

1 ÚVOD

Transplantace je nejlepším terapeutickým řešením pro pacienty s chronickým selháním ledvin. Transplantovaní pacienti mají ve srovnání s pacienty na dialyzační léčbě výrazně lepší kvalitu života a nižší riziko úmrtí (Viklický, 2008). V České republice (ČR) probíhá program transplantace ledviny v sedmi transplantačních centrech (Institut klinické a experimentální medicíny (IKEM) v Praze, Centrum kardiovaskulární a transplantační chirurgie v Brně, Transplantační centrum fakultní nemocnice Motol v Praze, Ostravě, Olomouci, Plzni a v Hradci Králové). První transplantace ledviny v ČR proběhla ve fakultní nemocnici v Hradci Králové v roce 1961. V současné době je více než polovina transplantací ledvin v ČR provedena v IKEM. V letech 1990 až 2006 proběhlo v ČR 5 742 transplantací ledviny, z toho 306 od žijícího dárce. V počtu transplantovaných ledvin na 1 milión obyvatel se ČR řadí mezi vyspělé státy Evropy (Koordinační Středisko Transplantací, Praha).

Dlouhodobé přežívání transplantovaného orgánu (štěpu) závisí na řadě imunologických a neimunologických faktorů. Imunitní reakce příjemce, která vzniká po transplantaci a je zaměřená proti štěpu, je tlumena podáváním imunosupresivních (IS) léků. Za posledních 20 let se díky velkému pokroku v imunosupresivní terapii výrazně zvýšila úspěšnost přežívání transplantovaných orgánů. Dlouhodobé působení IS léků má ale závažné vedlejší účinky. Nežádoucí účinky se projevují jak u nedostatečné – ztráta štěpu v důsledku odhojení (reakce), tak i u příliš silné IS terapie – vznik infekcí, malignit atp.

Kvůli závažnosti akutní reakce, která může ohrozit funkci transplantovaného orgánu a v určitých případech i život pacientů, a zároveň kvůli vedlejším účinkům IS léčby je klinicky velmi důležité rozdělit pacienty do skupin s nízkým, středním či vysokým rizikem reakce ještě před transplantací.

V současnosti jsou známy mnohé metody poskytující informace o imunitním stavu pacienta před i po transplantaci. B buněčná imunita se hodnotí pomocí detekce a specifikace protilátek proti antigenům dárce, zatímco charakterizace T buněčné imunity je většinou hodnocena pomocí stanovení exprese genů kódujících prozánětlivé cytokiny, testů hodnotících cytotoxickou aktivitu T lymfocytů ad.

Středem zájmu se v posledních letech stala metoda ELISpot (*Enzyme-linked immunosorbent spot assay*), díky níž je možné stanovit počty (frekvence) efektorových či paměťových buněk, které již po krátké stimulaci secernují různé cytokiny, např. interferon gama (IFN γ), interleukiny (IL-2, IL-4, IL-10) ad.

Tato diplomová práce se zaměřuje na charakterizaci významu určení frekvence buněk produkujících $\text{IFN}\gamma$ po stimulaci buněk příjemcových s buňkami dárcovými ve smíšených lymfocytárních kulturách pro předpověď rizika vývoje akutní rejekce po transplantaci ledviny.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 HLA antigeny

Lidské leukocytární antigeny (*Human Leukocyte Antigens*, HLA) jsou polymorfní glykoproteiny a patří do imunoglobulinové superrodiny. Geny kódující antigeny HLA patří do systému hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) člověka a nachází se na krátkém raménku 6. chromosomu. Hlavní úlohou HLA antigenů je prezentovat peptidy vlastního nebo cizího původu buňkám imunitního systému.

Antigeny pocházející z tkáně transplantovaného orgánu (štěpu) zpravidla vyvolávají silnou imunitní reakci. Významnou roli v jeho odhojení hraje rozpoznání obou základních skupin HLA antigenů – HLA antigenů I. a II. třídy (Klein and Sato, 2000a, b).

2.1.1 HLA antigeny I. třídy (HLA I)

HLA antigeny I. třídy (HLA I) dělíme na klasické (Ia) a neklasické (Ib). Klasické HLA I mají na svém povrchu všechny jaderné buňky a řadíme sem HLA-A, -B a -C. Neklasické HLA antigeny I. třídy, HLA-E, -F a -G, se vyskytují pouze na některých buněčných typech a jejich polymorfismus je omezený.

HLA glykoproteiny I. třídy jsou tvořeny transmembránovým α řetězcem a β_2 -mikroglobulinem, jehož gen je (na rozdíl od genu pro α řetězec) kódován na 15. chromosomu. HLA I jsou syntetizovány na povrchu endoplazmatického retikula, v jehož lumen pak vážou krátké peptidy intracelulárního (vlastního nebo virového) původu (Klein and Sato, 2000a, b).

2.1.2 HLA antigeny II. třídy (HLA II)

HLA-DR, -DP a -DQ aj. jsou známé jako HLA antigeny II. třídy (HLA II) a nacházejí se pouze na povrchu určité skupiny imunitních buněk, jako jsou B lymfocyty, aktivované T lymfocyty, makrofágy, dendritické buňky a thymové epiteliální buňky. Za určitých podmínek (přítomnost interferonu gama, $IFN\gamma$) mohou na svém povrchu exprimovat antigeny II. třídy i další buňky (epiteliální, tubulární buňky ledviny atd.).

HLA II jsou tvořeny dvěma nekovalentně asociovanými transmembránovými podjednotkami α a β . Oba řetězce jsou syntetizovány na membránách endoplazmatického retikula obdobně jako HLA I. Na rozdíl od nich však do vazebního místa tvořeného *N*-terminálními doménami obou řetězců vážou tzv. invariantní řetězec, aby nedošlo

k předčasné vazbě peptidů. Transportní váčky obsahující HLA II fúzí s endosomy pod cytoplazmatickou membránou, kam jsou přes Golgiho aparát transportovány. Působením proteas a výměnného proteinu DM přítomných v endosomu (pH 6) je invariantní řetězec vyměněn za peptidy extracelulárního původu, které se do buňky dostávají prostřednictvím fagocytózy (Klein and Sato, 2000a, b).

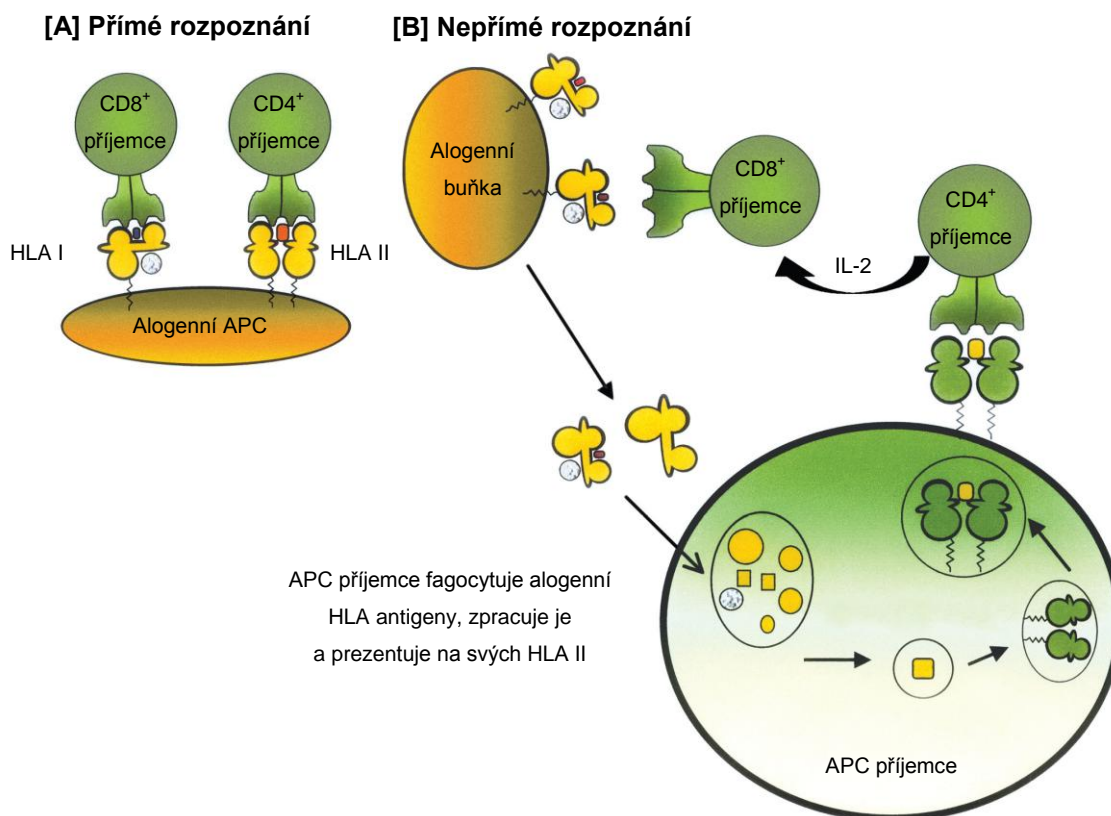
2.2 Mechanismus rozpoznání HLA antigenů

HLA molekuly jsou rozpoznávány T lymfocyty pomocí jejich T buněčných receptorů (TCR) a koreceptorů (CD4, nebo CD8). Pomocné T lymfocyty (Th) interagují s HLA II prostřednictvím povrchové molekuly CD4, zatímco cytotoxické T lymfocyty (CTL) vytváří vazbu s HLA I pomocí jejich koreceptoru CD8. Pro úspěšnou aktivaci naivních T lymfocytů nestačí prostá vazba HLA/peptid/TCR, nýbrž jsou vyžadovány další kostimulační signály (interakce CD28/CD80 nebo CD28/CD86, anebo CD40/CD154). Ty dostávají od profesionálních buněk prezentujících antigen (APC) nebo od B lymfocytů. Teprve poté je zprostředkován přenos signálu do buňky pomocí asociovaných proteinů CD3 komplexu (řetězce γ , δ , ϵ , ζ , η), (Hořejší and Bartůňková, 2009).

HLA antigeny štěpu, tzv. aloantigeny¹, identifikuje imunitní systém příjemce buď přímo na dárcových APC, nebo nepřímo prostřednictvím vlastních APC, které prezentují MHC molekuly pocházející ze štěpu na svých HLA antigenech (Obr. 1). V závislosti na okolních podmínkách (cytokinovém prostředí) diferencují T lymfocyty v jednotlivé buněčné podtypy a ty pak v transplantovaném orgánu spouští efektorovou fázi rejekce.

T lymfocyty rozpoznávající aloantigeny přímo na APC dárce hrají hlavní roli v procesu časně rejekce (Liu et al., 1993). Po měsíci uplynulém od transplantace se již ale více uplatňují buňky, které rozpoznávají aloantigeny nepřímo (Baker et al., 2001, Lee et al., 2001).

¹ Aloantigeny – antigeny transplantovaného orgánu pocházejícího od jedince stejného druhu jako příjemce ale lišícího se svým genetickým kódem.



Obr. 1 Přímé [A] a nepřímé [B] rozpoznání alogenních HLA antigenů.

[A] Alogenní HLA antigeny mohou být přímo rozpoznávány na APC dárce pomocnými (HLA II) i cytotoxickými (HLA I) T lymfocyty příjemce. [B] Na druhou stranu nepřímé rozpoznání aloantigenů na vlastních APC zprostředkovávají pouze pomocné T lymfocyty. Ty ale mohou cytotoxické T lymfocyty k přímému rozpoznávání HLA antigenů stimulovat. Aby APC příjemce mohly prezentovat aloantigeny dárce na svém povrchu, musí je nejprve fagocytovat, poté zpracovat v krátké peptidy, které jsou následně v endosomu asociovány s HLA antigeny II. třídy.

Upraveno dle (Hernandez-Fuentes et al., 2003).

Vysvětlivky: APC – buňka prezentující antigen, CD4 / CD8 – povrchové koreceptory T lymfocytů, HLA I / II – lidské leukocytární antigeny I. / II. třídy, IL-2 – interleukin 2.

2.3 Biologie rejekce a mechanismy poškození štěpu

Dlouhodobé přežívání štěpu je závislé na řadě imunologických a neimunologických faktorů. Imunitní reakci proti transplantovanému orgánu vyvolávají např. neshody příjemce a dárce v polymorfních systémech, jako jsou HLA a non-HLA antigeny.

Extrémní polymorfismus HLA antigenů je přes značné výhody v evoluci a obraně proti patogenům překážkou pro transplantace orgánů. Kvůli obrovské rozmanitosti je shoda mezi dárce a příjemcem v těchto antigenech dosažitelná jen s obtížemi. Dokonce až 10 % T lymfocytů příjemce je schopno přímo rozpoznávat a odpovídat na jednotlivé cizí HLA

molekuly. Také díky tak vysokému počtu aloreaktivních T buněk vyvolávají transplantované orgány *in vivo* prudkou imunitní reakci. Dlouhodobé přežívání štěpu omezují nejen aloreaktivní T lymfocyty, ale i preformované či přirozené protilátky – aloprotilátky, které také rozpoznávají HLA antigeny. K odhojení (rejekci) transplantovaného orgánu může dojít vzhledem k aktivitě imunitního systému (stupni presenzitizace) příjemce před transplantací. Opakované výskyty rejekcí mohou rovněž zvyšovat riziko dalšího vzniku rejekce.

Mezi neimunologické rizikové faktory rejekce patří např. věk pacienta a dárce (de Fijter et al., 2001, Oppenheimer et al., 2004, Fuggle et al., 2010, Hricik et al., 2013), zdravotní komplikace dárce před odběrem orgánů (hypo- / hypertenze, obezita, hyperlipidémie, diabetes, smrt v důsledku srdečního selhání) nebo dlouhotrvající dialýza pacienta před transplantací (Augustine et al., 2007). Dále do této kategorie můžeme zařadit etnický původ dárce nebo příjemce (Molnar et al., 2013) či celkový stav orgánu (délka studené ischémie, chirurgické a jiné stresové faktory), (Harris and Rumbaut, 2001).

Transplantace ledviny od živého dárce bývají většinou úspěšnější právě díky krátké manipulační a ischemické době, třebaže mohou mít tyto páry vyšší počet neshod v HLA antigenech (Fuggle et al., 2010). Ischémie a následná reperfúze vyvolává na buňkách štěpu zvýšenou expresi HLA antigenů a zároveň působí uvolňování chemokinů, prozánětlivých cytokinů a adhezivních molekul. Všechny tyto faktory pak zvyšují nejen buněčnou infiltraci štěpu, ale také celkovou imunologickou odpověď proti němu, což logicky zvyšuje riziko rejekce (Harris and Rumbaut, 2001, Kim et al., 2008).

Rejekce jsou tradičně děleny dle uplynulé doby od transplantace na hyperakutní, akutní a chronické. Lze je ovšem také dělit na základě dalších faktorů, např. podle typu hlavních aktérů v imunitní odpovědi (buněčná a humorální – rejekce zprostředkovaná protilátkami) či patofyziologických změn, které se během rejekce uskuteční (intersticiální, vaskulární, endoteliální), nebo na základě stupně závažnosti, a tedy i rozsahu poškození.

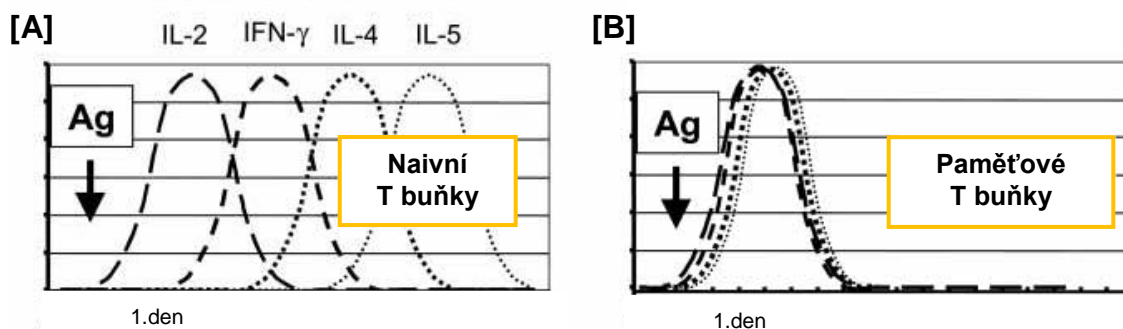
2.3.1 Celulární rejekce

V průběhu celulární rejekce jsou zapojené složky vrozené (dendritické buňky, makrofágy) i adaptivní imunity (CD4⁺ i CD8⁺ T lymfocyty), které spolu úzce spolupracují a podílí se na akutní i chronické rejekci. Základní podmínkou celulární rejekce je schopnost T lymfocytů rozpoznat HLA antigeny dárce.

Poté co naivní T lymfocyty rozeznají komplex HLA/peptid, uvolní v průběhu 24 h interleukin 2 (IL-2). Během následujících 3 až 6 dní pak aktivované buňky diferencují v buňky efektorové, které secernují další cytokiny jako např. interferon gama (IFN γ), IL-4,

IL-5 aj. Část efektorových buněk pak diferencuje v buňky paměťové. Ty mohou vznikat přímo po setkání s aloantigeny dárce, anebo zkříženou reakcí po kontaktu s antigenem patogenního původu (Pantenburg et al., 2002, Macdonald et al., 2009). Paměťové buňky se od buněk naivních liší nejen povrchovými znaky, ale především požadavky nutných pro aktivaci.

Pro aktivaci naivních T lymfocytů je nutné dosáhnout určitého aktivačního prahu, tj. interakce daného množství molekul HLA a TCR receptorů s příslušnou kostimulací. Na druhou stranu buňky paměťové mají tento práh nízký. Díky tomu po opětovném setkání s antigenem rychle proliferují a spouští produkci cytokinů již během několika hodin (4–12 h po stimulaci), (Obr. 2), (Rogers et al., 2000). K aktivaci jim stačí nejen rozeznat méně komplexů HLA/peptid, nýbrž ani nepotřebují dostávat patřičné kostimulační signály (CD28/CD80, CD28/CD86 nebo CD40/CD154), (London et al., 2000). Paměťové T lymfocyty navíc dokážou rozpoznávat aloantigen nejen na profesionálních APC, ale i na buňkách endotelu, B lymfocytech atd. (Bingaman and Farber, 2004).



Obr. 2 Posloupnost produkce cytokinů po rozeznání HLA antigenů u naivních [A] a paměťových [B] T lymfocytů.

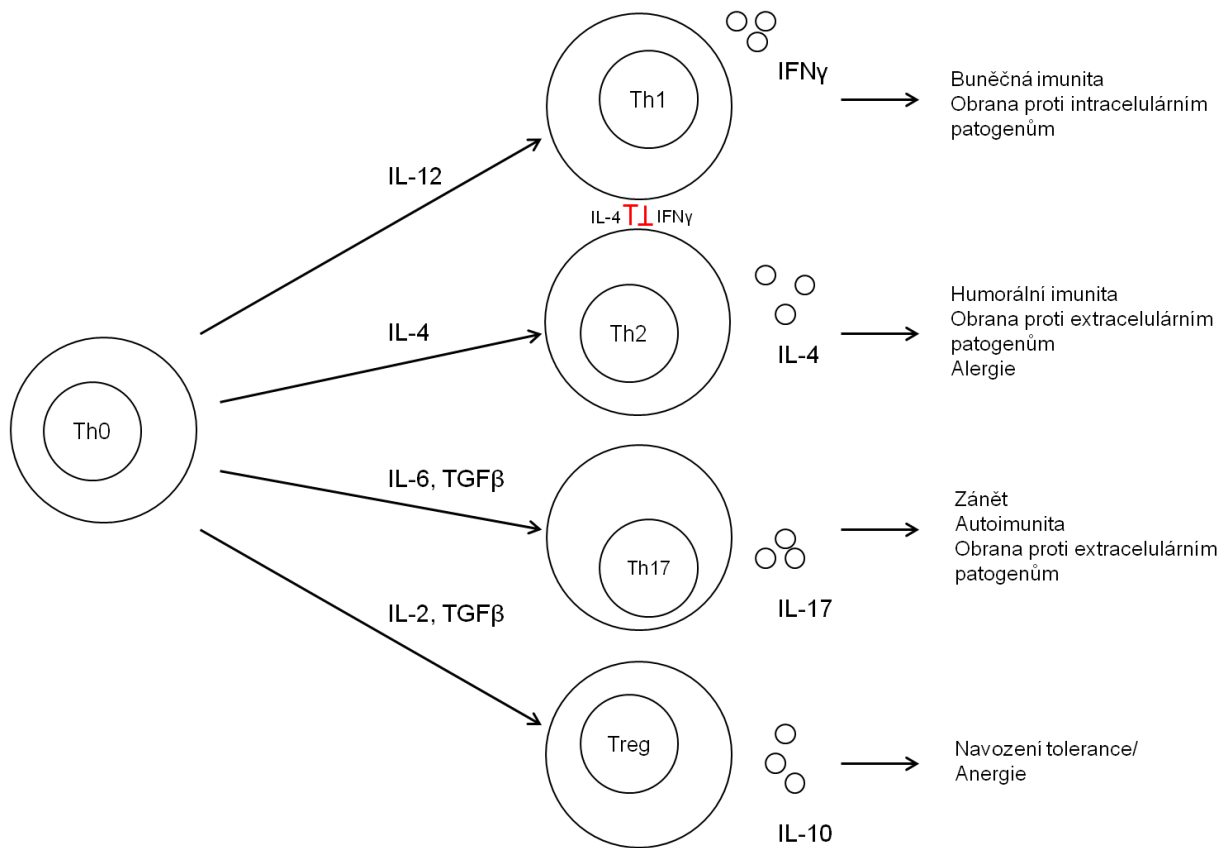
[A] Naivní T lymfocyt, který právě rozpoznal komplex HLA/peptid, uvolňuje nejprve IL-2. Teprve po několika dnech začíná produkovat další cytokiny. [B] Na druhou stranu paměťový T lymfocyt secernuje širokou škálu cytokinů již krátce po stimulaci. Upraveno podle (Volk and Kern, 2001).

Vysvětlivky: Ag – antigen, IFN γ – interferon gama, IL-2 / -4 / -5 – interleukin 2 / 4 / 5.

Udržování paměťových buněk v těle má své evoluční opodstatnění (účinné v obraně proti infekcím), na druhou stranu v současnosti představuje velký problém pro transplantaci imunologii. Paměťové T lymfocyty totiž také hrají roli v akutní rejekci a na rozdíl od naivních buněk se těžko eliminují. Pokud nejsou paměťové buňky včas zaznamenány, může dojít k vážnému poškození štěpu již krátce po transplantaci (Bingaman and Farber, 2004, Brook et al., 2006, Valujskikh, 2006).

2.3.1.1 ROLE POMOCNÝCH T LYMFOCYTŮ V REJEKCI

V závislosti na cytokinovém prostředí diferencují $CD4^+$ buňky, které rozpoznaly HLA II s navázaným peptidem, v řadu různých buněčných podtypů (Th1, Th2, Th17, Treg² ad.), (Obr. 3). Jednotlivé populace pomocných T lymfocytů pak spouští charakteristický typ odpovědi.



Obr. 3 Diferenciace $CD4^+$ T lymfocytů v buněčné podtypy na základě cytokinového prostředí.

Poté co naivní $CD4^+$ T lymfocyty rozpoznají komplex HLA II/peptid, diferencují v různé buněčné podtypy, které uvolňují charakteristické cytokiny a zapojují se do různých typů imunitní odpovědi. Upraveno dle (Jetten, 2009).

Vysvětlivky: IFN γ – interferon gama, IL-2 / -4 / ... – interleukin 2 / 4 / ..., TGF β – transformující růstový faktor beta, Th0 – naivní pomocný T lymfocyt, Th1 / 2 / 17 – diferencovaný pomocný T lymfocyt, Treg – regulační T lymfocyt.

V přítomnosti IL-12 dochází k diferenciaci naivních T lymfocytů ve směru Th1. Charakteristické cytokiny uvolňované Th1 lymfocyty jsou interferon gama, faktor nekrotizující nádory alfa (TNF α) a IL-2, které svým působením vedou k zánětlivé odpovědi.

² Treg – regulační T lymfocyty.

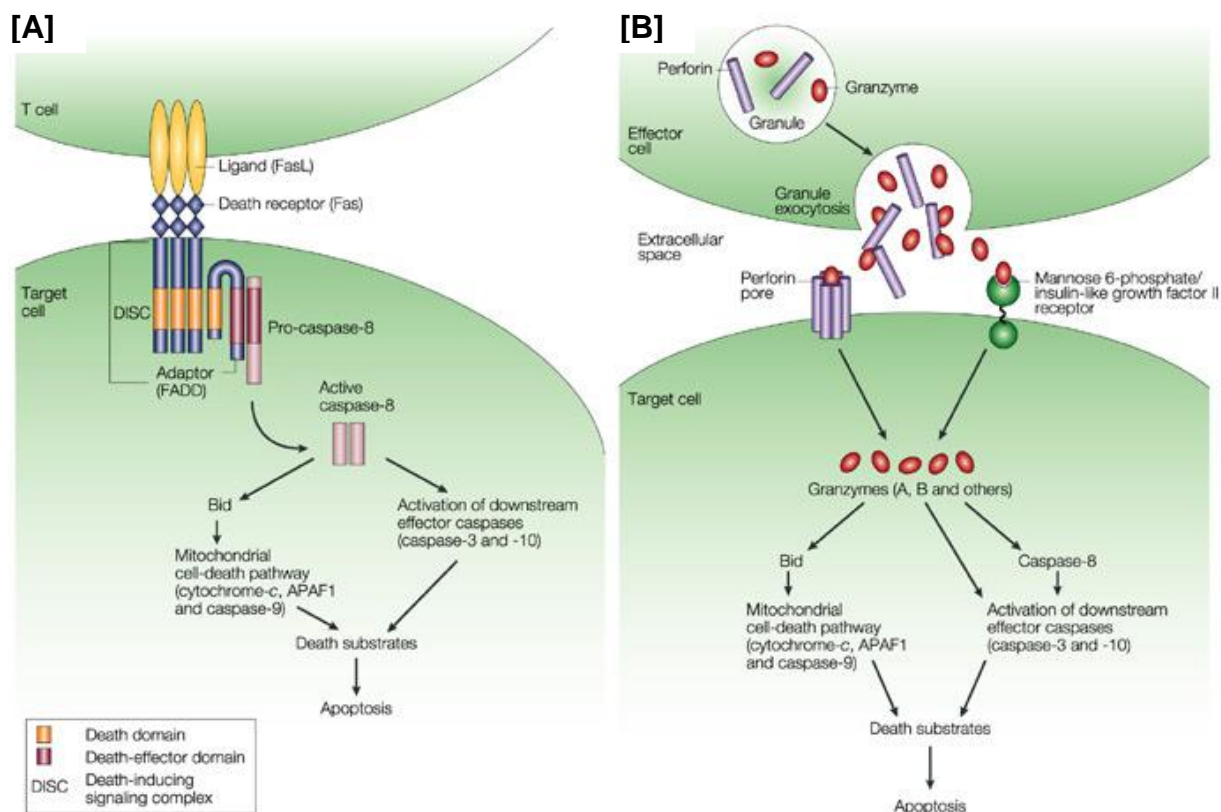
Stejně jako Th1 má i další typ pomocných T lymfocytů – Th17 prozánětlivé účinky. Diferencované efektorové T lymfocyty infiltrují štep, kde spouští odpověď typu oddálené přecitlivělosti (DTH) a zprostředkovávají přímou cytotoxicitu.

Pokud kontakt naivního CD4⁺ T lymfocytu s APC proběhne v prostředí s IL-4, dojde k rozvoji odpovědi ve směru Th2. Th2 lymfocyty stimulují přesmyk a produkci protilátek B lymfocyty, které také hrají roli v imunitní reakci namířené proti transplantovanému orgánu. Th2 lymfocyty dále aktivují eozinofily, které mohou štep vážně poškodit prostřednictvím enzymů obsažených v jejich granulích (Le Moine et al., 2002).

2.3.1.2 ROLE CYTOTOXICKÝCH T LYMFOCYTŮ V REJEKCI

Aloreaktivní CD8⁺ T buňky aktivované přímou cestou diferencují na cytotoxické efektorové buňky (CTL), které zabíjejí všechny jaderné buňky štepu exprimující alogenní HLA molekuly I. třídy. CD8⁺ cytotoxické T lymfocyty aktivované nepřímou cestou jsou „selfrestringované“ a nedokážou přímo zabít cizí buňky štepu. Pokud jsou tedy aloreaktivní T buňky stimulovány nepřímým způsobem, pak základním mechanismem rejekce je pravděpodobně reakce typu DTH.

CTL využívají tři mechanismy zabíjení (Obr. 4). Jednak mají v cytoplazmě velké množství cytotoxických granulí obsahující perforin a granzymy, které v místě kontaktu s cílovou buňkou po patřičné stimulaci splynou s plazmatickou membránou a vylijí svůj obsah do mezibuněčného prostoru. Perforin pak vytvoří póry v plazmatické membráně cílové buňky a granzymy A a B proniknou do cytoplazmy, kde proteolytickým štěpením aktivují kaspasy. Činnost kaspas následně vede k spuštění apoptotické smrti cílové buňky. Zadržují CTL na svém povrchu protein Fas ligand (strukturně podobný cytokinům skupiny TNF), kterým se na povrchu buněk vážou na Fas receptor často známý také jako receptor smrti. Interakcí receptoru s ligandem dochází k aktivaci kaskády reakcí vedoucí k apoptotické smrti. Třetím účinným způsobem, jak zabíjejí cytotoxické T lymfocyty, je lymfotoxin neboli TNFβ. TNFβ obdobně jako Fas ligand indukuje apoptózu cílových buněk. Tento způsob ovšem na rozdíl od prvních dvou nevyžaduje bezprostřední kontakt buněk, a proto také může vést k poškození okolních zdravých buněk (Graziotto et al., 2006, Hořejší and Bartůňková, 2009).



Obr. 4 Mechanismy zabíjení cílových buněk CD8⁺ T lymfocyty a NK buňkami.

[A] Vazba Fas ligandu T buňky na Fas receptor cílové buňky spouští kaskádu vedoucí k apoptóze. [B] Uvolnění obsahu cytotoxických granulí do mezibuněčného prostoru vede k porušení celistvosti plazmatické membrány cílové buňky, která končí buněčnou smrtí. Převzato z (van den Brink and Burakoff, 2002).

2.3.2 Rejckce zprostředkovaná protilátkami

K humorální rejckci neboli rejckci zprostředkované protilátkami dochází po rozpoznání antigenů dárce preformovanými nebo nově vzniklými protilátkami, což často vede k trvalému poškození transplantovaného orgánu. Protilátky se mohou účastnit hyperakutní rejckce, ale hlavní roli hrají především v akutní humorální rejckci (Colvin and Smith, 2005). V současné době je z imunologického hlediska nejčastější příčinou selhání transplantované ledviny chronická humorální rejckce (Viklický, 2008). Většina pacientů před transplantací nemá protilátky proti HLA molekulám, pokud u nich nedošlo k senzitivaci např. během těhotenství, prostřednictvím krevní transfúze či předešlé transplantace.

Protilátky (nově vzniklé i ty již existující) poškozují štěp hned několika cestami. Jednou z nich je aktivace klasické dráhy komplementu. Komplement je součástí vrozené imunity a participuje na akutní a hyperakutní humorální rejckci (Wang et al., 2007). Klasická

dráha komplementové kaskády je zahájena interakcí komplexu C1 s protilátkou navázanou na antigen. Protilátky různého isotypu mají odlišnou schopnost aktivovat komplementovou kaskádu. Některé isotypy (IgM, IgG1 a IgG3) aktivují komplement velmi silně. Jiné isotypy aktivují komplement méně či dokonce vůbec (IgG2 a IgG4), ale zato dokážou stimulovat přirozené zabíječe (NK buňky) přes jejich Fc γ receptory (Arase et al., 1997, Arase et al., 2003). Druhý mechanismus poškozování tkáně štěpu aktivovaného protilátkami tudíž zahrnuje působení NK buněk. NK buňky po aktivaci produkují cytokiny (IFN γ , IL-3 ad.) a podobně jako CTL mají v cytoplazmě cytotoxická granula s perforinem a granzymy, jimiž zabíjejí cílové buňky (Obr. 4). Třetím způsobem poškozování štěpu je přímé působení protilátek na endoteliální tkáň, kdy protilátky způsobují její fenotypové a metabolické změny, a to nezávisle na komplementu či NK buňkách (Hirohashi et al., 2010). Prostřednictvím transkripčních faktorů zvyšují proliferaci buněk hladké svaloviny a endotelu, což může vést k chronickému selhání transplantovaného orgánu (Smith et al., 2000, Jin et al., 2002).

2.3.2.1 HYPERAKUTNÍ REJEKCE

Preformované protilátky proti HLA antigenům ve vysokých koncentracích způsobují nevratné poškození štěpu, k němuž dochází již během prvních minut až hodin po transplantaci. Avšak rejekce tohoto typu jsou v současné době velmi vzácné. Reálné nebezpečí hyperakutní rejekce hrozí pacientům v případě, že se od svého dárce liší krevní skupinou. V jejich krvi totiž cirkulují přirozené protilátky proti AB0 antigenům exprimovaných na endoteliích. V současnosti ale probíhají i tyto transplantace úspěšně, a to po důkladné přípravě pacienta ještě před operativním zákrokem (plazmaferézy³, IVIG⁴). I přestože se zhruba po měsíci pacientovi vrátí protilátky proti AB0 antigenům do původního stavu a ve štěpu jsou pozorovatelná depozita složky komplementové kaskády – C4d, štěp zůstává funkční. Zřejmě zde dochází k určité akomodaci, jejíž mechanismus není doposud známý (Akiyoshi et al., 2012).

2.3.2.2 AKUTNÍ HUMORÁLNÍ REJEKCE

Časná akutní humorální rejekce (AMR) začíná již během několika dní či týdnů po transplantaci. Je způsobena protilátkami proti neshodným antigenům dárce (DSA), které

³ Plazmaferéza – mimotělní způsob terapie; pacientovi je odebrána plazma, která je zbavena škodlivých látek a poté je vrácena zpět do krevního oběhu pacienta.

⁴ IVIG – intravenózní imunoglobuliny.

mohou být buď syntetizovány *de novo*, anebo vzhledem k jejich nízkým předtransplantačním koncentracím nebyly považovány za kontraindikaci k transplantaci. Nově vznikající protilátky mohou být namířeny nejen proti HLA antigenům, ale také proti non-HLA antigenům a antigenům vlastním (Terasaki et al., 2007). Jedním z hlavních znaků akutní humorální rejekce je imunofluorescenční detekce depozit C4d v peritubulárních kapilárách transplantované ledviny (Feucht et al., 1991).

2.3.3 Diagnostika rejekce

O probíhající rejekci (ale také o nefrotoxicitě IS léčby, nebo pooperačních komplikacích) může nasvědčovat zhoršená funkce štěpu (změny glomerulární filtrace, koncentrace sérového kreatininu). Rejekci lze jednoznačně prokázat jedině histologickým vyšetřením vzorku odebraného při biopsii štěpu. Biopsie je u pacientů zpravidla prováděna ve třech měsících po transplantaci anebo s přihlédnutím k pooperačnímu průběhu jejich klinického stavu. Bioptické odebrání vzorku je ovšem invazivní metoda s možnými komplikacemi spojenými se zákrokem a následným hojením. Histologické nálezy jsou hodnoceny podle Banffovy klasifikace (Solez et al., 2008, Sis et al., 2010).

2.4 Imunosupresivní léčba a její rizika

V posledních 20 letech došlo díky dostupné imunosupresivní (IS) léčbě k výraznému zlepšení jednoročního i dlouhodobého přežívání štěpů a pacientů. Dlouhodobá imunosuprese, která je u pacientů po transplantaci nevyhnutelná, je ale někdy zatížena výskytem vedlejších účinků – infekcí, novotvarů, metabolických změn či nefrotoxicitou. Na druhou stranu při nedostatečné imunosupresi hrozí odhojení štěpu. Imunosupresivní terapie cíleně snižuje reaktivitu imunitního systému pacienta a v transplantologii ji dělíme na indukční, udržovací a antirejekční (Viklický, 2010).

2.4.1 Indukční imunosuprese

Pacientům s vysokým rizikem rejekce (po opakované transplantaci, s vysokými panel-reaktivními protilátkami atp.) je v časném období po transplantaci podávána velmi intenzivní tzv. indukční imunosuprese. Běžně užívanými přípravky indukční a antirejekční IS terapie jsou monoklonální (anti-CD52, anti-CD25) a polyklonální protilátky (králičí antithymocytární globulin, ATG) proti T lymfocytům ad. (Viklický, 2010).

2.4.2 Udržovací imunosuprese

Udržovací imunosuprese je méně intenzivní než indukční terapie a má za úkol zabránit vzniku akutní rejekce a zajistit dlouhodobou dobrou funkci transplantovaného orgánu. V praxi jsou běžně používány kombinace imunosupresiv jako tzv. imunosupresivní režimy (trojkombinace – inhibitor kalcineurinu, antiproliferační látka a kortikosteroidy). Imunosupresiva se podávají v kombinacích tak, aby byly pokryty všechny složky odpovědi imunitního systému, ale zároveň tak, aby nebyl pacient vystavován příliš vysokým dávkám jednotlivých přípravků a tedy i nežádoucím účinkům těchto látek (Viklický, 2010).

Antirejekční terapie je vzhledem k významným vedlejším účinkům podávána pacientovi až v případě pozitivního histologického nálezu.

2.5 Hodnocení rizika rejekce

Akutní rejekce se většinou projevuje zhoršenou funkcí transplantovaného orgánu a dalšími klinickými příznaky, jako bolesti v oblasti štěpu, zvýšenou teplotou ad. Může ale probíhat i skrytě a pacienti přicházejí do ordinace s už selhaným orgánem. Nezvratná imunologická rejekce je v současné době poměrně vzácná. Každopádně opakované rejekce (celulární nebo humorální) mohou poškodit štěp natolik, že dochází k jeho ztrátě. Celkový zdravotní stav pacienta včetně přežívání štěpu může být ovlivňován podáváním nevhodné imunosupresivní terapie.

Cílem hodnocení rizika rejekce je včasné rozpoznání rizika akutní anebo chronické rejekce a individualizace imunosupresivní léčby. Riziko rejekce lze hodnotit na základě řady biomarkerů, které jsou stanoveny na molekulární či buněčné úrovni (Tab. 1). Většina testů vychází z analýzy séra nebo buněk získaných z periferní krve pacienta. Některé biomarkery, jako např. panel-reaktivní protilátky (PRA) jsou používány již desetiletí. Jiné jsou používány méně vzhledem k problematické standardizaci či reproducibilitě testů, které je určují. I proto jsou neustále vyvíjeny nové metodické přístupy, které by umožnily rozdělit pacienty do skupin s nízkým, středním a vysokým rizikem rejekce před transplantací.

Tab. 1 Biomarkery hodnotící rizika rejekce.

<i>Stanovení</i>	<i>Biomarker</i>	<i>Metody</i>
Molekulární a solubilní biomarkery	Solubilní CD30	ELISA
	Intracelulární ATP	ImmuKnow
B buněčná senzitivace	PRA protilátky	CDC
	DSA protilátky	Křížové zkoušky (CDC, FCXM), ELISA, FACS, Luminex
	non-HLA protilátky	Luminex
T buněčná senzitivace	Efektorové / paměťové buňky	IFN γ -ELISpot

Vysvětlivky: ATP – adenosintrifosforečná kyselina, CDC – komplement dependentní cytotoxický test, DSA – donor-specifické protilátky, ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISpot – *Enzyme-linked immunosorbent spot assay*, FACS – průtoková cytometrie, FCXM – křížová zkouška využívající průtokovou cytometrii, HLA – lidské leukocytární antigeny, IFN γ – interferon gama, PRA – panel-reaktivní protilátky. Upraveno dle (Sawitzki et al., 2009).

2.5.1 Molekulární a solubilní biomarkery rejekce

2.5.1.1 SOLUBILNÍ CD30

CD4⁺ T lymfocyty po aktivaci uvolňují v rozpustné podobě (sCD30) jinak povrchový glykoprotein z rodiny TNF receptorů (Saini et al., 2008). Solubilní forma CD30 se podílí na regulaci rovnováhy mezi Th1 a Th2 typem imunitní odpovědi (Pellegrini et al., 2003) a zároveň hraje roli při generaci paměťových T buněk (Wieland et al., 2010).

Stanovení sCD30 v periferní krvi příjemce před i po transplantaci předvídá výskyt rejekce a horší přežívání štěpu (Susal et al., 2002, Slavcev et al., 2005, Langan et al., 2007, Saini et al., 2008) a je lepším biomarkerem potransplantační produkce DSA a akutní vaskulární rejekce než panel-reaktivní protilátky (Cinti et al., 2005, Vaidya et al., 2006). Zdá se, že koncentrace sCD30 v krvi odráží předtransplantační aktivační status T buněk a tím umožňuje identifikovat vysoce rizikové pacienty (Spiridon et al., 2008).

2.5.1.2 DIPEPTIDYLPEPTIDASA IV (CD26)

Molekula CD26 je transmembránový glykoprotein s proteasovou aktivitou na povrchu některých imunitních buněk. Běžně se vyskytuje na membráně CD4⁺ T lymfocytů, kterým poskytuje důležitý kostimulační signál. Její povrchová exprese se zvyšuje u aktivovaných buněk a zároveň koreluje s produkcí cytokinů charakteristických pro Th1 lymfocyty.

CD26⁺ CD4⁺ T buňky mohou migrovat do místa zánětu anebo podporovat B lymfocyty k diferenciaci v buňky plazmatické. Tato dipeptidylpeptidasa tudíž hraje roli nejen v zánětlivé reakci, nýbrž i v odpovědi zprostředkované protilátkami. Molekula CD26 je dobrým markerem efektorových a paměťových T lymfocytů a může předvídat rejekci (Ohnuma et al., 2008, Shipkova and Wieland, 2012).

2.5.1.3 INTRACELULÁRNÍ KONCENTRACE ATP

Nebezpečí akutní rejekce i stav imunitního systému pacienta po transplantaci lze sledovat měřením intracelulární koncentrace adenosintrifosforečné kyseliny (iATP), která se u CD4⁺ T lymfocytů zvyšuje po aktivaci. Koncentrace ATP uvnitř buňky je stanovena *in vitro* metodou ImmuKnow, která je založena na systému luciferin/luciferasa (Reinsmoen et al., 2008, Wieland et al., 2010).

2.5.2 Detekce B buněčné senzitivace

2.5.2.1 PANEL-REAKTIVNÍ PROTILÁTKY (PRA)

U pacientů s chronickým selháním ledvin, kteří jsou zařazeni na čekací listinu, se jednou za čtvrt roku provádí vyšetření protilátek proti HLA antigenům. Tzv. panel-reaktivní protilátky (PRA) jsou detekovány testem na bázi komplement dependentního cytotoxického (CDC) testu. Reaktivita séra pacienta proti buněčnému panelu (se zastoupením antigenů běžných ve sledované populaci) se vyjadřuje v procentech. Pacienti, kteří mají v séru více jak 40 % preformovaných protilátek, jsou identifikováni jako vysoce riziková. Těmto pacientům hrozí vyšší riziko akutní rejekce a zároveň mají horší přežití transplantovaných orgánů. Určení PRA je jedním z nejlepších biomarkerů rizika rejekce a používá se rutinně ve většině HLA laboratoří ve světě (Viklický, 2008).

2.5.2.2 PROTILÁTKY SPECIFICKÉ VŮČI ANTIGENŮM DÁRCE (DSA)

Protílátky specifické vůči antigenům dárce (DSA), jejichž přítomnost má negativní vliv na přežívání štěpu (Terasaki et al., 2007), mohou být detekovány hned několika způsoby. Standardně jsou určovány prostřednictvím křížových zkoušek (CDC a FCXM⁵) – inkubace pacientova séra s dárcovými lymfocyty. Pozitivní FCXM test predikuje špatný pooperační průběh a u transplantací od živého dárce je vážným důvodem kontraindikace transplantace

⁵ FCXM – křížová zkouška využívající průtokovou cytometrii; je citlivější než klasická křížová zkouška (CDC) a umožňuje detekovat i necytotoxické protilátky – tedy ty protilátky, které neváží komplement.

(Karpinski et al., 2001, Rebibou et al., 2004). Další testy, které zjišťují přítomnost protilátek specifických vůči antigenům dárce, jsou např. ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), ELISpot (*Enzyme-linked immunosorbent spot assay*) či průtoková cytometrie. Nejcitlivější metodou pro určení DSA protilátek je nyní Luminex, který využívá fluorescenčně značené kuličky potažené HLA antigeny I. nebo II. třídy. Navázané protilátky jsou detekovány sekundární protilátkou označenou fykoerytrinem (Viklický, 2008).

2.5.2.3 PROTILÁTKY PROTI NON-HLA ANTIGENŮM

Vedle HLA systému existuje celá řada polymorfních tkáňových i nitrobuněčných antigenů, které mohou být rozpoznávány imunitním systémem. Označujeme je jako tzv. non-HLA antigeny a patří mezi ně MICA a MICB (*MHC class I polypeptide-related sequence A/B*) a jiné tkáňově specifické antigeny (vimentin, ABO antigeny ad.). Protilátky namířené proti MICA antigenům mohou vyvolat imunitní reakci proti štěpu a ovlivňovat tak jeho dlouhodobé přežívání. Protilátky proti MICA antigenům jsou určovány pomocí metody Luminex (Terasaki et al., 2007, Zou et al., 2007, Sawitzki et al., 2009).

2.5.3 Detekce T buněčné senzitivace

Imunitní systém příjemce se během života setkává s různými antigeny vnějšího prostředí. To může vést k tvorbě paměťových T lymfocytů, které při opětovném setkání s antigenem umožňují akcelerovanou reakci (viz kapitola 2.3.1). Někteří pacienti proto silně a rychle odpovídají na antigeny štěpu, aniž by byli před transplantací přímo vystaveni kontaktu s tkáněmi dárce (např. během těhotenství, krevní transfúzí atp.).

Aloreaktivní T lymfocyty hrají zásadní roli při rozvoji akutní rejekce, a zdá se, že i při rozvoji rejekce chronické (Heeger et al., 1999, Baker et al., 2001). Na rozdíl od detekce protilátek, jejichž specifita a koncentrace může být snadno stanovena, identifikace alospecifických T buněk je metodicky obtížná. Mezi testy, které určují aloreaktivní T lymfocyty, patří analýzy sledující po aloantigenní stimulaci buněčnou proliferaci, cytotoxickou či sekreční aktivitu (produkce cytokinů).

2.5.3.1 PROLIFERACE T BUNĚK

Aloreaktivní T lymfocyty jsou tradičně detekovány měřením jejich proliferace po stimulaci ve smíšených lymfocytárních kulturách (MLC). V jednosměrné MLC jsou buňky příjemce stimulovány buňkami dárce, jejichž replikace deoxyribonukleové kyseliny (DNA) – základní krok při buněčném dělení – je inhibována buď radiací, nebo Mitomycinem C. Těsně

před ukončením 5 až 7denní inkubace je aplikován [³H]-thymidin, který se zabudovává do nově vznikajícího řetězce DNA. Buněčná proliferace je nepřímo měřena jako vzestup radioaktivního záření. V této formě MLC poskytuje informaci o celé buněčné populaci, nikoli o počtu či funkci skutečně odpovídajících buněk (efektorové buňky mohou proliferovat méně, zatímco regulační naopak více). Dnes se místo radioaktivně značeného thymidinu používá fluorescein a samotná proliferace je detekována na úrovni jedné buňky pomocí průtokové cytometrie. Takto je přímo umožněna i fenotypizace populace aktivovaných buněk (Ekong et al., 2009).

2.5.3.2 CYTOTOXICKÁ AKTIVITA

Standardní laboratorní metodou pro určení počtů T buněk (nejčastěji CTL, ale také producentů IL-2) je analýza limitního ředění (LDA). LDA zahrnuje sériové ředění T lymfocytů následováno *in vitro* stimulací a lyzí cílových buněk.

Někteří autoři poukazují, že proliferace T buněk příjemce stimulovaných peptidy dárce koreluje s epizodami akutní i chronické rejekce (Liu et al., 1996, Baker et al., 2001). Frekvence (počty) CTL před transplantací nejspíš nekorelují s výskytem akutní rejekce. Značnou nevýhodou této metody je dlouhodobá inkubace buněk (7–10 dní) a její náročnost (Ekong et al., 2009).

2.5.3.3 CYTOKINY JAKO BIOMARKERY REJEKCE

Cytokiny jsou malé signální molekuly produkované převážně buňkami imunitního systému. Cytokiny modulují typ imunitní odpovědi – směr diferenciaci naivní Th buňky, která na buňce prezentující antigeny rozpoznala komplex HLA/peptid, závisí na cytokinovém prostředí (viz kapitola 2.3.1.1). Roli cytokinů jako biomarkerů rejekce potvrzuje pozitivní korelace prozánětlivých cytokinů typických pro Th1 (IFN γ , TNF α) a Th17 (IL-17) lymfocyty s odhojením štěpu (Antonysamy et al., 1999, Hricik et al., 2003).

Jeden z hlavních cytokinů vyvolávající zánět – interferon gama je produkován Th1 a CTL lymfocyty, NK a NKT⁶ buňkami. Aktivuje makrofágy včetně jejich mikrobicidní aktivity a produkce oxidu dusnatého. Stimuluje expresi HLA antigenů I. a II. třídy a kostimulačních molekul u APC. Umožňuje diferenciaci naivních pomocných T lymfocytů ve směru Th1 a naopak inhibuje diferenciaci ve směru Th2. Aktivuje granulocyty, CTL

⁶ NKT buňky – T lymfocyty, které mají některé vlastnosti NK buněk a hrají velmi důležitou úlohu v regulaci imunitních odpovědí.

a zvyšuje cytotoxickou aktivitu NK buněk. Tím vším podporuje imunitní reakci proti transplantovanému orgánu.

Při prvním setkání s antigenem je IFN γ a řada jiných uvolňován až po několika dnech, ale při opětovném setkání paměťové buňky rychle proliferují a secernují velké množství cytokinů (včetně IFN γ) již krátce po stimulaci. Této vlastnosti je využíváno v některých testech hodnotících rizika rejekce. (Účast paměťových aloreaktivních buněk v akutní rejekci byla zmíněna výše.)

Cytokiny lze detekovat na úrovni exprese cytokinových genů pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR), nebo na úrovni proteinu jak intracelulárně prostřednictvím průtokové cytometrie nebo extracelulárně pomocí metod jako jsou Luminex, ELISA či ELISpot.

2.5.3.3.1 Průtoková cytometrie v detekci cytokinů

Metoda průtokové cytometrie (FACS) má v transplantační imunologii velké využití. Jedním z nich je i detekce cytokinů. Po zablokování sekreční dráhy se začnou cytokiny hromadit v cytoplasmě a mohou být takto – intracelulárně – stanoveny. FACS navíc umožňuje kombinovat detekci více cytokinů najednou s fenotypizací, tj. značením povrchových markerů. Buněčné populace jsou díky této technice charakterizovány nejen na základě jejich povrchových markerů, ale také na základě jejich cytokinové produkce (Korin et al., 2005, Ekong et al., 2009).

2.5.3.3.2 ELISpot v detekci cytokinů

Metoda ELISpot (*Enzyme-linked immunosorbent spot assay*) detekuje cytokiny uvolňované jednotlivými buňkami. Udává tak frekvenci (počty) buněk produkujících sledovaný cytokin. Touto technikou je možné v krátké, tj. 24hodinové analýze detekovat pouze efektorové / paměťové buňky pacienta, které se vyznačují vysokou produkcí IL-2, IFN γ , IL-10 či granzymu B.

Na destičce potažené monoklonální protilátkou proti vybranému cytokinu jsou inkubovány příjemcovy mononukleární buňky s inaktivovanými buňkami dárce. Stimulované T lymfocyty pacienta secernují cytokiny, které se vzápětí vážou na monoklonální protilátku na membráně. Destičky opláchnuté od buněk jsou poté inkubovány se sekundární protilátkou (proti jinému epitopu cytokinu) značenou biotínem a streptavidinem s navázanou křenovou peroxidasou / alkalickou fosfatase. Po přidání barevného substrátu se začnou na místě, kde

předtím byly buňky aktivované antigenem, vyvíjet spoty (tečky). Podle velikosti, intenzity a počtu spotů se dá odhadnout míra stimulace jednotlivých buněk (Gebauer et al., 2002).

ELISpot je velmi citlivá metoda, dokonce citlivější než FACS (Heeger et al., 1999). Stejně jako u průtokové cytometrie je dnes možné prostřednictvím ELISpotu využívajícího fluorescenci detekovat více cytokinů najednou (maximálně však jen dva).

Podle literárních údajů stanovení frekvence buněk secernujících IFN γ před a po transplantaci umožňuje identifikovat pacienty s vysokým rizikem akutní rejekce a zároveň predikovat dlouhodobé přežívání štěpu nezávisle na přítomnosti PRA (Heeger et al., 1999, Najafian et al., 2002, Hricik et al., 2003, Nickel et al., 2004, Augustine et al., 2005).

Variantou sledování donor-specifických T lymfocytů je detekce tzv. panel-reaktivních T buněk, které jsou rovněž stanoveny pomocí analýzy IFN γ -ELISpot. V reakci jsou stimulovány buňky příjemce panelem buněk s HLA antigeny běžnými ve sledované populaci (Andree et al., 2006, Poggio et al., 2006, Poggio et al., 2007).

3 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Pacienti, kteří byli před transplantací senzitivizováni vůči HLA antigenům (předchozí transplantací, transfúzí či těhotenstvím), mají vyšší riziko rozvoje akutní rejekce. Identifikace imunologicky rizikových pacientů prostřednictvím detekce aloreaktivních T lymfocytů metodou ELISpot by mohla umožnit individualizaci a optimalizaci léčebných postupů, a tudíž i snížit vedlejší účinky imunosupresivní terapie.

Cílem diplomové práce bylo:

1. Přispět k vyhodnocení rizika vývoje rejekce, a to na základě určení počtů donor-specifických buněk produkujících IFN γ před transplantací ledviny od žijících dárců.
2. Porovnat výsledky počtů donor-specifických buněk secernujících IFN γ s rizikovými faktory pro rozvoj rejekce jako jsou neshody v HLA antigenech, přítomnost panel-reaktivních protilátek a / nebo donor-specifických protilátek.
3. Retrospektivně vyhodnotit klinický význam dalších rizikových faktorů akutní celulární a humorální rejekce po transplantaci ledviny (opakované transplantace, imunosupresivní léčba atd.).

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Schéma pokusu

Do naší studie byli zařazeni pacienti s chronickým selháním ledviny, kteří byli v letech 2010 až 2012 transplantováni v Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze. Soubor pacientů tvořilo 47 příjemců (15 žen a 32 mužů) ledviny od žijícího dárce.

V rámci rutinních vyšetření před transplantací byla u dárců orgánů provedena typizace HLA antigenů pomocí polymerázové řetězové reakce se sekvenčně specifickými primery (PCR-SSP) a u příjemců pomocí PCR se sekvenčně specifickými oligonukleotidovými sondami (PCR-SSOP). Pomocí CDC testu byly u pacientů stanoveny panel-reaktivní protilátky. Donor-specifické protilátky byly zjišťovány prostřednictvím křížových zkoušek (crossmatch testů) využívajících CDC techniku i průtokovou cytometrii (FCXM). Na vyžádání kliniků byla u některých pacientů stanovena hladina a specifická protilátek metodou Luminex (LABScreen Mix a LABScreen Single Antigen I. a II. třídy). DNA určená pro typizaci HLA antigenů a lymfocyty pro CDC test byly izolovány z krve.

Z periferní krve, která byla na základě informovaného souhlasu odebrána pacientům a jejich dárcům před transplantací (0–310 dní), byly rovněž izolovány mononukleární buňky (PBMC) pro pozdější stanovení frekvence T lymfocytů specifických vůči antigenům dárce. Počty aloreaktivních T lymfocytů byly zjišťovány metodou ELISpot prostřednictvím detekce uvolňovaného IFN γ . Získané buňky byly před testováním zamrazeny a uloženy v kapalném dusíku.

Klinický stav pacientů po transplantaci byl sledován po dobu jednoho roku. Na základě histologického vyšetření biopsie štěpu (Banffova klasifikace '07) provedené v průběhu této doby byli pacienti rozřazeni do skupin bez rejekce, s výskytem akutní celulární (ACR) anebo humorální (AMR) rejekce.

4.2 Použité chemikálie, materiál a přístroje

4.2.1 Chemikálie

- DMSO (Dimethylsulfoxid), Sigma, Německo.
- Fetální telecí sérum (FCS), GE Healthcare, Rakousko.
- Ficoll-PaqueTM PLUS solution, GE Healthcare, Švédsko.
- Médium IMDM, GE Healthcare, Rakousko.
- Médium RPMI 1640 s L-Glutaminem a fenolovou červení, GE Healthcare, Rakousko.
- Mitomycin C (*Streptomyces caespitosus*), Sigma, Německo.
- Fosfátový pufr (PBS), pH 7,2–7,4, Lékárna IKEM.
- Penicilin-Streptomycin, Sigma, Německo.
- Souprava ELISpot^{PRO} pro lidský IFN γ , MABTECH, Švédsko:
 - 2 destičky s vyjímatelnými stripy potaženými protilátkou.
 - 7-B6-1-ALP, 150 μ l.
 - BCIP/NBT, 25 ml.
 - Monoklonální protilátka anti-CD3 (1 : 1 000), 100 μ l.
- Trypanová modř 0,3% roztok, Lékárna IKEM.

4.2.2 Přístroje

- Analyzátor buněk CEDEX XS, INNOVATIS, Roche, Švýcarsko (Cedex XS Smart Hide).
- Inkubátor s vodním pláštěm Queue Systems Inc., USA.
- Centrifuga Megafuge 1.ORS, Heraeus Instruments, Německo.
- BIOREADER[®]-6000-E α , BIOSYS, Německo.
- Laminární box s UV lampou, Heraeus Instruments, Německo.
- Vodní lázeň Julabo U3, Německo.
- Zamrazovač IceCube 1810, SY-LAB, Rakousko.
- Běžný laboratorní materiál.

4.3 Metody

4.3.1 Příprava odpovídajících a stimulujících buněk

4.3.1.1 IZOLACE BUNĚK Z PERIFERNÍ KRVE

Nesrážlivá krev (18 ml), odebraná z periferní žíly, byla přenesena do předem označených 50ml zkumavek. Krev doplněná sterilním fosfátovým pufrům (PBS, pH 7,2–7,4) do celkového objemu 35 ml byla lehce promíchána a vzápětí rychle ale opatrně přenesena do 50ml zkumavek s předem připraveným roztokem Ficollu (12,5 ml). Zkumavky byly centrifugovány při pokojové teplotě (1 000 g, 20 min), aniž by byly předem promíchávány. Bílý prstenec vzniklý na rozhraní a obsahující PBMC byl opatrně převeden do nové zkumavky, doplněn PBS na celkový objem 45 ml a odstředován (210 g, 10 min). Po odsání supernatantu byla roztřepaná peleta doplněna 10 ml 20% média (1 díl fetálního telecího séra (FCS) a 4 díly IMDM média s penicilinem-streptomycinem). Koncentrace buněčné suspenze byla spočítána pomocí analyzátoru buněk Cedex XS (Roche, Švýcarsko) a dle potřeby ředěna nebo koncentrována pro jejich následné zamrazování (viz kapitola 4.3.1.3).

4.3.1.2 VÝROBA SMĚSI KONTROLNÍCH BUNĚK (POOL)

Dle připraveného seznamu 30 suspenzí buněk získaných od zdravých dárců byla vytvořena směs kontrolních buněk, tzv. POOL tak, aby v něm byly zastoupeny HLA antigeny běžné pro testovanou populaci.

Po rozmražení těchto buněčných suspenzí (popsáno níže) jich bylo vždy po pěti přeneseno do šesti 50ml zkumavek. Objem vzorků pak byl doplněn 20% médiem (1 díl FCS a 4 díly RPMI 1640 média s penicilinem-streptomycinem) do 45 ml. Poté byly buňky inkubovány 30 min při laboratorní teplotě a dvakrát promyty (centrifugace 400 g, 10 min). Po odstředování byl odsán supernatant a peleta byla roztřepána. K peletě bylo následně přidáno 20% médium v objemu 10 ml. Byla spočítána koncentrace buněk, která byla upravena na požadovanou koncentraci $10\text{--}15 \cdot 10^6$ buněk/ml. Připravené ampule s 0,5 ml buněčné suspenze POOL byly zamrazeny a uloženy v kapalném dusíku.

4.3.1.3 ZMRAZOVÁNÍ BUNĚK

Buňky o koncentraci $10\text{--}15 \cdot 10^6/\text{ml}$ byly pipetovány v objemu 0,5 ml do popsaných mrazicích ampulí. Mezitím bylo na ledu připraveno mrazicí médium RPMI 1640 s 20% FCS a dimethylsulfoxidem (DMSO) v poměru 4 : 1 – vznikl tak 20% roztok DMSO. Vzorky i mrazicí médium byly ponechány alespoň 20 min na ledu, než byl k vychlazené buněčné suspenzi pomalu přikapáván mrazicí roztok o stejném objemu jako vzorky. Uzavřené ampule byly důkladně promíchány a vloženy do stroje ke kryokonzervaci.

4.3.1.4 ROZMRAZOVÁNÍ BUNĚK

Zmrazené ampule s buňkami byly rozmrazeny ve vodní lázni o teplotě 37 °C. Částečně rozmražené buňky byly v laminárním boxu přeneseny do 15ml sterilních zkumavek. Nejprve k nim byly po kapkách přidány 2 ml vychlazeného 20% RPMI 1640 média s FCS, poté byl celkový objem doplněn na 10 ml. Zkumavky byly 30 min inkubovány po tmě při laboratorní teplotě.

Pro úplné odstranění DMSO z mrazicí směsi byly buňky dvakrát promyty; zkumavky byly centrifugovány (400 g, 10 min), supernatant odsán, peleta roztřepána a k ní bylo přidáno 20% médium v objemu 10 ml. Na závěr byla spočítána koncentrace buněk v 1 ml média a dle potřeby upravena na koncentraci 10^6 buněk/ml.

4.3.1.5 SMÍŠENÉ LYMFOCYTÁRNÍ KULTURY (MLC)

Ve sterilních 96jamkových kultivačních destičkách byly v tetraplikátech stimulovány buňky příjemce (50 μl ~ 50 000 PBMC) zvláště vlastními buňkami, buňkami dárce a buněčnou suspenzí POOL (vždy 50 μl ~ 50 000 PBMC). Ovšem ještě předtím byla stimulujícím buňkám zablokována replikace DNA pomocí Mitomycinu C (inkubace 30 min při teplotě 37 °C s 50 μl Mitomycinu C, poté buňky dvakrát promývány).

Schopnost buněk produkovat IFN γ byla kontrolována stimulací buněk příjemce ledviny monoklonální protilátkou (anti-CD3) proti povrchové molekule T lymfocytů CD3. Pozitivní kontrola funkční MLC byla dána stimulací pacientových buněk buněčnou suspenzí POOL. Negativní kontrola, resp. test účinnosti Mitomycinu C, byla zprostředkována inkubací samotných inhibovaných buněk POOL v médiu. Inkubace média prostého buněk byla použita jako kontrola čistoty práce.

Destička byla po dobu cca 24 h ponechána v inkubátoru s vodním pláštěm při teplotě 37 °C a 5% CO $_2$ atmosféře.

4.3.2 Enzyme-linked Immunosorbent spot (ELISpot) assay

Druhý den, po zahájení stimulace příjemcových buněk v MLC, byla ELISpot destička aktivována 4krát opakovaným propláchnutím stripů, potažených monoklonální protilátkou proti IFN γ , sterilním PBS (200 μ l/jamka). Poté byla inkubována 30 min při laboratorní teplotě s 200 μ l 10% RPMI 1640 média s FCS. Po odstříknutí média byly na destičku přeneseny důkladně rozmíchané buňky stimulované přes noc v MLC. Následně bylo k buňkám pipetováno 50 μ l 10% média a k pozitivním kontrolám navíc 1 μ l roztoku s monoklonální protilátkou anti-CD3. Destička byla dána do inkubátoru cca na 20 h (37 °C a 5% CO $_2$).

Další den byla ELISpot destička (po odstříknutí svého obsahu) 5krát propláchnuta sterilním PBS (200 μ l/jamka). Do každé jamky pak bylo přidáno 100 μ l detekční protilátky 7-B6-ALP naředěné v poměru 1 : 200 0,5% PBS (200 dílů PBS a 1 díl FCS). Destička stála 2 h ve tmě a při pokojové teplotě, poté byl obsah destičky opět odstříknut. Stripy byly 5krát propláchnuty sterilním PBS a do každé jamky bylo pipetováno 100 μ l barevného substrátu BCIP/NBT – na membráně se začaly objevovat spoty. Vývoj spotů byl (cca po 10 min) zastaven pod tekoucí vodou. Usušená destička byla analyzována na BIOREADER[®]-6000-E α (BIOSYS, Německo). Nastavení důležitých parametrů při hodnocení spotů: medián velikosti spotu – 60 μ m, ostrý gradient, senzitivita 80 %. Pro každou reakci byl z tetraplikátů vypočítán medián. Ze získaných dat byl rovněž vypočítán stimulační index (SI), používaný tradičně při hodnocení MLC. Analyzované destičky byly uskladněny chráněné před vlhkostí a světlem.

Výpočet stimulačního indexu (SI):

$$SI = \frac{(PL + DL_x)}{(PL + PL_x)}$$

Vysvětlivky: (PL + DL $_x$) – počet spotů v reakci příjemce ledviny (PL) proti dárci ledviny (DL $_x$), jehož buňky byly předem zablokovány Mitomycinem C; (PL + PL $_x$) – počet spotů v reakci příjemce ledviny (PL) proti vlastním buňkám, které byly předem zablokovány Mitomycinem C.

4.3.3 Statistické zpracování dat

Mezi skupinami byly hodnoceny rozdíly v datech kvantitativního charakteru (věk, koncentrace sérového kreatininu, počet buněk produkujících IFN γ atd.) pomocí počítačového programu GraphPad InStat 3. Při normálním rozdělení dat byla provedena analýza Studentovým t testem. V případě, že data nesplňovala podmínky normálního rozdělení, byla provedena analýza pomocí Mann-Whitneyova nebo Kruskal-Wallisova testu (tj. neparametrický analog jednosměrné analýzy rozptylu – ANOVA) s následnými *post-hoc* testy s Dunnovou korekcí.

Mgr. Jelena Skibová stanovila senzitivitu a specificitu testu IFN γ -ELISpot pomocí počítačového programu MedCalc Software. Dále vyhodnotila kvalitativní data (pohlaví příjemce, přítomnost DSA, AB0 kompatibilita atp.) X^2 testem, případně X^2 testem s Yatesovou korekcí a provedla korelace výsledků se Spearmanovým korelačním koeficientem pomocí počítačového programu BMDP Statistical Software (Release 8.1).

Výsledky jsou prezentovány jako průměr \pm směrodatná odchylka nebo číslo [%].

Rozdíly mezi daty jsou statisticky významné, pokud $p < 0,05$.

5 VÝSLEDKY

V souboru 47 pacientů s transplantovanou ledvinou od žijícího dárce bylo 32 % ($n = 15$) žen, z nichž devět bylo před transplantací alespoň jednou gravidní. Na druhou stranu mezi dárci byly ženy zastoupeny téměř ze tří čtvrtin ($n = 35$). Průměrný věk pacientů v době transplantace byl 40 ± 13 let a dárců 53 ± 10 let. V 29 případech proběhla transplantace mezi přímými příbuznými (rodič/potomek). Šest pacientů prodělalo opakovanou transplantaci ledviny, přičemž čtyři z nich vyvinuli akutní celulární rejekci (ACR) a dva navíc i akutní humorální rejekci (AMR). Pět transplantací bylo provedeno mezi ABO inkompatibilním příjemcem a dárce, přičemž jeden pacient vyvinul ACR i AMR, ostatní byli bez rejekce. Šesti pacientům byl podán ATG jako indukční imunosuprese, přesto se u třech z nich projevila ACR a z toho u dvou i AMR.

Celkem byla do 1 roka po transplantaci diagnostikována akutní celulární rejekce u 21 pacientů (45 %), přičemž u 4 (19 %) z nich byla souběžně i akutní humorální rejekce. U 58 % ($n = 12$) pacientů s výskytem ACR byla rejekce identifikována do 1. měsíce od transplantace. U dalších 33 % ($n = 7$) pacientů s ACR byla diagnostikována do 3. měsíce a u 9 % ($n = 2$) do 1 roka od transplantace. Medián sledování stavu pacientů byl 1 rok. V průběhu této doby dva pacienti zemřeli na následky zdravotních komplikací nepřímo souvisejících s transplantací (srdeční selhání, pneumonie) a dvěma pacientům byl orgán odejmut z důvodu rekurence původního onemocnění či nezvládnuté akutní rejekce.

5.1 Rizikové faktory a výskyt akutní celulární rejekce

Statistická analýza výskytu ACR neprokázala signifikantní rozdíl v závislosti na pohlaví, věku pacienta ani dárce, ani na příbuzenském vztahu mezi nimi. Méně častý výskyt ACR byl prokázán u pacientů, u nichž byla v biopsii identifikována akutní tubulární nekróza (ATN), ($n = 16$, $p = 0,05$), a u žen, které před transplantací alespoň jednou rodily ($n = 8$, $p < 0,01$). Další demografická data a klinické údaje charakterizující náš experimentální soubor byly vztaženy k výskytu ACR a jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2 Demografické údaje příjemců ledviny a jejich dárců ve vztahu k výskytu akutní celulární rejekce (ACR).

Demografické údaje		Bez rejekce		ACR		P hodnota
		n = 26	Rozsah / [%]	n = 21	Rozsah / [%]	
Věk ^b	Příjemce	42 ± 14	(19–70)	38 ± 12	(19–65)	NS
	Dárce	54 ± 11	(31–68)	51 ± 10	(32–67)	NS
Pohlaví příjemce ^a	Muž (n = 32)	17	53 %	15	47 %	NS
	Žena (n = 15)	9	60 %	6	40 %	
Počet transplantací ^a	= 1 (n = 41)	24	59 %	17	41 %	NS
	> 1 (n = 6)	2	33 %	4	67 %	
AB0 kompatibilita ^a	Ano (n = 42)	22	52 %	20	48 %	NS
	Ne (n = 5)	4	80 %	1	20 %	
Studená ischémie [min] ^b	(n = 43)	43 ± 26	(12–115)	47 ± 20	(18–90)	NS
Sérový kreatinin [μmol/l] ^b	3. měsíc po Tx (n = 47)	145 ± 32	(82–195)	148 ± 31	(106–196)	NS
	6. měsíc po Tx (n = 47)	147 ± 53	(77–340)	168 ± 190	(66–989)	NS
	12. měsíc po Tx (n = 45)	146 ± 64	(84–408)	179 ± 222	(93–1143)	NS
Indukční imunosuprese (ATG) ^a	Ano (n = 6)	3	50 %	3	50 %	NS
	Ne (n = 41)	23	56 %	18	44 %	
Udržovací imunosuprese ^a	FK506, Prednison (n = 3)	1	4 %	2	9 %	NS
	FK506, Prednison, MMF (n = 40)	23	88 %	17	81 %	
	Cyklosporin A, Prednison (n = 1)	1	4 %	0	0 %	
	Cyklosporin A, Prednison, MMF (n = 2)	1	4 %	1	5 %	
	Jiná (n = 1)	0	0 %	1	5 %	

Vysvětlivky k Tab. 2 a Tab. 3: ACR (I/ II) – akutní celulární rejekce (typ I/ II), ATG – antithymocytární globulin, ELISpot – *Enzyme-linked immunosorbent spot assay*, FCXM-B – křížová zkouška využívající průtokovou cytometrii (B lymfocyty), FK506 – kalcineurinový inhibitor, HLA – lidské leukocytární antigeny, MMF – mykofenolát mofetil, NS – nesignifikantní, PL&DL_x – reakce příjemce proti dárci (alogenní reakce), PL&PL_x – reakce příjemce proti vlastním buňkám (autologní reakce), PRA – panel-reaktivní protilátky, SI – stimulační index, Tx – transplantace; # – $n = 24$, ## – $n = 8$, ### – $n = 11$.

Všechny testy byly provedeny na vzorcích odebraných před transplantací. Výsledky testů ELISpot jsou uvedeny jako počty (frekvence) spotů na 50 000 příjemcových mononukleárních buněk.

Použité statistické analýzy: ^a – χ^2 test, ^b – Mann-Whitneyův test, ^c – Kruskal-Wallisův test; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ proti skupině bez rejekce.

Parametry stanovené v rámci rutinních vyšetření před transplantací či retrospektivně, které by mohly souviset s výskytem rejekce, jsou porovnány mezi skupinami bez rejekce, s ACR I. a II. stupně v Tab. 3-I.

U pacientů s výskytem ACR II. stupně byl prokázán statisticky významně vyšší počet neshod v HLA antigenech II. třídy než u pacientů bez rejekce ($p < 0,05$). V přítomnosti donor-specifických protilátek před transplantací mezi pacienty bez rejekce a s rejekcí nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl.

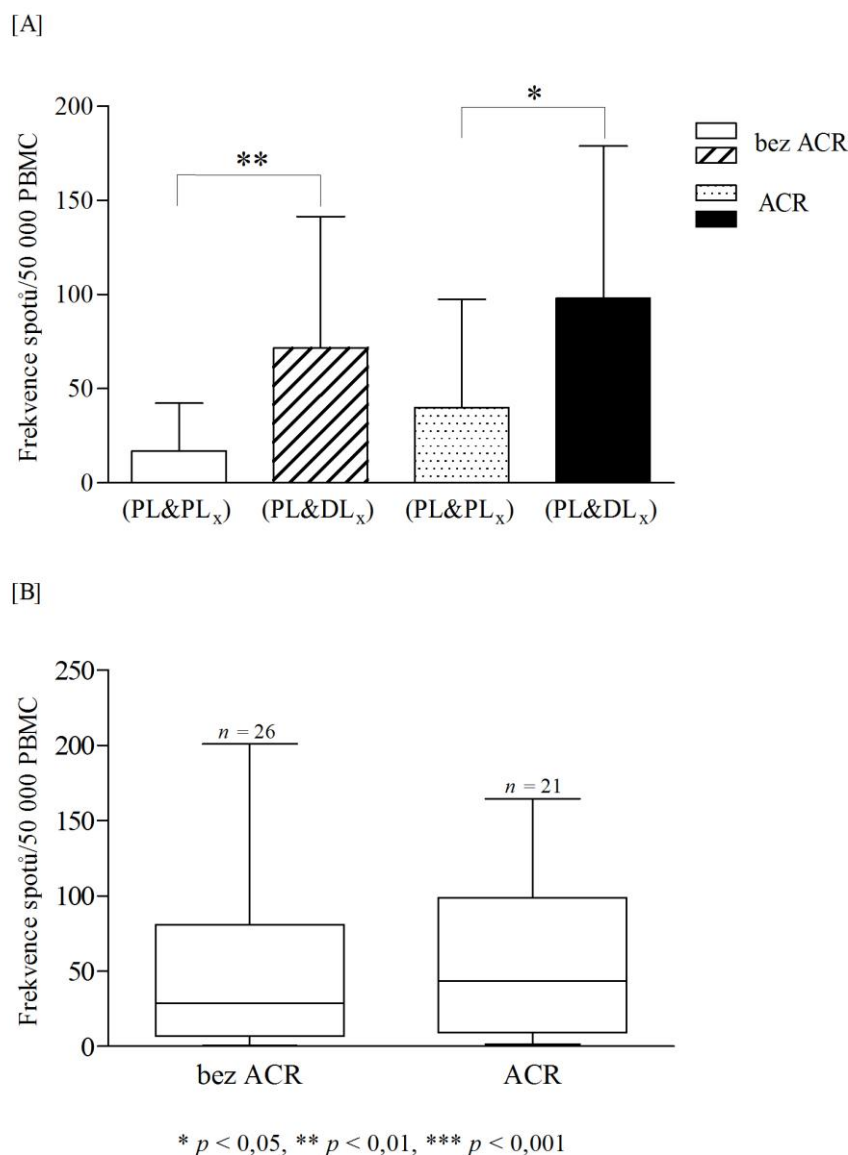
Ve výsledcích počtů buněk produkujících IFN γ (proti dárci, proti vlastním antigenům, ani poměr těchto dvou, tzv. stimulační index) neprokázala statistická analýza mezi sledovanými skupinami (bez rejekce, ACR I. a II. stupně) žádný významný rozdíl. Přesto u pacientů s výskytem ACR II. stupně byla detekována 1,9krát vyšší průměrná frekvence buněk produkujících IFN γ po stimulaci dárcovými buňkami než u pacientů bez rejekce a 3,7krát vyšší proti vlastním buňkám.

Rizikové faktory byly dále porovnávány s uplynulým časem od transplantace, kdy byla rejekce na základě biopsie diagnostikována (Tab. 3-II). Výskyt rejekce u pacientů do 1 měsíce po transplantaci ve srovnání se skupinou bez rejekce významně koreluje s počtem neshod v HLA antigenech II. třídy ($p < 0,01$).

Tab. 3 Rizikové faktory ve vztahu k stupni a době výskytu akutní celulární rejekce (ACR).

I. Stupeň ACR		<i>Bez rejekce</i>		<i>ACR I</i>		<i>ACR II</i>		<i>P hodnota</i>
		<i>n = 26</i>	<i>Rozsah / [%]</i>	<i>n = 12</i>	<i>Rozsah / [%]</i>	<i>n = 9</i>	<i>Rozsah / [%]</i>	
Neshody v HLA^c (<i>n = 47</i>)	A, B	2,1 ± 1,2	(0–4)	1,8 ± 1,1	(0–4)	2,4 ± 1,6	(0–4)	<i>NS</i>
	DR	0,8 ± 0,6	(0–2)	1,1 ± 0,5	(0–2)	*1,4 ± 0,7	(0–2)	<i>< 0,05</i>
	Celkem	2,9 ± 1,6	(0–6)	2,9 ± 1,4	(1–6)	3,9 ± 2,3	(0–6)	<i>NS</i>
PRA^a	< 10 % (<i>n = 44</i>)	23	52 %	12	27 %	9	21 %	<i>NS</i>
	≥ 10 % (<i>n = 3</i>)	3	100 %	0	0 %	0	0 %	
FCXM-B^a	Negativní (<i>n = 39</i>)	23	59 %	12	31 %	4	10 %	<i>< 0,01</i>
	Pozitivní (<i>n = 4</i>)	1	25 %	0	0 %	3	75 %	
ELISpot^c (<i>n = 47</i>)	PL&DL _x	71,6 ± 69,9	(1–228)	70,8 ± 58,3	(4–183)	134,4 ± 95,2	(4–264)	<i>NS</i>
	PL&PL _x	17,1 ± 25,2	(0–109)	22,6 ± 22,5	(1–63)	63,1 ± 80,7	(0–220)	<i>NS</i>
	SI	#10,2 ± 12,2	(1–49)	5,2 ± 4,8	(1–19)	##10,5 ± 15,7	(1–48)	<i>NS</i>
II. Kdy byla ACR diagnostikována		<i>Bez rejekce</i>		<i>ACR do 1. měsíce</i>		<i>ACR do 12. měsíce</i>		<i>P hodnota</i>
		<i>n = 26</i>	<i>Rozsah / [%]</i>	<i>n = 12</i>	<i>Rozsah / [%]</i>	<i>n = 9</i>	<i>Rozsah / [%]</i>	
Neshody v HLA^c (<i>n = 47</i>)	A, B	2,1 ± 1,2	(0–4)	2,5 ± 1,4	(0–4)	1,6 ± 1,0	(0–3)	<i>NS</i>
	DR	0,8 ± 0,6	(0–2)	**1,5 ± 0,5	(1–2)	0,9 ± 0,6	(0–2)	<i>< 0,01</i>
	Celkem	2,9 ± 1,6	(0–6)	4,0 ± 1,9	(1–6)	2,4 ± 1,4	(0–5)	<i>NS</i>
PRA^a	< 10 % (<i>n = 44</i>)	23	52 %	12	27 %	9	21 %	<i>NS</i>
	≥ 10 % (<i>n = 3</i>)	3	100 %	0	0 %	0	0 %	
FCXM-B^a	Negativní (<i>n = 39</i>)	23	59 %	7	18 %	9	23 %	<i>< 0,05</i>
	Pozitivní (<i>n = 4</i>)	1	25 %	3	75 %	0	0 %	
ELISpot^c (<i>n = 47</i>)	PL&DL _x	71,6 ± 69,9	(1–228)	107,1 ± 86,9	(4–264)	86,1 ± 75,4	(7–200)	<i>NS</i>
	PL&PL _x	17,1 ± 25,2	(0–109)	50,4 ± 71,0	(1–48)	26,0 ± 30,5	(1–94)	<i>NS</i>
	SI	#10,2 ± 12,2	(1–49)	###8,0 ± 13,6	(1–48)	6,5 ± 5,7	(2–19)	<i>NS</i>

Frekvence spotů (buněk produkujících IFN γ) v reakci proti antigenům dárce byla prokázána signifikantně vyšší než autologní reakce jak u skupiny s ACR ($p < 0,05$), tak i bez ní ($p < 0,01$), (Obr. 5-[A]). Po odečtení frekvence spotů detekovaných v reakci proti vlastním buňkám od frekvence spotů detekovaných v alogenní reakci není pozorovatelný žádný rozdíl v počtu stimulovaných buněk (Obr. 5-[B]). Analýza senzitivity (70 %) a specificity (68 %) pro metodu IFN γ -ELISpot neprokázala statistický význam.



Obr. 5 Frekvence spotů v závislosti na výskytu akutní celulární rejekce (ACR).

[A] Frekvence spotů v autologních a alogenních reakcích v závislosti na výskytu ACR.

[B] Frekvence spotů po odečtení autologní reakce od alogenní reakce ve vztahu s výskytem ACR.

Rozdíly mezi skupinami byly hodnoceny Kruskal-Wallisovým [A] a Mann-Whitneyovým [B] testem.

Vysvětlivky: ACR – akutní celulární rejekce, PBMC – mononukleární buňky z periferní krve, PL&DL_x – alogenní reakce, PL&PL_x – autologní reakce.

5.2 Rizikové faktory a výskyt akutní humorální rejekce

Demografická data a klinické údaje pacientů a jejich dárců vztažené k výskytu AMR jsou uvedeny v Tab. 4. Statistická analýza neprokázala vliv věku příjemce a dárce, pohlaví, ani příbuzenského vztahu mezi příjemcem a dárce, prodělaných porodů či výskytu ATN na výskyt AMR.

Tab. 5 ukazuje vztah možných rizikových faktorů vůči výskytu AMR. Korelace výskytu AMR s neshodami v HLA antigenech neprokázala statistickou významnost. (Neshody v HLA antigenech II. třídy pozitivně korelovaly pouze s výskytem ACR.) Pacienti s pozitivní křížovou zkouškou pro B lymfocyty (FCXM) před transplantací měli tendenci vyššího rizika vývoje AMR, než pacienti s výskytem pouze ACR nebo pacienti zcela bez rejekce ($p < 0,05$).

U pacientů s humorální rejekcí bylo buňkami dárce stimulováno k produkci IFN γ průměrně 1,8krát více buněk než u pacientů bez rejekce a 1,4krát více než u pacientů pouze s ACR. Přibližně stejný poměr frekvence buněk uvolňujících cytokin byl zaznamenán mezi pacienty s AMR a bez rejekce v autologní reakci (1,9krát více stimulovaných buněk u skupiny s AMR). Na druhou stranu v téže reakci měli pacienti s AMR průměrně o 24 % méně aktivovaných buněk než pacienti s ACR. Statisticky významný rozdíl však nebyl prokázán ani u jedné skupiny.

Tab. 4 Demografické údaje příjemců ledviny a jejich dárců ve vztahu k výskytu akutní humorální rejekce (AMR).

Demografické údaje		Bez rejekce		AMR		P hodnota
		n = 26	Rozsah / [%]	n = 4	Rozsah / [%]	
Věk ^d	Příjemce	42 ± 14	(19–70)	34 ± 10	(20–44)	NS
	Dárce	54 ± 11	(31–68)	46 ± 11	(35–60)	NS
Pohlaví příjemce ^a	Muž (n = 18)	17	94 %	1	6 %	NS
	Žena (n = 12)	9	75 %	3	25 %	
Počet transplantací ^a	= 1 (n = 26)	24	92 %	2	8 %	NS
	> 1 (n = 4)	2	50 %	2	50 %	
AB0 kompatibilita ^a	Ano (n = 25)	22	88 %	3	12 %	NS
	Ne (n = 5)	4	80 %	1	20 %	
Studená ischémie [min] ^b	(n = 26)	°43 ± 26	(12–115)	27 ± 9	(18–38)	NS
Sérový kreatinin [μmol/l] ^b	3. měsíc po Tx (n = 47)	145 ± 32	(82–195)	143 ± 34	(106–188)	NS
	6. měsíc po Tx (n = 47)	147 ± 53	(77–340)	318 ± 448	(66–989)	NS
	12. měsíc po Tx (n = 45)	146 ± 64	(84–408)	126 ± 19	(107–146)	NS
Indukční imunosuprese (ATG) ^a	Ano (n = 5)	3	60 %	2	40 %	NS
	Ne (n = 25)	23	92 %	2	8 %	
Udržovací imunosuprese ^a	FK506, Prednison (n = 1)	1	4 %	0	0 %	NS
	FK506, Prednison, MMF (n = 27)	23	88 %	4	100 %	
	Cyklosporin A, Prednison (n = 1)	1	4 %	0	0 %	
	Cyklosporin A, Prednison, MMF (n = 1)	1	4 %	0	0 %	

Tab. 5 Rizikové faktory ve vztahu k výskytu akutní humorální rejekce (AMR).

Rizikové faktory		Bez rejekce		ACR		AMR		P hodnota
		n = 26	Rozsah / [%]	n = 17	Rozsah / [%]	n = 4	Rozsah / [%]	
Neshody v HLA^c (n = 47)	A, B	2,1 ± 1,2	(0–4)	2,1 ± 1,3	(0–4)	2,0 ± 1,6	(0–4)	NS
	DR	0,8 ± 0,6	(0–2)	*1,4 ± 0,5	(1–2)	0,8 ± 1,0	(0–2)	< 0,05
	Celkem	2,9 ± 1,6	(0–6)	3,5 ± 1,7	(1–6)	2,8 ± 2,5	(0–6)	NS
PRA^a	< 10 % (n = 44)	23	52 %	17	39 %	4	9 %	NS
	≥ 10 % (n = 3)	3	100 %	0	0 %	0	0 %	
FCXM-B^a	Negativní (n = 39)	23	59 %	14	36 %	2	5 %	< 0,05
	Pozitivní (n = 4)	1	25 %	1	25 %	2	50 %	
ELISpot^c (n = 47)	PL&DL _x	71,6 ± 69,9	(1–228)	91,5 ± 81,9	(4–264)	126,0 ± 80,8	(15–200)	NS
	PL&PL _x	17,1 ± 25,2	(0–109)	41,8 ± 61,4	(0–220)	32,1 ± 42,6	(4–94)	NS
	SI	#10,2 ± 12,2	(1–49)	##5,5 ± 4,9	(1–19)	14,5 ± 22,3	(2–48)	NS

Vysvětlivky k Tab. 4 a Tab. 5: ACR – akutní celulární rejekce, AMR – akutní humorální rejekce, ATG – antithymocytární globulin, ELISpot – *Enzyme-linked immunosorbent spot assay*, FCXM-B – křížová zkouška využívající průtokovou cytometrii (B lymfocyty), FK506 – kalcineurinový inhibitor, HLA – lidské leukocytární antigeny, MMF – mykofenolát mofetil, NS – nesignifikantní, PL&DL_x – reakce příjemce proti dárci (alogenní reakce), PL&PL_x – reakce příjemce proti vlastním buňkám (autologní reakce), PRA – panel-reaktivní protilátky, SI – stimulační index, Tx – transplantace; ° – n = 22, # – n = 24, ## – n = 16.

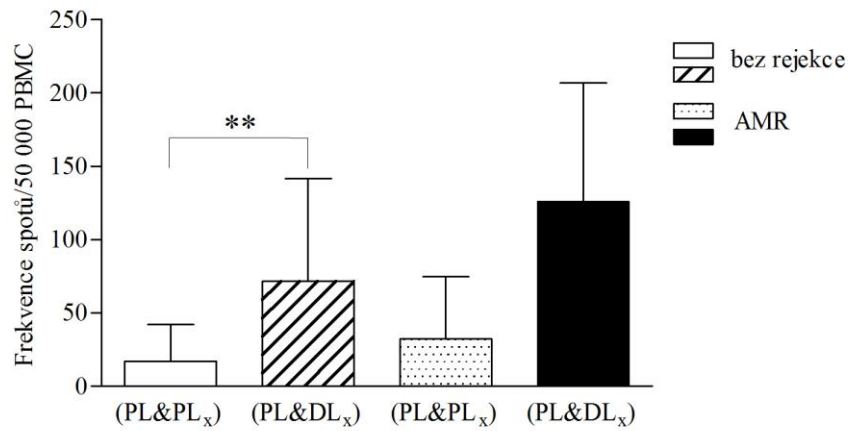
Všechny testy byly provedeny na vzorcích odebraných před transplantací. Výsledky testů ELISpot jsou uvedeny jako frekvence spotů na 50 000 příjemcových mononukleárních buněk. Skupina ACR zde uvedena bez 4 pacientů, kteří měli současně AMR – ti jsou uvedeni ve zvláštním sloupci.

Použité statistické analýzy: ^a – χ^2 test, ^b – Mann-Whitneyův test, ^c – Kruskal-Wallisův test, ^d – Studentův *t* test; * $p < 0,05$ proti skupině bez rejekce.

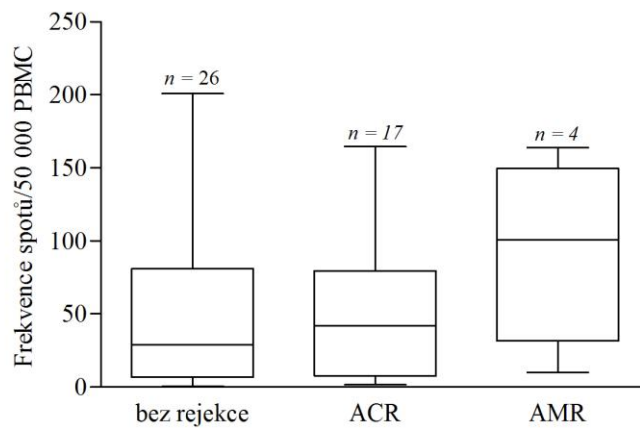
o

Jak již bylo zmíněno, frekvence spotů v reakci proti antigenům dárce byla prokázána signifikantně vyšší než autologní reakce u skupiny bez rejekce ($p < 0,01$). U skupiny s AMR je ale příliš málo dat na to, aby byl rozdíl detekovatelný (Obr. 6-[A]). Po odečtení frekvence spotů detekovaných v reakci proti vlastním buňkám od frekvence spotů detekovaných v alogenní reakci je pozorovatelný vyšší počet stimulovaných buněk u pacientů s AMR než u zbývajících dvou skupin (Obr. 6-[B]). Vzhledem k malému počtu dat uvnitř skupiny AMR ($n = 4$) ale nebylo možné prokázat statistický význam. Analýza senzitivity ani specifity pro metodu IFN γ -ELISpot ve spojitosti s výskytem AMR nebylo možné provést kvůli malému počtu dat ve skupině.

[A]



[B]



* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Obr. 6 Frekvence spotů v závislosti na výskytu akutní humorální rejekce (AMR).

[A] Frekvence spotů v autologních a alogenních reakcích v závislosti na výskytu AMR.

[B] Frekvence spotů po odečtení autologní reakce od alogenní reakce ve vztahu s výskytem AMR.

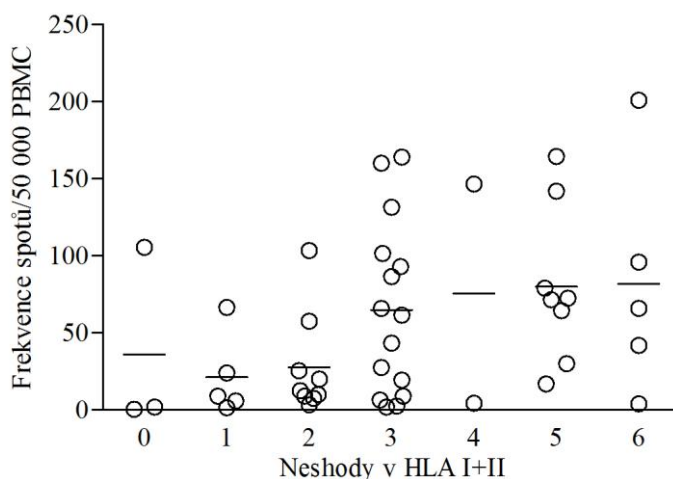
Rozdíly mezi skupinami byly hodnoceny Kruskal-Wallisovým testem.

Vysvětlivky: ACR – akutní celulární rejekce, AMR – akutní humorální rejekce, PBMC – mononukleární buňky z periferní krve, PL&DL_x – alogenní reakce, PL&PL_x – autologní reakce.

5.3 ELISpot ve srovnání s dalšími rizikovými faktory rejekce

Výsledky testů ELISpot jsme porovnávali s možnými rizikovými faktory rejekce.

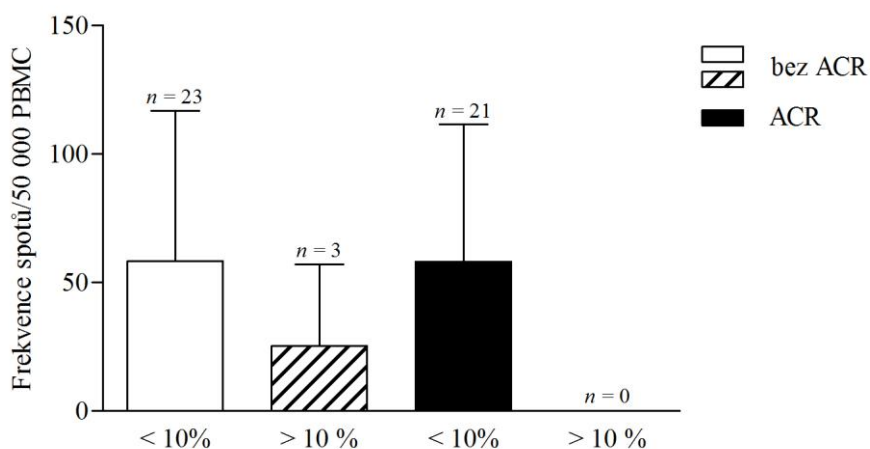
Prokázali jsme korelaci rozdílu frekvencí spotů mezi alogenní a autologní reakcí s počtem neshod HLA antigenů v I. třídě – HLA-A, -B ($r = 0,399$, $p < 0,01$) a společně třídy první s třídou druhou – HLA-A, -B, -DR ($r = 0,409$, $p < 0,01$), (Obr. 7). Stejná korelace s počtem neshod HLA antigenů II. třídy (HLA-DR) neprokázala statistickou důležitost.



Obr. 7 Korelace rozdílu frekvence aktivovaných buněk mezi reakcí proti dárce a příjemci s počtem neshod v HLA antigenech (HLA-A, -B, -DR).

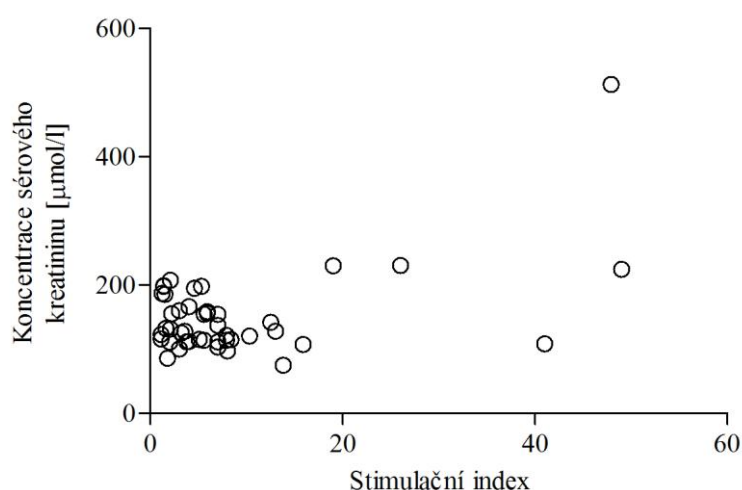
Vztah analyzován pomocí Spearmanova korelačního koeficientu.

Dále jsme porovnávali výsledky IFN γ -ELISpot s hladinou PRA pacienta před transplantací (Obr. 8). Žádný vztah jsme však neprokázali.



Obr. 8. Vztah rozdílu počtu spotů mezi reakcí proti dárce a příjemci s hladinou PRA před transplantací u pacientů s ACR nebo bez ní.

Současně jsme korelovali počty buněk uvolňujících IFN γ před transplantací s koncentrací sérového kreatininu po transplantaci (1., 3., 6. a 12. měsíc) – avšak žádný vztah nebyl identifikován. Korelace koncentrace sérového kreatininu v 1. měsíci po transplantaci se stimulačním indexem podle Pearsonova korelačního koeficientu byla signifikantní ($r = 0,528$, $p < 0,001$), ale v přesnějším testu se Spearmanovým korelačním koeficientem již tato vazba nebyla prokázána (Obr. 9).



Obr. 9 Vztah koncentrace sérového kreatininu 1 měsíc po transplantaci s poměrem počtu spotů reakcí proti dárce a příjemci před transplantací.

6 DISKUZE

Cílem předkládané diplomové práce bylo zavést metodiku ELISpot na oddělení imunogenetiky IKEM a ověřit literární údaje o klinickém významu této metody predikovat akutní rejekci po transplantaci ledviny. Akutní rejekce ledviny, jak bylo uvedeno v úvodu, je závažná komplikace, která může nenávratně poškodit transplantovaný orgán a tím omezit jeho dlouhodobou dobrou funkci. Predikce rizika akutní rejekce je proto v popředí zájmu jak klinických imunologů, tak imunologů zabývajících se základním výzkumem transplantačních reakcí.

Analýza imunologického statusu pacientů před transplantací probíhá několika základními směry. Běžná je charakterizace B-buněčné imunity ve smyslu měření panel-reaktivních protilátek (PRA) a provádění křížové zkoušky (crossmatch) před transplantací pro vyloučení přítomnosti donor-specifických protilátek (Viklický, 2008). Analýza buněčné imunity před transplantací je na druhou stranu ne zcela běžným vyšetřením z několika důvodů. Zaprvé se tato vyšetření mezi jednotlivými laboratořemi obtížně standardizují a zadruhé interpretace výsledků je nezdědka složitá (Janetzki et al., 2004, Ashoor et al., 2013).

Charakterizace cytokinového profilu pacientů před transplantací je často komplikovaná jak z důvodu překrývajících se funkcí (redundantnosti) jednotlivých cytokinů, tak i z důvodu polyklonální stimulace, která nedokáže charakterizovat reaktivitu pacienta proti určitému dárci orgánu. V tomto smyslu metodika ELISpot nabízí velkou výhodu – změřit produkci cytokinu (IFN γ) proti vybranému dárci a tak predikovat riziko rejekce s vysokou specificitou. ELISpot je navíc velmi citlivou metodou – její rozsah je lepší než u průtokové cytometrie (Heeger et al., 1999).

V této diplomové práci jsme se soustředili na detekci jednoho ze základních cytokinů účastnícího se transplantačních reakcí – interferon gama. Je známo, že efektorové / paměťové buňky po opakovaném setkání s antigenem secernují celou škálu cytokinů již krátce po stimulaci. Jedním z prvních cytokinů, které jsou uvolňovány, je právě IFN γ . Ten aktivuje řadu typů imunitních buněk podílejících se na rozvoji akutní celulární rejekce (ACR). V literatuře se uvádí, že vysoká frekvence efektorových / paměťových T lymfocytů produkujících IFN γ po krátké stimulaci dárcovými antigeny před i po transplantaci koreluje s výskytem akutní rejekce (Augustine et al., 2005, Augustine et al., 2007, Hricik et al., 2013).

Náš soubor se skládal ze 47 pacientů, kteří podstoupili transplantaci od živého dárce. Jak již bylo zmíněno, transplantace od živých dárců mají signifikantně lepší výsledky než

transplantace od dárců s mozkovou smrtí. Některé důvody lepšího přežití ledvin od živých dárců jsou známé, jiné nebyly dosud dostatečně vysvětleny. Nejpravděpodobnějším důvodem je velmi krátká studená ischemie orgánů (pár desítek minut) a tím menší stres transplantované ledviny. Pravděpodobně i proto je u transplantací od živých dárců vliv HLA shody mezi dárcem a příjemcem méně výrazný než u transplantací od zemřelých dárců (nižší exprese stresových a adhezivních molekul na endoteliálních buňkách štěpu).

Naše analýza demografických detailů souboru neprokázala signifikantní vliv pohlaví, věku pacienta a dárce, počtu předchozích transplantací, shody v krevní skupině, délky studené ischemie nebo typu indukční a udržovací imunosuprese na výskyt akutní (celulární i humorální) rejekce. Překvapivě byl pozorován signifikantně méně častý výskyt ACR u pacientů, kteří měli histologicky ověřený výskyt akutní tubulární nekrózy, která je asociována s ACR jako jeden z rizikových faktorů.

Vyhodnocení korelace některých rizikových faktorů s výskytem akutní rejekce neprokázala statisticky významný rozdíl viz např. mezi rejekcí (ACR i AMR) a přítomností panel-reaktivních protilátek (PRA). Pravděpodobně je to způsobeno relativně malým počtem pacientů zahrnutých do našeho souboru. Nicméně signifikantní korelace byla pozorována u pozitivních křížových zkoušek s B lymfocyty (FCXM-B) jak u ACR, tak i AMR. Tento nálezný svědčí o klinické důležitosti protilátek namířených proti HLA antigenům II. třídy – pozitivita FCXM na B buňkách totiž nepřímo svědčí o přítomnosti protilátek proti antigenům II. třídy. V naší analýze jsme navíc pozorovali souvislost mezi počtem neshod v HLA-DR antigenech a výskytem ACR.

Výsledky korelace počtů buněk produkujících $IFN\gamma$ s výskytem ACR do 1 roka po transplantaci nedosáhly statistické významnosti. Přesto jsme pozorovali tendenci vyšší produkce $IFN\gamma$ u pacientů s ACR během inkubace jak s dárcovými, tak s vlastními (autologními) buňkami. Po autologní i alogenní stimulaci měli pacienti s ACR II. stupně před transplantací ve srovnání s pacienty bez rejekce v průměru vyšší frekvenci buněk secernujících $IFN\gamma$ (63 ± 81 vs. 17 ± 25 v autologní reakci a 134 ± 95 vs. 72 ± 70 v reakci alogenní). Vzhledem k tomu, že 58 % rejekcí diagnostikovaných do 1. měsíce po transplantaci zahrnovalo pacienty s ACR II. stupně, byl tento trend pozorován i u této skupiny. Naše pozorování naznačuje, že pacienti s vyšším rizikem ACR by mohli mít zvýšenou produkci $IFN\gamma$ jak proti alogenním, tak proti autologním buňkám, což může svědčit

o celkové (i nespecifické) aktivaci imunitního systému. Podrobnější analýza tohoto jevu ale přesahovala cíle předkládané diplomové práce.

Navzdory tomu, že velká část publikací poukazuje na pozitivní korelaci buněk produkujících IFN γ s výskytem akutní rejekce, existují autoři, kteří takovou souvislost nenalezli (Reinsmoen et al., 2008). Tyto práce vysvětlují svůj nálezn podáváním indukční imunoprese (ATG) a eliminací efektorových / paměťových T buněk. Což je v souladu s předpoklady jiných autorů – kombinace ATG s udržovací imunopresí (FK506, Cyklosporin A) může bránit vzniku rejekce přes blokaci senzitivovaných aloreaktivních T lymfocytů (Augustine et al., 2008). Výsledky naší studie ale svědčí spíše o opaku: u poloviny pacientů ($n = 3$) se přes indukční imunopresi – ATG, do 1 měsíce po transplantaci vyvinula ACR II. stupně. Frekvence buněk produkujících IFN γ (po odečtení autologní reakce) u těchto pacientů byla 10krát vyšší než u pacientů s ATG ale bez rejekce (92 ± 74 vs. 9 ± 10) a přibližně srovnatelná s pacienty bez indukční imunoprese antithymocytárním globulinem ale zároveň s ACR II. stupně (71 ± 64).

Akutní rejekce může být způsobena nejen aloreaktivními T lymfocyty, nýbrž i protilátkami či buňkami vrozené imunity. U pacientů s AMR jsme na rozdíl od pacientů bez rejekce pozorovali tendenci vyššího průměrného počtu aktivovaných buněk – buněk produkujících IFN γ . Avšak vzhledem k nízkému výskytu humorální rejekce u našeho experimentálního souboru, nelze s určitostí považovat výsledky za dostatečně statisticky silné. Možné vysvětlení pozorovaného jevu by mohl být i fakt, že akutní celulární a humorální rejekce často probíhají současně. Přesto pacienti s akutní celulární i humorální rejekcí dohromady měli podstatně vyšší frekvenci aktivovaných buněk než pacienti pouze s rejekcí celulární (126 ± 81 vs. 92 ± 82).

Jak bylo uvedeno výše, v porovnání s pacienty bez rejekce jsme prokázali statisticky významně vyšší počet neshod v HLA antigenech II. třídy u pacientů, kterým byla ACR diagnostikována již v 1. měsíci po transplantaci. Signifikantní vztah jsme prokázali i u skupiny pacientů s ACR II. stupně. Tyto výsledky jsou v souladu s literaturou svědčící o větším významu shody mezi dárce a příjemcem v HLA antigenech II. třídy (Bradley, 1991, Opelz et al., 1999). Zajímavým nálezem naší studie byla statisticky významná korelace počtů buněk produkujících IFN γ před transplantací s počtem neshod v HLA antigenech mezi příjemcem a dárce, zejména pak s neshodami v HLA-A, -B či HLA-A, -B, -DR dohromady (nikoli však v HLA-DR samotných). Tato zjištění rovněž podporují skutečnost, že imunitní

reakce je převážně namířená proti neshodným HLA antigenům dárce a že časná rejekce je vyvolána přímým rozpoznáním antigenů dárce.

Porovnání frekvence buněk secernujících $IFN\gamma$ před transplantací s koncentrací sérového kreatininu (1., 3., 6. a 12. měsíc) po transplantaci neprokázala statistickou významnost. Každopádně, hladiny sérového kreatininu ne vždy přesně korelují s funkcí ledviny a jsou mnohdy ovlivněny faktory jako např. váha pacienta (svalová hmota), původní stav ledviny před transplantací (chirurgický nebo jiný inzult atd.). Navíc jsme náš soubor sledovali jen jeden rok, což je doba většinou příliš krátká, abychom pozorovali výraznější změny ve funkci transplantovaných orgánů.

Z našich výsledků vyplývá, že i přesto, že jsme nedosáhli statisticky signifikantních výsledků, předtransplantační určení počtu aloreaktivních buněk pomocí metody ELISpot může být užitečné a může dodat důležité informace o stavu T buněčné imunity pacientů před transplantací od živých dárců. Zajímavý je také nález korelace mezi počtem buněk produkujících $IFN\gamma$ a výskytem humorální rejekce – což podle našeho nejlepšího vědomí v literatuře zatím nebylo uvedeno.

Při větším souboru pacientů by se ELISpot mohl prokázat jako dobrý test pro předpověď vážnějších stupňů rejekce či rejekce zprostředkované protilátkami. Pro další studium by mohla být přínosná i korelace různých parametrů s výsledky ELISpotu po transplantaci (Nather et al., 2006, Bestard et al., 2008).

7 ZÁVĚRY

1. Zavedla jsem metodu ELISpot pro detekci frekvence buněk produkujících interferon gama ($\text{IFN}\gamma$). Na našem souboru pacientů se nepodařilo prokázat signifikantní korelaci mezi počty buněk secernujících $\text{IFN}\gamma$ před transplantací ledvin od žijících dárců a výskytem akutní celulární a humorální rejekce. U pacientů s těžší formou celulární rejekce (typu II) jsme však zjistili trend zvýšených počtů buněk produkujících $\text{IFN}\gamma$ ve srovnání s pacienty bez rejekce a pacienty s lehčí formou celulární rejekce. Současně byl pozorovatelný vyšší počet stimulovaných buněk u pacientů s humorální rejekcí než u pacientů s celulární rejekcí a bez rejekce.
2. Prokázali jsme pozitivní korelaci mezi frekvencí buněk produkujících $\text{IFN}\gamma$ a počtem neshod v lidských leukocytárních antigenech (HLA), nikoli však s výskytem panel-reaktivních protilátek (PRA).
3. Neshody v HLA antigenech II. třídy pozitivně korelovaly s výskytem akutní celulární rejekce, ale ne s výskytem rejekce humorální. Na druhou stranu vyšší riziko vývoje rejekce zprostředkované protilátkami měli pacienti s pozitivní křížovou zkouškou na B lymfocytech.

Z našich výsledků vyplývá, že předtransplantační určení počtu aloreaktivních buněk pomocí metody ELISpot může být užitečné a může dodat důležité informace o stavu T buněčné imunity pacientů před transplantací od živých dárců.

8 KLASIFIKACE CD MOLEKUL

<i>Molekula</i>	<i>Struktura</i>	<i>Funkce</i>	<i>Ligand/Receptor</i>	<i>Exprese/Buněčný typ</i>
CD3	Ig	Součást TCR		T lymfocyt
CD4	Ig	Koreceptor	MHC II	T lymfocyt (podskupina), monocyty
CD8	Ig	Koreceptor	MHC I	T lymfocyt (podskupina)
CD25		Receptor (α -podjednotka)	IL-2	Aktivovaný T lymfocyt, B lymfocyt, monocyty
CD26		Dipeptidylpeptidasa IV		B lymfocyt, makrofág, NK, aktivovaný T lymfocyt
CD28	Ig	Signalizace	CD80, CD86	T lymfocyt (podskupina)
CD30	TNF-R	Signalizace	CD153	Aktivovaný T lymfocyt, B lymfocyt, NK, monocyty
CD40	TNF-R	Signalizace	CD154	B lymfocyt, DC
CD52	(GPI)	Adheze?		Leukocyty
CD80	Ig	Signalizace	CD28, CD152	B lymfocyt, DC, monocyty, aktivovaný T lymfocyt
CD86	Ig	Signalizace	CD28, CD152	DC, monocyty, aktivovaný B lymfocyt
CD154	TNF	Signalizace	CD40	Aktivovaný T lymfocyt, mastocyty

Vysvětlivky: DC – dendritické buňky, GPI – glykosylfosfatidylinositol, Ig – imunoglobulin, IL-2 – interleukin 2, MHC I/ II – hlavní histokompatibilní komplex I. / II. třídy, NK – přirozený zabíječ, TCR – T buněčný receptor, TNF – faktor nekrotizující nádory, TNF-R – receptor pro TNF.

Převzato z (Hořejší and Bartůňková, 2009).

9 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obr. 1 Přímé [A] a nepřímé [B] rozpoznání alogenních HLA antigenů.	9
Obr. 2 Posloupnost produkce cytokinů po rozeznání HLA antigenů u naivních [A] a paměťových [B] T lymfocytů.	11
Obr. 3 Diferenciace CD4 ⁺ T lymfocytů v buněčné podtypy na základě cytokinového prostředí.	12
Obr. 4 Mechanismy zabíjení cílových buněk CD8 ⁺ T lymfocyty a NK buňkami.	14
Obr. 5 Frekvence spotů v závislosti na výskytu akutní celulární rejekce (ACR).	35
Obr. 6 Frekvence spotů v závislosti na výskytu akutní humorální rejekce (AMR).	40
Obr. 7 Korelace rozdílu frekvence aktivovaných buněk mezi reakcí proti dárci a příjemci s počtem neshod v HLA antigenech (HLA-A, -B, -DR).	41
Obr. 8. Vztah rozdílu počtu spotů mezi reakcí proti dárci a příjemci s hladinou PRA před transplantací u pacientů s ACR nebo bez ní.	42
Obr. 9 Vztah koncentrace sérového kreatininu 1 měsíc po transplantaci s poměrem počtu spotů reakcí proti dárci a příjemci před transplantací.	42
Tab. 1 Biomarkery hodnotící rizika rejekce.	18
Tab. 2 Demografické údaje příjemců ledviny a jejich dárců ve vztahu k výskytu akutní celulární rejekce (ACR).	32
Tab. 3 Rizikové faktory ve vztahu k stupni a době výskytu akutní celulární rejekce (ACR). ..	34
Tab. 4 Demografické údaje příjemců ledviny a jejich dárců ve vztahu k výskytu akutní humorální rejekce (AMR).	37
Tab. 5 Rizikové faktory ve vztahu k výskytu akutní humorální rejekce (AMR).	38

10 LITERATURA

- Akiyoshi T, Hirohashi T, Alessandrini A, Chase CM, Farkash EA, Neal Smith R, Madsen JC, Russell PS, Colvin RB (2012) Role of complement and NK cells in antibody mediated rejection. *Hum Immunol* 73:1226-1232.
- Andree H, Nickel P, Nasiadko C, Hammer MH, Schonemann C, Pruss A, Volk HD, Reinke P (2006) Identification of dialysis patients with panel-reactive memory T cells before kidney transplantation using an allogeneic cell bank. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 17:573-580.
- Antonyasamy MA, Fanslow WC, Fu F, Li W, Qian S, Troutt AB, Thomson AW (1999) Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection: IL-17 promotes the functional differentiation of dendritic cell progenitors. *J Immunol* 162:577-584.
- Arase N, Arase H, Hirano S, Yokosuka T, Sakurai D, Saito T (2003) IgE-mediated activation of NK cells through Fc gamma RIII. *J Immunol* 170:3054-3058.
- Arase N, Arase H, Park SY, Ohno H, Ra C, Saito T (1997) Association with FcRgamma is essential for activation signal through NKR-P1 (CD161) in natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells. *The Journal of experimental medicine* 186:1957-1963.
- Ashoor I, Najafian N, Korin Y, Reed EF, Mohanakumar T, Ikle D, Heeger PS, Lin M (2013) Standardization and cross validation of alloreactive IFNgamma ELISPOT assays within the clinical trials in organ transplantation consortium. *Am J Transplant* 13:1871-1879.
- Augustine JJ, Poggio ED, Clemente M, Aeder MI, Bodziak KA, Schulak JA, Heeger PS, Hricik DE (2007) Hemodialysis vintage, black ethnicity, and pretransplantation antidonor cellular immunity in kidney transplant recipients. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 18:1602-1606.
- Augustine JJ, Poggio ED, Heeger PS, Hricik DE (2008) Preferential benefit of antibody induction therapy in kidney recipients with high pretransplant frequencies of donor-reactive interferon-gamma enzyme-linked immunosorbent spots. *Transplantation* 86:529-534.

- Augustine JJ, Siu DS, Clemente MJ, Schulak JA, Heeger PS, Hricik DE (2005) Pre-transplant IFN-gamma ELISPOTs are associated with post-transplant renal function in African American renal transplant recipients. *Am J Transplant* 5:1971-1975.
- Baker RJ, Hernandez-Fuentes MP, Brookes PA, Chaudhry AN, Cook HT, Lechler RI (2001) Loss of direct and maintenance of indirect alloresponses in renal allograft recipients: implications for the pathogenesis of chronic allograft nephropathy. *J Immunol* 167:7199-7206.
- Bestard O, Nickel P, Cruzado JM, Schoenemann C, Boenisch O, Sefrin A, Grinyo JM, Volk HD, Reinke P (2008) Circulating alloreactive T cells correlate with graft function in longstanding renal transplant recipients. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 19:1419-1429.
- Bingaman AW, Farber DL (2004) Memory T cells in transplantation: generation, function, and potential role in rejection. *Am J Transplant* 4:846-852.
- Bradley BA (1991) The role of HLA matching in transplantation. *Immunol Lett* 29:55-59.
- Brook MO, Wood KJ, Jones ND (2006) The impact of memory T cells on rejection and the induction of tolerance. *Transplantation* 82:1-9.
- Cinti P, Pretagostini R, Arpino A, Tamburro ML, Mengasini S, Lattanzi R, De Simone P, Berloco P, Molajoni ER (2005) Evaluation of pretransplant immunologic status in kidney-transplant recipients by panel reactive antibody and soluble CD30 determinations. *Transplantation* 79:599-601.
- Colvin RB, Smith RN (2005) Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol* 5:807-817.
- de Fijter JW, Mallat MJ, Doxiadis, II, Ringers J, Rosendaal FR, Claas FH, Paul LC (2001) Increased immunogenicity and cause of graft loss of old donor kidneys. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 12:1538-1546.
- Ekong UD, Miller SD, O'Gorman MR (2009) In vitro assays of allosensitization. *Pediatr Transplant* 13:25-34.

- Feucht HE, Felber E, Gokel MJ, Hillebrand G, Nattermann U, Brockmeyer C, Held E, Riethmuller G, Land W, Albert E (1991) Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell-mediated rejection. *Clin Exp Immunol* 86:464-470.
- Fuggle SV, Allen JE, Johnson RJ, Collett D, Mason PD, Dudley C, Rudge CJ, Bradley JA, Watson CJ (2010) Factors affecting graft and patient survival after live donor kidney transplantation in the UK. *Transplantation* 89:694-701.
- Gebauer BS, Hricik DE, Atallah A, Bryan K, Riley J, Tary-Lehmann M, Greenspan NS, DeJelo C, Boehm BO, Hering BJ, Heeger PS (2002) Evolution of the enzyme-linked immunosorbent spot assay for post-transplant alloreactivity as a potentially useful immune monitoring tool. *Am J Transplant* 2:857-866.
- Graziotto R, Del Prete D, Rigotti P, Anglani F, Baldan N, Furian L, Valente M, Antonello A, Marchini F, D'Angelo A, Gambaro G (2006) Perforin, Granzyme B, and fas ligand for molecular diagnosis of acute renal-allograft rejection: analyses on serial biopsies suggest methodological issues. *Transplantation* 81:1125-1132.
- Harris NR, Rumbaut RE (2001) Age-related responses of the microcirculation to ischemia-reperfusion and inflammation. *Pathophysiology* 8:1-10.
- Heeger PS, Greenspan NS, Kuhlenschmidt S, DeJelo C, Hricik DE, Schulak JA, Tary-Lehmann M (1999) Pretransplant frequency of donor-specific, IFN-gamma-producing lymphocytes is a manifestation of immunologic memory and correlates with the risk of posttransplant rejection episodes. *J Immunol* 163:2267-2275.
- Hernandez-Fuentes MP, Warrens AN, Lechler RI (2003) Immunologic monitoring. *Immunol Rev* 196:247-264.
- Hirohashi T, Uehara S, Chase CM, DellaPelle P, Madsen JC, Russell PS, Colvin RB (2010) Complement independent antibody-mediated endarteritis and transplant arteriopathy in mice. *Am J Transplant* 10:510-517.
- Hořejší V, Bartůňková J (2009) *Základy imunologie*. Prague: TRITON.

- Hricik DE, Poggio ED, Woodside KJ, Sarabu N, Sanchez EQ, Schulak JA, Padiyar A, Heeger PS, Augustine JJ (2013) Effects of cellular sensitization and donor age on acute rejection and graft function after deceased-donor kidney transplantation. *Transplantation* 95:1254-1258.
- Hricik DE, Rodriguez V, Riley J, Bryan K, Tary-Lehmann M, Greenspan N, DeJelo C, Schulak JA, Heeger PS (2003) Enzyme linked immunosorbent spot (ELISPOT) assay for interferon-gamma independently predicts renal function in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 3:878-884.
- Janetzki S, Schaed S, Blachere NE, Ben-Porat L, Houghton AN, Panageas KS (2004) Evaluation of Elispot assays: influence of method and operator on variability of results. *Journal of immunological methods* 291:175-183.
- Jetten AM (2009) Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nuclear receptor signaling* 7:e003.
- Jin YP, Singh RP, Du ZY, Rajasekaran AK, Rozengurt E, Reed EF (2002) Ligation of HLA class I molecules on endothelial cells induces phosphorylation of Src, paxillin, and focal adhesion kinase in an actin-dependent manner. *J Immunol* 168:5415-5423.
- Karpinski M, Rush D, Jeffery J, Exner M, Regele H, Dancea S, Pochinco D, Birk P, Nickerson P (2001) Flow cytometric crossmatching in primary renal transplant recipients with a negative anti-human globulin enhanced cytotoxicity crossmatch. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 12:2807-2814.
- Kim IK, Bedi DS, Denecke C, Ge X, Tullius SG (2008) Impact of innate and adaptive immunity on rejection and tolerance. *Transplantation* 86:889-894.
- Klein J, Sato A (2000a) The HLA system. First of two parts. *The New England journal of medicine* 343:702-709.
- Klein J, Sato A (2000b) The HLA system. Second of two parts. *The New England journal of medicine* 343:782-786.

- Korin YD, Lee C, Gjertson DW, Wilkinson AH, Pham TP, Danovitch GM, Gritsch HA, Reed EF (2005) A novel flow assay for the detection of cytokine secreting alloreactive T cells: application to immune monitoring. *Hum Immunol* 66:1110-1124.
- Langan LL, Park LP, Hughes TL, Irish A, Luxton G, Witt CS, Christiansen FT (2007) Post-transplant HLA class II antibodies and high soluble CD30 levels are independently associated with poor kidney graft survival. *Am J Transplant* 7:847-856.
- Le Moine A, Goldman M, Abramowicz D (2002) Multiple pathways to allograft rejection. *Transplantation* 73:1373-1381.
- Lee RS, Yamada K, Houser SL, Womer KL, Maloney ME, Rose HS, Sayegh MH, Madsen JC (2001) Indirect recognition of allopeptides promotes the development of cardiac allograft vasculopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:3276-3281.
- Liu Z, Colovai AI, Tugulea S, Reed EF, Fisher PE, Mancini D, Rose EA, Cortesini R, Michler RE, Suci-Foca N (1996) Indirect recognition of donor HLA-DR peptides in organ allograft rejection. *The Journal of clinical investigation* 98:1150-1157.
- Liu Z, Sun YK, Xi YP, Maffei A, Reed E, Harris P, Suci-Foca N (1993) Contribution of direct and indirect recognition pathways to T cell alloreactivity. *The Journal of experimental medicine* 177:1643-1650.
- London CA, Lodge MP, Abbas AK (2000) Functional responses and costimulator dependence of memory CD4+ T cells. *J Immunol* 164:265-272.
- Macdonald WA, Chen Z, Gras S, Archbold JK, Tynan FE, Clements CS, Bharadwaj M, Kjer-Nielsen L, Saunders PM, Wilce MC, Crawford F, Stadinsky B, Jackson D, Brooks AG, Purcell AW, Kappler JW, Burrows SR, Rossjohn J, McCluskey J (2009) T cell allorecognition via molecular mimicry. *Immunity* 31:897-908.
- Molnar MZ, Kovesdy CP, Bunnapradist S, Streja E, Krishnan M, Mucsi I, Norris KC, Kalantar-Zadeh K (2013) Donor race and outcomes in kidney transplant recipients. *Clin Transplant* 27:37-51.

- Najafian N, Salama AD, Fedoseyeva EV, Benichou G, Sayegh MH (2002) Enzyme-linked immunosorbent spot assay analysis of peripheral blood lymphocyte reactivity to donor HLA-DR peptides: potential novel assay for prediction of outcomes for renal transplant recipients. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 13:252-259.
- Nather BJ, Nickel P, Bold G, Presber F, Schonemann C, Pratschke J, Volk HD, Reinke P (2006) Modified ELISPOT technique--highly significant inverse correlation of post-Tx donor-reactive IFN γ -producing cell frequencies with 6 and 12 months graft function in kidney transplant recipients. *Transpl Immunol* 16:232-237.
- Nickel P, Presber F, Bold G, Biti D, Schonemann C, Tullius SG, Volk HD, Reinke P (2004) Enzyme-linked immunosorbent spot assay for donor-reactive interferon-gamma-producing cells identifies T-cell presensitization and correlates with graft function at 6 and 12 months in renal-transplant recipients. *Transplantation* 78:1640-1646.
- Ohnuma K, Dang NH, Morimoto C (2008) Revisiting an old acquaintance: CD26 and its molecular mechanisms in T cell function. *Trends Immunol* 29:295-301.
- Opelz G, Wujciak T, Dohler B, Scherer S, Mytilineos J (1999) HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study. *Rev Immunogenet* 1:334-342.
- Oppenheimer F, Aljama P, Asensio Peinado C, Bustamante Bustamante J, Crespo Albiach JF, Guirado Perich L (2004) The impact of donor age on the results of renal transplantation. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 19 Suppl 3:iii11-15.
- Pantenburg B, Heinzl F, Das L, Heeger PS, Valujskikh A (2002) T cells primed by *Leishmania major* infection cross-react with alloantigens and alter the course of allograft rejection. *J Immunol* 169:3686-3693.
- Pellegrini P, Berghella AM, Contasta I, Adorno D (2003) CD30 antigen: not a physiological marker for TH2 cells but an important costimulator molecule in the regulation of the balance between TH1/TH2 response. *Transpl Immunol* 12:49-61.

- Poggio ED, Augustine JJ, Clemente M, Danzig JM, Volokh N, Zand MS, Hricik DE, Heeger PS (2007) Pretransplant cellular alloimmunity as assessed by a panel of reactive T cells assay correlates with acute renal graft rejection. *Transplantation* 83:847-852.
- Poggio ED, Clemente M, Hricik DE, Heeger PS (2006) Panel of reactive T cells as a measurement of primed cellular alloimmunity in kidney transplant candidates. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 17:564-572.
- Rebibou JM, Bittencourt MC, Saint-Hillier Y, Chabod J, Dupont I, Bittard H, Chalopin JM, Herve P, Tiberghien P (2004) T-cell flow-cytometry crossmatch and long-term renal graft survival. *Clin Transplant* 18:558-563.
- Reinsmoen NL, Cornett KM, Kloehn R, Burnette AD, McHugh L, Flewellen BK, Matas A, Savik K (2008) Pretransplant donor-specific and non-specific immune parameters associated with early acute rejection. *Transplantation* 85:462-470.
- Rogers PR, Dubey C, Swain SL (2000) Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen. *J Immunol* 164:2338-2346.
- Saini D, Ramachandran S, Nataraju A, Benschhoff N, Liu W, Desai N, Chapman W, Mohanakumar T (2008) Activated effector and memory T cells contribute to circulating sCD30: potential marker for islet allograft rejection. *Am J Transplant* 8:1798-1808.
- Sawitzki B, Schlickeiser S, Reinke P, Volk HD (2009) Pretransplant immune risk assessment. *Curr Opin Organ Transplant* 14:650-655.
- Shipkova M, Wieland E (2012) Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 413:1338-1349.
- Sis B, Mengel M, Haas M, Colvin RB, Halloran PF, Racusen LC, Solez K, Baldwin WM, 3rd, Bracamonte ER, Broecker V, Cosio F, Demetris AJ, Drachenberg C, Einecke G, Gloor J, Glotz D, Kraus E, Legendre C, Liapis H, Mannon RB, Nankivell BJ, Nickleit V, Papadimitriou JC, Randhawa P, Regele H, Renaudin K, Rodriguez ER, Seron D, Seshan S, Suthanthiran M, Wasowska BA, Zachary A, Zeevi A (2010) Banff

- '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant* 10:464-471.
- Slavcev A, Lacha J, Honsova E, Sajdlova H, Lodererova A, Vitko S, Skibova J, Striz I (2005) Soluble CD30 and HLA antibodies as potential risk factors for kidney transplant rejection. *Transpl Immunol* 14:117-121.
- Smith JD, Lawson C, Yacoub MH, Rose ML (2000) Activation of NF-kappa B in human endothelial cells induced by monoclonal and allospecific HLA antibodies. *Int Immunol* 12:563-571.
- Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, Halloran PF, Baldwin W, Banfi G, Collins AB, Cosio F, David DS, Drachenberg C, Einecke G, Fogo AB, Gibson IW, Glotz D, Iskandar SS, Kraus E, Lerut E, Mannon RB, Mihatsch M, Nankivell BJ, Nickleit V, Papadimitriou JC, Randhawa P, Regele H, Renaudin K, Roberts I, Seron D, Smith RN, Valente M (2008) Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 8:753-760.
- Spiridon C, Nikaein A, Lerman M, Hunt J, Dickerman R, Mack M (2008) CD30, a marker to detect the high-risk kidney transplant recipients. *Clin Transplant* 22:765-769.
- Susal C, Pelzl S, Dohler B, Opelz G (2002) Identification of highly responsive kidney transplant recipients using pretransplant soluble CD30. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 13:1650-1656.
- Terasaki PI, Ozawa M, Castro R (2007) Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival. *Am J Transplant* 7:408-415.
- Vaidya S, Partlow D, Barnes T, Thomas P, Gugliuzza K (2006) Soluble CD30 concentrations in ESRD patients with and without panel reactive HLA antibodies. *Clin Transplant* 20:461-464.
- Valujskikh A (2006) The challenge of inhibiting alloreactive T-cell memory. *Am J Transplant* 6:647-651.
- van den Brink MR, Burakoff SJ (2002) Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Immunol* 2:273-281.

Viklický O (2010) Imunosuprese po transplantaci ledviny. *Klinická farmakologie a farmacie* 2:84-86.

Viklický O, Janoušek L, Baláž P a kolektiv (2008) *Transplantace ledviny v klinické praxi*. Praha: Grada Publishing.

Volk HD, Kern F (2001) Insights into the specificity and function of (allo)antigen-reactive T cells. *Am J Transplant* 1:109-114.

Wang H, Arp J, Liu W, Faas SJ, Jiang J, Gies DR, Ramcharran S, Garcia B, Zhong R, Rother RP (2007) Inhibition of terminal complement components in presensitized transplant recipients prevents antibody-mediated rejection leading to long-term graft survival and accommodation. *J Immunol* 179:4451-4463.

Wieland E, Olbricht CJ, Susal C, Gurrachaa P, Bohler T, Israeli M, Sommerer C, Budde K, Hartmann B, Shipkova M, Oellerich M (2010) Biomarkers as a tool for management of immunosuppression in transplant patients. *Ther Drug Monit* 32:560-572.

Zou Y, Stastny P, Susal C, Dohler B, Opelz G (2007) Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *The New England journal of medicine* 357:1293-1300.

Internetové odkazy

Koordináční Středisko Transplantací, Praha (13. 4. 2014): <http://www.kst.cz/web/home.php>.