

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2020

Veronika Šípová

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví, B5345

Veronika Šípová

Studijní obor: Zdravotní laborant, 5345R020

**STANOVENÍ VÝSKYTU DONOR SPECIFICKÝCH
PROTILÁTEK U PACIENTŮ PO TRANSPLANTACI
LEDVINY**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Bc. Tomáš Vlas

PLZEŇ 2020

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

Fakulta zdravotnických studií

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Veronika ŠÍPOVÁ**
Osobní číslo: **Z17B0100P**
Studijní program: **B5345 Specializace ve zdravotnictví**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Stanovení výskytu donor specifických protilátek u pacientů po transplantaci ledviny**
Zadávací katedra: **Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví**

Zásady pro vypracování

- Zpracovat seznam odborné literatury na vybrané téma
- Stanovit cíl kvalifikační práce
- Zpracovat teoretickou a praktickou část práce dle požadavků FZS
- Popsat metodiku praktické části
- Vypracovat diskuzi a závěr kvalifikační práce
- Dodržet formální úpravu kvalifikační práce dle požadavků FZS
- Dodržet citační normu



Rozsah bakalářské práce:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- HOŘEJŠÍ, Václav. Základy imunologie. 6. vydání. Praha: Triton, 2017. 304 s. ISBN 978-80-7553-250-3.
- KREJSEK, Jan a Otakar KOPECKÝ. Klinická imunologie. 1. vydání. Hradec Králové: Nucleus HK, 2004. 941 s. ISBN 80-86225-50-X.
- KREJSEK, Jan. Imunologie člověka. 1. vydání. Hradec Králové: Garamon, 2016. 495 s. ISBN 978-80-86472-74-4.
- KOPECKÝ, Otakar. Laboratorní vyšetření v klinické imunologii a alergologii. 1. vydání. Hradec Králové: Garamon, 2004. 112 s. ISBN 80-86472-17-5.
- CHAPEL, Helen. Essentials of clinical immunology. 5. vydání. Oxford: Blackwell, 2006. 358 s. ISBN 1-4051-2761-9.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Bc. Tomáš Vlas

Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Datum zadání bakalářské práce:

18. června 2019

Termín odevzdání bakalářské práce:

31. března 2020

PhDr. Lukáš Štich
děkan



Mgr. Stanislava Reichertová
vedoucí katedry

V Plzni dne 31. ledna 2020

Čestné prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 29. 4. 2020

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Šípová Veronika

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Stanovení výskytu donor specifických protilátek u pacientů po transplantaci ledviny

Vedoucí práce: Ing. Bc. Tomáš Vlas

Počet stran – číslované: 49

Počet stran – nečíslované: 24

Počet příloh: 5

Počet titulů použité literatury: 36

Klíčová slova: HLA systém, donor specifické protilátky, transplantace, rejekce, metoda Luminex®

Souhrn:

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo získat přehled o výskytu donor specifických protilátek (DSA) u pacientů po transplantaci ledviny. DSA hrají významnou roli v přežívání štěpu. Dalším cílem bylo zjistit zastoupení HLA alel v populaci a porovnat ho s výskytem DSA.

Stanovení donor specifických protilátek probíhalo na analyzátoru Luminex® s využitím screeningových imunotestů LIFECODES LSA™ I. a II. třídy ve Fakultní nemocnici Plzeň. Vyšetřovaný soubor tvořilo 315 vyšetřovaných pacientů z nichž mělo 91 pozitivní nález donor specifických protilátek.

Z výsledků bylo zjištěno, že nejčastějšími protilátkami vyskytujícími se u pacientů po transplantaci ledviny jsou: anti-A*24:02, anti-A*23:01, anti-B*15:12, anti-B*82:02, anti-B*44:02, anti-C*17:01, anti-C*04:01, anti-DQB1*06:02, anti-DQB1*03:03, anti-DRB1*04:01 a anti-DRB1*09:01. Nejvíce zastoupenými alelami v populaci byly: A*02:01, A*01:01, B*07:02, B*08:01, C*07:01, C*07:02, DQB1*03:01, DQB1*06:02, DRB1*07:01 a DRB1*15:01. Dále bylo zjištěno, že zastoupení HLA alel v populaci nijak nekoreluje s výskytem DSA u pacientů. Pro praxi lze doporučit vyšetření epitopů antigenů proti nimž je DSA namířena.

Abstract

Surname and name: Šípová Veronika

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Determination of donor specific antibodies in kidney transplant patients

Consultant: Ing. Bc. Tomáš Vlas

Number of pages – numbered: 49

Number of pages – unnumbered: 24

Number of appendices: 5

Number of literature items used: 36

Keywords: HLA system, donor specific antibodies, transplantation, rejection, Luminex[®] assay

Summary:

The main goal of this bachelor thesis was to obtain an overview of the prevalence of donor specific antibodies (DSA) in patients after kidney transplantation. DSA has an important role in the survival of the graft. Another objective was to determine the representation of HLA alleles in the population and compare it with the incidence of DSA.

Donor-specific antibodies were determined on a Luminex[®] analyzer using LIFECODES LSA[™] I. and II. class screening immunoassays at the University Hospital Pilsen. The examined group consisted of 315 examined patients, which 91 of them had a positive finding of donor specific antibodies.

The results showed that the most common antibodies occurring in kidney transplant patients are: anti-A*24:02, anti-A*23:01, anti-B*15:12, anti-B*82:02, anti-B*44:02, anti-C*17:01, anti-C*04:01, anti-DQB1*06:02, anti-DQB1*03:03, anti-DRB1*04:01 and anti-DRB1*09:01. The most common alleles in the population were: A*02:01, A*01:01, B*07:02, B*08:01, C*07:01, C*07:02, DQB1*03:01, DQB1*06:02, DRB1*07:01 and DRB1*15:01. The results show that there is no correlation between donor specific antibodies frequencies and HLA alleles frequencies. In practice, examination of epitopes of antigens against which DSA is directed may be recommended.

PŘEDMLUVA

Dlouho jsem přemýšlela, jaké téma zvolit pro mojí bakalářskou práci. Chtěla jsem aktuální téma, které se bude dotýkat jednoho z hlavních předmětů mého studia. Rozhodla jsem se pro imunologii a téma, které se věnuje transplantaci ledvin. Rejekce štěpu v souvislosti s donor specifickými protilátkami a možností jejich stanovení je momentálně jedním z velkých a důležitých témat celosvětové transplantologie, protože tyto protilátky mohou způsobit všechny typy rejekčních mechanismů.

Poděkování

Děkuji Ing. Bc. Tomáši Vlasovi za odborné vedení práce, pomoc, poskytování rad, materiálních podkladů, a čas, který mi věnoval. Dále bych chtěla poděkovat svým rodičům za podporu při studiu.

OBSAH

SEZNAM GRAFŮ	11
SEZNAM OBRÁZKŮ	12
SEZNAM TABULEK	13
SEZNAM ZKRATEK	14
ÚVOD.....	16
TEORETICKÁ ČÁST	17
1 HLA SYSTÉM	17
1.1 Organizace genetické informace v HLA systému	17
1.2 HLA nomenklatura	18
1.2.1 Sérologická nomenklatura	18
1.2.2 Molekulárně – genetická nomenklatura	19
1.3 HLA molekuly I. třídy	19
1.4 HLA molekuly II. třídy.....	20
1.5 Zpracování a prezentace antigenních peptidů	21
1.5.1 Molekuly HLA I. třídy.....	21
1.5.2 Molekuly HLA II. třídy	22
1.6 HLA typizace.....	23
1.6.1 Sérologické metody HLA typizace.....	23
1.6.2 Molekulárně – genetické metody HLA typizace.....	24
1.7 xMAP technologie firmy Luminex®	25
2 PROTILÁTKY	27
2.1 Struktura protilátek	27
2.2 Jednotlivé třídy imunoglobulinů.....	28
2.2.1 IgG	28
2.2.2 IgM	28
2.2.3 IgE	29
2.2.4 IgA	29
2.2.5 IgD.....	29
2.3 Anti-HLA protilátky ve vztahu k transplantacím	29
2.3.1 Donor specifické protilátky	29
3 TRANSPLANTACE	31
3.1 Druhy transplantací.....	31
3.2 Transplantace ledvin.....	32
3.3 Dárci ledvin	33
3.4 Rejekce štěpu.....	34
3.4.1 Hyperakutní rejekce.....	34
3.4.2 Akutní rejekce.....	35
3.4.3 Chronická rejekce	37
3.5 Imunosupresivní léčba po transplantaci ledviny	37
3.5.1 Indukční režim	37
3.5.2 Udržovací režim	38
3.5.3 Antirejekční terapie	38

PRAKTICKÁ ČÁST	39
4 CÍL PRÁCE	39
5 VÝZKUMNÉ OTÁZKY	40
6 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	41
7 METODIKA PRÁCE	42
7.1 Materiál, reagentie, pomůcky a přístroje	43
7.2 Postup stanovení	44
8 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	45
8.1 Lokus A – Zastoupení HLA alel v populaci	45
8.2 Lokus A – Zastoupení donor specifických protilátek u pacientů	46
8.3 Lokus A – Porovnání zastoupení DSA u pacientů a HLA alel v populaci	47
8.4 Lokus B – Zastoupení HLA alel v populaci	48
8.5 Lokus B – Zastoupení donor specifických protilátek u pacientů	49
8.6 Lokus B – Porovnání zastoupení DSA u pacientů a HLA alel v populaci	50
8.7 Lokus C – Zastoupení HLA alel v populaci	51
8.8 Lokus C – Zastoupení donor specifických protilátek u pacientů	52
8.9 Lokus C – Porovnání zastoupení DSA u pacientů a HLA alel v populaci	53
8.10 Lokus DQB1 – Zastoupení HLA alel v populaci	54
8.11 Lokus DQB1 – Zastoupení donor specifických protilátek u pacientů	55
8.12 Lokus DQB1 – Porovnání zastoupení DSA u pacientů a HLA alel v populaci ..	56
8.13 Lokus DRB1 – Zastoupení HLA alel v populaci	57
8.14 Lokus DRB1 – Zastoupení donor specifických protilátek u pacientů	58
8.15 Lokus DRB1 – Porovnání zastoupení DSA u pacientů a HLA alel v populaci ..	59
DISKUZE	60
ZÁVĚR	64
SEZNAM LITERATURY	65
SEZNAM PŘÍLOH	68
PŘÍLOHY	69

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Porovnání výskytu četnosti donor specifických protilátek u pacientů a HLA alel v populaci v rámci lokusu A.....	47
Graf 2 Porovnání výskytu četnosti donor specifických protilátek u pacientů a HLA alel v populaci v rámci lokusu B.....	50
Graf 3 Porovnání výskytu četnosti donor specifických protilátek u pacientů a HLA alel v populaci v rámci lokusu C.....	53
Graf 4 Porovnání výskytu četnosti donor specifických protilátek u pacientů a HLA alel v populaci v rámci lokusu DQB1	56
Graf 5 Porovnání četnosti výskytu donor specifických protilátek u pacientů a HLA alel v populaci v rámci lokusu DRB1	59

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1	Struktura molekuly HLA I. třídy.....	20
Obrázek 2	Struktura molekuly HLA II. třídy	21
Obrázek 3	Ukázka obarvených mikrokuliček systému Luminex® a excitace záření lasery	25
Obrázek 4	Struktura protilátky a vazba antigenu v jejím Fab fragmentu.....	28
Obrázek 5	Ledvina v řezu.....	33
Obrázek 6	Přímé a nepřímé rozpoznání HLA antigenu	36
Obrázek 7	Analyzátor Luminex® (Luminex Corporation, Austin, TX).....	42
Obrázek 8	Mikrotitrační destička využívaná pro stanovení DSA	44

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Počet provedených transplantací v ČR v roce 2019.....	31
Tabulka 2 Zastoupení HLA alel lokusu A v populaci.....	45
Tabulka 3 Zastoupení DSA lokusu A u pacientů po transplantaci ledviny.....	46
Tabulka 4 Zastoupení HLA alel lokusu B v populaci.....	48
Tabulka 5 Zastoupení donor specifických protilátek lokusu B u pacientů po transplantaci ledviny.....	49
Tabulka 6 Zastoupení HLA alel lokusu C v populaci.....	51
Tabulka 7 Zastoupení donor specifických protilátek lokusu C u pacientů po transplantaci ledviny.....	52
Tabulka 8 Zastoupení HLA alel lokusu DQB1 v populaci.....	54
Tabulka 9 Zastoupení donor specifických protilátek lokusu DQB1 u pacientů po transplantaci ledviny.....	55
Tabulka 10 Zastoupení HLA alel lokusu DRB1 v populaci.....	57
Tabulka 11 Zastoupení donor specifických protilátek lokusu DRB1 u pacientů po transplantaci ledviny.....	58

SEZNAM ZKRATEK

APC.....	<i>antigen presenting cell</i> , antigen prezentující buňka
β_2m	β_2 – mikroglobulin
BcR	<i>B cell receptor</i> , specifický receptor B lymfocytů pro antigen
Bw6.....	široký antigen 6
CD.....	<i>cluster of differentiation</i> , diferenciační skupina (povrchové determinanty buněk)
CDC	<i>complement dependent cytotoxicity crossmatch test</i> , komplement-dependentní lymfocytotoxický test
CLIP.....	<i>class II-associated invariant chain peptide</i> , peptid invariantního řetězce asociovaný s HLA II. třídy
CREGs	<i>cross reactive groups</i> , křížově reagující skupiny
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DSA	<i>donor specific antibody</i> , donor specifická protilátka
HLA	<i>human leukocyte antigens</i> , hlavní histokompatibilní systém člověka
Ig	imunoglobulin
IVIg	intravenózní imunoglobuliny
LCT	lymfocytotoxický test
MAC	<i>membrane attack complex</i> , membrány atakující komplex
MASP2	serinová proteáza
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i> , intenzita fluorescenčního záření
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , hlavní histokompatibilní systém
MICA.....	<i>MHC class I polypeptide-related sequence A</i> , povrchový glykoprotein
MICB	<i>MHC class I polypeptide-related sequence B</i> , povrchový glykoprotein
PCR.....	polymerázová řetězová reakce
PCR-SSO	polymerázová řetězová reakce s následnou hybridizací se sekvenčně specifickými oligonukleotidy
PCR-SSP.....	polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými primery

PE.....*phycoerythrin*, fykoerytrin
SBT sekvenování HLA alel
TAP..... transportní systém
TcR *T cell receptor*, specifický receptor T lymfocytů pro antigen
Th..... *Helper T lymphocyte*, pomocný T lymfocyt
xMAP..... *multi-analyte profiling*, multiplexní analýza vzorků

ÚVOD

Ledviny jsou v současné době nejčastěji transplantovaným orgánem. Zásadní vliv na přežití transplantovaného štěpu mají anti-HLA protilátky. Mohou se vytvořit po opakovaném těhotenství, opakované transplantaci nebo krevní transfúzi. Donor specifické protilátky (DSA) jsou protilátky, které si tvoří příjemce proti HLA antigenům I. a II. třídy umístěných na povrchu transplantovaného orgánu. Účastní se všech typů rejekčních mechanismů, a to jak hyperakutní, tak akutní i chronické rejekce. Proto jsou součástí základního vyšetření před i po orgánové transplantaci.

Dříve se vyšetření anti-HLA protilátek provádělo jen za pomoci lymfocytotoxického testu (LCT), dnes je možno využít moderních multiplexových metod jakou je např. xMAP (multi-analyte profiling) technologie firmy Luminex[®], která je v současné době považována za nejsenzitivnější metodu stanovení anti-HLA protilátek a umožňuje zjistit i jejich sílu a specifitu.

Cílem bakalářské práce je získat přehled o přítomnosti DSA u pacientů po transplantaci ledviny, zjistit jaký je výskyt alel v populaci a následně data porovnat. Bakalářská práce je členěna do dvou částí.

Teoretická část obsahuje informace o HLA systému, jeho nomenklatuře, molekulách a metodách HLA typizace včetně metody Luminex[®], kterou využívá k detekci donor specifických protilátek Ústav imunologie a alergologie FN Plzeň. Dalším tématem jsou protilátky, jejich struktura, dělení a význam ve vztahu k transplantacím. Třetí kapitola přibližuje problematiku transplantací, výběru dárců, hyperakutní, akutní a chronické rejekce štěpu. Následuje souhrn imunosupresivní léčby po transplantaci a její režimy.

Praktická část je věnována stanovení anti-HLA protilátek a interpretaci získaných výsledků. Dále sestavení přehledu HLA alel vyskytujících se v populaci České republiky a jejich porovnání s výskytem protilátek u pacientů Fakultní nemocnice v Plzni po transplantaci ledviny.

Diskuze srovnává výsledky mého stanovení s ostatními studii.

TEORETICKÁ ČÁST

1 HLA SYSTÉM

Jako MHC systém (Major Histocompatibility Complex) je nazýván tzv. hlavní histokompatibilní systém. Ten je přítomen u všech vyšších obratlovců a pro každý druh má rozdílný název. HLA systém (Human Leukocyte Antigen) je hlavním histokompatibilním systémem člověka (Krejsek, a další, 2016). Jde o skupinu genetických lokusů, které kódují tři třídy polypeptidů (HLA I., II. a III. třídy). Tyto polypeptidy mají zásadní význam ve fungování a regulaci imunitního systému. Produkty HLA systému, tzv. HLA molekuly, zajišťují odlišení vlastních buněk od cizích, rozpoznání patogenů a pomáhají při selekci lymfocytů v jejich vývoji. Někdy bývají nazývány také jako transplantační antigeny. (Dobrovolná, a další, 2015).

Ve třicátých letech dvacátého století byla objevena skupina bílkovinných molekul, které byly zodpovědné za rejekci štěpu u myši. Na konci padesátých let byly u lidí pomocí protilátek zachyceny tyto molekuly taktéž, a to na leukocytech. Proto dostaly označení human leukocyte antigens (HLA) (Krejsek, a další, 2016).

Tento systém je vysoce polymorfní (Krejsek, a další, 2016). Genetický polymorfismus znamená existenci více než jedné alely v jednom genetickém lokusu s výskytem v populaci vyšším než jedno procento (Dobrovolná, a další, 2015). Kombinace HLA molekul na povrchu buněk je u každého člověka unikátní. Výjimku tvoří pouze jednovaječná dvojčata (Krejsek, a další, 2016).

1.1 Organizace genetické informace v HLA systému

HLA systém je dědičný systém přenášející se na potomstvo (Hořejší, a další, 2017). Přenáší se jako celek (haplotyp) a dědičnost je mendelovského typu. Geny pro HLA systém se nachází na jednotlivých lokusech krátkého raménka 6. chromozomu a tvoří zhruba jednu tisícinu lidského genomu. Jde o oblast s vysokou koncentrací genů na krátkém úseku DNA. Díky svému významu je úsek, kde jsou uloženy geny pro HLA systém, jeden z nejlépe prostudovaných úseků lidského genomu (Dobrovolná, a další, 2015). Varianty genů, které kódují jednotlivé HLA molekuly, se nazývají alely (Slavčev, 2019). K září 2019 je celkový počet HLA alel 25 576 z toho je 18 691 HLA alel I. třídy a zbylých 7 065 se řadí ke II. třídě (Anthony Nolan Research Institute, 2019).

Geny pro HLA se rozdělují do tří tříd. Geny HLA I. a II. třídy jsou kodominantní, vyjadřují se současně. Buňky tedy exprimují HLA molekuly matčina i otcova haplotypu (Jílek, 2019).

Molekuly HLA A, B, C, E, F a G kódují geny I. třídy. Oblast pro geny první třídy můžeme dále rozdělit na tři podoblasti, které se značí malými písmeny a, b, c. V oblasti Ia jsou umístěny geny pro molekuly HLA-A, HLA-B, HLA-C. V oblasti Ib jsou geny pro HLA-E, HLA-F, HLA-G a v posledním úseku Ic jsou geny pro MICA a MICB. Molekuly HLA-B vykazují nejvyšší polymorfismus, počet alel se pohybuje přes 4000 (Krejsek, a další, 2016).

V oblasti D, která je nejbližší centromere chromozomu, se nacházejí geny pro molekuly HLA II. třídy. Tato oblast má několik podoblastí, z nichž hlavními jsou DP, DQ a DR. Tyto páry genů kódují těžké a lehké řetězce HLA antigenů II. třídy (Krejsek, a další, 2016).

Geny pro III. třídu HLA molekul kóduje mnoho proteinů, které úzce souvisejí s imunitním systémem, např. C2 a C4 složky komplementu nebo NKp30 a NKp40 receptory NK buněk (Krejsek, a další, 2016).

1.2 HLA nomenklatura

V roce 1968 došlo díky potřebě přehledného názvosloví k založení Nomenklaturního výboru světové zdravotnické organizace pro faktory HLA. Vytvořené názvosloví bylo postupně vylepšováno, avšak v roce 2010 muselo být vzhledem k nárůstu počtů známých alel změněno. Současná HLA nomenklatura dokáže nové alely systematicky zařadit a pojmenovat podle sekvenčních podobností (Dobrovolná, a další, 2015). V dnešní době se využívají dva typy HLA nomenklatury: sérologická a molekulárně – genetická (Hořejší, a další, 2017).

1.2.1 Sérologická nomenklatura

Tento typ nomenklatury byl zaveden v roce 1975, v roce 1984 byl upraven. Využívá sérologické a celulární techniky k určení produktů HLA genů (Hořejší, a další, 2017).

HLA antigeny dělíme do několika skupin:

1. základní antigeny – např. A9, A10, B5, DR3
2. splitové antigeny, které vznikají rozdělením základních antigenů – např. A9 je dělen na A23 a A24
3. obecné antigeny – např. Bw6, DR51, DR53

V sérologické nomenklatuře jsou lokusy značeny velkými písmeny (např. A, B, DR) a specifita antigenu je označena číslem (Hořejší, a další, 2017).

1.2.2 Molekulárně – genetická nomenklatura

Je založena na určení nukleotidových sekvencí alel, vznikla v roce 1987 a byla upravena v roce 2010. Sérologická nomenklatura má pouze dva číslicové znaky, které označují HLA specifitu, ale molekulárně – genetická nomenklatura může mít označení alel vícemístné (Hořejší, a další, 2017).

1. Rozlišení na úrovni „low resolution“ – např. HLA-A*02, kde písmeno A označuje lokus a číslice za * odpovídající sérologickou specifitu
2. Rozlišení na úrovni „high resolution“ – např. HLA-A*02:01, kde písmeno A opět označuje lokus, sérologickou specifitu ukazují první dvě číslice za * a číslice za dvojtečkou označují konkrétní alelu (Hořejší, a další, 2017)

1.3 HLA molekuly I. třídy

HLA molekuly I. třídy jsou přítomny na všech somatických jaderných buňkách organismu, nejvíce však na buňkách imunitního systému. Jedná se o transmembránové glykoproteiny, které jsou tvořené těžkým (α) a lehkým (β) řetězcem. Oba řetězce patří do rodiny imunoglobulinů (Penka, a další, 2012).

Těžký řetězec α má aminoskupinový konec orientovaný extracelulárně, zatímco karboxylový konec se nachází v cytoplazmě buňky. Dále ho můžeme rozdělit na tři oblasti: extracelulární, která se skládá ze tří domén (α_1 , α_2 , α_3), transmembránovou a cytoplazmatickou (Penka, a další, 2012).

Lehký řetězec β je tvořen β_2 – mikroglobulinem (β_{2m}) vázajícím se na těžký řetězec nekovalentní vazbou. β_{2m} není transmembránovým proteinem a není ukotvený v cytoplazmatické membráně. Váže se na α_3 doménu těžkého řetězce a má odpovědnost za správnou orientaci molekuly (Penka, a další, 2012).

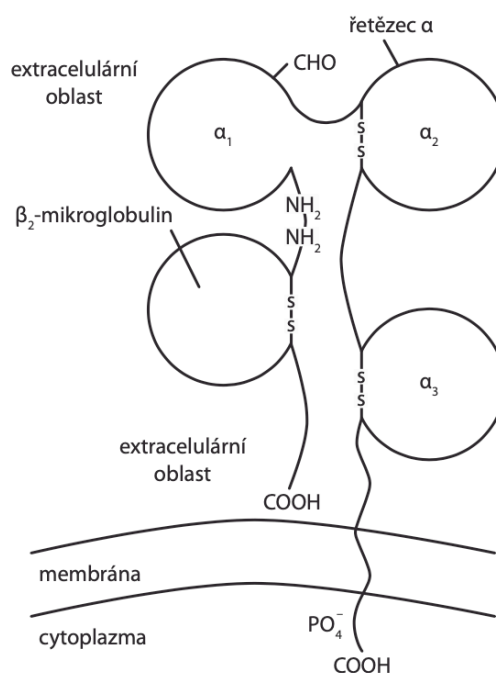
Antigenní peptid o délce 8–10 aminokyselin se váže do žlábků, který vzniká interakcí α_1 a α_2 domény těžkého řetězce. Antigen navázaný na HLA molekule I. třídy se vystavuje T lymfocytům (Penka, a další, 2012). Ty poté rozpoznávají a usmrcují buňky, které tyto antigeny exprimují (Owen, a další, 2013).

Tkáňově specificky se exprimují tzv. neklasické HLA I. třídy, do kterých řadíme molekuly HLA-E, -F, -G (Penka, a další, 2012). Struktura těchto molekul je podobná klasickým HLA I. třídy. Skládají se z podobného těžkého α řetězce a lehkého β řetězce tvořeného β_2 – mikroglobulinem (Hořejší, a další, 2017). Mají ale sníženou expresivitu,

jsou méně polymorfní a jejich produkty se distribuují ve tkáních omezeně (Penka, a další, 2012). Neklasické HLA I. třídy hrají pravděpodobně roli v imunotoleranci vůči nádorovým buňkám (Dobrovolná, a další, 2015).

Mezi HLA I. třídy také patří další jim strukturně podobné molekuly, jako např. transportní FcRn receptor nebo proteiny MICA a MICB, které najdeme na buňkách infikovanými viry, některých nádorových buňkách, a hlavně na povrchu epiteliálních buněk vystavených stresu (Hořejší, a další, 2017).

Obrázek 1 Struktura molekuly HLA I. třídy



Zdroj: Penka, Miroslav, Tesařová, Eva a kolektiv, Hematologie a transfúzní lékařství II, Praha: GRADA Publishing, 2012.

1.4 HLA molekuly II. třídy

HLA molekuly II. třídy jsou stejně jako HLA I. třídy glykoproteiny, které můžeme díky jejich stejné struktuře také zařadit do imunoglobulinů (Penka, a další, 2012). Vyskytují se pouze na antigen prezentujících buňkách (APC), které předkládají antigen T lymfocytům. Do této skupiny buněk řadíme dendritické buňky, aktivovanou formu monocytů – makrofágy a B lymfocyty (Krejsek, a další, 2016).

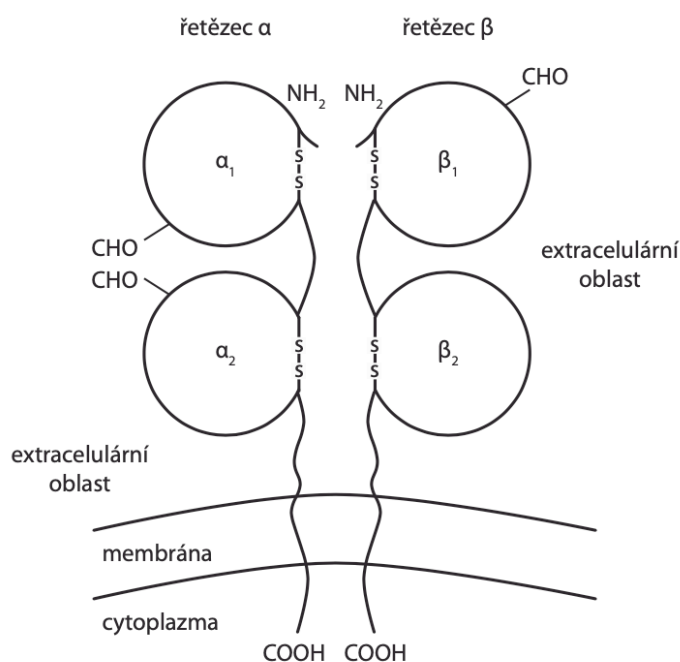
Struktura molekul HLA II. třídy je heterodimerní, skládá se z těžkého (α) a lehkého (β) řetězce vázaných nekovalentní vazbou.

Těžký řetězec α se stejně jako u molekul HLA I. třídy skládá z extracelulární, transmembránové a cytoplazmatické oblasti (Owen, a další, 2013). Na svých dvou doménách α_1 a α_2 , které jsou umístěny extracelulárně, má navázané dva postranní oligosacharidové řetězce (-CHO) (Penka, a další, 2012).

Lehký řetězec β obsahuje domény β_1 a β_2 , kdy pouze na doméně β_1 nalezneme jeden oligosacharidový řetězec.

Interakcemi mezi doménami α_1 a β_1 řetězců vznikne žlábek, do kterého se navazuje antigen. Protože je vazebné místo na rozdíl od molekul HLA I. třídy otevřené, může se na něj vázat antigenní fragment o délce 15–35 aminokyselin nebo delší (Penka, a další, 2012).

Obrázek 2 Struktura molekuly HLA II. třídy



Zdroj: Penka, Miroslav, Tesařová, Eva a kolektiv, Hematologie a transfúzní lékařství II, Praha: GRADA Publishing, 2012.

1.5 Zpracování a prezentace antigenních peptidů

1.5.1 Molekuly HLA I. třídy

HLA molekuly I. třídy prezentují endogenní antigeny, tedy antigeny nacházející se uvnitř buňky (Slavčev, 2019). Mezi zdroje endogenních antigenů patří produkty intracelulárních patogenů, a to zejména virů. Dále jimi mohou být vlastní proteiny, které jsou

chybně syntetizované, nepotřebné, pozměněné nebo nesprávně vytvořené (Krejsek, a další, 2016).

Antigeny jsou v cytoplazmě označeny molekulami ubiquitinu (Klein, a další, 2000). Označený protein je zbaven vyšší konformační struktury a putuje do imunoproteasomu, kde je štěpen na peptidy. Ty jsou poté translokovány do endoplazmatického retikula za pomoci transportního systému TAP (Krejsek, a další, 2016).

Syntéza α řetězce HLA molekuly I. třídy probíhá na ribozomech endoplazmatického retikula. Nově vzniklá molekula je ještě před spojením s β_2 – mikroglobulinem ukotvena do membrány, je stabilizována a prostorově překontrolována chaperony. Dochází ke spojení molekuly s β_2 – mikroglobulinem a k asociaci s komplexem TAP. Ten předá antigenní peptid HLA molekule I. třídy a ta ho na sebe naváže. Pokud je peptid delší než přípustných 8–10 aminokyselinových zbytků, je nutné, aby byl před navázáním na molekulu HLA zkrácen. Děje se tak pomocí aminopeptidáz (Krejsek, a další, 2016).

HLA molekula s navázaným antigenním peptidem je přes Golgiho aparát transportována na povrch buňky, kde dochází k jejímu rozpoznání cytotoxickým $CD8^+$ T lymfocytům (Krejsek, a další, 2016).

1.5.2 Molekuly HLA II. třídy

Exogenní antigeny jsou zachytávány a zpracovávány antigen prezentujícími buňkami – dendritickými buňkami, makrofágy a B lymfocyty. Hlavními cestami přesunu materiálu z vnějšího povrchu buňky do nitra je endocytóza zprostředkovaná receptorem, fagocytózou a pinocytózou. Antigeny se nacházejí v časných endosomech, které se postupně vyvíjejí v pozdní endosomy a nakonec se dovyvinou v lysozomy. Tam probíhá za pomoci enzymů jejich rozklad na peptidy, které jsou vhodné k prezentaci T lymfocytům (Krejsek, a další, 2016).

HLA molekuly II. třídy vznikají v endoplazmatickém retikulu, kde se na ně ještě před transportem do endosomu váže invariantní řetězec, který molekulu stabilizuje a zároveň zabraňuje tomu, aby se na vytvořenou HLA molekulu nenavázal antigenní peptid předčasně (Krejsek, a další, 2016).

Po transportu molekuly do endosomu dochází k odštěpení invariantního řetězce až na fragment, který se označuje jako CLIP. Na jeho místo později přijde antigenní peptid. Po jeho navázání je HLA molekula II. třídy transportována z endosomu na povrch buňky a je rozpoznána pomocným $CD4^+$ T lymfocytům (Krejsek, a další, 2016).

1.6 HLA typizace

HLA typizace je vyšetření sestavy HLA u konkrétního pacienta. Indikací k tomuto vyšetření je ve většině případů předtransplantační vyšetření. Dále se provádí při určování paternity nebo u onemocnění s vysokou asociací s určitými HLA haplotypy, jako je např. Bechtěrevova choroba (Liška, a další, 2013). HLA typizaci můžeme provádět buď sérologickou nebo molekulárně-genetickou metodou (Penka, a další, 2012).

1.6.1 Sérologické metody HLA typizace

Pomocí sérologických metod můžeme určit HLA molekuly I. i II. třídy. Tato metoda identifikuje HLA antigeny vystavené na povrchu buňky. K typizaci se používají typizační séra, která by měla být v ideálním případě monospecifická, tzn. že by měla reagovat s jediným HLA antigenem. Bohužel jsou vzácná a ve většině případů se využívají polyspecifická séra, která reagují s více antigeny (Penka, a další, 2012).

Typování HLA antigenů se provádí lymfocytotoxickým testem (LCT) z lymfocytů izolovaných z periferní krve pacienta. Kultivační mikrodestičky mají ve svých jamkách navázané monoklonální protilátky nebo séra proti jednotlivým alelám. Do těchto jamek se přidá dva tisíce izolovaných lymfocytů a destička se inkubuje. Po skončení inkubace se přidá králičí komplement, destička se znovu inkubuje. V posledním kroku se přidá diskriminační barvivo a fixací buněk se zastaví reakce (Bartůňková, a další, 2011).

V první části reakce dojde k navázání HLA specifických protilátek na antigeny. Díky tomu se může aktivovat komplement a dojde k lýze buněk. Do buňky se přes porušenou membránu dostává diskriminační barvivo. Tuto reakci můžeme vidět ve světelném mikroskopu. Pokud nedojde k aktivaci komplementu, buňky zůstávají světlé (bez barviva) (Bartůňková, a další, 2011).

Sérologické metody HLA typizace jsou zatíženy určitou mírou nepřesnosti. Problémem jsou antigeny určitého lokusu, které tvoří tzv. křížově reagující skupiny – CREGs (Cross-reactive groups). Jako příklad můžeme uvést antigen HLA-B7, který kromě séra anti-HLA-B27 reaguje i s dalšími séry jako jsou anti-B22, anti-B27 atd. Tyto skupiny poté mohou zapříčinit falešně pozitivní výsledek. Dalším problémem je slabá exprese HLA molekul na buňkách pacienta, kdy dochází k falešně negativním výsledkům. Obtížná sérologická HLA typizace je např. i u nádorových buněk, které mají změněnou morfologii nebo u buněk s nižší životností (Penka, a další, 2012).

1.6.2 Molekulárně – genetické metody HLA typizace

Pomocí metody PCR (polymerázová řetězová reakce) se provádí genotypizace HLA alel. V přítomnosti specifických primerů, Taq polymerázy a deoxyribonukleotidů dojde k namnožení vybraného úseku DNA. Pro určování HLA alel se používají dva genotypizační způsoby. První je nazýván jako „low resolution“ a slouží k rozeznání alel na nižším stupni rozlišení, vyšší stupeň rozlišení umožňuje druhý způsob „high resolution“ (Penka, a další, 2012).

Mezi molekulárně – genetické metody využívané k typizaci HLA molekul řadíme:

1. **PCR-SSP** (polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými primery)
PCR-SSP využívá sady párových primerů komplementární ke konkrétní alele. Při pozitivní reakci proběhne PCR reakce tam, kde primery najdou ve vyšetřované DNA komplementární protějšek v celé své délce. Pokud primery nenajdou ve vyšetřované DNA komplementární sekvenci, nedojde ke specifické amplifikaci a reakce je negativní. Hodnocení přítomnosti specifických PCR produktů se provádí po rozdělení elektroforézou na agarózovém gelu (Penka, a další, 2012).
2. **PCR-SSO** (polymerázová řetězová reakce s následnou hybridizací se sekvenčně specifickými oligonukleotidy)
Metoda využívá pár primerů, který zapříčiní amplifikaci typizovaného HLA lokusu. Reverzní hybridizací dojde v postamplifikační fázi k rozlišení alel (Penka, a další, 2012).
3. **Sekvenování HLA alel** (SBT)
STB metoda se využívá k určování nových HLA alel. Fluorescenčně označené stop-nukleotidy při PCR dávají za vznik vláknům DNA s rozdílnou délkou. Tato vlákna začínají stejnou startovací sekvencí a končí značeným stop-nukleotidem. Následuje elektroforetické rozdělení produktů PCR a laserovému snímání konce značeného nukleotidu. Nasnímaná sekvence je poté srovnávána pomocí počítače se známými sekvencemi HLA alel. (Penka, a další, 2012)
4. **Mikročipová metoda**
Technologie mikročipu je revoluční metoda, která však ještě není rutinně používána. Na plochu mikročipu, který má rozměry 1 x 1 cm a je na něm umístěno tisíce oligonukleotidových sond, se přidává DNA. Dochází k hybridizaci a jejímu vyhodnocení pomocí speciálního analyzátoru. (Penka, a další, 2012)

5. HLA typizace prostřednictvím průtokového analyzátoru (např. Luminex®)

Mikročástice, které jsou barevně odlišené pomocí flurochromů, jsou konjugovány s protilátkou nebo DNA sondou, díky které dochází k záchytu cílových molekul. Následuje amplifikace pomocí PCR a hybridizace s DNA sondami navázanými na barevné mikročástice. Mikročástice vysílají fluorescenční signály a ty jsou snímány pomocí laseru v průtokovém analyzátoru. Výsledná data se automaticky zpracují a vyhodnotí. (Penka, a další, 2012)

1.7 xMAP technologie firmy Luminex®

xMAP (multi-analyte profiling) technologie firmy Luminex® je multiplexová metoda, která umožňuje stanovení až pět set analytů v jednom vzorku současně v závislosti na tom, jaký systém použijeme (Bio-Rad Laboratories, 2020). Tato technologie stanovení DSA je mnohem více senzitivnější než CDC crossmatch test a v některých případech je schopna předvídat rejekci štěpu i když je CDC crossmatch negativní. Stanovuje totiž všechny protilátky bez ohledu na to, zda dokážou vázat komplement (Viklický, 2013).

Metoda je kombinací imunoanalýzy a průtokové cytometrie. Zkráceně se dá říci, že principem je molekulární reakce, která probíhá na různě barevných, fluorescenčně označených, mikrokuličkách. Ty po excitaci laserem poskytnou fluorescenční signál (Bačina, a další, 2020).

Obrázek 3 Ukázka obarvených mikrokuliček systému Luminex® a excitace záření lasery

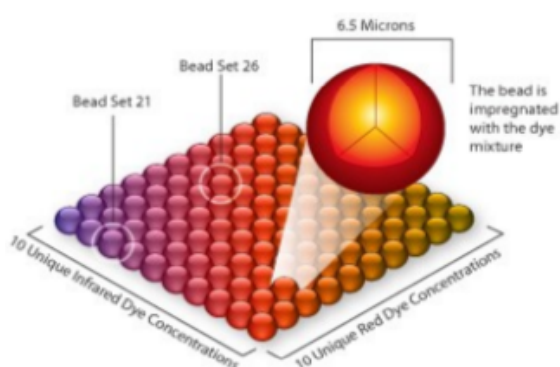


Figure 1: Impregnation of polystyrene beads with specific concentrations of two different red-emitting fluorophores allows the specific identification of 100 different bead types.

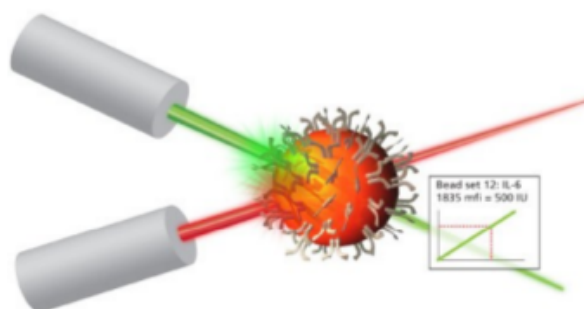


Figure 2: Dual lasers in the LX100 instrument excite the identification fluorophores within each bead as well as the phycoerythrin fluorescent detection protein on the bead

Zdroj: https://www.oceanridgebio.com/sites/default/files/html/luminex_xmap.html.

Polystyrenové mikrokuličky používané touto metodou mají velikost 5,6 μm a jsou obarveny dvěma spektrálně odlišnými fluorochromy. Podle toho, jaké množství každého fluorochromu se na obarvení kuličky použije, vzniknou partikule každá o jiné barvě. Díky tomu je možné stanovení až několikaset analytů v jednom vzorku současně, protože každá partikule má jedinečné zbarvení (Dunbar, 2006). Na povrchu mikrokuliček je umístěny HLA antigeny, na které se poté může vázat stanovovaná protilátka namířená proti konkrétnímu HLA antigenu (Viklický, 2013).

Dalším krokem je přidání kozí IgG protilátky konjugované s fykoerytrinem (PE). Ta se naváže na stanovovanou protilátku, pokud je ve vzorku přítomna (Bio-Rad Laboratories, 2020). Mikrokuličky s navázanými protilátkami procházejí analyzátozem Luminex[®], kde dochází k excitaci, kterou způsobují dva lasery. První excituje červený fluorochrom v partikuli při 635 nm. Ten určí, o jakou mikrokuličku se jedná. Druhý laser excituje fykoerytrin při 532 nm. Díky němu dokážeme detekovat navázané protilátky přítomné v séru pacienta. Excitované záření je poté vedeno k detektorům s fotonásobičem. Kvantitu udává intenzita fluorescenčního záření (MFI) molekuly PE (Lencová, a další, 2019).

2 PROTILÁTKY

V organismu vznikají při odpovědi na imunogen protilátky (Penka, a další, 2012). Jsou to glykoproteiny – imunoglobuliny (Ig), které v imunitní obraně plní dvě základní funkce.

Jejich první funkcí je rozpoznávat a vázat se na cizí molekuly (antigeny). Protilátky mají obrovskou rozmanitost a umí rozpoznat nepřeberné množství cizích molekulárních struktur (antigenních determinant), které se nacházejí např. na povrchu viru nebo bakteriální buňky. Samotná vazba protilátky na tyto determinanty může stačit k inaktivaci patogenu nebo zneškodnění toxinu (Delves, a další, 2017).

Druhou funkcí protilátek jsou jejich efektorové vlastnosti. Dovedou se navázat na komplement, který po své aktivaci protilátkami způsobí lýzu buňky nebo se váží na specifické receptory jednotlivých buněk (fagocytů, lymfocytů...) a aktivují je (Penka, a další, 2012).

2.1 Struktura protilátek

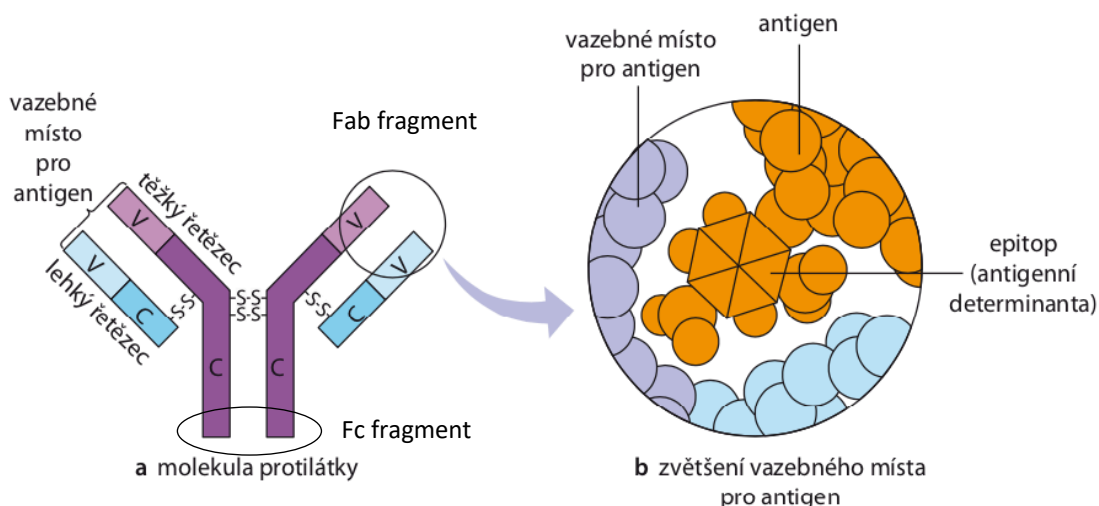
Imunoglobulin má tvar písmene ‚Y‘ a je složen ze čtyř polypeptidových řetězců – dvou lehkých, které mají molekulovou hmotnost 25 000 Da a dvou těžkých s hmotností okolo 55 000 Da (Parija, 2012). Ty jsou spojeny disulfidickými vazbami.

Rozeznáváme dva druhy lehkých řetězců – kappa (κ) a lambda (λ). Geny pro lehké řetězce se nacházejí na rozdílných chromozomech. Primární struktura jejich domén je tedy kódována různými geny, a proto se liší (Penka, a další, 2012).

Geny pro těžké řetězce leží na chromozomu č. 14. Jimi kódované těžké řetězce se poté nazývají alfa (α), delta (δ), epsilon (ϵ), gama (γ), mí (μ). Díky těmto pěti druhům těžkých řetězců rozeznáváme pět tříd imunoglobulinů: IgG, IgM, IgA, IgD a IgE.

Na protilátce se nacházejí dva fragmenty Fab a jeden fragment Fc. Fab fragment slouží jako vazebné místo pro antigen, zatímco Fc fragment se váže na receptory na povrchu leukocytů (Hořejší, a další, 2017). Středová část protilátky tzv. pantová oblast je místo, které umožňuje pohyb Fab fragmentů (Penka, a další, 2012).

Obrázek 4 Struktura protilátky a vazba antigenu v jejím Fab fragmentu



Zdroj: Penka, Miroslav, Tesařová, Eva a kolektiv, Hematologie a transfúzní lékařství II, Praha: GRADA Publishing, 2012, upraveno

2.2 Jednotlivé třídy imunoglobulinů

2.2.1 IgG

Jedná se o nejvíce zastoupenou třídu imunoglobulinů v plazmě. Tvoří cca 80 % celkového sérového imunoglobulinu (Parija, 2012) a jeho hladina se pohybuje u dospělého v rozmezí 7-19 g/l. (Krejsek, a další, 2016) Protilátka typu IgG je monomer, který se tvoří při sekundární imunitní odpovědi. Jako jediná protilátka dokáže procházet placentou. Podle typu těžkých řetězců dokážeme rozlišit čtyři podtřídy: IgG₁ až IgG₄ (Parija, 2012). Rozdíl mezi nimi je v počtu disulfidických můstků v pantové oblasti IgG protilátky.

Podtřídy IgG₁ a IgG₃ reagují s virovými a bakteriálními antigeny. Dobře se váží na C1q složku komplementu, a tím aktivují komplementový systém. Tuto schopnost má i IgG₂, ten však váže C1q složku hůře než předchozí dva podtypy, a proto je aktivace komplementu horší. IgG₄ neváže C1q složku vůbec. Funkce této protilátky je zatím nejasná (Krejsek, a další, 2016).

2.2.2 IgM

IgM protilátky vznikají jako první při setkání s antigenem. Vyznačují se nejvyšší molekulovou hmotností. Tvoří nejvýznamnější část tzv. přirozených protilátek. Přirozené protilátky jsou definovány jako nízkoafinní, polyreaktivní a jsou namířené proti velkému množství proteinových i neproteinových antigenů, včetně autoantigenů. Mají tedy význam v brzké antiinfekční imunitní odpovědi a uplatňují se ve vývoji adaptivní imunity (Krejsek, a další, 2016).

Základní molekula IgM se skládá z pěti podjednotek. Tyto podjednotky jsou spojeny řetězci J. Monomerní IgM protilátky se vyskytují jako součást BcR receptoru na membráně zralých B lymfocytů. Pentamerní IgM je velmi silným aktivátorem komplementu (Krejsek, a další, 2016).

2.2.3 IgE

Imunoglobuliny E jsou v plazmě zastoupeny nejméně. Jsou to silně glykosylované imunoglobuliny, které neaktivují komplementový systém a neprocházejí placentou. Mají schopnost vázat se na efektorové buňky, konkrétně na mastocyty a basofily (Krejsek, a další, 2016). Jsou hlavní příčinou atopických (alergických) reakcí a uplatňují se v obraně proti mnohobuněčným parazitům (Hořejší, a další, 2017).

2.2.4 IgA

Protilátka IgA je uvolňována do slin, mateřského mléka, na povrchy sliznic zažívacího, dýchacího a urogenitálního traktu. Hlavní úlohou IgA je vázat se na mikroorganismy a tím bránit jejich adhezi na povrchu sliznic (Krejsek, a další, 2016).

2.2.5 IgD

IgD se vyskytuje ve slinách, slzách a sekretech dýchacího traktu. Je schopný se vázat na membrány žírných buněk a basofilů. V podobě BcR receptoru se nachází na povrchu B lymfocytů (Krejsek, a další, 2016).

2.3 Anti-HLA protilátky ve vztahu k transplantacím

Anti-HLA protilátky vznikají v organismu po imunizačním podnětu – senzibilizaci. Jde hlavně o protilátky typu IgG, anti-HLA protilátky typu IgM jsou méně časté. Podnětem k senzibilizaci může být opakované těhotenství, opakovaná transplantace nebo krevní transfúze. Až u 20 % žen po opakovaných graviditách nacházíme trvale přítomné cytotoxické anti-HLA protilátky (Řeháček, a další, 2013).

2.3.1 Donor specifické protilátky

Klinicky nejvýznamnější jsou protilátky příjemce, které jsou zacíleny proti HLA antigenům dárce. Tyto protilátky souhrnně nazýváme donor specifické protilátky (DSA – Donor Specific Antibodies). Především sem patří imunoglobuliny třídy G, které jsou namířeny proti HLA antigenům I. a II. třídy, ale také proti molekulám MICA a MICB. Dokáží způsobit odhojení štěpu nebo transplantátu tím, že se naváží na antigeny štěpu nacházející se na endotelové výstelce. Po navázání zaktivují komplement, který způsobí

zánět endotelové výstelky transplantované tkáně a díky němu se nakonec spustí koagulační kaskáda (Krejsek, a další, 2016).

Přítomnost DSA protilátek velmi významně ovlivňuje prognózu přežití transplantátu. DSA se účastní všech typů rejekčních mechanismů, avšak dominují především u hyperakutních rejekcí. Tvorba posttransplantačních DSA je obvyklým příznakem začínající rejekce. U pacientů, kteří byli zařazeni do čekací listiny na transplantaci ledvin, jsou stanovovány DSA protilátky různými metodami. Dnes je to nejčastěji mikrolymfocytotoxický test, multiplexová technologie Luminex[®] nebo virtuální cross-match test. Pokud jsou nalezeny „shody“ ve specifikách protilátek, znamená to vysoké riziko rejekce (Krejsek, a další, 2016).

Nález DSA je závažný, proto se dnes zájem upíná na metody, které dokáží hladinu těchto protilátek snížit nebo je úplně odstranit z organismu příjemce. Nejjednodušší metodou je plazmaferéza a specifická imunoadsorpce (Krejsek, a další, 2016). Při výměnné plazmaferéze se odstraní plazma příjemce s obsahem DSA protilátek a je nahrazena roztoky krystaloidů, koloidů a plazmou. Specifická imunoadsorpce je separační technika, při které se z cirkulace pacienta separuje plazma. Ta následně projde adsorpční komorou, kde se oddělí patogenní komponenta (DSA) a takto ošetřená plazma se vrátí zpět do krevního oběhu příjemce (Řeháček, a další, 2013). Výše uvedené metody se většinou doplňují o podání imunopresiv nebo aplikací intravenózních imunoglobulinů (IVIg). Novým postupem je podání biologických léčiv působících na B lymfocyty a plazmatické buňky (rituximab) (Krejsek, a další, 2016).

3 TRANSPLANTACE

Transplantace je zákrok, při němž dochází k výměně nefunkční tkáně nebo orgánu příjemce za funkční ekvivalent dárce. Imunitní reakce HLA systému hraje v těchto případech zásadní roli (Hořejší, a další, 2017). Nejčastějším druhem orgánové transplantace v posledních letech je transplantace ledvin, po ní následují transplantace, jater, srdce, plic, slinivky břišní a tenkého střeva (Žák, a další, 2012).

Tabulka 1 Počet provedených transplantací v ČR v roce 2019

Transplantovaný orgán	Počet transplantovaných osob
Ledvina	452
Játra	197
Srdce	148
Plíce	42
Slinivka břišní	41
Tenké střevo	1

Zdroj: <https://kst.cz/wp-content/uploads/2020/01/Transplantační-aktivita-v-ČR-2019.pdf>,
upraveno

Mezi základní pojmy v transplantační medicíně patří štěp, což je výraz pro transplantovaný orgán nebo tkáň. Dále rozdíl mezi dárce a příjemcem, kdy dárce je jedinec, ze kterého pochází transplantát, který je poté příjemci transplantován. Posledním základním pojmem je odhojení (rejekce) štěpu, ke které dochází při nežádoucí reakci příjemce na štěp, který je vnímán jako cizorodý. Dochází tak k reakci štěpu proti hostiteli (Hořejší, a další, 2017).

3.1 Druhy transplantací

Existují čtyři základní druhy transplantací, které odrážejí genetický vztah mezi dárce a příjemcem:

1. **Autotransplantace:** Jedná se o přenos vlastní tkáně nebo orgánu z jednoho místa na jiné místo v těle. Jinými slovy můžeme říct, že příjemce je zároveň i dárce. Mezi příklady autotransplantací patří kožní transplantace u pacientů s popáleninami nebo například bypassová operace u pacientů s koronárním onemocněním srdce.

2. **Izotransplantace:** Přenos tkáně nebo orgánu mezi dvěma geneticky identickými jedinci (tj. jednovaječnými dvojčaty) nazýváme izotransplantací. V roce 1954 byla provedena první úspěšná transplantace ledviny tohoto druhu.
3. **Alotransplantace:** Tato forma transplantace je dnes převládající. Tkáň nebo orgán přenášíme z jednoho člověka na druhého. To znamená, že provádíme transplantaci mezi geneticky odlišnými členy stejného druhu.
4. **Xenotransplantace:** Označujeme tak přenos transplantátu mezi různými živočišnými druhy. Tento typ představuje nejvíce rozdílné genetické vztahy mezi druhy a téměř vždy je štěp příjemcem odmítnut (Parija, 2012).

Jako zvláštní druh transplantace, který se nepočítá do základních, můžeme považovat implantace, kdy se používají umělé (syntetické) náhrady tkání (Hořejší, a další, 2017).

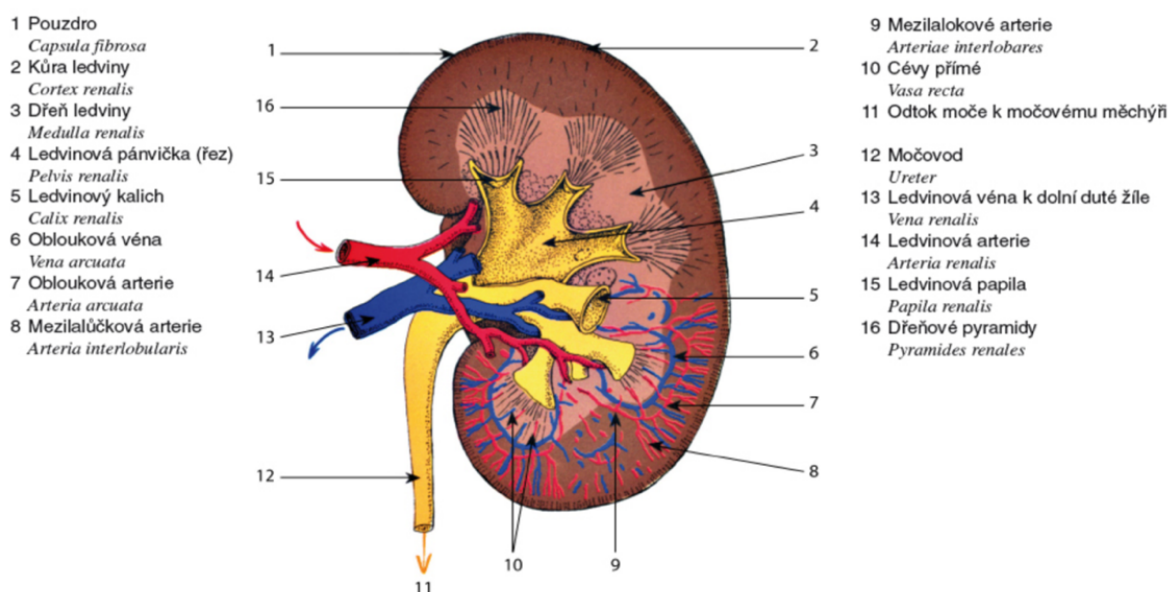
Mezi základní kritéria úspěchu transplantace patří reakce příjemce na štěp. Problém odvržení štěpu je minimální nebo prakticky žádný u autotransplantací. Pouze v případě alotransplantací a xenotransplantací, kdy se používá transplantát z jiného člověka nebo jiného živočišného druhu, vzniká problém s odmítnutím štěpu. Událostmi, které nastanou u těchto dvou druhů transplantací po odejmutí štěpu a následné transplantaci dárce, se zabývá transplantální imunologie (Parija, 2012).

3.2 Transplantace ledvin

Ledviny jsou párový orgán připomínající tvar fazole. Nacházejí se v retroperitoneálním prostoru po obou stranách bederní páteře. Skládají se ze světlejší kůry a tmavší dřeně. Kůra je uložena pod vazivovým pouzdem na povrchu ledviny. Dřeň je upravena do pyramidovitých útvarů.

Základní stavební a funkční jednotkou ledvin je nefron. Dělíme ho na několik částí: Bowmanův váček, ve kterém je uložen glomerulus (klubíčko kapilár), proximální kanálek, Henleovu kličku a distální kanálek. Ten přechází do sběrných kanálků. Glomerulem protéká krev, která se přes stěnu kapilár a stěnu Bowmanova váčku filtruje a zbavuje se tak odpadních látek. Velké množství filtrátu je pak v systému kanálků upraveno na definitivní moč (Dylevský, 1999). Ledviny mají také endokrinní funkci. Produkuje renin, erythropoetin a 1,2 – hydroxycholecalciferol (Čihák, 2013).

Obrázek 5 Ledvina v řezu



Zdroj: https://is.muni.cz/do/fsps/e-learning/zaklady_anatomie/zakl_anatomie_II/pages/soustava_mocova.html#.

První úspěšná transplantace ledvin proběhla v roce 1954. V dnešní době jsou ledviny nejčastějším transplantovaným orgánem. Indikací k transplantaci je selhání ledvin, které je většinou spojené se závažnou chronickou glomerulonefritidou, dále pak s diabetickou nefropatií a těžkou chronickou pyelonefritidou (Krejsek, a další, 2016).

Největší překážkou úspěšné transplantace je tkáňová inkompatibilita a vznik rejekce. Zásadní je shoda v zastoupení HLA antigenů. Nejrizikovějšími antigeny jsou HLA-B, HLA-A a HLA-DR. O něco nižší riziko nese neshoda v HLA-DQ a nejnižší riziko ze všech uvedených nesou HLA-C a HLA-DP (Krejsek, a další, 2016).

Další věcí, kterou je nutné před transplantací prověřit, jsou donor specifické protilátky. Čekatelé na waiting listu jsou průběžně a opakovaně testováni na hladinu a typ DSA protilátek. Před vlastní transplantací se musí provést cross-match test na DSA protilátky se sérem příjemce, a to buď lymfocytotoxickým testem nebo za pomoci průtokové cytometrie. Pokud vyjde cross-match test pozitivní, nelze přistoupit k transplantaci (Krejsek, a další, 2016).

3.3 Dárci ledvin

Aby mohla transplantace proběhnout, je potřeba vyhledat vhodného dárce. Tím se může stát žijící nebo zemřelý (kadaverózní) dárce splňující určitá kritéria (Viklický, a další,

2008). Kvalita darovaného orgánu má zásadní význam na úspěšnost transplantace (Krejsek, a další, 2016).

Zemřelý dárce je pacient, u kterého došlo k nezvratně prokázané smrti mozku a jeho krevní oběh a dýchání je uměle udržováno až do odběru štěpu (Jílek, 2019). Zákon č. 285/2002 Sb. („transplantační zákon“) upravuje, v jakém případě může být nemocný s podezřením na smrt mozku prohlášen za mrtvého. Vyšetření nemocného musí být provedeno dvěma lékaři nezávisle na sobě v odstupu čtyř hodin. Diagnóza musí být potvrzena angiografií nebo scintigrafií mozku (Viklický, a další, 2008). Po prohlášení dárce za mrtvého je nutné co nejdříve zajistit odběr ledviny. Ta je poté převezena v konzervačním roztoku a podchlazeném stavu na místo určení. Doba transportu nesmí být delší než 48 hodin (Krejsek, a další, 2016). Dalšími dárci jsou pacienti po smrti srdce. Obecně můžeme říct, že šlo o jedince, u něhož došlo k zástavě srdce a srdeční akci se nepodařilo resuscitací obnovit (Viklický, a další, 2008).

Transplantace ledviny od živého dárce má lepší výsledky v přežívání štěpů a pacientů (Viklický, a další, 2008). Rok po transplantaci od živého dárce přežívá více než 95 % nemocných a u 80-90 % štěp funguje správně. Zato u transplantace od kadaverózního dárce přežívá okolo 90 % příjemců a transplantovaná ledvina funguje správně u 70-90 % případů (Krejsek, a další, 2016). Výhodou je možnost provedení transplantace ještě před zahájením dialyzační léčby, a tím tedy snížení rizika spojeného s dialýzou – žádné riziko infekce, nemusí být zakládán cévní přístup nebo peritoneální katetr. Obecně je brán za nejvhodnějšího žijícího dárce ledviny nejbližší pokrevní člen rodiny příjemce. Vyšetření potenciálního dárce se skládá z několika částí: vyšetření nefrologem a lékařem transplantačního centra, vyšetření krve (kompatibilita v AB0 systému, cross-match, HLA typizace), vyšetření moče a další. Záleží také na věku a funkci ledvin dárce, je nutné posoudit rizika spojená s odběrem transplantátu (Viklický, a další, 2008).

3.4 Rejekce štěpu

Rozlišujeme tři druhy rejekce v závislosti na převládajících mechanismech a časování po transplantaci: hyperakutní, akutní a chronickou rejekci (Krejsek, a další, 2016).

3.4.1 Hyperakutní rejekce

Jako hyperakutní rejekci označujeme stav, při kterém dochází k nepřijetí transplantovaného orgánu ve velice krátké době – v řádech minut až hodin po operaci.

Příčinou je masivní poškození cévního systému v transplantovaném orgánu, vznik trombóz a ischemií (Krejsek, a další, 2016).

Při hyperakutní reakci se nacházejí preformované protilátky v krevní cirkulaci příjemce. Jsou namířeny především proti HLA antigenům dárce (DSA protilátky). Pocházejí z předchozích opakovaných těhotenství, transplantací a transfúzí nebo jsou přirozené (např. IgM proti sacharidovým antigenům peptidům) (Hořejší, a další, 2017). Po vazbě těchto protilátek na HLA antigeny, které se nacházejí na povrchu endotelu štěpu se spustí klasická cesta komplementu. Na mechanismu rejekce se může podílet i lektinová a alternativní cesta aktivace komplementového systému, a to hlavně tehdy, pokud je nějakým způsobem štěp poškozen transportem nebo nevhodnou manipulací. Komplementová kaskáda klasické cesty je spuštěna navázáním DSA na C1q složku komplementu. V průběhu aktivace komplementu se uvolňují složky C3a a C5a, které podpoří vznik a rozvoj zánětu. Na konci kaskády vzniká komplex atakující membránu (MAC komplex) (Krejsek, a další, 2016). Ten perforuje membránu endotelových buněk a tím způsobí jejich lýzu (Hořejší, a další, 2017).

Vzniklé složky komplementu (C5a, MAC komplex) a serinová proteáza MASP2 způsobí, že se začne z endotelových buněk uvolňovat tkáňový faktor, který je spouštěčem koagulační kaskády. Díky tomuto systému dochází k adhezi trombocytů na poškozený endotel a ke vzniku trombů. Ty poté způsobí v transplantovaném orgánu nevratné ischemické a následkem toho i nekrotické změny. Štěp ztrácí svoji funkci (Krejsek, a další, 2016).

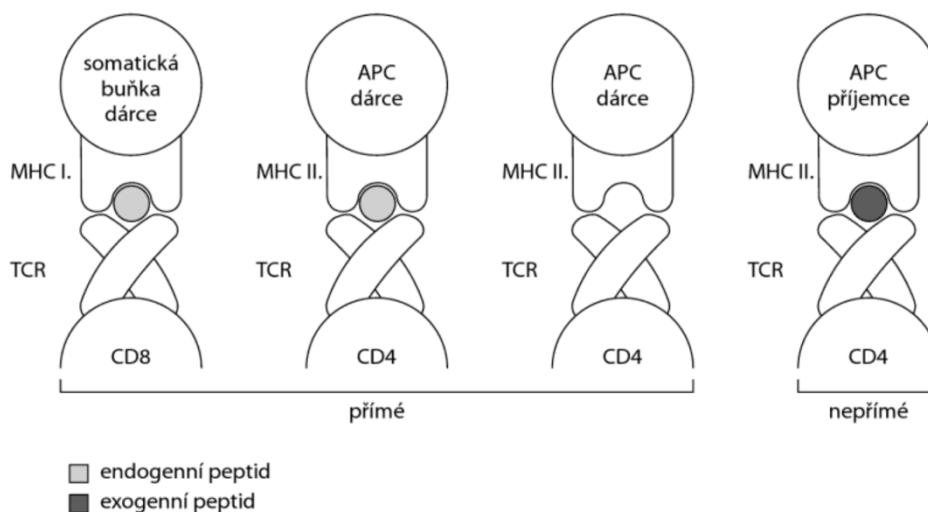
V praxi dochází k hyperakutní reakci výjimečně, protože přítomnost anti-HLA protilátek se vyšetřuje před samotnou transplantací (Hořejší, a další, 2017).

3.4.2 Akutní rejekce

Na rozdíl od hyperakutní reakce dojde u akutní rejekce k primární imunitní reakci proti transplantátu. Akutní odhojování štěpu nastává během pár dnů až týdnů. Někdy k tomuto stavu může dojít i později, pokud se z nějakých důvodů pozastaví imunosupresivní léčba (Hořejší, a další, 2017).

Rozhodujícím mechanismem je aloreaktivita proti štěpu dárce, která je zprostředkována T lymfocyty příjemce. Rozpoznání HLA antigenů dárce probíhá přímou i nepřímou cestou (Krejsek, a další, 2016).

Obrázek 6 Přímé a nepřímé rozpoznání HLA antigenu



Zdroj: Teplan, Vladimír a kolektiv. 2011. Praktická nefrologie: 2., zcela přepracované a doplněné vydání. Praha : Grada Publishing, a.s., 2011. 80-247-1122-2.

Při přímém rozpoznání zaznamená TcR receptor cytotoxického $CD8^+$ T lymfocytu příjemce HLA molekuly I. třídy dárce. Obvykle rozpozná HLA molekuly i s cizími peptidy. TcR receptory $CD4^+$ lymfocytů identifikují HLA antigeny II. třídy, které jsou umístěné na povrchu lymfocytů a antigen prezentujících buněk. APC dárce mohou být rozpoznávány příjemcovi $CD4^+$ lymfocyty, a to jak s peptidem, tak i bez něj. (Krejsek, a další, 2016)

Při nepřímém rozpoznání dojde k prezentaci antigenu tak, že antigen prezentující buňky příjemce fagocytují cizí proteiny a exprimují je na svém povrchu v podobě peptidu umístěného ve žlábků HLA molekuly II. třídy. Tam je přečten TcR receptorem $CD4^+$ lymfocytu, který se aktivuje a začne uvolňovat IL-2, jenž navodí imunitní odpověď.

Po rozpoznání HLA antigenů dárce jsou naivní $CD4^+$ T lymfocyty příjemce aktivovány a díky kooperaci dalších buněk nespecifické imunity se diferencují v Th1 a Th17, které produkují cytokiny. Vzniklé cytokiny podporují cytotoxicitu NK buněk a $CD8^+$ T lymfocytů. Rozvíjející se zánět přitahuje do tkáně neutrofilní granulocyty, monocyty a makrofágy. Následkem tohoto procesu je transplantovaná tkáň poškozena cytotoxickým působením buněk (Krejsek, a další, 2016).

Akutní rejekci mohou způsobit i protilátky proti antigenům dárce – donor specifické protilátky vytvořené až po transplantaci. Protilátky se naváží na endotelové buňky štěpu a způsobí poškození endotelu. Následuje aktivace koagulační kaskády a ischemie transplantátu (Krejsek, a další, 2016).

3.4.3 Chronická rejekce

Jde o dlouhodobý proces, který může probíhat i řadu let po transplantaci. Mohou se na něm podílet DSA, ale i aloreaktivní T lymfocyty. Chronická rejekce může nastat i v případě, že dárce a příjemce jsou HLA shodní. Zde hraje roli reaktivita proti vedlejším histokompatibilním antigenům (např. MiHA) (Krejsek, a další, 2016).

Chronickou rejekci provází dlouhodobý zánět, který způsobí postupnou přestavbu transplantátu. Působením myofibroblastů a fibroblastů dojde k produkci pojiva, doprovázenou fibrotizací a ztluštěním cévních stěn v transplantovaném orgánu. Dochází ke ztrátě funkce, protože funkční tkáň je nahrazována pojivem (Krejsek, a další, 2016).

3.5 Imunosupresivní léčba po transplantaci ledviny

To, zda bude transplantace ledvin úspěšná, záleží na kvalitě dárcovského orgánu, chirurgickém výkonu a imunosupresivním režimu (Viklický, 2010). Imunosupresiva jsou látky, které potlačují funkci imunitního systému (Hynie, 2001). Cílem léčby imunosupresivy je zamezit imunitní reakci pacienta vůči transplantátu a zabránit tak rejekci štěpu, ale také současně zachovat obranyschopnost příjemce (Bürgelová, 2011). Díky imunosupresivům přežívá po jednom roce po transplantaci 90-93 % štěpů. Horší je situace po pěti letech. Tuto dobu přežije 66 % štěpů a 79 % pacientů. Hlavním důvodem ztráty funkce transplantované ledviny z dlouhodobého hlediska je chronická rejekce (Viklický, 2010).

Mezi nevýhody imunosupresiv patří jejich nepříznivé vedlejší účinky, které se podílejí na vzniku komplikací a tím ovlivňují osud štěpu (Bürgelová, 2011). Vlivem těchto účinků se mohou v kratší době po transplantaci vyskytnout infekce, po delším období nádorová onemocnění a kardiovaskulární onemocnění. Je tedy zapotřebí najít rovnováhu mezi účinnou imunosupresivní léčbou, která dokáže potlačit rejekci a imunosupresi s vedlejšími účinky (Viklický, 2010).

Viklický, 2010 a Bürgelová, 2011 uvádí, že imunosupresivní režimy rozlišujeme podle doby jejich použití a indikací na indukční, udržovací a antirejekční imunosupresi, která byla vyvinuta k léčbě rejekčních epizod.

3.5.1 Indukční režim

Indukční režim je používán v brzkém období po transplantaci. Jedná se o velmi intenzivní imunosupresi, jež pomáhá zabránit odhojení štěpu v období, kdy imunitní systém nejintenzivněji odpovídá na aloantigen. Před samotnou transplantací, a ve většině případů i den po ní, je pacientovi aplikován metylprednisolon (Viklický, 2010). Jedná se o kortikosteroid, který má lymfolytické účinky, inhibuje tvorbu prostaglandinů a leukotrienů,

utlumuje tvorbu IL-2 a dalších cytokinů a zasahuje tím do buněčných odpovědí (Hynie, 2001). Pokud je u pacienta zvýšené riziko rejekce, aplikují se polyklonální protilátky proti T lymfocytům – králičí antithymocytární globulin. V případech, kdy hrozí protilátkami zprostředkovaná rejekce (např. při transplantaci AB0 inkompatibilního štěpu) se před transplantací provede plazmaferéza a po zákroku budou pacientovi podány intravenózní imunoglobuliny (IVIg), eventuálně rituximab (Viklický, 2010). Léčba IvIg je účinná, rychlá a z dlouhodobého hlediska snižuje hladinu HLA protilátek. Rituximab je monoklonální protilátka proti transmembránovému antigenu CD20⁺ B lymfocytů. Pokud se rituximab naváže na tento antigen, dojde za pomoci komplementu k lýze B lymfocytů (Bürgelová, 2011).

3.5.2 Udržovací režim

Udržovací imunosuprese navazuje na indukční režim, je však méně intenzivní a slouží k profylaxi akutní rejekce. Nejvíce používaný udržovací režim se skládá z trojkombinace imunosupresiv (Viklický, 2010). Tou je nejčastěji trojkombinace takrolimu, mekofenolát mofetilu a prednisonu. Takrolimus je inhibitor kalcineurinu, jeho aktivitu tedy blokuje a díky tomu je následně porušena aktivace cytokinů (hlavně IL-2), který hraje významnou roli v aktivaci T lymfocytů (Bürgelová, 2011). Toto imunosupresivum se dále kombinuje s antiproliferačně působícím imunosupresivem, jakým je mekofenolát mofetilu, a také s kortikosteroidy (prednison). Imunosupresivní dávky se postupem času snižují a pokud dochází k projevení vedlejších účinků, mohou se trojkombinace měnit na dvojkombinace, příp. i na monoterapii (Viklický, 2010).

3.5.3 Antirejekční terapie

Tento imunosupresivní režim je využíván k léčbě rejekce. V případě akutní rejekce T lymfocyty se zařazují kortikosteroidy ve vysokých dávkách, při rezistenci rejekce k nim se nasazuje antilymfocytární preparát. Akutní humorální protilátkami zprostředkovaná rejekce se léčí pomocí kombinace plazmaferéz IVIg a příp. podáním rituximabu. Tato terapie by se měla používat pouze na základě znalosti histologického vyšetření kvůli svým nepříznivým vedlejším účinkům (Viklický, 2010).

PRAKTICKÁ ČÁST

Praktická část bakalářské práce obsahuje postup stanovení donor specifických protilátek pomocí xMAP technologie firmy Luminex® (Luminex Corporation, Austin, TX) u pacientů po transplantaci ledviny a následné vyhodnocení a porovnání získaných výsledků se studií NMDR provedenou v roce 2014 Českým národním registrem dárců kostní dřeně, která zjišťovala zastoupení HLA alel I. a II. třídy v populaci ČR.

4 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem bakalářské práce je zjištění výskytu donor specifických protilátek u pacientů po transplantaci ledviny. Dále zjistit zastoupení HLA alel v populaci ČR a porovnat ho se zastoupením donor specifických protilátek u pacientů.

5 VÝZKUMNÉ OTÁZKY

- 1) Jaké je zastoupení DSA ve skupině pacientů transplantovaných ve Fakultní nemocnici Plzeň?
- 2) Jaké je zastoupení HLA alel v I. a II. třídě v populaci České republiky?
- 3) Jaké je porovnání zastoupení DSA se zastoupením HLA v populaci?

6 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

Sledovaný soubor tvoří pacienti Fakultní nemocnice v Plzni, kteří byli vyšetřováni mezi roky 2016–2020 pomocí technologie Luminex® (Luminex Corporation, Austin, TX) na přítomnost donor specifických protilátek.

Pacientům byla odebrána krev. Sérum bylo poté vyšetřováno na Ústavu imunologie a alergologie. Celkový vyšetřovaný soubor obsahoval 315 pacientů, z nichž mělo 91 pacientů (51 mužů a 40 žen) pozitivní nález donor specifických protilátek.

7 METODIKA PRÁCE

Stanovení DSA probíhalo na přístroji Luminex® (Luminex Corporation, Austin, TX) s využitím imunotestů LIFECODES LSA™ I. a II. třídy (Immucor, USA). Jedná se o screeningové testy, které jsou využitelné pro kvalitativní detekci IgG protilátek reagujících s HLA I. a II. třídy. Data byla hodnocena softwarem MatchIt® (Immucor, USA). Pro správné hodnocení musíme znát HLA typizaci dárce i příjemce. Následně byly ze získaných výsledků zpracovány tabulky pomocí programu Excel (Microsoft, USA).

Získaná data o DSA byla porovnáována s výsledky studie NMDR, která byla provedena v roce 2014 Českým národním registrem dárců kostní dřeně. Tato studie zjišťovala za pomoci metod PCR-SSP a PCR-SSOP zastoupení HLA alel v populaci, kdy u dárců kostní dřeně byly vyšetřeny lokusy A, B, C, DQB1 a DRB1. Typizace lokusů A, B a DRB1 proběhla u 5099 dárců, lokus C zahrnoval 4669 dárců a lokus DQB1 4049 dárců. Výsledky byly uveřejněny na stránkách www.allelefreqencies.net.

Pomocí programu Excel (Microsoft, USA) byly vytvořeny grafy srovnání četnosti výskytu DSA a HLA alel v populaci. Pro sestavení grafů bylo vždy vybráno pět nejčastějších alel a DSA. Ke srovnání byly vybrány pouze protilátky proti diagnosticky významným lokusům stanovujícím se u pacientů po transplantaci ledvin. Těmi jsou lokusy A, B, DQB1 a DRB1. Nově se do tohoto seznamu zařazuje i lokus C, proto je součástí porovnání.

Obrázek 7 Analyzátor Luminex® (Luminex Corporation, Austin, TX)



Zdroj: <https://www.luminexcorp.com/eu/luminex-100200/>

7.1 Materiál, reagencie, pomůcky a přístroje

1. Materiál, pomůcky a přístroje použité pro stanovení DSA

Vzorek patientského séra

Analyzátor Luminex® (Luminex Corporation, Austin, TX), software LIFECODES Match It!

(Immucor, USA), centrifuga, mikrocentrifuga, vortex, odsávací deska

Mikrotitrační destička, nastavitelné pipety (5 µl - 50 µl), vícekanálová pipeta (250 µl), odpovídající špičky

2. Reagencie použité pro stanovení DSA

LIFECODES LSA™ I. třída (Immucor, USA) obsahující:

- Směs kuliček LSA I. třídy: kuličky jsou konjugovány s rozdílnými glykoproteiny HLA I. třídy, dále směs obsahuje kontrolní kuličky
- Koncentrát konjugátu LSA: kozí anti-lidské IgG protilátky konjugované s fykoerytrinem v pufru, před použitím je nutné koncentrát naředit promývacím pufrem v poměru 1:10
- Promývací pufr
- Pozitivní kontrola LSA I. třída: sérum získané od jedinců s prokázanou aloimunitou proti HLA antigenům, reagující s většinou kuliček LSA I. třídy
- Negativní kontrola LSA I. třída: sérum získané od jedinců, u kterých nebyly prokázány protilátky proti antigenům HLA, nereagují s většinou/žádnými kuličkami LSA I. třídy

LIFECODES LSA™ II. třída (Immucor, USA) obsahující:

- Směs kuliček LSA II. třídy: kuličky jsou konjugovány s rozdílnými glykoproteiny HLA II. třídy, dále směs obsahuje kontrolní kuličky
- Koncentrát konjugátu LSA: kozí anti-lidské IgG protilátky konjugované s fykoerytrinem v pufru, před použitím je nutné koncentrát naředit promývacím pufrem v poměru 1:10
- Promývací pufr
- Pozitivní kontrola LSA II. třída: sérum získané od jedinců s prokázanou aloimunitou proti HLA antigenům, reagující s většinou kuliček LSA II. třídy
- Negativní kontrola LSA II. třída: sérum získané od jedinců, u kterých nebyly prokázány protilátky proti antigenům HLA, nereagují s většinou/žádnými kuličkami LSA II. třídy

7.2 Postup stanovení

Před samotným stanovením je potřeba vzorky sér promíchat. Dále musíme všechny reagensie vytemperovat na laboratorní teplotu.

Reakční destičku zvlhčíme přidáním 200 μl destilované vody a necháme 5 minut inkubovat. Během inkubace si připravíme reakční kuličky a to tak, že je intenzivně promícháme minimálně 1 minutu na vortexu, poté 30 sekund centrifugujeme na mikrocentrifuze a opět promícháme alespoň 1 minutu na vortexu. Po uběhnutí doby inkubace odsajeme destilovanou vodu na odsávací desce. Před odsátím odstraníme kryt membrány destičky, který na ní již nevracíme.

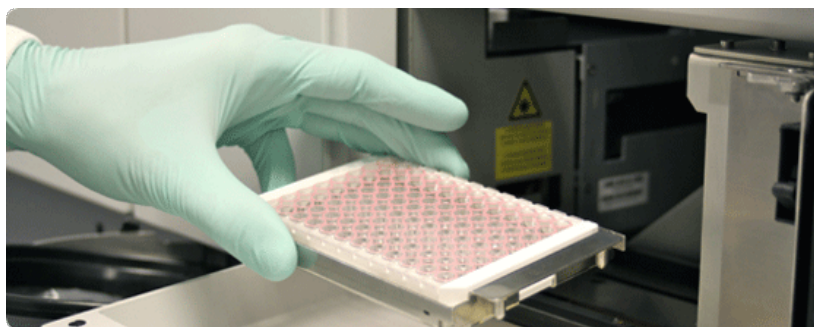
Do všech reakčních jamek destičky napipetujeme 40 μl reakčních kuliček. Do jamek pro testování přidáme 10 μl patientského séra. Do jamek určených pro pozitivní a negativní kontrolu napipetujeme 10 μl odpovídajícího kontrolního materiálu, který je součástí sady. Destičku inkubujeme 30 minut ve tmě za stálého míchání na vortexu.

Během inkubace si připravíme roztok konjugátu fykoerytrinu (PE) s IgG pro HLA I. a II. třídu. Na jednu jamku potřebujeme 5 μl konjugátu a 45 μl promývacího roztoku. Připravený konjugát uschováme do použití ve tmě.

Po skončení inkubace destičku 3x promyjeme na odsávací desce. Poprvé promýváme 100 μl promývacího pufru, podruhé a potřetí 250 μl promývacího roztoku. Spodní část destičky osušíme buničitou vatou a do každé reakční jamky napipetujeme 50 μl naředěného konjugátu. Následuje 30 minut inkubace na vortexu ve tmě. Po ukončení inkubace do každé jamky napipetujeme 130 μl promývacího roztoku a na destičku vrátíme kryt jamek.

Takto připravenou destičku je potřeba nejdéle do 3 hodin analyzovat. Vlastní analýza se provádí po měření destičky na přístroji Luminex[®] (Luminex Corporation, Austin, TX) pomocí softwaru MatchIt[®] (Immucor, USA).

Obrázek 8 Mikrotitrační destička využívaná pro stanovení DSA



Zdroj: <https://www.immucor.com/global/Products/Pages/LIFECODES-LSA-Single-Antigen.aspx>

8 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

8.1 Lokus A – Zastoupení HLA alel v populaci

Tabulka 2 Zastoupení HLA alel lokusu A v populaci

Pořadí	Alela	Četnost [%]	Pořadí	Alela	Četnost [%]
1	A*02:01	24,31	32	A*02:07	0,04
2	A*01:01	16,07	33	A*02:09	0,04
3	A*03:01	14,24	34	A*74:03	0,04
4	A*24:02	9,60	35	A*02:11	0,03
5	A*11:01	5,66	36	A*24:07	0,03
6	A*26:01	5,03	37	A*24:56	0,03
7	A*25:01	4,02	38	A*01:03	0,02
8	A*32:01	3,18	39	A*02:03	0,02
9	A*68:01	3,03	40	A*02:08	0,02
10	A*23:01	2,94	41	A*03:33	0,02
11	A*31:01	2,13	42	A*25:02	0,02
12	A*29:02	1,96	43	A*29:10	0,02
13	A*30:01	1,89	44	A*66:17	0,02
14	A*02:05	0,82	45	A*80:01	0,02
15	A*66:01	0,82	46	A*01:02	0,01
16	A*33:01	0,54	47	A*01:06	0,01
17	A*68:02	0,52	48	A*02:04	0,01
18	A*29:01	0,46	49	A*02:35	0,01
19	A*33:03	0,44	50	A*02:138	0,01
20	A*30:02	0,36	51	A*02:149	0,01
21	A*03:02	0,32	52	A*02:158	0,01
22	A*02:06	0,21	53	A*11:04	0,01
23	A*02:17	0,19	54	A*23:17	0,01
24	A*24:03	0,13	55	A*24:31	0,01
25	A*30:04	0,13	56	A*31:08	0,01
26	A*02:02	0,12	57	A*31:26	0,01
27	A*02:30	0,10	58	A*32:02	0,01
28	A*69:01	0,09	59	A*34:01	0,01
29	A*26:08	0,06	60	A*68:08	0,01
30	A*34:02	0,06	61	A*68:09	0,01
31	A*03:20	0,05	62	A*68:12	0,01

Zdroj: vlastní

Dle studie NMDR je nejvíce zastoupenou alelou lokusu A v populaci A*02:01 s četností 24,31 %. Tu následuje s četností 16,07 % alela A*01:01, třetí v pořadí je alela A*03:01 s frekvencí 14,24 %. Čtvrté, páté, šesté a sedmé místo připadá alelám A*24:02, A*11:01, A*26:01 a A*25:01 s četnostmi 9,60 %, 5,66 %, 5,03 % a 4,02 %.

8.2 Lokus A – Zastoupení donor specifických protilátek u pacientů

Tabulka 3 Zastoupení DSA lokusu A u pacientů po transplantaci ledviny

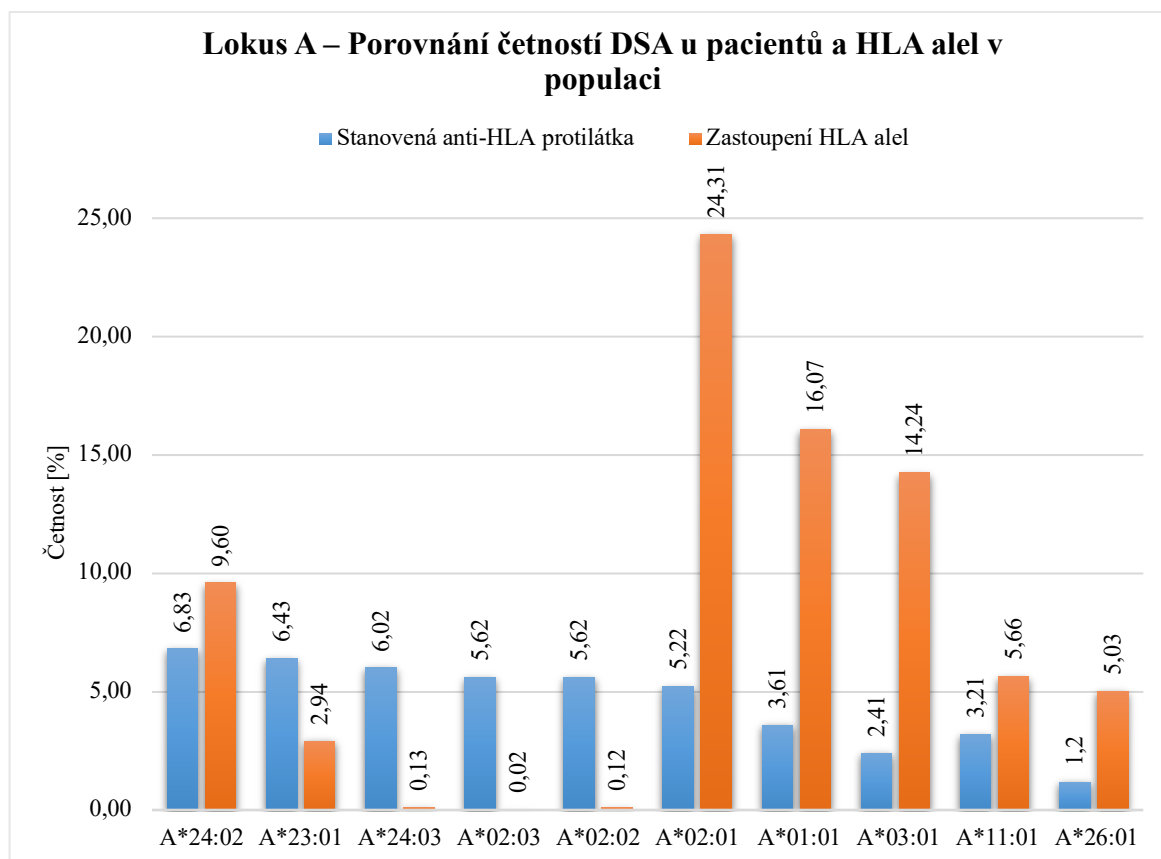
Pořadí	Protilátka [anti-]	Četnost [%]
1	A*24:02	6,83
2	A*23:01	6,43
3	A*24:03	6,02
4	A*02:03	5,62
5	A*02:02	5,62
6	A*02:01	5,22
7	A*02:05	5,22
8	A*69:01	4,82
9	A*68:01	4,02
10	A*68:02	4,02
11	A*74:01	4,02
12	A*11:02	3,61
13	A*01:01	3,61
14	A*32:01	3,21
15	A*11:01	3,21
16	A*66:02	2,41
17	A*03:01	2,41
18	A*29:02	2,41
19	A*33:03	2,41
20	A*34:01	2,41
21	A*36:01	2,41
22	A*43:01	2,01
23	A*25:01	2,01
24	A*29:01	2,01
25	A*33:01	2,01
26	A*66:01	1,61
27	A*31:01	1,61
28	A*80:01	1,20
29	A*26:01	1,20
30	A*30:01	0,40

Zdroj: vlastní

Stanovením DSA u pacientů bylo zjištěno, že nejčastěji vyskytující se protilátka v lokusu A je anti-A*24:02 s četností 6,83 %. Následují anti-A*23:01 a anti-A*24:03 s četnostmi 6,43 % a 6,02 %. O čtvrté a páté místo v pořadí se dělí s četností 5,62 % protilátky anti-A*02:03 a anti-A*02:02. Jako další se umístily anti-A*02:01, anti-A*02:05 s 5,22 % frekvencí výskytu u pacientů.

8.3 Lokus A – Porovnání zastoupení DSA u pacientů a HLA alel v populaci

Graf 1 Porovnání výskytu četnosti donor specifických protilátek u pacientů a HLA alel v populaci v rámci lokusu A



Zdroj: vlastní

V Grafu 1 můžeme vidět, že nejčetnější DSA je dle mého měření protilátka anti-A*24:02, která má četnost 6,83 %, ale alela A*24:02 je v pořadí zastoupení HLA alel v populaci až na čtvrtém místě s četností 9,60 %. Druhou nejčetnější DSA je anti-A*23:01, v populaci je alela A*23:01 desátá.

Nejvíce zastoupenou alelou v populaci je A*02:01 s četností 24,31 %. Protilátka anti-A*02:01 se umístila na šestém místě díky četnosti 5,22 %. Alely A*01:01 a A*03:01 jsou druhé a třetí v pořadí, protilátky anti-A*01:01 a anti-A*03:01 jsou dle mého zjištění na třináctém a sedmnáctém místě v Tabulce 3.

8.4 Lokus B – Zastoupení HLA alel v populaci

Tabulka 4 Zastoupení HLA alel lokusu B v populaci

Pořadí	Alela	Četnost [%]	Pořadí	Alela	Četnost [%]
1	B*07:02	11,9	32	B*14:01	0,41
2	B*08:01	10,34	33	B*41:01	0,41
3	B*18:01	6,43	34	B*39:06	0,4
4	B*15:01	5,53	35	B*47:01	0,4
5	B*44:02	5,38	36	B*07:05	0,34
6	B*35:01	5,31	37	B*45:01	0,25
7	B*51:01	5,12	38	B*07:04	0,22
8	B*44:03	4,91	39	B*51:08	0,21
9	B*13:02	4,75	40	B*53:01	0,21
10	B*38:01	3,7	41	B*18:03	0,2
11	B*40:01	3,68	42	B*15:18	0,19
12	B*27:05	3,46	43	B*40:06	0,19
13	B*57:01	3,23	44	B*15:03	0,09
14	B*35:03	3,15	45	B*15:09	0,09
15	B*49:01	1,77	46	B*51:05	0,08
16	B*14:02	1,65	47	B*73:01	0,07
17	B*40:02	1,56	48	B*13:01	0,06
18	B*35:02	1,53	49	B*48:01	0,06
19	B*55:01	1,19	50	B*07:06	0,04
20	B*39:01	1,18	51	B*15:07	0,04
21	B*52:01	1,17	52	B*42:02	0,04
22	B*27:02	1,1	53	B*46:01	0,04
23	B*41:02	1,1	54	B*27:07	0,03
24	B*37:01	1,05	55	B*50:02	0,03
25	B*50:01	1,05	56	B*13:10	0,02
26	B*56:01	0,97	57	B*15:08	0,02
27	B*44:27	0,69	58	B*15:16	0,02
28	B*58:01	0,69	59	B*15:24	0,02
29	B*44:05	0,66	60	B*15:157	0,02
30	B*15:17	0,61	61	B*15:220	0,02
31	B*35:08	0,61	62	B*18:07	0,02

Zdroj: vlastní

Alelou s největší frekvencí výskytu v populaci (11,9 %) v rámci lokusu B je B*07:02. Druhé a třetí místo přísluší alelám B*08:01 a B*18:01 s četnostmi 10,34 % a 6,43 %. Četnosti 5,53 %, 5,38 %, 5,31 % a 5,12 % náleží alelám na čtvrtém až sedmém místě v pořadí – B*15:01, B*44:02, B*35:01, B*51:01. Alely s četností pod 0,02 % nejsou v této tabulce uvedeny.

8.5 Lokus B – Zastoupení donor specifických protilátek u pacientů

Tabulka 5 Zastoupení donor specifických protilátek lokusu B u pacientů po transplantaci ledviny

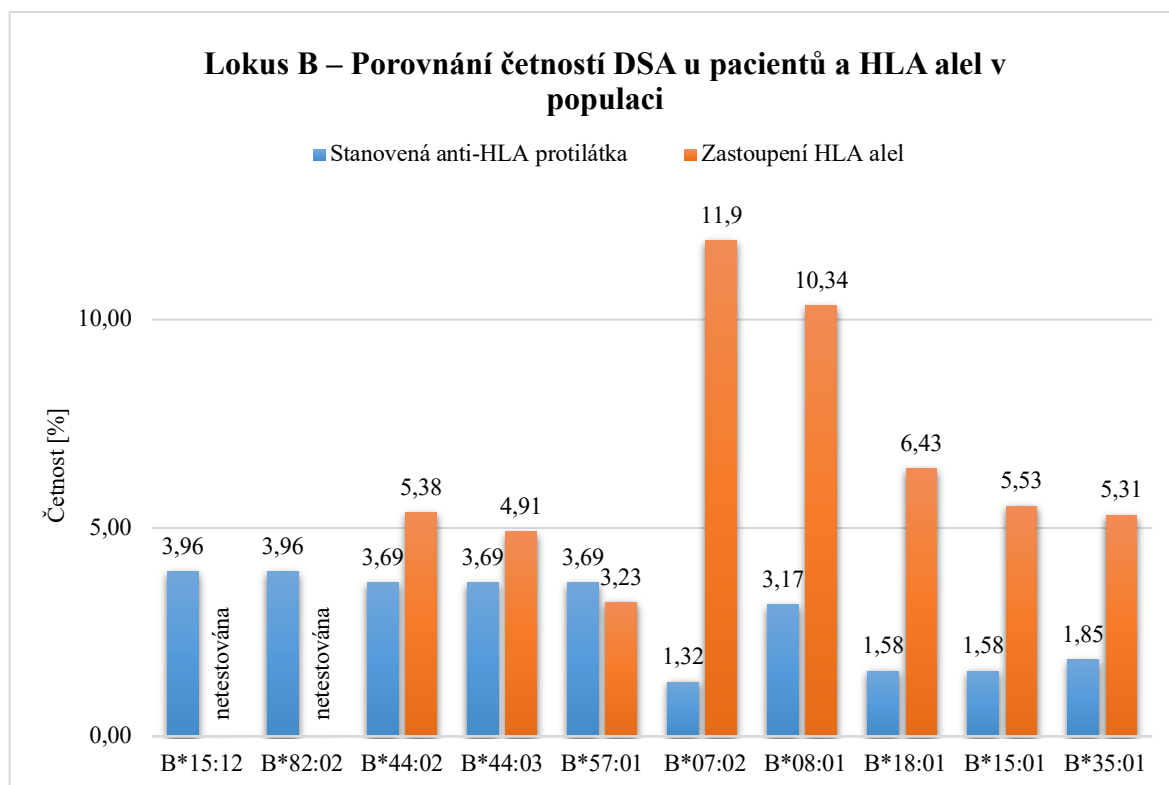
Pořadí	Protilátka [anti-]	Četnost [%]	Pořadí	Protilátka [anti-]	Četnost [%]
1	B*15:12	3,96	25	B*40:01	1,85
2	B*82:02	3,96	26	B*40:02	1,85
3	B*44:02	3,69	27	B*47:01	1,85
4	B*44:03	3,69	28	B*50:01	1,85
5	B*57:01	3,69	29	B*53:01	1,85
6	B*58:01	3,43	30	B*54:01	1,85
7	B*08:01	3,17	31	B*59:01	1,85
8	B*15:16	2,90	32	B*15:01	1,58
9	B*56:01	2,90	33	B*18:01	1,58
10	B*49:01	2,64	34	B*37:01	1,58
11	B*55:01	2,64	35	B*38:01	1,58
12	B*13:02	2,37	36	B*41:01	1,58
13	B*35:08	2,37	37	B*67:01	1,58
14	B*45:01	2,37	38	B*73:01	1,58
15	B*52:01	2,37	39	B*81:01	1,58
16	B*15:18	2,11	40	B*07:02	1,32
17	B*42:01	2,11	41	B*07:03	1,32
18	B*46:01	2,11	42	B*15:02	1,32
19	B*51:01	2,11	43	B*27:08	1,32
20	B*15:03	1,85	44	B*39:01	1,32
21	B*15:13	1,85	45	B*78:01	1,32
22	B*27:03	1,85	46	B*14:02	1,06
23	B*27:05	1,85	47	B*14:01	0,79
24	B*35:01	1,85	48	B*48:01	0,79

Zdroj: vlastní

Protilátkami s nejvyšším frekvenčním výskytem ve stanovovaném souboru v rámci lokusu B jsou anti-B*15:12 a anti-B*82:02 se stejnou četností 3,96 %. Třetí až páté místo obsazují protilátky s frekvencí výskytu 3,69 %. Těmi jsou anti-B*44:02, anti-B*44:03 a anti-B*57:01. Další v pořadí se vykytují protilátky s četností více než 3 % – anti-B*58:01 (3,43 %) a anti-B*08:01 (3,17 %).

8.6 Lokus B – Porovnání zastoupení DSA u pacientů a HLA alel v populaci

Graf 2 Porovnání výskytu četnosti donor specifických protilátek u pacientů a HLA alel v populaci v rámci lokusu B



Zdroj: vlastní

Nejvíce zastoupenou HLA alelou v lokusu B je B*07:02 s četností 11,9 %. Protilátka anti-B*07:02 je až na čtyřicátém místě. Alela B*08:01 je druhou nejčetnější, protilátka anti-B*08:01 je sedmá v pořadí a četnost jejího výskytu je 3,17 %. Další jsou alely B*18:01, B*15:01 a B*35:01 s frekvencemi 6,43 %, 5,53 % a 5,38 %. Donor specifické protilátky anti-B*18:01, anti-B*15:01 a anti-B*35:01 jsou v Tabulce 5 na třicátém třetím, třicátém druhém a dvacátém čtvrtém místě.

V rámci lokusu B bohužel nelze porovnat nejčetnější protilátky anti-B*15:12 a anti-B*82:02 s alelami B*15:12 a B*82:02, protože studie NMDR tyto alely při svém stanovení nevyšetřovala. Díky veřejně dostupným informacím na webu www.allelefrequencies.net lze ale říci, že celosvětově je výskyt těchto alel nízký. Alela B*15:12 se ve své nejvyšší frekvenci 2 % objevuje v USA, dále v Indonésii a Číně, kde je četnost zhruba 1,5 %. Alela B*82:02 je nejfrekvenčnější v Súdánu. Četnost se zde pohybuje okolo 2,5 %. V ostatních státech je její výskyt pod 1 %.

8.7 Lokus C – Zastoupení HLA alel v populaci

Tabulka 6 Zastoupení HLA alel lokusu C v populaci

Pořadí	Alela	Četnost [%]	Pořadí	Alela	Četnost [%]
1	C*07:01	15,24	28	C*15:13	0,05
2	C*07:02	12,92	29	C*04:03	0,04
3	C*04:01	12,87	30	C*15:06	0,04
4	C*06:02	11,12	31	C*02:10	0,03
5	C*12:03	8,93	32	C*15:04	0,03
6	C*03:04	6,02	33	C*01:44	0,02
7	C*02:02	5,77	34	C*05:65	0,02
8	C*03:03	4,74	35	C*17:02	0,02
9	C*05:01	4,74	36	C*01:04	0,01
10	C*01:02	3,31	37	C*01:52	0,01
11	C*08:02	2,05	38	C*03:19	0,01
12	C*15:02	1,93	39	C*04:30	0,01
13	C*07:04	1,91	40	C*04:82	0,01
14	C*16:01	1,8	41	C*05:08	0,01
15	C*12:02	1,22	42	C*05:34	0,01
16	C*14:02	1,11	43	C*06:04	0,01
17	C*17:03	0,91	44	C*06:17	0,01
18	C*16:02	0,65	45	C*06:73	0,01
19	C*15:05	0,45	46	C*06:89	0,01
20	C*17:01	0,43	47	C*07:06	0,01
21	C*03:02	0,42	48	C*07:12	0,01
22	C*07:18	0,26	49	C*07:29	0,01
23	C*07:19	0,23	50	C*07:40	0,01
24	C*07:27	0,21	51	C*07:60	0,01
25	C*16:04	0,17	52	C*14:03	0,01
26	C*08:03	0,06	53	C*15:11	0,01
27	C*08:01	0,05	54	C*18:02	0,01

Zdroj: vlastní

Nejvíce frekvenční alelou lokusu C je C*07:01 s četností 15,24 %. Druhé a třetí místo obsazují alely C*07:02 a C*04:01 s četnostmi 12,92 % a 12,87 %. Čtvrtá v pořadí je alela C*06:02. Na pátém, šestém a sedmém místě se s frekvenčním výskytem pod 10 % umísťují C*12:03, C*03:04 a C*02:02.

8.8 Lokus C – Zastoupení donor specifických protilátek u pacientů

Tabulka 7 Zastoupení donor specifických protilátek lokusu C u pacientů po transplantaci ledviny

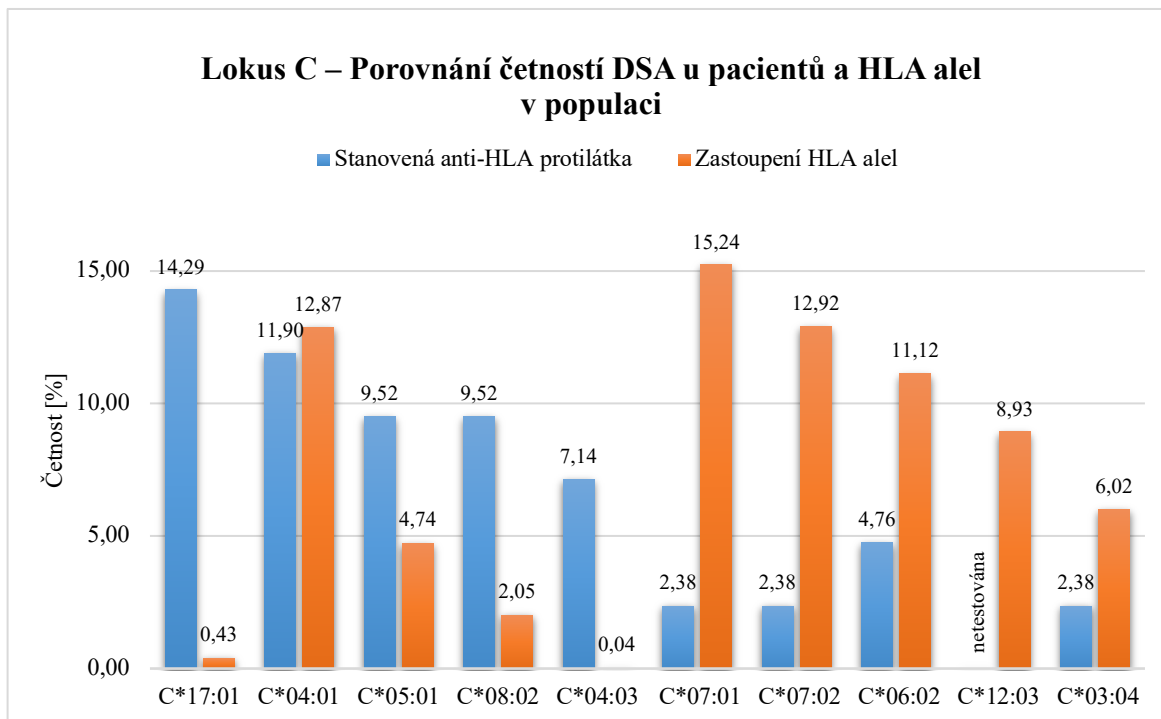
Pořadí	Protilátka [anti-]	Četnost [%]
1	C*17:01	14,29
2	C*04:01	11,90
3	C*05:01	9,52
4	C*08:02	9,52
5	C*04:03	7,14
6	C*18:01	7,14
7	C*01:02	4,76
8	C*03:03	4,76
9	C*06:02	4,76
10	C*08:01	4,76
11	C*14:02	4,76
12	C*15:02	4,76
13	C*02:02	2,38
14	C*03:04	2,38
15	C*07:01	2,38
16	C*07:02	2,38
17	C*12:02	2,38

Zdroj: vlastní

Nejfrekvenčnějšími protilátkami lokusu C jsou anti-C*17:01 (14,92 %), anti-C*04:01 (11,90 %), anti-C*05:01 a anti-C*08:02. Poslední dvě jmenované se dělí o třetí a čtvrté umístění s četností 9,52 %. Následují je protilátky anti-C*04:03 a anti-C*18:01 se 7,14 % frekvencí výskytu u pacientů. Jako další pokračují DSA s četností pod 5 %, konkrétně anti-C*01:02, anti-C*03:03, anti-C*06:02, anti-C*08:01, anti-C*14:02 a nakonec anti-C*15:02.

8.9 Lokus C – Porovnání zastoupení DSA u pacientů a HLA alel v populaci

Graf 3 Porovnání výskytu četnosti donor specifických protilátek u pacientů a HLA alel v populaci v rámci lokusu C



Zdroj: vlastní

Donor specifickou protilátkou s největší frekvencí výskytu je anti-C*17:01. Alela C*17:01 se v populaci vyskytuje ale pouze v zastoupení 0,43 % a v Tabulce 6 je tedy až na dvacátém místě. Oproti tomu alelou s nejvyšším zastoupením 15,24 % je C*07:01. Protilátka anti-C*07:01 se umísťuje na patnáctém místě. Alela C*04:01 a protilátka anti-C*04:01 se podobným výskytem v populaci (12,87 % a 11,90 %) řadí za třetí nejčastější alelu v lokusu C a druhou nejvíce produkovanou protilátkou.

Alela C*12:03, která je pátou nejfrekvenčnější, bohužel není možné porovnat, protože se v rámci vyšetření pacientů na DSA protilátka anti-C*12:03 nestanovuje.

8.10 Lokus DQB1 – Zastoupení HLA alel v populaci

Tabulka 8 Zastoupení HLA alel lokusu DQB1 v populaci

Pořadí	Alela	Četnost [%]
1	DQB1*03:01	19,24
2	DQB1*06:02	12,83
3	DQB1*02:01	11,48
4	DQB1*02:02	10,78
5	DQB1*05:01	10,29
6	DQB1*03:02	8,71
7	DQB1*06:03	7,73
8	DQB1*03:03	4,21
9	DQB1*05:02	4,15
10	DQB1*04:02	3,22
11	DQB1*05:03	2,54
12	DQB1*06:04	2,52
13	DQB1*06:01	0,89
14	DQB1*06:09	0,41
15	DQB1*03:04	0,38
16	DQB1*03:19	0,19
17	DQB1*05:04	0,16
18	DQB1*03:05	0,14
19	DQB1*06:39	0,04
20	DQB1*02:03	0,03
21	DQB1*03:08	0,01
22	DQB1*03:12	0,01
23	DQB1*06:07	0,01
24	DQB1*06:13	0,01
25	DQB1*06:14	0,01
26	DQB1*06:28	0,01

Zdroj: vlastní

Lokusu DQB1 dominuje alela DQB1*03:01 s četností v populaci 19,24 %. Následují alely DQB1*06:02, DQB1*02:01 a DQB1*02:02 s frekvenčními výskyty 12,83 %, 11,48 % a 10,78 %. Pátou nejčastější je DQB1*05:01 (10,29 %). Poté frekvence klesá pod 10 % a na šestém, sedmém a osmém místě jsou tak alely DQB1*03:02, DQB1*06:03 a DQB1*03:03.

8.11 Lokus DQB1 – Zastoupení donor specifických protilátek u pacientů

Tabulka 9 Zastoupení donor specifických protilátek lokusu DQB1 u pacientů po transplantaci ledviny

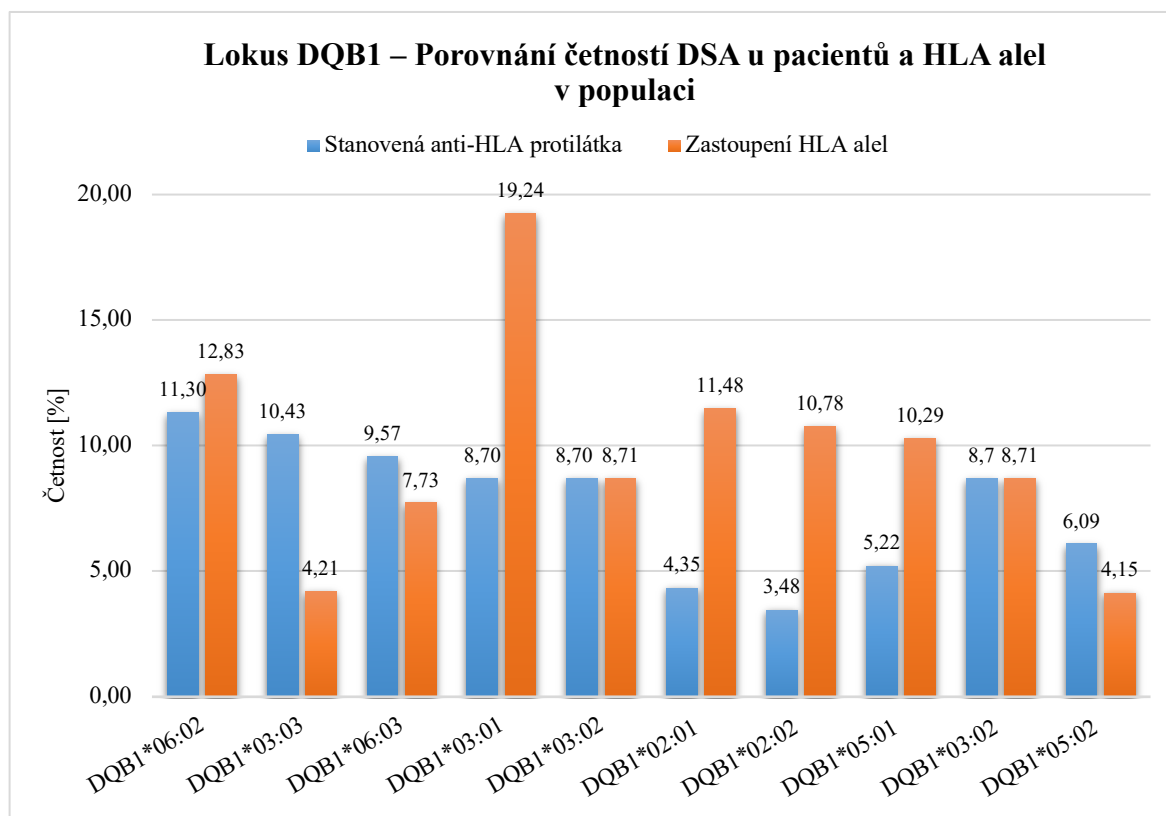
Pořadí	Protilátka [anti-]	Četnost [%]
1	DQB1*06:02	11,30
2	DQB1*03:03	10,43
3	DQB1*06:03	9,57
4	DQB1*03:01	8,70
5	DQB1*03:02	8,70
6	DQB1*04:02	7,83
7	DQB1*06:04	7,83
8	DQB1*05:02	6,09
9	DQB1*06:01	6,09
10	DQB1*04:01	5,22
11	DQB1*05:01	5,22
12	DQB1*05:03	5,22
13	DQB1*02:01	4,35
14	DQB1*02:02	3,48

Zdroj: vlastní

Díky stanovení DSA bylo zjištěno, že nejobvyklejšími protilátkami v lokusu DQB1 jsou anti-DQB1*06:02 a anti-DQB1*03:03. Obě protilátky se vyskytly u více než 10 % pacientů. S četností 9,57 % je doprovází protilátka anti-DQB1*06:03. O čtvrté a páté místo se dělí anti-DQB1*03:01 a anti-DQB1*03:02, které mají četnost 8,70 %. Další v pořadí se objevují protilátky s výskytem 7,83 % – anti-DQB1*04:02 a anti-DQB1*06:04.

8.12 Lokus DQB1 – Porovnání zastoupení DSA u pacientů a HLA alel v populaci

Graf 4 Porovnání výskytu četnosti donor specifických protilátek u pacientů a HLA alel v populaci v rámci lokusu DQB1



Zdroj: vlastní

Ze studie NMDR bylo zjištěno, že nejvíce zastoupenou alelou v lokusu DQB1 je DQB1*03:01 (19,24 %). V pořadí protilátek je anti-DQB1*03:01 na čtvrtém místě s četností 8,70 %. Nejfrekvenčnější DSA je anti-DQB1*06:02, alela DQB1*06:02 je druhá v pořadí zastoupených alel v populaci. Protilátky proti alelám DQB1*02:01 a DQB1*02:02 jsou v našem stanovením až na posledních dvou místech.

8.13 Lokus DRB1 – Zastoupení HLA alel v populaci

Tabulka 10 Zastoupení HLA alel lokusu DRB1 v populaci

Pořadí	Alela	Četnost [%]	Pořadí	Alela	Četnost [%]
1	DRB1*07:01	14,28	29	DRB1*16:02	0,23
2	DRB1*15:01	13,11	30	DRB1*08:03	0,2
3	DRB1*03:01	10,79	31	DRB1*01:03	0,18
4	DRB1*01:01	8,06	32	DRB1*08:04	0,17
5	DRB1*11:01	7,76	33	DRB1*13:05	0,17
6	DRB1*13:01	7,41	34	DRB1*04:06	0,07
7	DRB1*04:01	5,91	35	DRB1*08:02	0,06
8	DRB1*11:04	4,67	36	DRB1*03:04	0,06
9	DRB1*16:01	3,59	37	DRB1*12:02	0,06
10	DRB1*13:02	3,01	38	DRB1*11:15	0,04
11	DRB1*08:01	2,91	39	DRB1*14:20	0,04
12	DRB1*04:04	2,59	40	DRB1*14:05	0,03
13	DRB1*13:03	2	41	DRB1*11:12	0,02
14	DRB1*12:01	1,83	42	DRB1*13:49	0,02
15	DRB1*14:54	1,73	43	DRB1*15:04	0,02
16	DRB1*11:03	1,22	44	DRB1*11:43	0,01
17	DRB1*01:02	1,19	45	DRB1*08:06	0,01
18	DRB1*04:02	1,02	46	DRB1*11:14	0,01
19	DRB1*10:01	0,9	47	DRB1*11:29	0,01
20	DRB1*04:03	0,82	48	DRB1*11:18	0,01
21	DRB1*15:02	0,8	49	DRB1*03:06	0,01
22	DRB1*09:01	0,61	50	DRB1*12:11	0,01
23	DRB1*04:08	0,54	51	DRB1*13:06	0,01
24	DRB1*04:07	0,52	52	DRB1*13:15	0,01
25	DRB1*14:01	0,44	53	DRB1*13:17	0,01
26	DRB1*04:05	0,31	54	DRB1*14:03	0,01
27	DRB1*11:02	0,26	55	DRB1*14:07	0,01
28	DRB1*14:04	0,25	56	DRB1*15:06	0,01

Zdroj: vlastní

Nejhojnějšími HLA alelami II. třídy s frekvencí výskytu nad 10 % v rámci lokusu DRB1 jsou DRB1*07:01, DRB1*15:01 a DRB1*03:01. Čtvrtou, pátou a šestou alelou v pořadí jsou DRB1*01:01, DRB1*11:01 a DRB1*13:01 s četnostmi 8,06 %, 7,76 % a 7,41 %.

8.14 Lokus DRB1 – Zastoupení donor specifických protilátek u pacientů

Tabulka 11 Zastoupení donor specifických protilátek lokusu DRB1 u pacientů po transplantaci ledviny

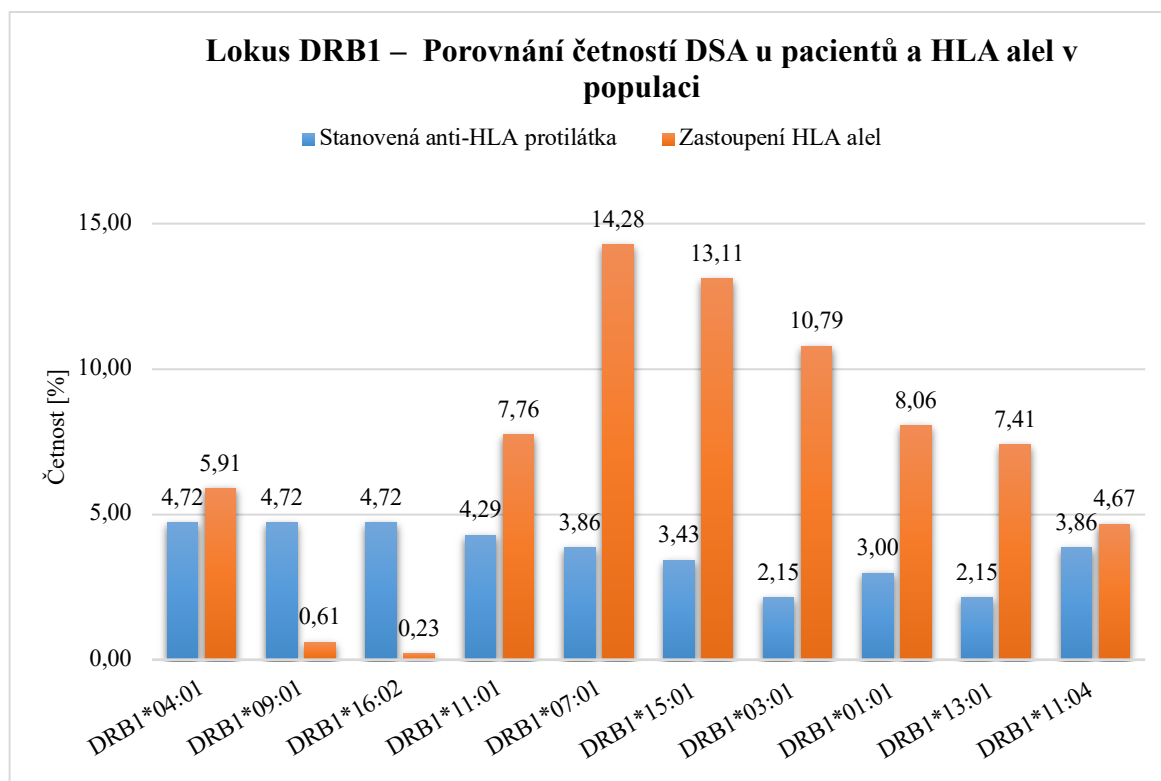
Pořadí	Protilátka [anti-]	Četnost [%]
1	DRB1*04:01	4,72
2	DRB1*09:01	4,72
3	DRB1*16:02	4,72
4	DRB1*11:01	4,29
5	DRB1*07:01	3,86
6	DRB1*11:04	3,86
7	DRB1*01:02	3,43
8	DRB1*04:03	3,43
9	DRB1*10:01	3,43
10	DRB1*12:01	3,43
11	DRB1*12:02	3,43
12	DRB1*15:01	3,43
13	DRB1*16:01	3,43
14	DRB1*01:01	3,00
15	DRB1*01:03	3,00
16	DRB1*04:02	3,00
17	DRB1*08:01	3,00
18	DRB1*08:02	3,00
19	DRB1*11:03	3,00
20	DRB1*13:03	3,00
21	DRB1*03:02	2,58
22	DRB1*04:04	2,58
23	DRB1*04:05	2,58
24	DRB1*14:01	2,58
25	DRB1*14:04	2,58
26	DRB1*15:02	2,58
27	DRB1*15:03	2,58
28	DRB1*03:01	2,15
29	DRB1*03:03	2,15
30	DRB1*13:01	2,15
31	DRB1*13:05	2,15
32	DRB1*14:03	2,15

Zdroj: vlastní

O první tři místa Tabulky 11 se dělí protilátky anti-DRB1*04:01, anti-DRB1*09:01 a anti-DRB1*16:02 s četností 4,72 %. Čtvrté místo zaujímá anti-DRB1*11:01 (4,29 %). Následují donor specifické protilátky s frekvencí výskytu menší než 4 %, tedy anti-DRB1*07:01, anti-DRB1*11:04, anti-DRB1*01:02, anti-DRB1*04:03, atd.

8.15 Lokus DRB1 – Porovnání zastoupení DSA u pacientů a HLA alel v populaci

Graf 5 Porovnání četnosti výskytu donor specifických protilátek u pacientů a HLA alel v populaci v rámci lokusu DRB1



Zdroj: vlastní

Nejvíce zastoupenou alelou s četností 14,28 % je DRB1*07:01. Protilátka anti-DRB1*07:01 je na pátém místě s frekvencí výskytu 4,29 %.

Graf 4 ukazuje na to, že nejfrekvenčnější DSA jsou anti-DRB1*04:01 (4,72 %), anti-DRB1*09:01 (4,72 %), anti-DRB1*11:01 (4,72 %) a anti-DRB1*16:02 (4,29 %). Alely DRB1*04:01, DRB1*09:01, DRB1*11:01, DRB1*16:02, jsou v populaci umístěny až na sedmém, dvacátém druhém, dvacátém sedmém a dvacátém devátém místě.

Druhou, třetí a čtvrtou nejčetnější alelou jsou DRB1*15:01, DRB1*03:01 a DRB1*01:01, ale až na čtrnáctém místě se v tabulce protilátek umístila anti-DRB1*01:01, na dvacátém osmém a dvacátém devátém jsou anti-DRB1*15:01 a anti-DRB1*03:01.

DISKUZE

První výzkumná otázka bakalářské práce a také její hlavní cíl dává za úkol zjistit zastoupení donor specifických protilátek ve skupině pacientů transplantovaných ve Fakultní nemocnici Plzeň. Z celkem 315 pacientů, kteří byli na přítomnost DSA po transplantaci ledviny testováni, byla u 91 z nich zjištěna jejich přítomnost. Ze získaných dat se podařilo zjistit procentuální četnost zastoupení DSA ve sledovaném souboru.

Proto, aby byla transplantace úspěšná, je zásadní kompatibilita transplantátu. Podstatná je shoda v zastoupení HLA antigenů. Mezi nejrizikovější patří antigeny HLA-A, HLA-B a HLA-DR. O něco nižší riziko nese neshoda v lokusech DQ a C. Výskyt protilátek proti těmto antigenům značně ovlivňuje prognózu přežití transplantátu, protože DSA se účastní všech typů rejekčních mechanismů (Krejsek, a další, 2016). Zaleží také, zda jsou protilátky tvořeny proti I. nebo II. třídě HLA antigenů, popřípadě proti oběma. Pacienti, kteří měli po roce od transplantace ledviny protilátky pouze proti antigenům I. třídy, měli 6,1 % riziko odhojení štěpu. Při detekovaných protilátkách proti HLA II. třídy toto riziko vzrůstá na 7,1 %. Největšímu nebezpečí (9,7 %) byli vystaveni pacienti s pozitivními protilátkami proti oběma HLA třídám (Ozawa, a další, 2007).

Nejčastěji stanovovanými protilátkami v lokusu A byly anti-A*24:02 (6,83 %), anti-A*23:01, anti-A*24:03, anti-A*02:03 a anti-A*02:02. Velmi podobného zastoupení ve své studii dosáhli i Başturk, a další, 2016, kteří detekovali jako nejčastější protilátky anti-A*02, anti-A*68 a anti-A*24. Anti-HLA protilátka vůči antigenu A*68 se v mém pořadí umisťuje na devátém a desátém místě.

Protilátky s nejvyšší frekvencí výskytu v rámci lokusu B byly anti-B*15:12 (3,96 %), anti-B*82:02, anti-B*44:02, anti-B*44:03 a anti-B*57:01. Protilátku anti-B*82:02 popisuje jako čtvrtou nejčastější Mishra, a další, 2019, v dalších protilátkách se studie odlišuje. Jako nejvíce zastoupené uvádí anti-B*15:02 a anti-B*27:08. Tyto DSA se u vyšetřovaných pacientů FN Plzeň tvoří v menším množství a zaujímají s četností 1,32 % čtyřicáté druhé a čtyřicáté třetí místo.

Hlavními DSA lokusu C jsou anti-C*17:01 (14,92 %), anti-C*04:01, anti-C*05:01, anti-C*08:02 a anti-C*04:03. Anti-C*17:01 uvádí Mishra, a další, 2019 v rámci jejich studie jako čtvrtou nejčastější. Protilátky anti-C*07:01 a anti-C*07:02, které v jejich studii dominují, jsou v naší populaci zařazené na patnáctém a šestnáctém místě.

Nejvíce častými protilátkami v lokusu DQB1 jsou anti-DQB1*06:02 (11,30 %), anti-DQB1*03:03, anti-DQB1*06:03, DQB1*03:01 a anti-DQB1*03:02. Podobné pořadí

nachází Mishra, a další, 2019, kde se na předních pozicích nacházejí anti-DQB1*03:03 a DQB1*03:01. Jako nejčastější v rámci lokusu DQB1 uvádí anti-DQB1*06:04, která je v mém pořadí na sedmém místě.

V posledním testovaném lokusu DRB1 byly zjištěny jako nejčastější protilátky anti-DRB1*04:01 (4,72 %), anti-DRB1*09:01, anti-DRB1*16:02, anti-DRB1*11:01 a anti-DRB1*07:01. Mishra, a další, 2019 označují jako nejčastější protilátky anti-DRB1*09:01 a anti-DRB1*04:01, což odpovídá mému zjištění.

Pokud tedy srovnáme získaná data s dalšími studiemi, zjistíme, že většina nejčastěji stanovovaných protilátek v určitých lokusech odpovídá studiím, některé jsou ale rozdílné. Důvodem, proč jsou některé výsledky odlišné od ostatních studií může být skutečnost, že tyto studie probíhaly v různě velkých sledovaných souborech a v jiné populaci (Mishra, a další, 2019). Studie Başturk, a další, 2016 probíhala v Turecku za účasti 4707 dárců a pacientů, Mishra, a další, 2019 zkoumali v jihovýchodní Asii na přítomnost anti-HLA protilátek soubor 179 pacientů.

Díky tomuto stanovení jsme získali přehled o nejčastěji se tvořících DSA po transplantaci ledviny. Tímto byla tedy splněna první výzkumná otázka a hlavní cíl bakalářské práce.

Druhým cílem bylo zjistit, jaké je zastoupení HLA alel v I. a II. třídě v populaci České republiky. V naší populaci můžeme pozorovat následující zastoupení. A*02:01, A*01:01, A*03:01, A*24:02, A*11:01 jsou nejčastěji vyskytující se HLA alely lokusu A. Srovnávat můžeme s německou studií Registru dárců kostní dřeně, která je umístěna na webu www.allelefrequencies.net. Velikost zkoumané populace je 39689 vyšetřovaných. Zastoupení v lokusu A je totožné, shodují se i četnosti.

Alely s největší frekvencí výskytu jsou B*07:02, B*08:01, B*18:01, B*15:01 a B*44:02. Německá studie uvádí lehce odlišné výsledky, kdy B*18:01 je na sedmém místě a B*44:02 na místě třetím.

Pro lokus C jsou hlavní tyto alely: C*07:01, C*07:02, C*04:01, C*06:02 a C*12:03. Rozdíl nacházím pouze u alely C*12:03. Ta je ve studii na sedmém místě.

DQB1*03:01, DQB1*06:02, DQB1*02:01, DQB1*02:02, DQB1*05:01 jsou nejčastěji vyskytující se alely lokusu DQB1. Bohužel tento lokus nelze porovnat, protože ho studie nestanovovala. Avšak v rámci celého Německa uvádí web www.allelefrequencies.net jako nejvíce časté alely DQB1*03:01, DQB1*02:01 a DQB1*06:02, což odpovídá naší populaci.

DRB1*07:01, DRB1*15:01, DRB1*03:01, DRB1*01:01 a DRB1*11:01 jsou nejvíce zastoupené alely u nás. U lokusu DRB1 se v německé studii vyskytuje DRB1*15:01 první a DRB1*07:01 druhá v pořadí. Další pořadí je identické.

Lehké odlišnosti ve výsledcích mohou být způsobeny velikostí a rozmanitostí zkoumané populace.

Zjistila jsem zastoupení HLA alel I a II. třídy v populaci České republiky. Byla splněna druhá výzkumná otázka bakalářské práce.

Třetím cílem bylo porovnat zastoupení donor specifických protilátek se zastoupením HLA v populaci. Z grafů porovnání je patrné, že zastoupení HLA alel v populaci a zastoupení donor specifických protilátek u pacientů je ve všech lokusech odlišné. Başturk, 2016 a Lucas, 2015 uvádí, že neexistuje žádná korelace mezi alelami a frekvencí protilátek. Vysvětlením by mohla být zkřížená reaktivita v systému – reakce, ke které dochází mezi protilátkou a antigenem. Stejné epitopy se vyskytují na různých antigenech. Protilátka je syntetizována proti jinému, ale podobnému antigenu (imunogenu). Termín označující skupinu, ve které probíhá cross-reaktivita, je CREG – cross-reactive group (Deshpande, 2017).

Nejvíce zastoupenou alelou v naší populaci pro lokus A je A*02:01 s četností 24,31 %. Teoreticky by se mělo tvořit nejvíce protilátek proti této alele. Avšak v stanovení protilátek je až na šesté pozici s četností 5,22 %. Nejčetnější protilátka v lokusu A je anti-A*24:02. Tu následují anti-A*23:01 a anti-A*24:03. Největší schopnost tvořit protilátky mají tedy alely A*23 a A*24. To může být způsobeno cross-reaktivitou v rámci skupiny A*02 (2 CREG), kterou můžeme vidět v Příloze 2. Alela A*02 může způsobovat tvorbu protilátek proti A*23 a A*24 než proti sobě samotné, což vysvětluje, proč jsou v pořadí před protilátkou anti-A*02:01. Alela A*02 je také silně cross-reaktivní s alelami A*68 a A*69. DSA proti těmto alelám jsou v tabulce na předních místech, avšak alely jsou v rámci populace nejméně časté. Opět můžeme mluvit o zkřížené reaktivitě. Pacienti, kteří mají protilátky proti alele A*02 zároveň vytvářejí i protilátky proti A*68 a A*69.

Cross-reaktivitu můžeme sledovat ve všech stanovovaných lokusech I. třídy. Nejčastější alely lokusu B jsou B*07:02 a B*08:01. Tyto alely patří do skupiny širokého antigenu B – Bw6 (Příloha 5). Protilátky proti nim se umístily na čtyřicátém a sedmém místě v tabulce. DSA se nejčastěji tvoří proti alelám B*15:12 a B*82:02, které taktéž patří do skupiny Bw6. Lze tedy předpokládat, že může docházet ke cross-reaktivitě v rámci skupiny Bw6. Další ukázkou je alela s nejvyšší četností v lokusu C – C*07:01, která zkříženě

reaguje s C*17:01, což můžeme vidět v Příloze 4, a následkem toho se proti ní tvoří nejvíce protilátek.

Bohužel, nelze zhodnotit lokusy DRB1 a DQB1, protože se nepodařilo dohledat žádné mapy cross-reakivity.

Bylo tedy zjištěno, že výskyt HLA alel v populaci je rozdílný od zastoupení donor specifických protilátek u pacientů po transplantaci ledviny, což může být způsobeno tím, že některé HLA antigeny mají velkou homologii v epitopech, které vázají anti-HLA protilátky. Byl splněn třetí cíl a třetí výzkumná otázka bakalářské práce.

ZÁVĚR

Bakalářská práce se zabývala stanovením výskytu donor specifických protilátek u pacientů po transplantaci ledviny. DSA hraje důležitou roli v rejekčních mechanismech. Jejich vyšetřování je důležité, a to i ve velmi malých koncentracích, což umožňuje xMAP technologie firmy Luminex®. Tímto vysoce specifickým a vysoce senzitivním testem můžeme zlepšit péči o pacienty po transplantaci.

Podařilo se splnit všechny cíle bakalářské práce. Byl sestaven přehled nejčastěji se vyskytujících donor specifických protilátek a HLA alel I. a II. třídy. Bylo zjištěno, že neexistuje žádná korelace mezi HLA alelami a frekvencí protilátek, což může být způsobeno zkříženou reaktivitou v systému.

Pro praxi lze doporučit další vyšetření, které bude zaměřené na epitopy antigenů, proti nimž je stanovená donor specifická protilátka namířena.

SEZNAM LITERATURY

Anthony Nolan Research Institute. 2019. HLA Alleles Numbers. *HLA Nomenclature*. [Online] September 2019. [Citace: 30. listopad 2019.] <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>.

Başturk, Bilkay , a další. 2016. The Most Common HLA Alleles and Anti-HLA Antibodies to Know for Virtual Cross-Match. *Experimental and Clinical Transplantation*. Listopad 2016, Sv. III, 14, stránky 53-55.

Bartůňková, Jiřina a Paulík, Milan a kolektiv. 2011. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2. vydání. Praha : Grada Publishing, 2011. str. 168. 978-80-247-3533-7.

Bačina, Aleš, Budayová, Eva a Vokatá, Soňa. 2020. Multiplexové analýzy. *Laboratorní metody VOŠZ a SZŠ Hradec Králové*. [Online] 2020. [Citace: 8. březen 2020.] <https://labmet.zshk.cz/vyuka/multiplexove-analyzy.aspx>.

Bio-Rad Laboratories, Inc. 2020. Luminex xMAP Technology. *BIO-RAD*. [Online] 2020. [Citace: 7. březen 2020.] <https://www.bio-rad.com/featured/en/luminex-xmap-technology.html>.

Bürgelová, Marcela. 2011. Imunosupresivní léčba po transplantaci ledviny - současné přístupy. *Remedia*. 2011, 4, stránky 321-328.

Čihák, Radomír. 2013. *Anatomie 2*. Praha : Grada Publishing, a.s., 2013. str. 512. Sv. II. 978-80-247-4788-0.

Delves, Peter J., a další. 2017. *Roitt's Essential Immunology*. 13th Edition. Chichester : WILEY Blackwell, 2017. 9781118416068.

Deshpande, Anand. 2017. The Human Leukocyte Antigen System ... Simplified. *Global Journal of Transfusion Medicine*. 2017, Sv. II, 2, stránky 77-88.

Dobrovolná, Marie, Vraná, Milena a Dyr, Jan Evangelista. 2015. Polymorfismus hlavního histokompatibilního systému člověka: funkce - indikace - detekce - interpretace. *Chemické Listy*. 2015, 109.

Dunbar, Sharon A. 2006. Applications of Luminex® xMAP™ technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. *Clinica Chimica Acta*. 2006, 363.

Dylevský, Ivan. 1999. *Somatologie*. místo neznámé : Epava, 1999. 978-80-86297-05-7.

Hanzlová, Jitka a Hemza, Jan. 2013. Základy anatomie soustavy trávicí, žláz s vnitřní sekrecí a soustavy močopohlavní. *Soustava močová – organa urinaria, organa uropoetica*. [Online] Fakulta zdravotních studií Masarykovy univerzity, 2013. [Citace: 2020. března 12.]

<https://is.muni.cz/do/fsps/e->

learning/zaklady_anatomie/zakl_anatomie_II/pages/soustava_mocova.html#.

Hořejší, Václav, a další. 2017. *Základy imunologie*. 6. vydání. Praha : TRITON s.r.o., 2017. str. 304. 978-80-7553-250-3.

Hynie, Sixtus. 2001. *Farmakologie v kostce*. Praha : Triton, 2001. 80-7254-181-1.

Jílek, Petr. 2019. *Imunologie stručně, jasně, přehledně*. Praha : Grada Publishing, a.s., 2019. 978-80-271-0595-3.

Klein, Jan a Sato, Akie. 2000. The HLA System. *The New England Journal of Medicine* . 2000, 10.

Koordináční středisko transplantací. 2020. Statistika. *Koordináční středisko transplantací*. [Online] Leden 2020. [Citace: 29. Březen 2020.] <https://kst.cz/wp-content/uploads/2020/01/Transplantační-aktivita-v-ČR-2019.pdf>.

Krejsek, Jan, Andrýs, Ctirad a Krčmová, Irena. 2016. *Imunologie člověka*. Hradec Králové : Garamon s.r.o., 2016. 978-80-86472-74-4.

Lencová, Simona, a další. 2019. Aktuální trendy druhové identifikace rybího masa pomocí molekulárně-biologických metod. *Chemické listy*. 2019, 113.

Liška, Martin, Ochotná, Jitka a Panzner, Petr. 2013. Výukový portál Lékařské fakulty v Plzni. *mefanet*. [Online] 25. března 2013. [Citace: 4. prosinec 2019.] <http://mefanet.lfp.cuni.cz/index.php>.

Lucas, Donna P., Leffell, Mary S. a Zachary, Andrea A. 2015. Differences in Immunogenicity of HLA Antigens and the Impact of Cross-Reactivity on the Humoral Response. *Transplantation*. Leden 2015, Sv. I, 99, stránky 77-85.

LUMINEX®. 2020. LUMINEX® 100/200™. *LUMINEX®*. [Online] 2020. [Citace: 3. března 2020.] <https://www.luminexcorp.com/eu/luminex-100200/>.

Mishra, Vikash C., a další. 2019. Prevalence and specificity of anti-HLA antibodies in Indian patients - single-centre data! *ISBT Science Series*. 2019, 14, stránky 374-378.

Ocean Ridge Biosciences. 2020. Ocean Ridge Biosciences. *Protein Profiling Services Multiplex, ELISAs, & Enzymatic Assays*. [Online] 2020. [Citace: 5. března 2020.] https://www.oceanridgebio.com/sites/default/files/html/luminex_xmap.html.

Owen, Judith A., a další. 2013. *Kuby Immunology*. 7th Edition. New York : W. H. Freeman and Company, 2013. 978-14641-3784-6.

Ozawa, M., a další. 2007. 14th International HLA and Immunogenetics Workshop: Report on the Prospective Chronic Rejection Project. *Tissue Antigens*. 2007, Sv. I, 69, stránky 174-179.

- Parija, Subhash Chandra. 2012.** *Textbook of Microbiology and Immunology*. 2nd Edition. Haryana : Elsevier, 2012. 978-81-312-2810-4.
- Penka, Miroslav, Tesařová, Eva a kolektiv. 2012.** *Hematologie a transfúzní lékařství II*. Praha : GRADA Publishing, 2012.
- Řeháček, Vít, Masopust, Jiří a kolektiv. 2013.** *Transfúzní lékařství*. místo neznámé : Grada Publishing a.s., 2013. 978-80-247-4534-3.
- Slavčev, Antonij. 2019.** Hlavní histokompatibilní komplex u člověka (HLA) - diagnostika a význam pro transplantace orgánů. *Postgraduální medicína*. 2019, 4.
- Teplan, Vladimír a kolektiv. 2011.** *Praktická nefrologie: 2., zcela přepracované a doplněné vydání*. Praha : Grada Publishing, a.s., 2011. 80-247-1122-2.
- Viklický, Ondřej. 2010.** Imunosuprese po transplantaci ledviny. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2010, 24, stránky 98-102.
- Viklický, Ondřej. 2013.** Přežití transplantované ledviny ovlivňují dárcovsky specifické protilátky vázající komplement. *Postgraduální nefrologie*. 2013, 4, stránky 62-63.
- Viklický, Ondřej, a další. 2008.** *Transplantace ledviny v klinické praxi*. Praha : Grada Publishing a.s., 2008. 978-80-247-2455-3.
- Žák, Aleš a Petrášek, Jan et al. 2012.** *Základy vnitřního lékařství*. Praha : Galen, 2012. 978-80-7262-851-3.

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 Povolení o sběru informací

Příloha 2 Mapa cross-reaktivity HLA lokusu A

Příloha 3 Mapa cross-reaktivity HLA lokusu B

Příloha 4 Mapa cross-reaktivity HLA lokusu C

Příloha 5 Výsledek vyšetření DSA, ukázka alel Bw6

PŘÍLOHY

Příloha 1 Povolení o sběru informací



FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ

Útvar náměstka pro ošetrovatelskou péči

Edvarda Beneše 13, 305 99 Plzeň - Bory
alej Svobody 80, 304 60 Plzeň - Lochotín
IČO 00669806 tel.: 377 401 111, 377 103 111

Vážená paní

Veronika Šípová

Studentka oboru Zdravotní laborant

Fakulta zdravotnických studií, Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Západočeská univerzita v Plzni

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči FN Plzeň **uděluji souhlas** se sběrem a zpracováním anonymizovaných dat z výsledků laboratorních metod, používaných v *Ústavu imunologie a alergologie (ÚIA) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem „*Stanovení výskytu donor specifických protilátek u pacientů po transplantaci ledviny*“.

Podmínky, za kterých Vám bude umožněna realizace Vašeho šetření ve FN Plzeň:

- Vedoucí zdravotní laborantka ÚIA souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně povedete svoje šetření.
- Vaše šetření nenaruší chod pracoviště ve smyslu provozního zajištění dle platných směrnic FN Plzeň, ochrany dat pacientů a dodržování Hygienického plánu FN Plzeň. **Vaše šetření bude provedeno za dodržení všech legislativních norem, zejména s ohledem na platnost zákona č. 372/2011 Sb., o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění.**
- Údaje ze zdravotnické dokumentace pacientů, které budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být anonymizovány.
- Sběr informací budete provádět v době Vaší, školou schválené odborné praxe na ÚIA a pod přímým vedením oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým **je Ing. Bc. Tomáš Vlas, odborný pracovník v laboratorních metodách ÚIA FN Plzeň.**

Po zpracování Vámi zjištěných údajů poskytnete zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň závěry Vašeho šetření, pokud o ně projeví oprávněný pracovník ZOK / OC zájem a budete se aktivně podílet na případné prezentaci výsledků Vašeho šetření na vzdělávacích akcích pořádaných FN Plzeň.

Toto povolení nezakládá povinnost zdravotnických pracovníků s Vámi spolupracovat, pokud by spolupráce s Vámi narušovala plnění pracovních povinností zaměstnanců. Spolupráce zaměstnanců FN Plzeň na Vašem šetření je dobrovolná.

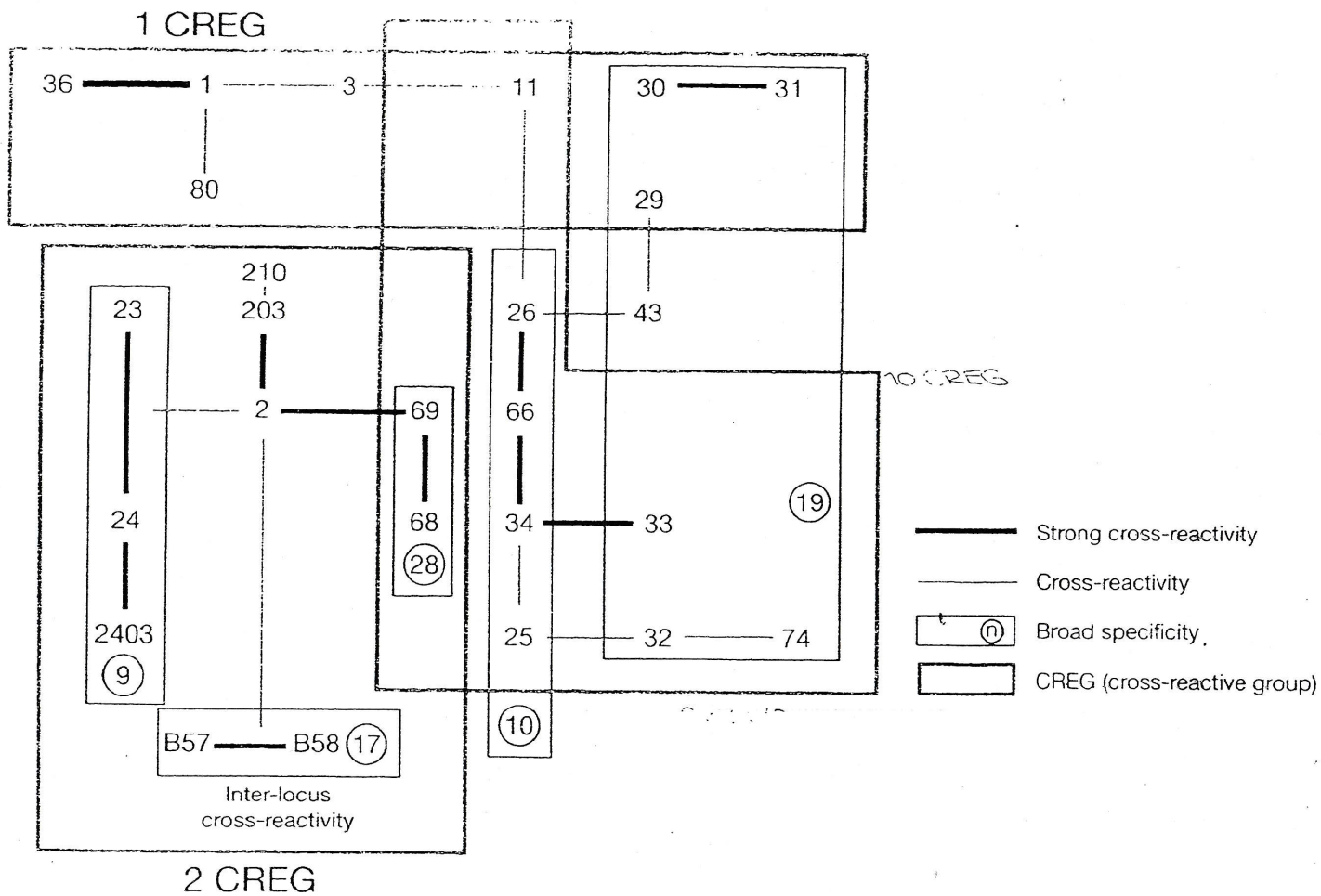
Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

Mgr. Bc. Světluše Chabrová
manažerka pro vzdělávání a výuku NELZP
zástupkyně náměstkyně pro oš. péči

Útvar náměstkyně pro oš. péči FN Plzeň
tel.: 377 103 204, 377 402 207
e-mail: chabrovas@fnplzen.cz

14. 11. 2019

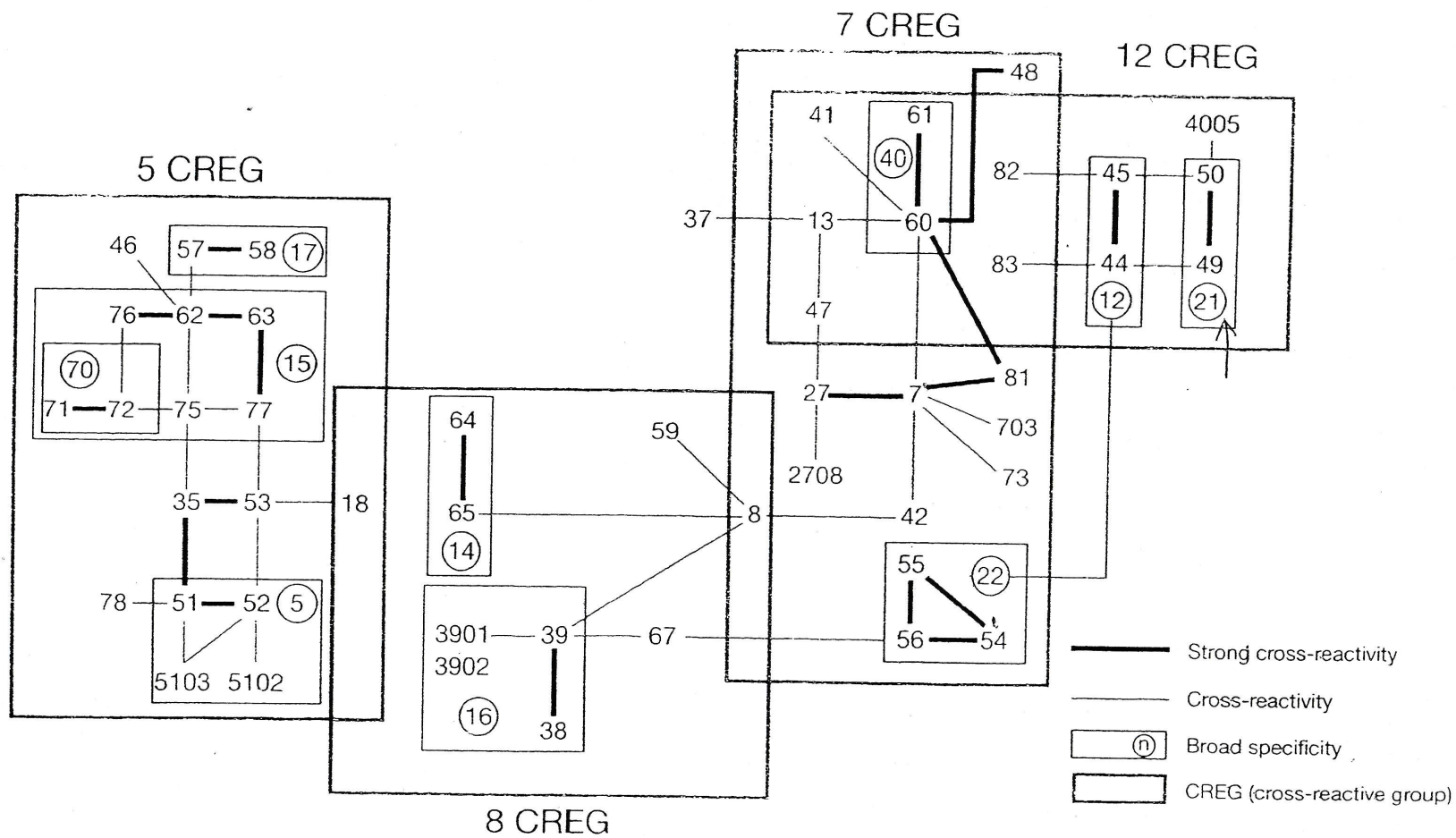
Příloha 2 Mapa cross-reaktivity HLA lokusu A



invitrogen

Zdroj: Materiály ÚIA Fakultní nemocnice Plzeň

Příloha 3 Mapa cross-reaktivity HLA lokusu B

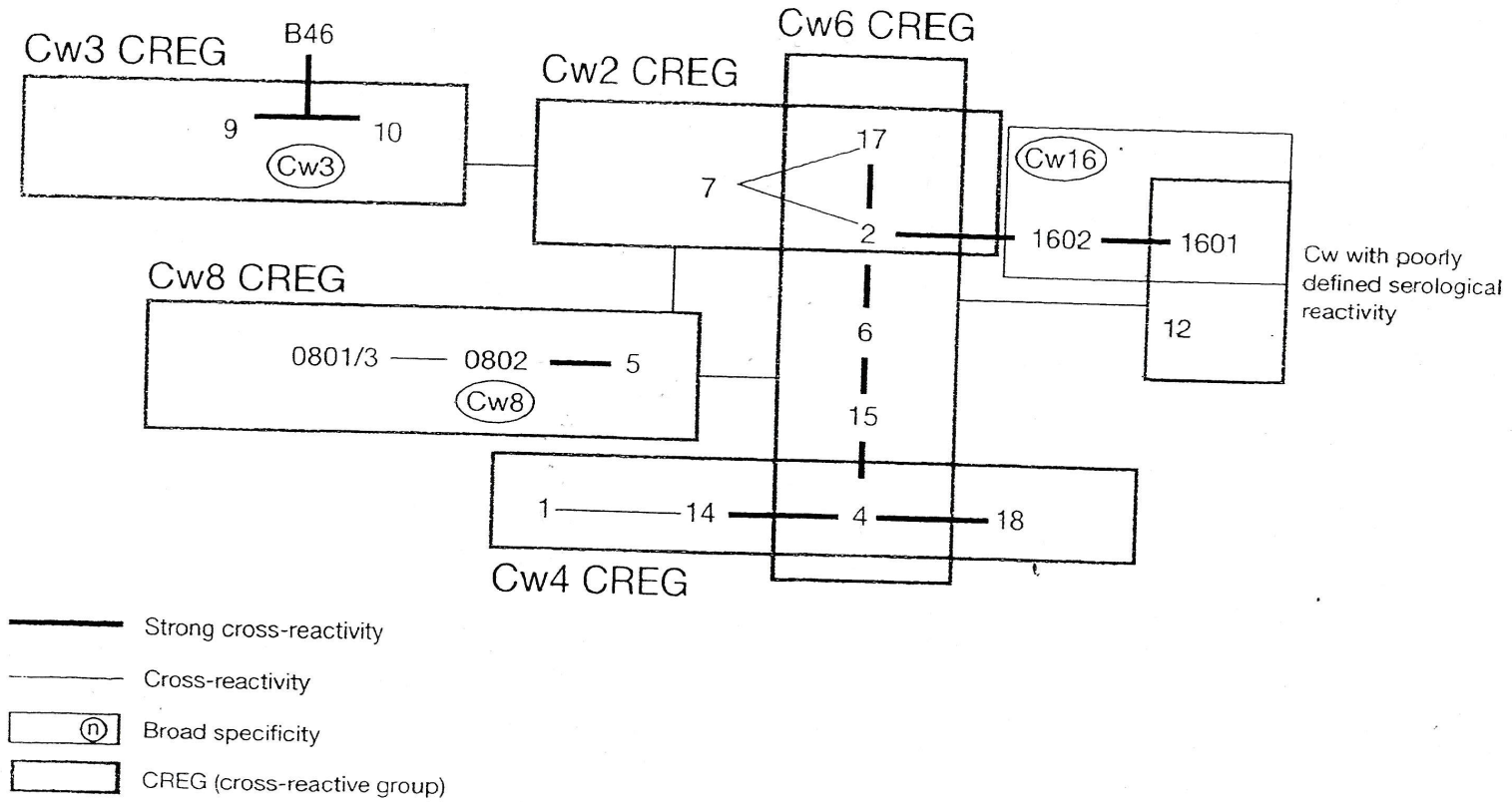


© 2000 Invitrogen Corporation, San Diego, CA, USA

invitrogen

Zdroj: Materiály ÚIA Fakultní nemocnice Plzeň

Příloha 4 Mapa cross-reaktivity HLA lokusu C



Zdroj: Materiály ÚIA Fakultní nemocnice Plzeň

Příloha 5 Výsledek vyšetření DSA, ukázka alel Bw6

Ustav imunologie a alergologie
 FN Plzeň
 Alej Svobody 80
 Plzeň,

Phone: 4310

Class I Single Antigen Results Batch ID: dsa-1-30-3-2020

Patient Name: Patient DOB: Draw Date: Donor Number: Expiration Date: 07.08.2020
Sample ID: Lot ID: 3008563 3008542-SA1 Donor Center #: Accession #:
Patient HLA Type: Report By: Tomas Vlas

Method Type: Legacy Calculation

Positive CON MFI: 11014
Negative CON MFI: 76

Analysis Mode: Manual

% PRA: 11

Bead	Bead Count	Raw Value	BCM	BCR	AD-BCR	Assignment	A	B	C	Bw	A Serology	B Serology	C Serology
103	89	7632	7474	116.78	127.21	Positive	A*01:01				A1		
143	69	6011	5857	86.77	79.53	Positive		B*15:12		Bw6		B76(15)	
125	92	3514	3346	52.27	54.68	Positive	A*36:01					A36	
113	98	3230	3077	48.08	50.40	Positive	A*24:02			Bw4		A24(9)	
112	78	2958	2802	43.78	48.16	Positive	A*23:01			Bw4		A23(9)	
133	86	1846	1702	26.59	28.87	Positive	A*80:01				A80		
162	98	1628	1464	21.68	23.59	Positive		B*45:01		Bw6		B45(12)	
160	101	1502	1346	19.94	20.02	Positive		B*44:02		Bw4		B44(12)	
161	66	1486	1309	19.39	19.26	Positive		B*44:03		Bw4		B44(12)	
181	92	1369	1201	17.79	20.06	Positive		B*82:02		Bw6			
190	87	652	422	3.67	6.66	Positive			C*07:01				Cw7
178	88	410	226	3.35	3.78	Weak		B*73:01				B73	
114	89	325	153	2.39	2.46	Negative	A*24:03			Bw4	A2403		
191	109	311	71	0.62	1.33	Negative			C*07:02				Cw7
185	88	293	60	0.52	0.59	Negative			C*03:04				Cw10(w3)
194	65	283	58	0.50	0.65	Negative			C*12:02				
192	92	266	76	0.66	0.94	Negative			C*08:01				Cw8
182	90	262	52	0.45	0.60	Negative			C*01:02				Cw1
195	96	256	45	0.39	0.50	Negative			C*14:02				
110	87	251	114	1.78	1.70	Negative	A*11:01				A11		
111	94	245	80	1.25	1.38	Negative	A*11:02				A11		
193	75	239	-4	-0.03	-0.06	Negative			C*08:02				Cw8
184	78	235	20	0.17	0.22	Negative			C*03:03				Cw9(w3)
197	83	228	5	0.04	0.08	Negative			C*16:01				
163	83	215	-34	-0.50	-0.69	Negative		B*46:01				B46	
176	86	211	58	0.86	0.87	Negative		B*59:01		Bw4		B59	
136	89	193	36	0.53	0.53	Negative		B*08:01		Bw6		B8	
171	89	189	23	0.34	0.37	Negative		B*54:01		Bw6		B54(22)	
108	86	180	-5	-0.07	-0.08	Negative	A*02:05				A2		
186	85	178	-116	-1.01	-2.91	Negative			C*04:01				Cw4
109	81	161	5	0.08	0.08	Negative	A*03:01				A3		
175	102	153	-16	-0.24	-0.26	Negative		B*58:01		Bw4		B58(17)	
183	86	153	-77	-0.67	-1.18	Negative			C*02:02				Cw2
172	88	151	-30	-0.44	-0.50	Negative		B*55:01		Bw6		B55(22)	
198	93	150	-77	-0.67	-1.33	Negative			C*17:01				
188	98	149	-70	-0.60	-1.05	Negative			C*05:01				Cw5
165	89	134	-55	-0.81	-1.22	Negative		B*48:01		Bw6		B48	
139	110	130	-101	-1.50	-1.64	Negative		B*14:02		Bw6		B65(14)	
199	98	130	-118	-1.03	-1.86	Negative			C*18:01				
104	88	127	-37	-0.57	-0.63	Negative	A*02:01				A2		
189	83	125	-75	-0.65	-0.89	Negative			C*06:02				Cw6
106	101	124	-42	-0.66	-0.70	Negative	A*02:02				A2		
134	79	120	-63	-0.93	-1.02	Negative		B*07:02		Bw6		B7	
152	85	117	-74	-1.10	-1.37	Negative		B*35:08		Bw6		B35	
158	89	117	-35	-0.52	-0.55	Negative		B*41:01		Bw6		B41	
187	73	117	-103	-0.90	-1.24	Negative			C*04:03				
196	87	115	-86	-0.75	-0.96	Negative			C*15:02				
179	86	115	-69	-1.01	-1.05	Negative		B*78:01		Bw6		B78	
131	71	114	-83	-1.30	-1.72	Negative	A*69:01				A69(28)		
135	88	114	-64	-0.94	-1.02	Negative		B*07:03		Bw6		B703	
138	87	111	-64	-0.95	-1.04	Negative		B*14:01		Bw6		B64(14)	
122	83	107	-57	-0.89	-0.97	Negative	A*33:01				A33(19)		
144	87	107	-58	-0.86	-0.99	Negative		B*15:13		Bw4		B77(15)	
153	71	107	-44	-0.65	-0.70	Negative		B*37:01		Bw4		B37	
168	108	107	-67	-0.99	-1.06	Negative		B*51:01		Bw4		B51(5)	
180	73	105	-58	-0.86	-0.95	Negative		B*81:01		Bw6		B81	
132	62	104	-63	-0.98	-1.10	Negative	A*74:01				A74(19)		
159	81	104	-87	-1.29	-1.38	Negative		B*42:01		Bw6		B42	

Sample ID:

Patient Name:

Draw Date:

Report Date: 03.30.2020

145	100	104	-63	-0.93	-0.90	Negative		B*15:16		Bw4		B63(15)	
151	95	102	-80	-1.19	-1.24	Negative		B*35:01		Bw6		B35	
119	89	99	-96	-1.50	-1.79	Negative	A*30:01				A30(19)		
121	78	99	-65	-1.02	-1.06	Negative	A*32:01			Bw4	A32(19)		
137	79	98	-77	-1.14	-1.47	Negative		B*13:02		Bw4		B13	
154	107	98	-46	-0.68	-0.67	Negative		B*38:01		Bw4		B38(16)	
155	94	98	-47	-0.69	-0.68	Negative		B*39:01		Bw6		B3901	
126	74	97	-77	-1.20	-1.48	Negative	A*43:01				A43		
130	176	97	-69	-1.08	-1.10	Negative	A*68:02				A68(28)		
170	81	97	-62	-0.92	-0.96	Negative		B*53:01		Bw4		B53	
147	78	96	-64	-0.95	-0.96	Negative		B*18:01		Bw6		B18	
120	94	96	-100	-1.55	-1.93	Negative	A*31:01				A31(19)		
164	90	96	-73	-1.07	-1.10	Negative		B*47:01		Bw4		B47	
169	92	95	-80	-1.19	-1.29	Negative		B*52:01		Bw4		B52(5)	
174	80	95	-62	-0.92	-0.85	Negative		B*57:01		Bw4		B57(17)	
148	91	94	-69	-1.02	-1.00	Negative		B*27:03		Bw4		B27	
167	86	93	-64	-0.95	-1.03	Negative		B*50:01		Bw6		B50(21)	
140	60	92	-56	-0.82	-0.79	Negative		B*15:01		Bw6		B62(15)	
166	83	91	-48	-0.71	-0.70	Negative		B*49:01		Bw4		B49(21)	
117	94	90	-87	-1.36	-1.62	Negative	A*29:01				A29(19)		
123	93	90	-77	-1.20	-1.48	Negative	A*33:03				A33(19)		
129	74	88	-61	-0.95	-1.07	Negative	A*68:01				A68(28)		
118	101	87	-89	-1.39	-1.49	Negative	A*29:02				A29(19)		
124	107	87	-65	-1.02	-1.22	Negative	A*34:02				A34(10)		
146	81	87	-59	-0.87	-0.88	Negative		B*15:18		Bw6		B71(70)	
156	84	87	-61	-0.90	-1.03	Negative		B*40:01		Bw6		B60(40)	
173	106	87	-73	-1.08	-1.11	Negative		B*56:01		Bw6		B56(22)	
142	75	85	-73	-1.08	-1.15	Negative		B*15:03		Bw6		B72(70)	
149	91	85	-72	-1.07	-1.06	Negative		B*27:05		Bw4		B27	
157	98	85	-70	-1.04	-1.01	Negative		B*40:02		Bw6		B61(40)	
141	76	83	-79	-1.16	-1.26	Negative		B*15:02		Bw6		B75(15)	
116	60	78	-72	-1.12	-1.16	Negative	A*26:01				A26(10)		
128	82	78	-56	-0.88	-0.89	Negative	A*66:02				A66(10)		
107	78	76	-90	-1.41	-1.54	Negative	A*02:03				A203		
127	97	72	-68	-1.06	-1.15	Negative	A*66:01				A66(10)		
150	90	69	-64	-0.95	-0.83	Negative		B*27:08		Bw6		B2708	
177	100	68	-63	-0.93	-0.82	Negative		B*67:01		Bw6		B67	
115	76	64	-82	-1.28	-1.19	Negative	A*25:01			Bw4	A25(10)		

Zdroj: Materiály ÚIA Fakultní nemocnice Plzeň