

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



## DIPLOMOVÁ PRÁCE

# ANALÝZA PROTILÁTEK PROTI HLA ANTIGENŮM METODOU LUMINEX U PACIENTŮ PŘED A PO TRANSPLANTACI LEDVINY

Bc. Renata Holoubková

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Karolína Jankovičová, Ph.D.

Hradec Králové, 2024

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat touto cestou své vedoucí diplomové práce Mgr. Karolíně Jankovičové, Ph.D. za její odborné vedení, poskytnutí cenných informací, literatury a konzultací při tvorbě mé práce. Dále bych chtěla poděkovat panu prof. RNDr. Ctiradu Andrýsovi, Ph.D. za uskutečnění této práce a mnoho odborných rad. Poděkování patří i Fakultní nemocnici v Hradci Králové, kde jsem mohla vykonat praktickou část své práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat příteli Bc. Patriku Zmijovi za trpělivost a podporu.

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

V Hradci Králové 10. 5. 2024

Bc. Renata Holoubková

## Obsah

### 1. OBSAH

2.	ABSTRAKT .....	7
3.	ABSTRACT .....	8
4.	ÚVOD .....	9
5.	CÍLE PRÁCE.....	10
6.	TEORETICKÁ ČÁST.....	11
6.1	Imunitní systém.....	11
6.1.1	Vrozená imunita .....	11
6.1.2	Specifická imunita .....	13
6.2	T-Lymfocyty .....	14
6.2.1	Úvod .....	14
6.2.2	Vznik a vývoj.....	14
6.2.3	Centrální tolerance.....	15
6.2.4	Diferenciace .....	15
6.2.5	TCR receptor.....	16
6.2.6	Klasifikace T lymfocytů.....	17
6.2.7	T lymfocyt a APC.....	17
6.3	B lymfocyty.....	18
6.3.1	Úvod .....	18
6.3.2	Vznik a vývoj.....	18
6.3.3	Protilátky .....	19
6.4	HLA SYSTÉM .....	22
6.4.1	Úvod .....	22
6.4.2	Polymorfismus HLA .....	23
6.4.3	Asociace HLA s chorobami .....	24
6.4.4	Dědičnost HLA systému.....	25
6.4.5	HLA nomenklatura .....	25
6.4.6	HLA I. třídy.....	26

6.4.7	HLA II. třídy.....	27
6.4.8	Molekuly MICA, MICB .....	29
6.4.9	Typizace HLA .....	29
6.4.10	HLA protilátky jako DSA a jejich vliv na transplantaci ledvin .....	30
6.5	Transplantace.....	31
6.5.1	Aloreaktivita .....	32
6.5.2	Transplantace ledviny .....	32
6.5.3	Rejekce .....	33
6.5.4	Imunosupresivní léčba .....	35
6.5.5	Detekce HLA před transplantací ledviny .....	35
6.6	Luminex (xMap, SAB) .....	37
6.6.1	Princip.....	38
6.6.2	Vyšetření metodou Luminex u transplantace ledviny .....	39
6.6.3	Algoritmus vyšetření protilátek.....	40
6.6.4	Vyhodnocení .....	41
7.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	44
7.1	Příprava sér .....	44
7.2	Příprava reagensů a přístroje .....	44
7.3	Kalibrace přístroje.....	44
7.4	Postup zpracování vzorku .....	45
7.5	Postup měření.....	46
7.6	Postup analýzy dat pomocí softwaru HLA-Fusion.....	46
7.7	Statistická analýza dat.....	47
8.	výsledky .....	48
8.1	Výběrový soubor .....	48
8.2	Celkový přehled dat .....	49
8.3	Skupina negativní .....	50
8.4	Skupina pozitivní .....	54
8.5	Skupina „slabší index“ .....	64
8.6	Skupina „verifikovat“ .....	67
8.7	Celkové vyhodnocení .....	68
9.	DISKUSE .....	70

10. ZÁVĚR .....	75
11. POUŽITÉ ZKRATKY.....	76
12. SEZNAM TABULEK .....	78
13. SEZNAM OBRÁZKŮ .....	79
14. SEZNAM GRAFŮ.....	79
15. POUŽITÁ LETERATURA.....	80

## 2. ABSTRAKT

Tato práce se zaměřuje na zvládnutí techniky vyšetření anti-HLA protilátek pomocí multiplexové metody Luminex. Cílem bylo osvojit si práci s analyzačním softwarem, který umožňuje vyhodnocování specifit a hladin jednotlivých anti-HLA protilátek v sérech pacientů před a po transplantaci ledviny. Zároveň byly posouzeny cut-off hodnoty pro screeningové vyšetření anti-HLA protilátek u souboru hodnocených pacientů. Dále byla provedena analýza senzibilizace vůči jednotlivým HLA antigenům u skupiny pacientů, kteří měli nízkou hladinou protilátek.

V teoretické části této práce jsem se zabývala hlavním histokompatibilitním systémem (HLA systém) a jeho významem v transplantologii. Dále jsem se zaměřila na problematiku transplantační imunity a na principy aloreaktivity a rejekcí. V textu jsem rozebrala vznik a význam HLA protilátek a dále jsem se zabývala různými metodikami analýzy anti-HLA protilátek, zvláště multiplexovou metodou Luminex.

V experimentální části, kterou jsem vykonala na oddělení Klinické imunologie a alergologie v Hradci Králové, jsem prováděla analýzu protilátek namířených proti HLA antigenům I. a II. třídy pomocí multiplexové metody Luminex. U obou HLA tříd byly sledovány hodnoty indexů screeningových vyšetření. U pozitivních hodnot indexů byly v následném typizačním vyšetření sledovány hodnoty MFI. Dále byly také sledovány protilátky proti jednotlivým HLA specifitám. V rámci této diplomové práce byli sledováni pacienti za rok 2023 a byli rozděleni podle hodnot indexů na 4 skupiny, které byly podrobně zhodnoceny.

Na sledovaných skupinách pacientů bylo zjištěno, že nejvíce pacientů vykazovalo pozitivní screening HLA protilátek. Pozitivita byla nejčastěji namířena proti HLA-B antigenům v HLA I. třídě a proti HLA-DQ v II. třídě. Procento pacientů, kteří si vytvořili DSA, nedosahovalo ani 50%. Byla prověřena mezní hodnota screeningového vyšetření a celkové zhodnocení vyšetření protilátek metodou Luminex.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** donor specifické protilátky, HLA systém, HLA protilátky, index, Luminex, MFI, rejekce, screening, typizace

### **3. ABSTRACT**

This work focuses on mastering the technique of examining anti-HLA antibodies using the multiplex Luminex method. The aim was to become proficient in working with analytical software capable of evaluating the specificity and levels of individual anti-HLA antibodies in patients' sera before and after kidney transplantation. Additionally, cut-off values for screening for anti-HLA antibodies in the assessed patient cohort were determined. Furthermore, an analysis of sensitization to individual HLA antigens was performed in a group of patients with low antibody levels.

In the theoretical part of this work, I addressed the major histocompatibility system (HLA system) and its significance in transplantology. I also focused on the issues of transplant immunity and the principles of alloreactivity and rejection. I discussed the origin and significance of HLA antibodies and examined various methods for analyzing anti-HLA antibodies, particularly the multiplex Luminex method.

In the experimental part, conducted at the Department of Clinical Immunology and Allergology in Hradec Kralove, I analyzed antibodies targeting HLA class I and II antigens using the multiplex Luminex method. Screening index values were monitored for both HLA classes. In subsequent typing examinations, MFI values were observed for positive index values. Additionally, antibodies against individual HLA specificities were monitored. Patients were followed for the year 2023 and divided into 4 groups based on index values, which were thoroughly evaluated.

It was found that most patients exhibited positive screening for HLA antibodies. Positivity was most frequently directed against HLA-B antigens in class I and against HLA-DQ in class II. The percentage of patients who developed DSA did not even reach 50%. The cut-off value for screening examination and overall assessment of antibody examination using the Luminex method was verified.

**KEYWORDS:** donor-specific antibodies, HLA system, HLA antibodies, index, Luminex, MFI, rejection, screening, typing



## 4. ÚVOD

Transplantace ledviny představuje nejúčinnější metodu léčby v případě terminálního selhání ledvin. Zatímco hemodialýza může výrazně prodloužit život pacienta, přináší s sebou komplexní soubor rizik, což může vést ke snížení celkové kvality života. (Krejsek J, 2016). Největší překážku při transplantacích tvoří HLA molekuly. HLA systém má zásadní roli v obraně proti cizím patogenům a imunitním dozoru nad nádory. V kontextu transplantace jsou molekuly HLA velice problematické neboť tento systém je vysoce polymorfní a variabilní. Tato variabilita je v populaci důležitá v ohledu ochrany jedince avšak při transplantaci tvoří zásadní problém. Pokud imunitní systém příjemce rozpozná transplantovanou ledvinu jako cizí předmět, dojde k odmítnutí štěpu. (Reindl-Schwaighofer R, 2019) Odmítnutí aloštěpu neboli rejekce, je výsledkem složité souhry zahrnující jak vrozený, tak adaptivní imunitní systém. Rejekce může být akutní či později chronická a uplatňují se zde nejvíce T- lymfocyty a protilátky. Anti-HLA protilátky však mohou být vytvořeny již před transplantací, kdy jedinec může být senzibilizován krevními transfuzemi, předchozími transplantacemi, anebo těhotenstvím. Průkaz těchto předem vytvořených protilátek v cytotoxickém crossmatch testu je kontraindikací transplantace. Na druhé straně vývoj de novo protilátek může zvýšit riziko akutní a zvláště chronické rejekce. (Aleign T, 2018). Anti-HLA protilátky jsou sledovány u pacientů před i po transplantaci ledviny. Nejnovějším přístupem jejich sledování je multiplexová metoda Luminex, u které analýza probíhá na mikrokuličkách a umožňuje stanovení až 100 specifit. Na Luminexu je možné provést screeningové vyšetření, které přináší informaci zvláště o pozitivitě séra. V případě positivity se provádí typizační vyšetření, které je vysoce senzitivní a umožňuje přímo určit, proti kterým HLA antigenům si pacient vytvořil protilátky. Také lze sledovat protilátky v čase a sledovat tak změny hladin protilátek. (Lachmann N, 2013) Pacienti před transplantací absolvují vyšetření jednou ročně, zatímco pacienti po transplantaci dochází na vyšetření dle klinické potřeby. Po provedené transplantaci jsou pacienti v imunosupresivní terapii, která snižuje reaktivitu imunitního systému. (Česká nefrologická společnost, 2014), (Kordulová P, 2019)

## 5. CÍLE PRÁCE

1. Zvládnutí techniky vyšetření anti-HLA protilátek multiplexovou metodou na principu XMAP - Luminex.
2. Osvojení si práce s analyzačním softwarem vyhodnocujícím specifitu a hladiny jednotlivých anti-HLA protilátek v sérech pacientů před a po transplantaci ledviny.
3. Posouzení cut-off hodnoty pro screeningové vyšetření anti-HLA protilátek u souboru hodnocených pacientů.
4. Analýza senzibilizace vůči jednotlivým HLA antigenům u skupiny pacientů s nízkou hladinou protilátek.

## 6. TEORETICKÁ ČÁST

### 6.1 Imunitní systém

Imunitní systém patří k základním homeostatickým mechanismům lidského organismu, jehož cílem je udržení integrity organismu tím, že rozpoznává škodlivé od neškodného a tím se také podílí na fyziologické obměně tkání. Skládá se z buněk, molekul a tkání, které jsou ve vzájemné interakci a jejich cílem je rozeznat a eliminovat škodliviny z vnějšího tak i z vnitřního prostředí. Ohrožení z vnějšího prostředí představují škodlivé patogeny a jejich toxické produkty. Aby imunitní systém nezahajoval reakci proti vlastním strukturám a neškodným podnětům je důležitá autotolerance, kdy systém rozpozná vlastní tkáň a udržuje vůči nim toleranci. Další nezbytnou funkcí imunitního systému je imunitní dohled, kdy dokáže rozpoznat škodliviny pocházející z vnitřního prostředí. Díky tomuto dohledu průběžně odstraňuje poškozené, staré či jinak změněné buňky. Imunitní systém tvoří složky vrozené a antigenně specifické. Důležitou složkou imunity jsou dále molekuly jako např. adhezivní molekuly, HLA molekuly a tkáňové hormony - cytokiny. (Hořejší V, 2017), (Faenza I, 2022)

#### 6.1.1 Vrozená imunita

Mechanismy této složky imunity jsou evolučně starší. Vyznačují se schopností rozeznat patogeny tím, že reagují na jejich strukturní nebo funkční rysy. Též dokáží rozeznat škodliviny exprimované na vlastních poškozených buňkách. Tato obrana je založená na buňkách a molekulách, které jsou v těle připravené předem a nepotřebují ke své funkci specializované molekuly, jak je tomu u imunity specifické. Zástupci buněčné obrané linie jsou převážně fagocytující buňky, jako polymorfonukleární granulocyty, monocyty, makrofágy a dendritické buňky. Eosinofilní a bazofilní segmenty se uplatňují hlavně při alergických reakcích a při parazitárních onemocněních. Neutrofilní segmenty vycestovávají z krevního oběhu do místa infekce vlivem chemoatraktantů jako jsou převážně složky komplemetu C3a a C5a. Prostup cévou jim umožňují adhezivní molekuly, které jsou zde exprimovány vlivem zánětlivých cytokinů. Měňavkovitým pohybem migrují do místa infekce, kde patogeny pohltnou a účinně je usmrcují svými enzymatickými a mikrobicidními působky. Fagocytóza je usnadněna

díky interakcím mezi fagocytem a patogenem. Tyto interakce jsou na principu receptor-ligand. Patogen, který má být zlikvidován může být zviditelněn tzv. opsonizován. Opsoniny tvoří například složky komplementu C3b nebo protilátky. Fagocyt je vybaven receptory, které díky přítomnému ligandu umožní k patogenu lépe přilnout. Neutrofilní segment po fagocytóze hyne apoptózou. Apoptická tělíska fagocytuje makrofág. Makrofágy jsou poslední vývojové stádium monocytů a stejně tak jako neutrofilny se řadí mezi profesionální fagocyty. Monocyty se nacházejí v periferní krvi a po vycestování do tkání se stávají tkáňovými makrofágy. Tyto buňky mají velkou fagocytární aktivitu a také tvoří nedílnou spojku mezi vrozenou a specifickou imunitou, neboť na svém povrchu exprimují HLA molekuly II. třídy a dokáží tak prezentovat antigenní materiál T-lymfocytům. Jejich důležitá úloha je také při ukončení fyziologické zánětlivé reakce, kdy po fagocytóze apoptických buněk produkují TGF- $\beta$ , který hraje roli při obnově tkání. Další důležitou obranou buněčné složky jsou přirozené cytotoxické buňky, kterou reprezentuje hlavně skupina NK buněk neboli přirozených zabíječů. Ti rozeznávají buňky, které mají na svém povrchu nízkou expresi HLA molekul a podílí se tak hlavně na virové obraně nebo při nádorovém bujení. Tyto buňky obsahují ve svých granulích perforiny a granzymy, které následně patogena usmrtí. Podobně jako cytotoxické lymfocyty exprimují povrchový receptor FasL, který po navázání na příslušný receptor Fas okamžitě indukuje apoptózu. Mezi humorální složky nespecifické imunity patří komplement, lektiny, interferony a jiné sérové proteiny. Komplement je soubor přibližně 30ti sérových a membránových proteinů, kdy hlavními složkami jsou složky C1-C9. Štěpení těchto složek se liší cestou jejich aktivace, která může být klasická, alternativní nebo lektinová. Všechny tyto cesty se setkávají v terminálním lytickém stádiu. Při štěpení se část složek uvolní do prostředí a působí jako chemotaxiny zvláště složky C3a a C5a, a část se zachytí na mikroorganismus a působí jako opsoniny zvláště složka C5b. Při dalším štěpení dochází v membráně patogena k vytvoření kruhovitěho membranolytického komplexu, který způsobí osmotickou lýzu. Stejně tak, jako například koagulační kaskáda, musí i tato kaskáda reakcí být striktně regulována. Interferony, zvláště interferon  $\alpha$  a  $\beta$ , jsou látky, které se uplatňují hlavně při virové nákaze. Napadené buňky je produkují a v dosud neinfikovaných buňkách navozují antivirový stav. Sérové proteiny, zejména C-reaktivní protein nebo sérový amyloid A, mají funkci zejména opsonizační nebo také

transportní. Proto se jejich sérové koncentrace při zánětech mnohonásobně zvyšují. Vrozené složky imunity jsou nezbytné pro zahájení antigenně specifických reakcí. (Hořejší V, 2017), (Hamplová L, 2019), (Martins Y, 2023)

### **6.1.2 Specifická imunita**

Specifická imunita je založená na vysoce specializovaných molekulách. Mezi tyto molekuly patří receptory zakotvené v membráně T a B lymfocytů, které tvoří buněčnou složku specifické imunity. Mezi humorální složky patří imunoglobuliny, které produkují plazmatické buňky vznikající diferenciací z B lymfocytů. Lymfocyty rozpoznávají antigen pomocí TCR v případě T-lymfocytů nebo BCR v případě B-lymfocytů. Vznik antigenně specifické odpovědi je časově náročnější, než je tomu u vrozené imunity, která je schopna reagovat řádově v minutách. Na rozdíl od vrozené imunity si vytvářejí imunologickou paměť, díky které se po opakovaném setkání s infekčním agens zahájí rychlejší a účinnější imunitní odpověď. Adaptivní mechanismus je založen na klonálním anticipačním principu, kdy v organismu jsou řádově miliony T a B lymfocytů, které se liší ve struktuře svých vazebných míst na svých specifických receptorech. To znamená, že tělo je schopné předvídat tzv. anticipovat setkání s jakýmkoli antigenem. Aby mohl být patogen účinně eliminován, musí se daný klon T lymfocytu, který rozpoznal antigen, pomnožit – naklonovat. K této stimulaci nestačí pouze rozpoznání antigenu jako takového, ale k produktivní aktivaci je zapotřebí ještě signál pomocný neboli kostimulační. Ten dostávají lymfocyty od jiných buněk imunitního systému. Tento princip druhého signálu má důležitý regulační význam, díky kterému se zabezpečuje, aby nedocházelo ke snadné aktivaci lymfocytů. Imunoglobuliny tvořené plazmatickými buňkami mají důležité role při neutralizaci mikrobiálních toxinů a virů, kdy toxin obalený protilátkami, již nemůže poškodit tělní buňky a je brzy fagocytován. Podobně je tomu i při opsonizaci bakterií, kdy protilátky přilehnou na bakterii, která je následně fagocytózou odstraněna, nebo takto navázanou protilátku rozpozná NK buňka a zahájí ADCC (=antibody dependent cellular cytotoxicity) neboli cytotoxicitu závislou na protilátkách. Protilátky navázané na mikrobiálních površích mohou spouštět i klasickou cestu aktivace komplemetu a tím přispívat k eliminaci. Důležitou úlohu mají i protilátky, které se vyskytují na sliznicích a brání tak adhezi viru na epitelie. Setkáním antigenu s protilátkou vzniká

imunokomplex, který lze detekovat řadou imunologických metod. Na tomto principu jsou založené i některé biochemické stanovení. (Hořejší V, 2017), (Jílek P, 2019), (Weisberg S, 2021)

## **6.2 T-Lymfocyty**

### **6.2.1 Úvod**

Tato populace buněk má klíčovou roli ve fungování imunitního systému. Úzce kooperuje s vrozenou imunitou, díky které přijímá signály a zároveň se podílí na její regulaci pomocí cytokinů. Také se podílí na regulaci B lymfocytů a tvorby protilátek a zajišťuje specifickou cytotoxickou reaktivitu. (Krejsek J, 2016)

### **6.2.2 Vznik a vývoj**

T lymfocyty, jako většina krevních buněk, vznikají v kostní dřeni z prekurzoru, pocházejícího z pluripotentní kmenové buňky. Na rozdíl od ostatních krevních buněk, které zde i vyžívají a následně se přesouvají do periferní krve, musí T lymfocyty podléhat vyžívání, které již v kostní dřeni neprobíhá. Nezralé T lymfocyty opouštějí kostní dřeň a vycestovávají do thymu, kde prodělávají řadu fenotypových změn. Také vcházejí do kontaktu s HLA molekulami na povrchu dendritických a epitelálních buněk. Tyto lymfocyty se nazývají dvojité negativní neboť v tuto chvíli ještě neexprimují TCR receptor ani CD znaky CD4 a CD8. Geny pro tyto povrchové molekuly jsou v klidové fázi. Po proniknutí do thymu následuje příprava rekombinantních systémů pro genové přeskupení a vznik TCR receptorů. TCR je složen ze čtyř hlavních segmentů, které se skládají ze dvou řetězců označených  $\alpha$  a  $\beta$ . Menší část populace T-lymfocytů nese řetězce  $\gamma$  a  $\delta$ . Každý řetězec obsahuje ve své extracelulární části konstantní a variabilní doménu. Variabilní domény vytvářejí vazebné místo pro antigen. Genetickou informaci pro variabilní doménu obsahují segmenty V, D a J. Pro konstantní doménu ji kódují segmenty C. K vzniku genů, pro variabilní i konstantní část, dochází náhodným přeskupováním genových segmentů C, V, D, J. Tento proces rekombinace je řízen rekombinázami. Díky tomuto přeskupení vznikají TCR receptory rozmanitých specifit. (Krejsek J, 2016), (Kumar B, 2018)

### 6.2.3 Centrální tolerance

Během genového přeskupení přechází lymfocyt do stádia, kdy exprimuje zároveň molekulu CD4+ i CD8+ a je nazýván jako dvojitě pozitivní. K tomu, aby lymfocyty vykonávaly svou budoucí funkci v těle správně, musí procházet takzvanou pozitivní a negativní selekcí. V thymu vzniká velké množství rozdílných T lymfocytů, jejichž úkolem je rozpoznávat antigenní determinanty vystavené na HLA molekulách. Optimální funkce spočívá v rozpoznání vlastní HLA molekuly s navázaným cizorodým antigenem a zároveň vlastní HLA molekuly s autologním peptidem, na který je nutné udržovat toleranci a nereagovat na něj. V nově vzniklé populaci lymfocytů vznikne i velké množství lymfocytů, které s HLA molekulami nebudou reagovat vůbec, takové buňky nemají pro organismus význam a jsou odstraněny apoptózou – pozitivní selekce. Na druhou stranu se vytvářejí i lymfocyty, které s HLA molekulami reagují s příliš velkou afinitou a mohly by být autoreaktivní. Takové buňky jsou pro tělo hrozbou a také musí být odstraněny apoptózou, nebo se přeměňují na regulační lymfocyty, které mají tlumivé účinky na imunitní odpověď – negativní selekce. Tímto testováním je zajištěna centrální tolerance organismu. (Krejsek J, 2016), (Xing Y, 2012), (Nurieva R, 2011)

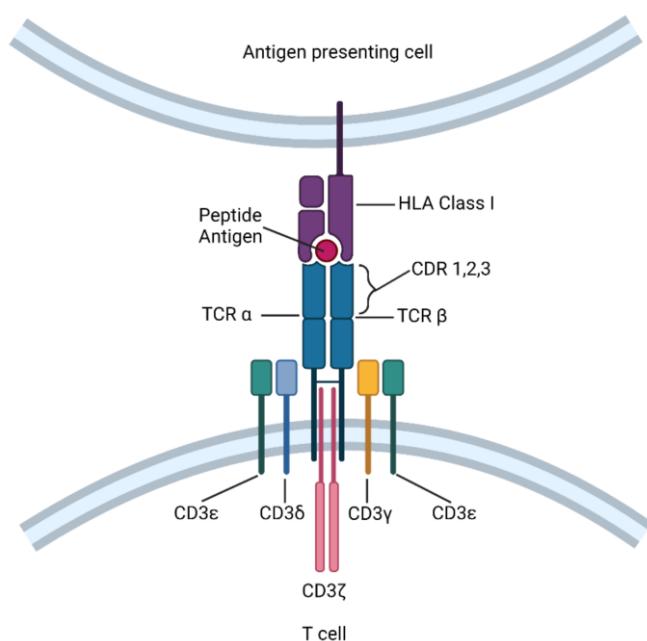
### 6.2.4 Diferenciace

Procesy pozitivní a negativní selekce zároveň probíhají s diferenciací T-lymfocytu z dvojitě pozitivního, který exprimuje znaky CD4+CD8+ na pomocné (CD4+CD8-) nebo cytotoxické lymfocyty (CD4-CD8+). Diferenciace je dána schopností reakce jejich TCR receptoru s HLA molekulami I. třídy a s HLA molekulami II. třídy. Molekuly CD4+ a CD8+ fungují jako koreceptory, které zprostředkovávají vazbu při reakci TCR s HLA molekulou. V případě, že dvojitě pozitivní lymfocyt reaguje s HLA molekulou a síla koreceptoru CD4+ je slabá, dochází k transkripci koreceptoru CD8+. V případě silného signálu mezi CD4+ a molekulou II. třídy dochází k expresi CD4+ a vzniku pomocného lymfocytu. V opačném případě, buňky nesoucí koreceptor CD8+ silně reagují s HLA molekulami I. třídy a slabě s molekulami II. třídy a neexprimují tedy CD4+. Takto diferencované lymfocyty již opouští thymus a přesouvají se do lymfatických uzlin, kde následně čekají na aktivaci za pomoci antigen prezentující buněk. (Krejsek J, 2016)

## 6.2.5 TCR receptor

Jak již bylo výše uvedeno, TCR neboli T buněčný receptor je povrchová molekula, která má za úkol rozpoznávat antigenní peptid na povrchu HLA molekul a díky tomuto patří k nejdůležitějším receptorům v imunitním systému. Vystavení antigenu na HLA molekulách zprostředkovávají antigen prezentující buňky, které antigen zachycují, štěpí, zpracovávají a následně prezentují. TCR je povrchový glykoprotein, který se skládá ze dvou transmembránových polypeptidových řetězců. Tyto řetězce jsou propojeny disulfidickými můstky. Rozlišujeme dva typy řetězců: častější typ řetězce  $\alpha$  a  $\beta$  a méně časté řetězce  $\delta$  a  $\gamma$ . Již víme, že každý řetězec obsahuje konstantní a variabilní část, které díky genovému přeskupování zajišťují obrovský polymorfismus těchto receptorů. (Shah K, 2021), (Pai J, 2021)

**Obrázek 1: TCR receptor**



*Zdroj: Sun Y., 2021*

T buněčný receptor je přítomen v komplexu s asociovaným komplexem proteinů CD3, který je také nezbytný pro aktivaci T-buněk. Tyto molekuly pomáhají převádět extracelulární vazbu antigenu a receptoru na vnitřní buněčné signály, proto se také někdy nazývají jako převodníky signálu. Komplex CD3 se skládá ze čtyř řetězců, které jsou transmembránovými proteiny, které mají ve své intracelulární části aminokyselinové sekvence. V těchto sekvencích se nachází tyrosinové zbytky.



Pokud dojde k vazbě mezi receptorem a příslušným ligandem, tyrosinové zbytky fosforylují za pomoci enzymů proteintyrosinkinázy. Výsledné signalizace přes TCR vedou například k dělení buněk nebo k aktivaci jejich efektorových mechanismů. (Perdue S, 2023), (Hwang J, 2020), (Pai J, 2021)

## **6.2.6 Klasifikace T lymfocytů**

T lymfocyty lze klasifikovat podle typu nesoucího TCR na  $\alpha\beta$  a  $\gamma\delta$ . Většina T lymfocytů nese receptor s řetězcí  $\alpha\beta$ . T lymfocyty s řetězcí  $\gamma\delta$  se vyskytují v nízkém počtu a jsou takzvaně dvojitě negativní, neboť neexprimují ani molekulu CD4 ani CD8. Tyto buňky například rozpoznávají pyrofosfátové meziprodukty bakteriální syntézy lipidů. Dále lze T lymfocyty rozdělit podle koreceptorů na CD4+ a CD8+. Většinu CD4 pozitivní populace T lymfocytů představují takzvaně pomocné lymfocyty (Th=T-lymfocytes helper). Podle cytokinů, které produkují, je lze rozdělit na Th1, Th2, Th17, Treg, a Tfh. Lymfocyty exprimující molekulu CD8 patří hlavně k populaci cytotoxických buněk (Tc). (Krejsek J, 2016), (Aleebrahim-Dehkordi E, 2022), (Raskov H, 2021)

## **6.2.7 T lymfocyt a APC**

### **6.2.7.1 Antigen prezentující buňky**

Profesionální antigen prezentující buňky (APC) jsou imunitní buňky, které se specializují na prezentaci antigenu T lymfocytům. Hlavními typy profesionálních APC jsou dendritické buňky (DC), makrofágy a B lymfocyty. Profesionální antigen prezentující buňka pohltí antigen, zpracuje ho a část z něj vystaví na svém povrchu spolu s hlavním histokompatibilním komplexem II třídy (MHC) neboli HLA II. třídy. T lymfocyt interaguje s HLA molekulou a tím dochází k jeho aktivaci. (Jílek P, 2019), (Rastogi I, 2022)

### **6.2.7.2 Kooperace T lymfocytu s APC**

Výsledkem interakce T lymfocytu s antigen prezentující buňkou je přenos signálu a následná aktivace T lymfocytu. Tento proces se nazývá imunologická synapse. Ta nastává v okamžiku, kdy je receptor T lymfocytu v přímém kontaktu s antigen prezentující buňkou. Tímto spojením dochází k přesouvání velkého množství membránových a cytoplazmatických proteinů do místa kontaktu, jak u T lymfocytu,

tak i u APC. Imunologická synapse je tvořena TCR receptorem, komplexem CD3, dále koreceptory CD4 nebo CD8, záleží na typu lymfocytu kooperujícím s HLA molekulou, a receptory pro kostimulační molekuly. Zevní stranu synapse tvoří převážně adhezivní molekuly, které umožňují pevnou vazbu mezi lymfocylem a APC. U antigen prezentující buňky se nachází ve středu synapse HLA molekula s vystaveným antigenem, kostimulační a adhezivní molekuly. Cytotoxické lymfocyty CD8+ rozpoznávají HLA molekulu I. třídy, která je spojena s prezentací vlastních endogenních peptidů, nebo virových peptidů v případě infekce. Exogenní materiál zpracovávají antigen prezentující buňky, který následně vystavují na svém povrchu s HLA molekulou II. třídy. Na tuto molekulu reagují lymfocyty CD4+. Pro aktivaci lymfocytu je tedy nezbytný kontakt mezi TCR receptorem a HLA molekulou podpořený koreceptory CD4+ nebo CD8+. Tomuto spojení se říká tzv. první signál. K tomu aby lymfocyt mohl být aktivován je zapotřebí ještě druhý pomocný signál, který je zprostředkován kostimulačními molekulami APC, pro které je lymfocyt vybaven příslušnými receptory. V případě existence pouze prvního signálu je T lymfocyt funkčně utlumen, anebo hyne apoptózou. Tímto mechanismem je zajištěno, aby nedocházelo ke snadné aktivaci T lymfocytů, a je tak zachována tolerance na periférii. (Krejsek J, 2016), (Jílek P, 2019), (Tittarelli A, 2020), (Shi H, 2023)

## **6.3 B lymfocyty**

### **6.3.1 Úvod**

B lymfocyty spolu s T lymfocyty tvoří specifickou složkou imunity. Svými produkty se podílí na vzniku adaptivní humorální imunity. Při setkání s cizí látkou, antigenem, se B lymfocyt diferencuje na plazmatickou buňku, která produkuje protilátky. (Hoffman W, 2016)

### **6.3.2 Vznik a vývoj**

B lymfocyty vznikají z lymfoidního prekurzoru. Na rozdíl od T lymfocytů, které dokončují svůj vývoj v thymu, B lymfocyty vznikají i vyzrávají v kostní dřeni. Jejich název je odvozen od speciálního orgánu ptáků – Bursa Fabricii, který jim nahrazuje

kostní dřen při tvorbě B lymfocytů, neboť ptáci mají duté kosti a tím i málo kostní dřene. (Jílek P, 2019)

Počáteční fáze vývoje B lymfocytů jsou nezávislé na antigenu. V těchto fázích dochází také k vytvoření prekurzorových B lymfocytů. Během vývoje B lymfocytů dochází k přeskupení genových segmentů, které kódují řetězce receptorů pro antigen BCR. Díky této rekombinaci vzniká zralý B lymfocyt, který je schopen pomocí svého receptoru vázat antigen. Na rozdíl od T lymfocytu, dokáže B lymfocyt rozpoznat antigen v nativní formě, antigen tedy nemusí být vystaven na molekulách HLA. Po rekombinaci následuje selekční proces, při němž dochází k úpravě BCR receptoru nebo ke klonální delecii. Tyto selekční kroky jsou důležité pro eliminaci autoreaktivních klonů. Takto zralé B lymfocyty opouští kostní dřeň a migrují do sekundárních lymfatických orgánů, kterými jsou slezina, lymfatické uzliny a slizniční lymfatické tkáně. Zde se diferencují po rozpoznání antigenu pomocí svého BCR. Díky stimulaci antigenem se B lymfocyty za pomoci Th2 lymfocytů v několika diferenčních krocích stávají plazmatickými buňkami, které jsou schopné produkovat protilátky. Pokud dojde k antigenní stimulaci, začne plazmatická buňka produkovat protilátky třídy IgM, tyto protilátky jsou stejné specifity jako BCR exprimovaný na daném B lymfocytu. Takto se to děje v časné imunitní odpovědi. V případě opakovaného kontaktu se stejným antigenem dochází již k tvorbě dalších izotypů specifických protilátek, jako jsou například IgA, IgG, IgE. (Krejsek J, 2016)

### **6.3.3 Protilátky**

#### **6.3.3.1 Struktura**

Protilátky tvoří základ specifické humorální odpovědi. Jedná se o glykoproteiny, jež jsou součástí krevních bílkovin a lze je elektroforeticky detekovat jako gamaglobuliny. Strukturně se podobají např. TCR receptoru nebo HLA molekulám, neboť jsou také tvořeny doménami. Tyto domény jsou udržovány disulfidickými můstky. Molekulu imunoglobulinu tvoří čtyři polypeptidové řetězce. Dva kratší řetězce tzv. lehké řetězce a dva delší tzv. těžké řetězce. Ty se skládají z několika aminokyselinových sekvencí, z nichž každá odpovídá proteinové doméně. Každý lehký řetězec má dvě domény (jednu variabilní a jednu konstantní) a každý těžký řetězec má

4 nebo 5 domén, vždy jednu variabilní. Těžké řetězce mohou být klasifikovány do pěti základních typů, které určují třídu protilátky. Na příkladu lze pozorovat, že imunoglobulin G (IgG) obsahuje těžký řetězec označovaný jako  $\gamma$ , zatímco imunoglobulin M (IgM) má těžký řetězec, který je označován jako  $\mu$ . Řetězec  $\gamma$  se vyskytuje ve více variantách a určuje tak podtřídu IgG. Ačkoli rozlišujeme dva typy lehkých řetězců, v imunoglobulinu je přítomen pouze jeden z nich. Časně studie struktury Ig byly usnadněny použitím enzymů k fragmentaci molekul IgG. Papain štěpí IgG na dva Fab fragmenty, které jsou pojmenovány podle jejich schopnosti vázat antigen a jeden Fc fragment, který umožňuje imunoglobulinu vazbu na specifické receptory a obsahuje vazebná místa pro komplement. (Schroeder H, 2013), (Mandal A, 2022), (Krejsek J, 2016), (Chiu M, 2019)

### **6.3.3.2 Vazba antigen - protilátka**

Variabilní oblasti lehkých a těžkých řetězců jsou odpovědné za vazbu antigení determinanty a vynikají svou vysokou mírou variability. V rámci těchto segmentů lze rozpoznat oblasti s největší mírou variability. Tři tyto segmenty, známé jako CDR (Complementarity Determining Region), se vyskytují v každém řetězci. Mezi těmito oblastmi se nachází úseky s menší variabilitou FR (Framework Region). Společně utvářejí vazebné místo pro antigen. Na této vazbě se podílejí nekovalentní interakce, které mají výhodu v tom, že působí na krátké vzdálenosti a tak musí epitop a protilátka do sebe zapadat obdobně jako „zámek a klíč“. Epitop je malá oblast molekuly antigenu, na kterou se váže specifická protilátka. Vůči antigenu může být vyvinuto několik různých protilátek, které reagují s odlišnými epitopy na jeho povrchu.

Sílu vazby mezi jedním epitopem a protilátkou nazýváme pojmem afinita, kterou lze vyjádřit prostřednictvím disociační konstanty. Nicméně většina antigenů je multivalentní, což znamená, že obsahují několik vazebných determinant pro různé protilátky. Celkovou sílu interakcí mezi všemi vazebnými místy protilátky a multivalentním antigenem představuje avidita. Ta závisí na afinitě, přičemž zahrnuje valenci antigenu a protilátky, a rovněž bere v úvahu nesespecifické faktory ovlivňující vazby mezi antigenem a protilátkou. Valence protilátky označuje počet vazebných míst na její molekule, která mohou reagovat s epitopy konkrétního antigenu. Naopak,

valence antigenu je definována jako počet epitopů, schopných vázat se na vazebná místa imunoglobulinu. Z toho vyplývá, že protilátky jsou buď monovalentní, s jedním vazebným místem, nebo polyvalentní, s více vazebnými místy, což ovlivňuje jejich schopnost reagovat s různými antigeny. Například IgG, IgE a IgD mají dvě vazebná místa pro antigen, na rozdíl od dimerizovaného IgA, který má čtyři vazebná místa, nebo IgM s 10 vazebnými místy. Pravděpodobnost, že se všech deset antigenů odpojí z IgM pentameru najednou, je malá. Z tohoto důvodu může být avidita IgM relativně vysoká, přestože afinita jednotlivého vazebného místa může být nízká. (Gorshtein G, 2023), (Schroeder H, 2013), (Krejsek J, 2016)

### **6.3.3.3 Vlastnosti a funkce imunoglobulinů**

Protilátková odpověď začíná produkcí protilátky IgM, ale brzy postupuje k tvorbě všech různých typů protilátek. Každý typ protilátky má své specifické místo v těle a plní určité funkce. Protilátky IgM se převážně nacházejí v krvi a mají pentamerní strukturu. Jako monomery jsou součástí specifických BCR receptorů na B lymfocytech. Jsou schopné silně aktivovat komplementovou kaskádu po navázání na antigen. Díky své polymerní struktuře mají velkou schopnost aglutinovat antigeny, ale nemohou například vzhledem ke své velikosti procházet do tkání. Jsou součástí přirozených protilátek, ke kterým se řadí například i aglutininy krevního skupinového systému AB0. (Schroeder H, 2013)

Protilátky IgG jsou nejvíce zastoupená třída v cirkulaci. Podle těžkých řetězců je lze rozdělit do čtyř podtypů na IgG1, IgG2, IgG3, a IgG4, které mají rozličné funkce. Imunoglobuliny G mají obvykle vyšší afinitu a vyskytují se v krvi a extracelulární tekutině, kde mohou neutralizovat toxiny, viry a bakterie. Dále mohou opsonizovat pro fagocytující buňky a aktivovat komplementový systém. Také jsou hlavními protilátkami způsobující ADCC. Protilátky IgG mohou procházet přes placentu a tvořit tak hlavní zdroj protilátek pro novorozence. Na druhou stranu mohou působit i velice cytotoxicky a mají tak významnou roli při krevních transfuzích. Zde mají hlavní význam protilátky proti erytrocytovým antigenům, jako jsou přirozené protilátky IgM, ale právě také IgG vzniklé po předchozí imunizaci např. po předešlé transfuzi nebo těhotenství. V rámci transplantací orgánů se nejvíce uplatňují protilátky vzniklé proti hlavním

a vedlejším histokompatibilním antigenům. (Janeway Ch, 2001), (Řeháček V, 2013), (Krejsek J, 2016)

Imunoglobuliny IgA jsou buď ve formě monomerů, které cirkulují v krvi a extracelulární tekutině, nebo jako dimerické molekuly v lamina propria různých epitelů. Lze je nalézt také ve slinách a mateřském mléce. Dimerické formy IgA jsou selektivně transportovány přes epitelie do míst, kde neutralizují toxiny a viry a blokují jejich vstup přes střevní epitel. Protilátky IgE se nachází hlavně na povrchu žírných buněk, ale jsou také přítomny v nízkých hladinách v krvi a extracelulární tekutině. Jsou spojeny s alergií, zejména reakcemi přecitlivělosti typu I, včetně atopických onemocnění a anafylaxe. Spouští uvolňování histaminu z žírných buněk a bazofilů. IgE je také součástí reakce těla na parazitární infekce. Imunoglobulin IgD je součástí BCR receptoru na povrchu naivních B lymfocytů, kde je později nahrazen IgG. Protilátka IgD je též v menších množstvích přítomna ve slinách a slzách. (Janeway Ch, 2001), (Schroeder H, 2013)

## **6.4 HLA SYSTÉM**

### **6.4.1 Úvod**

HLA systém (Human Leukocyte Antigen) je součástí hlavního histokompatibilního komplexu (MHC), který byl poprvé popsán v roce 1950. Název tohoto systému je odvozen od faktu, že byl poprvé objeven právě u leukocytů. Výzkumy, které byly zaměřené na histokompatibilní systém poukázaly na genetický rozdíl mezi jedinci téhož druhu, a tím i na to, že mohou reagovat na cizí tkáň jako na antigen. Tento systém se také vyjadřuje obrovským polymorfismem a variabilitou. Kooperace HLA systému s T-lymfocyty umožňuje rozpoznání cizorodého antigenu, ale také nastavení autotolerance vůči vlastním buňkám. HLA antigeny I. třídy jsou povrchové glykoproteiny, které se nachází na všech jaderných buňkách. Hlavní funkcí těchto molekul je zpracování, vystavení a prezentace antigenu T lymfocytům. Tato spolupráce tvoří základní mechanismus aktivace specifické složky imunity. HLA molekuly II. třídy se nachází na specializovaných imunitních buňkách - antigen prezentujících buňkách. Tyto buňky prezentují cizorodé peptidy efektorovým buňkám imunitního systému, které jsou zodpovědné za jak buněčnou, tak humorální imunitní odpověď. HLA systém

je klinicky významný pro transplantační medicínu, proto se jeho vyšetření – typizace, rutinně provádí za účelem zjištění shody mezi příjemcem (akceptorem) a dárce (donorem). Při transplantaci orgánů hraje důležitou roli v aloimunitní odpovědi vedoucí k přijetí nebo odmítnutí štěpu. (Tinckam K, 2006), (Choo S, 2007), (Krejsek J, 2016)

#### **6.4.2 Polymorfismus HLA**

Geny odpovědné za HLA antigeny se nacházejí na krátkém raménku 6. chromozomu v oblasti 6p21. Tyto geny se dělí do tří oblastí na HLA I., HLA II. a HLA III. třídy. Geny, které kódují molekuly antigenu II. třídy, jsou umístěny nejbližší k centromere. Konkrétně se jedná o HLA DP, HLA DQ a HLA DR. Naopak geny pro molekuly I. třídy jako jsou HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F a HLA-G, jsou umístěny od centromery nejdále. Mezi těmito úseky je oblast HLA III., ve které jsou umístěny geny, které kódují pestrou škálu proteinů, zahrnující například C4 složku komplementu, TNF a stresové proteiny. Geny pro molekuly HLA-A, HLA-B a HLA-C vykazují nejvyšší polymorfismus, přičemž u molekuly HLA-B přesahují počty alel až přes 4000. Molekuly HLA-E, HLA-F a HLA-G jsou často klasifikovány jako neklasické, díky svým specifickým vlastnostem. Na rozdíl od molekul HLA-A, HLA-B a HLA-C se tyto neklasické varianty vyskytují selektivně pouze na určitých typech buněk a jsou specializované na vázání unikátních ligandů. Molekula HLA-G je výhradně přítomna na buňkách trofoblastu a hraje klíčovou roli v podpoře imunologické tolerance mezi matkou a plodem. Jedinečná imunoregulační role HLA-G plyne z jeho schopnosti uniknout rozpoznání T lymfocyty, zatímco NK buňky ji identifikují prostřednictvím svých inhibičních receptorů. V rámci transplantace ledviny jsou molekuly HLA-A, HLA-B a HLA-DR považovány za nejrizikovější antigeny, zatímco molekuly HLA-C a HLA-DP představují riziko nízké. Molekula HLA-DQ se řadí do kategorie středního rizika. (Řeháček V, 2013), (Krejsek J, 2016), (Petzl-Erler, 2020), (Di Marco M, 2017)

**Tabulka 1: Aktuální počty alel a definovaných proteinů**

HLA I. třída						
gen	A	B	C	E	F	G
alely	8012	9573	7995	350	91	157
proteiny	4688	5694	4410	140	17	48
HLA II. třída						
gen	DRA	DRB	DQA1	DQB1	DPA1	DPB1
alely	65	4530	688	2510	619	2393
proteiny	14	2983	337	1524	297	1399
non HLA, MICA						
gen	MICA			MICB		
alely	531			245		
proteiny	280			47		

*Zdroj: EMBL's European Bioinformatics Institute, 2024 (převzato)*

### 6.4.3 Asociace HLA s chorobami

Již před čtyřiceti lety byl popsán vztah mezi expresí HLA molekul a výskytem konkrétních onemocnění a od té doby bylo zjištěno mnoho nových poznatků týkajících se HLA molekul, které jsou asociovány s maligními a autoimunitními chorobami. Tato spojitost je také uváděna v souvislosti s citlivostí k infekcím a lékovými reakcemi. Díky pokroku v molekulární biologii se rozšířilo spektrum známých asociací, ale přesné mechanismy, jak HLA fenotyp ovlivňuje konkrétní onemocnění, zůstávají stále nejasné. Existuje mnoho hypotéz, které se pokoušejí tento vztah vysvětlit, včetně teorie o specifickém vazebném místě HLA molekuly pro antigenní peptidy spojené s onemocněním, konceptu molekulárních mimikrů a možnosti, že některé patogeny



využívají HLA molekuly jako receptory pro průnik do buněk. Nicméně význam této asociace pro imunopatogenezi choroby zůstává nejistý. Příklady onemocnění spojených s HLA expresí zahrnují například revmatoidní artritidu (HLA DR4), Goodpastureův syndrom (HLA DR2), myasthenia gravis (HLA DR3) a ankylozující spondylartritidu (HLA B27). (Krejsek J, 2016), (Hořejší V, 2017), (Muñiz Castrillo S, 2020)

#### **6.4.4 Dědičnost HLA systému**

Geny systému HLA se nachází na krátkém raménku 6. chromozomu. Vzhledem k tomu, že chromozomy existují v páru, má každý jedinec na svém 6. chromozomu specifickou kombinaci HLA alel, kterou zdědil od svých rodičů. Kombinace HLA alel tvoří soubor genů, které jsou vzájemně provázány a dědí se od každého z rodičů jako tzv. haplotyp. Každý jedinec nese dvě takové kombinace, přičemž jednu zdědí od otce a druhou od matky. Tyto genetické kombinace tvoří tzv. HLA genotyp jedince. V jednom genovém lokusu HLA např. HLA-A, B, DR, -DQ, může každý jedinec mít nejvýše dvě varianty alel. Alely jsou kodominantní, což značí, že obě varianty alel jsou exprimovány současně na buněčném povrchu. V situaci, kdy jedinec zdědí v lokusu, od obou rodičů stejné alely, projevuje se v tomto místě jako homozygotní. Naopak, když dostane od rodičů odlišné alely, je v tomto místě heterozygotní. V rodině existují dva haplotypy od matky a dva haplotypy od otce, které mohou dohromady vytvářet čtyři různé kombinace haplotypů u jejich potomků. Podle Mendelových zákonů je možné shrnout, že zhruba 25% potomků bude geneticky identických tím, že zdědí shodný haplotyp jak od otce, tak od matky. Přibližně 50% potomků bude sdílet pouze jeden haplotyp, což znamená, že obdrží stejný haplotyp od otce a od matky dostanou odlišný, nebo naopak. Zbývajících přibližně 25% potomků bude mít geneticky odlišné haplotypy od obou rodičů. (Penka M, 2012)

#### **6.4.5 HLA nomenklatura**

Vzhledem k obrovskému polymorfismu a variabilitě byla v roce 1987 zavedena nomenklatura alel, která byla postupně definována a doplňována. Označení začíná prefixem HLA, po kterém je uveden lokus velkými písmeny např. HLA-A, HLA-B. Poté je

za pomoci hvězdičky zapsán rozdělovač, po kterém následují číselné skupiny – alelická skupina, alelický subtyp, tiché nebo nekódující substituce, polymorfismy mimo exony a na konci je uvedena expresivita. Tyto skupiny jsou také rozděleny rozdělovačem, v tomto případě dvojtečkou. Alelická skupina odpovídá sérologickému antigenu nesenému alotypem. (Medhasi 2022), (Krejsek J, 2016), (Madden K, 2019)

#### **6.4.6 HLA I. třídy**

Struktura molekuly HLA I. třídy se skládá z polypeptidového řetězce, který obsahuje cytoplazmatický konec C a extracelulární konec N. Extracelulární konec obsahuje tři domény  $\alpha$ , přičemž domény  $\alpha 1$  a  $\alpha 2$  vytváří jakýsi žlábek pro antigenní peptidy, který umožní navázat 8–10 aminokyselin. K těmto doménám je nekovalentně připojený beta-2 mikroglobulin, který tak tvoří  $\beta$  řetězec a udržuje konformaci molekuly. Cytoplazmatická doména  $\alpha 3$  interaguje s CD8 receptorem cytotoxických lymfocytů. Tento komplex udržuje molekulu HLA I. třídy a receptor TCR v interakci. Alfa domény jsou kódovány mnoha geny, které jsou vysoce polymorfní na rozdíl od beta řetězce. Jak již bylo výše uvedeno HLA se geneticky dědí od rodičů, vždy jsou zastoupeny dva lokusy - jeden od matky a druhý od otce. To je také důvod, proč se před transplantací hledá vhodný dárcce mezi členy rodiny. Je totiž pravděpodobnější, že bude větší shoda mezi sourozenci než s náhodným členem populace. Avšak i sourozenci mají stále jen 25% šanci, že se budou shodovat. Pravděpodobnost, že by se dva nepříbuzní lidé shodovali je přibližně 1:100 000. (Medhasi S, 2022), (Mei S, 2020)

##### **6.4.6.1 Vazba peptidů na HLA molekulu I. třídy**

U HLA molekuly I. třídy je vazebné místo pro peptidy na obou stranách uzavřené, což omezuje vázání peptidů na délku 8-10 aminokyselin. Naopak, HLA molekula II. třídy má otevřené vazebné místo, což umožňuje vazbu delších peptidů. Ve vazebném žlábkou HLA molekuly I. třídy jsou peptidy uchyceny po celé délce vazebného místa, nebo se mohou uchytit pouze na koncích a střední oblast peptidu vyčnívá ven. Molekula HLA, například konkrétní alelická forma HLA-A, má schopnost vázat peptidy, které sdílejí určité strukturní rysy. Tato podobnost se obvykle projevuje vazebným motivem, který je zásadní především v oblasti koncové části peptidu. Ostatní

aminokyseliny v peptidu mají méně výrazný nebo žádný vliv na vazbu. Vazba peptidů probíhá během biosyntézy v endoplazmatickém retikulu (ER). Tyto peptidy pocházejí z endogenně produkovaných proteinů v buňce. Po vytvoření a uspořádání řetězce  $\alpha$  a  $\beta_2m$  dochází současně k navázání endogenního peptidu, který vyhovuje vazebným nárokům příslušné HLA molekuly. Základní součástí komplexu HLA, který je směřován k dalšímu zpracování v Golgiho aparátu a následně transportován na povrch buňky, je  $\alpha$ -řetězec,  $\beta_2m$  a peptid. Peptidy vznikají v proteazomu, což je proteolytický komplex, ve kterém dochází k degradaci proteinů, převážně cytoplazmatických. Aby proteazom mohl proteiny zlikvidovat, musí být označeny ubiquitinem, což je polypeptid který se k danému proteinu připojí. Tato degradace je základní součástí metabolismu proteinů, ve které jsou štěpeny jak vlastní proteiny pocházející z buňky, tak i proteiny, které pocházejí například z intracelulárních patogenů, především virů. Naštípané proteiny vzniklé v proteazomu jsou pomocí transportního systému translokovány z cytoplazmy do ER. V některých situacích je nezbytné zabezpečit, aby se peptidy získané z vnějších fagocytovaných proteinů mohly vázat na molekulu HLA I. třídy na povrchu prezentujících buněk. Tento proces, známý jako "zkřížená prezentace" (cross-presentation), umožňuje, aby fagocytované proteiny byly přeneseny z fagozomu do cytoplazmy. V proteazomech jsou rozštěpeny na odpovídající peptidy, které jsou poté běžným způsobem transportovány do ER a navázány na HLA molekulu I. třídy. V populaci se vyskytuje mnoho různých variant alel molekul HLA I. třídy. Každý jedinec pak exprimuje dvě alelické formy, což znamená celkem šest různých typů HLA I. třídy. (Hořejší V, 2017), (Bartůňková J, 2021)

#### **6.4.7 HLA II. třídy**

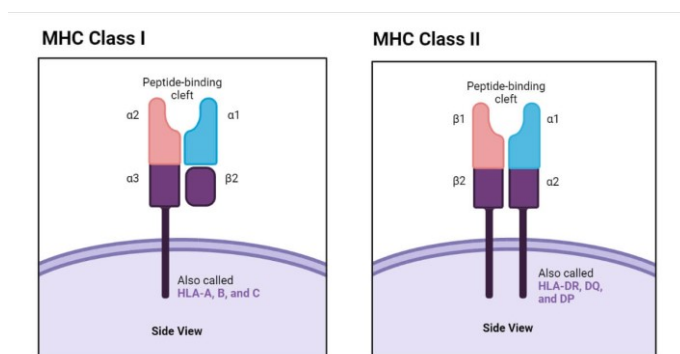
HLA molekuly II. třídy se, na rozdíl od molekul HLA I. třídy, skládají ze dvou transmembránových glykoproteinových řetězců. Tyto řetězce se označují  $\alpha$  a  $\beta$ . Extracelulárně orientovaná část řetězce N obsahuje pro řetězec  $\alpha$  domény  $\alpha_1$  a  $\alpha_2$ . Pro  $\beta$  řetězec jsou to domény  $\beta_1$  a  $\beta_2$ , které jsou propojeny disulfidickými můstky. Konec řetězce je cytoplazmatický. Domény  $\alpha_1$  a  $\beta_1$  vytvářejí vazebné místo pro antigen, které není uzavřené a díky tomu mohou HLA molekuly II. třídy vázat antigenní peptidy o délce 15 - 40 aminokyselin. Dno vazebného žlábků je vytvořeno strukturou beta skádaného listu domén  $\alpha_2$  a  $\beta_2$ . Po stranách žlábků je spirálovitá

struktura  $\alpha$  helix, tvořená doménami  $\alpha 1$  a  $\beta 1$ . Molekuly II. třídy se mohou exprimovat pod vlivem cytokinů  $INF\gamma$ ,  $TNF\alpha$  i na endotelových či epitelových buňkách. (Krejsek J, 2016), (Wieczorek M, 2017)

#### 6.4.7.1 Vazba peptidů na molekulu HLA II. třídy

Proces vazby peptidů na HLA molekuly II. třídy se odlišuje od mechanismu u HLA I. třídy. Profesionální buňky, jako jsou dendritické buňky, makrofágy a B lymfocyty, zachytávají a zpracovávají exogenní antigenní materiál, který následně vystaví na svém povrchu. Hlavními způsoby, jakými se tento antigenní materiál dostává do buňky, jsou endocytóza pomocí receptorů, fagocytóza a pinocytóza. Pohlčený materiál se nejprve nachází v časných endosomech, které postupně přecházejí na pozdní endosomy a nakonec přechází do lyzozomů. Pomocí hydrolytických enzymů dochází v lyzozomech k rozkladu antigenních látek zahrnujících proteiny, sacharidy a lipidy. V důsledku degradace proteinů vznikají peptidy s antigenními vlastnostmi, které jsou vhodné pro prezentaci T lymfocytům. Před přenosem HLA molekul II. třídy do endosomů, jsou ještě tyto molekuly v ER upevněny pomocí invariantního řetězce CD74. Tento řetězec slouží k ochraně před předčasným navázáním antigenního peptidu. Takto vytvořený komplex již přechází do endosomu, kde dojde k oddělení tohoto ochranného řetězce za vzniku fragmentu CLIP, který je následně vyměněn za antigenní peptid. Aktivita tohoto procesu je řízena pomocí HLA-DM a HLA-DO. Po spojení s antigenním peptidem se HLA molekula přesunuje z endosomu na povrch buňky. Tuto molekulu rozpoznávají pomocné lymfocyty CD4. Na jediné buňce je možné exprimovat deset variant HLA II. třídy, které prezentují rozsáhlou paletu různých antigenních peptidů. (Krejsek J, 2016), (Bartůňková J, 2021)

#### Obrázek 2: struktura HLA molekul I. a II. třídy



Zdroj: Microbe Notes, 2022

#### **6.4.8 Molekuly MICA, MICB**

MICA a MICB (MHC class I chain-related proteins A and B) jsou typy neklasických MHC molekul. Jsou to transmembránové glykoproteiny, které patří do skupiny MHC molekul. MICA a MICB vykazují určitou strukturální podobnost s klasickými MHC molekulami, ale nemají schopnost vázat peptidy. MICA a MICB mají klíčovou roli v imunitní odpovědi, zejména v kontrole buněčné cytotoxicity. Tyto proteiny fungují jako ligandy pro receptor NKG2D (natural killer group 2 member D), který je exprimován na různých buňkách imunitního systému, jako jsou přirozené zabíječské buňky NK buňky, NKT buňky a cytotoxické T lymfocyty. Interakce mezi MICA nebo MICB a NKG2D aktivuje cytotoxické funkce těchto buněk, což hraje důležitou roli v monitorování infekcí, nádorových buněk a dalších abnormalit v těle. Tyto molekuly se také nachází na epitelálních buňkách nebo mohou být indukovány na povrchu buněk v reakci na buněčný stres. Při transplantaci orgánu může v některých případech dojít k tvorbě protilátek namířených proti molekulám MICA a MICB. Tato imunitní reakce může být vyvolána přítomností těchto proteinů na povrchu buněk transplantovaného orgánu a může přispět k imunologickému odmítnutí. (Klussmeier A, 2023), (Stephens H, 2001)

#### **6.4.9 Typizace HLA**

Typizaci HLA zahrnují různé systematické metody přizpůsobené konkrétním účelům. HLA systém byl charakterizován pomocí sérologických metod založených na cytotoxicitě závislé na komplementu. Při této metodě se inkubují lymfocyty pacienta slidskými anti-HLA protilátkami, které mohou být získány ze séra aloimunizovaných dárců, jako jsou vícenásobné rodičky do 6 týdnů po porodu, vakcinací dobrovolníků, nebo mohou být použity komerčně připravené sety typizačních sér - monoklonální protilátky. Do směsi je následně přidán komplement, díky kterému dochází k lýze lymfocytů. Z pozitivní reakce lze zjistit, která kombinace HLA antigenů byla přítomna na původních tkáňových buňkách. (Choo S, 2007), (Berger A, 2001)

Současná hlavní metoda pro identifikaci leukocytárních antigenů zahrnuje využití genetické analýzy pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Tato precizní

a spolehlivá technika umožňuje detailní charakterizaci na úrovni genomu. (Krejsek J, 2016)

#### **6.4.10 HLA protilátky jako DSA a jejich vliv na transplantaci ledvin**

Protilátky HLA se v těle nevyskytují přirozeně, ale vytvářejí se po kontaktu s cizími HLA antigeny. Proces tvorby protilátek začíná v okamžiku, kdy antigen prezentující buňky přijmou a zpracují cizí antigeny a prezentují je CD4+ T lymfocytům. Současně B lymfocyty rozpoznávají, vážou a zpracovávají tyto antigeny prostřednictvím svého BCR receptoru. Pomnožení B lymfocytů je indukováno přítomností kostimulačního signálu, což vede k jejich diferenciaci a následné produkci IgG protilátek a vytvoření paměťových B lymfocytů. Stimuly, které vedou k tvorbě HLA protilátek zahrnují faktory, jako jsou těhotenství, předchozí transplantace nebo krevní transfuze. Tyto předem existující protilátky DSA neboli donor-specifické protilátky, jsou zaměřeny proti jeho HLA antigenům a jsou identifikovatelné již před transplantací a mohou způsobovat hyperakutní rejekci. K tomu dochází po návázání protilátky na svou cílovou molekulu a následné aktivaci komplementového systému a cytotoxických mechanismů vedoucích k poškození a ztrátě štěpu. Paměťové B lymfocyty a plazmatické buňky mohou vyvolat akcelerovanou akutní rejekci během několika hodin nebo dnů po transplantaci ledviny. Protilátky proti HLA však mohou vznikat i de novo po transplantaci. Vývoj DSA u dříve nesenzibilizovaných pacientů je spojen s pozdní akutní rejekcí zprostředkovanou protilátkami, chronickou rejekcí zprostředkovanou protilátkami a transplantační glomerulopatií. Chronická rejekce omezuje dlouhodobý úspěch transplantace ledvin. Vyskytuje se po delším časovém odstupu od provedeného zákroku a je způsobena celou řadou procesů, zejména opakovaným zánětem a poškozením způsobeným jak imunologickými, tak neimunologickými reakcemi. Pro úspěšně provedenou renální transplantaci je klíčové důkladné vyšetření kompatibility v rámci krevního systému ABO a kritické posouzení shody HLA mezi dárce a příjemcem. Pacienti na seznamu čekatelů proto podstupují předtransplantační vyšetření, které zahrnuje CDC crossmatch a detekci specifických protilátek proti HLA antigenům pomocí metody Luminex. (Billen E, 2011), (Zhang R, 2018), (Tambur A, 2018)

## **6.5 Transplantace**

Transplantace (Tx) představuje proces přenášení buněk, tkání či orgánů z jednoho místa na jiné, obvykle mezi různými jedinci. Dysfunkce orgánového systému lze korigovat pomocí transplantace orgánu od dárce. Nejčastější typ transplantace je alogenní, kde dochází k transplantaci mezi geneticky neidentickými jedinci. V případě transplantace identických dvojčat hovoříme o transplantaci syngenní. Jedinec, ze kterého pochází transplantovaný orgán, se nazývá dárce. Pro transplantovaný orgán se používá termín štěp. Akceptor je příjemce orgánu a jeho reakce vůči štěpu může způsobovat jeho odhojení tzv. rejekci. V situaci, kdy dárce patří do odlišného živočišného druhu, se jedná o xenogenní transplantaci, která se uplatňuje ve výzkumu nádorů. Nicméně imunitní systém zůstává nejzávažnější překážkou pro rutinní využívání transplantace jako léčebného postupu, neboť jeho součástí jsou složité a účinné mechanismy k boji s cizorodými agens. Tyto mechanismy jsou rovněž zapojeny do odmítání transplantovaných orgánů, které jsou imunitním systémem příjemce považovány za cizí. Na rejekcích se nejvíce podílejí protilátky proti HLA antigenům a aloreaktivní T lymfocyty. (Malhotra D, 2023)

V České republice jsou prováděny transplantace srdce, plic, jater, ledvin, slinivky břišní, ostrůvků Langerhansových a tenkého střeva. V zemi funguje sedm transplantačních center, přičemž převládající a nejčastěji prováděný typ transplantace je transplantace ledvin. Úspěšná transplantace obvykle přináší významné zlepšení kvality života příjemce. Přestože pacienti po transplantaci čelí určitým omezením, například trvalé potřebě užívání imunosupresivních léků a pravidelným návštěvám specializovaných lékařských zařízení, většina pacientů hodnotí svou kvalitu života jako velmi příznivou. (Koordinační středisko transplantací, 2019)

Vznik transplantačního centra v Hradci Králové sahá do roku 1978, kdy bylo centrum oficiálně zřízeno na základě vyhlášky Ministerstva zdravotnictví České republiky. Transplantace ledvin byly v Hradci Králové prováděny sporadicky od roku 1961. (Fakultní nemocnice Hradec Králové, 2023)

### **6.5.1 Aloreaktivita**

Nejběžnějším typem transplantace je alogenní, charakterizovaná genetickým polymorfismem mezi jedinci stejného druhu. Tato genetická diverzita vyvolává imunitní reakce imunokompetentních buněk na antigeny přítomné v tkáních jiného jedince, což představuje hlavní příčinu rejekcí u transplantací. V případě, že mají dárce a příjemce identické alelické formy molekul HLA, existuje několik dalších polymorfních tkáňových antigenů, které imunitní systém může rozpoznat. Tyto antigeny jsou souhrnně označovány jako minor histokompatibilní antigeny. (Hořejší V, 2017), (Mehrotra A, 2015)

### **6.5.2 Transplantace ledviny**

Transplantace ledviny představuje nejúčinnější metodu léčby v případě terminálního selhání ledvin. Zatímco hemodialýza může výrazně prodloužit život pacienta, přináší s sebou komplexní soubor rizik, což může vést ke snížení celkové kvality života. Indikace pro transplantaci ledviny se týkají selhání ledvin spojeného především s těžkou chronickou glomerulonefritidou, diabetickou nefropatií a pokročilou chronickou pyelonefritidou. Operace transplantace ledviny je velký chirurgický zákrok, během kterého osoba se selháním ledvin dostane novou ledvinu – buď od žijícího dárce, nebo od zemřelého dárce. Úspěšná transplantace ledviny je nejbližší přirozené funkci ledvin a je považována za nejúčinnější léčbu chronického onemocnění ledvin. Kvalita darovaného orgánu má zásadní význam pro úspěch transplantace. Úspěšnost transplantace se hodnotí poločasem přežití přenesené ledviny. Jeden rok po transplantaci ledviny od žijícího příbuzného dárce přežívá více než 95% pacientů, a optimální funkce ledviny je pozorována u 80-90% pacientů. V případě transplantace ledviny od zemřelého dárce jsou výsledky poměrně méně příznivé. Jeden rok po chirurgickém zákroku přežívá zhruba 90% pacientů a funkce ledviny je udržována v přibližně 70-90% případů. Je důležité podotknout, že trvalá funkčnost transplantované ledviny i po dvaceti letech není výjimečným případem. Transplantovaná ledvina je obvykle umístěna heterotopicky, to znamená, že se chirurgicky našívá na jiné místo organismu. V případě transplantace srdce by se jednalo o ortotopické umístění. Ledvina je umístěna do oblasti jámy kyčelní



a anatomicky je spojena s pánevními cévami a močovodem. Navzdory podávání imunosupresivních látek zažívá většina příjemců jednu nebo dvě příhody akutní rejekce v raném pooperačním období, které jsou obvykle řešeny úpravou dávek léčiv. Je nezbytné udržovat dlouhodobou imunosupresi, protože i krátkodobá nedodržení může vyvolat rejekci. Nicméně u některých pacientů se může vyvinout nevratná chronická rejekce transplantátu s postupným zhoršováním renální funkce, což vyžaduje začlenění pacienta do programu hemodialýz a/nebo zvážení nové transplantace. (Krejsek J, 2016), (Wang J, 2016),

### **6.5.3 Rejekce**

#### **6.5.3.1 Hyperakutní rejekce**

Hyperakutní rejekce se objevuje v prvních minutách po transplantaci. Toto velmi rychlé odmítnutí je charakterizováno trombózou cév vedoucí k nekróze štěpu. Hyperakutní rejekce je způsobena přítomností protilátek proti HLA antigenům, stejně tak například přítomností protilátek proti antigenům systému ABO existujících u příjemce již před transplantací. Tyto protilátky indukují jak aktivaci komplementové kaskády, tak stimulaci endoteliálních buněk k sekreci Von Willebrandova faktoru, což vede k adhezi a agregaci krevních destiček. Výsledkem těchto reakcí je vznik intravaskulární trombózy vedoucí k tvorbě lézí a nakonec ke ztrátě funkce štěpu. Dnes je tomuto typu odmítnutí ve většině případů zabráněno kontrolou kompatibility v ABO systému a vyloučením přítomnosti protilátek proti HLA. (Moreau A, 2013)

#### **6.5.3.2 Akutní rejekce**

Akutní odmítnutí vzniká v důsledku aloreaktivity T lymfocytů. V rámci tohoto procesu dochází k rozpoznání HLA antigenů dárce prostřednictvím jak přímé, tak nepřímé cesty. Aktivace T lymfocytů příjemce vede k jejich diferenciaci do podskupin Th1 a Th17 s pomocí buněk vrozené imunity. Tyto podtypy podporují cytotoxickou aktivitu Tc lymfocytů a NK buněk pomocí produkce cytokinů. Proces vznikajícího zánětu produkuje i chemotaktické látky, které lákají neutrofilní granulocyty a makrofágy do místa zánětu. Výsledkem je cytotoxické poškození endotelu a dalších buněk tkáňového nebo orgánového štěpu. Protilátky proti HLA antigenům dárce, které se vytvořily

po transplantaci, mohou být rovněž zapojeny do akutní rejekce. Po navázání protilátek na endotel a další buňky transplantátu dochází k aktivaci komplementového systému, což vede k dalšímu poškození endotelu, které je doprovázeno aktivací koagulačního systému a následnou ischemií transplantovaného orgánu. (Krejsek J, 2016), (Benzimra M, 2017)

V rámci orgánových transplantací jsou protilátky proti antigenům dárce nejdůležitější příčinou dysfunkce a ztráty štěpů. Největší přelom v diagnostice protilátkami zprostředkovaných rejekcí nastal po objevení C4d. Tato složka komplementu je degradačním produktem C4 složky komplementové kaskády, která vzniká při aktivaci klasickou cestou. Tento objev poskytl základ pro stanovení diagnostických kritérií jak pro akutní, tak i chronickou fázi tohoto typu odhojení. I přesto, že byla detekce C4d klíčovým prvkem při diagnostice humorálně zprostředkované rejekce po dobu přesahující více než 10 let, dnes se stále více ukazuje, že některé případy s podobnými morfologickými a klinickými znaky nemají detekovatelné C4d. To vedlo k modifikaci Banffské klasifikace z roku 2013 na základě výsledků experimentálních studií v oblasti humánní transplantologie. Nová verze klasifikace nyní zahrnuje i případy C4d negativní protilátkami zprostředkované rejekce a uznává, že akutní vaskulární rejekce může být nedílnou součástí protilátkami zprostředkované rejekce. (Honsová E, 2015), (Nickeleit V, 2003)

### **6.5.3.3 Chronická rejekce**

Chronická rejekce, trvající dlouhodobě, může vést ke ztrátě transplantovaného orgánu i po mnoha letech od provedené transplantace. Mechanismy tohoto typu odmítnutí jsou podobné jako u ostatních rejekcí a mohou zahrnovat protilátky proti HLA antigenům a aktivitu aloreaktivních T lymfocytů. K chronickému odvržení může dojít i v případě kompatibility HLA antigenů mezi příjemcem a dárce. Tento jev může být způsoben reaktivitou vůči antigenům vedlejšího histokompatibilního systému, jako jsou například MICA a MICB antigeny. Dlouhodobá zánětlivá odpověď vede k postupné rekonfiguraci transplantovaného orgánu. Vlivem cytokinů jsou do místa zánětu přitahovány fibroblasty a myofibroblasty, které přispívají k vytváření pojivové tkáně, což vede k postupné fibrotické změně a zahušťování cévních stěn. Následné nahrazení

funkčních tkání pojivovou, může vést ke ztrátě orgánové funkce. Klinické projevy se liší v závislosti na typu transplantovaného orgánu. V kontextu transplantace ledviny se tento proces projevuje fibrotickými změnami a glomerulonefritidou. (Krejsek J, 2016)

#### **6.5.4 Imunosupresivní léčba**

Při péči o pacienty podstupující transplantaci hraje klíčovou roli imunosupresivní terapie. Tato forma léčby je zaměřená na potlačení imunitního systému a má za úkol minimalizovat riziko odmítnutí nově transplantovaného orgánu. Před samotným chirurgickým zákrokem je pacientovi podávána první dávka imunosupresivní léčby, tato fáze terapie se nazývá indukční. Tato etapa má za cíl připravit organismus na přijetí transplantátu a snížit riziko jeho odmítnutí. Po provedení transplantace následuje období udržovací terapie, během které je imunosuprese udržována na dlouhou dobu s účelem zabránit odhojení transplantovaného orgánu. Důležité je zdůraznit, že volba konkrétního imunosupresivního režimu je individualizována v závislosti na imunologickém riziku každého pacienta, a to podle specifických protokolů daného transplantačního centra. V průběhu indukční fáze jsou pacienti v období zvýšeného rizika rejekce, což vyžaduje pečlivé sledování a přizpůsobení imunosupresivní terapie. Udržovací fáze poté klade důraz na vyvážení rizika akutní rejekce a současně na minimalizaci možných infekčních komplikací spojených s vysokými dávkami imunosuprese. Hlavním cílem imunosupresivní léčby je dosáhnout optimálního stavu, kdy je transplantovaný orgán plně funkční a zároveň jsou efektivně omezena rizika odmítnutí a dalších komplikací spojených s potlačením imunitního systému. (Kordulová P, 2019)

#### **6.5.5 Detekce HLA před transplantací ledviny**

Detekce a charakterizace HLA specifických protilátek pomocí pevné fáze (solid phase assays, SPI, známé také jako Luminex) jsou dle doporučení mezinárodních organizací, konkrétně Eurotransplant a Evropské federace pro imunogenetiku (EFI), považovány za nezbytný krok před provedením transplantace ledviny. Zavedení těchto metod výrazně usnadnilo a zpřesnilo identifikaci donor-specifických protilátek (DSA) před a po provedení transplantace. Předtransplantační detekce těchto protilátek

prostřednictvím SPI, není kontraindikací pro samotný zákrok, ale představuje klíčový ukazatel pro posouzení rizika vzniku rejekce zprostředkované protilátkami. Metody založené na pevné fázi jsou výrazně citlivější než tradiční a rozšířený komplement-dependentní lymfocytotoxický test, a proto je nutné pečlivě zohlednit vyhodnocování získaných výsledků. (Česká nefrologická společnost, 2014)

#### **6.5.5.1 Cytotoxický crossmatch test**

Complement-Dependent Cytotoxicity neboli CDC test patří k jednomu z předtransplantačních vyšetření. Základním principem testu je inkubace patientského séra s potenciálními dárcovskými lymfocyty, aby se zjistilo, zda příjemce má specifické protilátky proti HLA antigenům dárce – DSA protilátky. K této směsi se přidává králičí sérum jako zdroj komplementu. V případě přítomnosti DSA protilátek dochází k buněčné lýze. Tuto lýzu lze detekovat původní metodou vyloučení barviva nebo pozdějšími metodami, které zahrnují fluorescenci. Byly provedeny modifikace testu, aby byl citlivější, například prodloužená doba inkubace a použití druhé protilátky, nicméně s testem zůstává několik technických problémů. Test velmi závisí na životaschopnosti dárcovských buněk a v případě zemřelých dárců není vždy dosaženo optimální životaschopnosti. Kromě protilátek IgG detekuje test také IgM a autoprottilátky. Proto je nutné tyto protilátky eliminovat pomocí dithiotreitolu, který štěpí molekulu IgM, aby se zamezilo falešně pozitivnímu výsledku testu před transplantací. Vývoj citlivějších testů na detekci protilátek na pevné fázi v podstatě nahradil CDC, ale protože je to jediný funkční test, je používán jako nezbytný a nezpochybnitelný předtransplantační test kompatibility. Nicméně i tento test je postupně nahrazován "virtuálním" křížovým testem. Použitím panelu přesně HLA fenotypovaných buněk je možné výsledek vyjádřit jako procento panelu reaktivních protilátek tj. procento buněk v panelu s pozitivním výsledkem, a zároveň určit HLA specificitu protilátek. Panel reaktivních protilátek (PRA) je užitečným ukazatelem pravděpodobnosti, že pacient bude mít negativní křížový test s nepříbuzným dárce. (Tait B, 2016), (Česká nefrologická společnost, 2014)

### **6.5.5.2 Cross-matching průtoková cytometrie (FCXM)**

Tato laboratorní diagnostická metoda je používána v oblasti transplantace orgánů, zejména při transplantaci ledvin. Cílem této metody je identifikovat protilátky v séru pacienta, které jsou zaměřeny na antigeny na povrchu buněk dárcovského orgánu. Lymfocyty nebo jiné buněčné populace od dárce jsou inkubovány se sérem pacienta. Pokud pacientovo sérum obsahuje protilátky namířené proti antigenům na povrchu těchto buněk, dojde k jejich navázání. Pro detekci a vizualizaci navázaných protilátek se používají fluorescenčně značené protilátky. Tato technika umožňuje měřit a vizualizovat fyzikální a chemické vlastnosti buněk ve vzorku. V případě FCXM se sleduje fluorescence na jednotlivých buňkách. Na základě analýzy flow cytometrie lze posoudit, zda došlo k interakci mezi protilátkami v séru pacienta a buněčnými antigeny dárcovského orgánu. Pozitivní výsledek může naznačovat přítomnost protilátek, což může zvýšit riziko rejekce transplantovaného orgánu. FCXM se používá v mnoha transplantačních centrech jako pomoc při klinickém rozhodování. Zvláště u vysoce senzibilizovaných pacientů, kteří mají hodně HLA specifit. (Tait B, 2016)

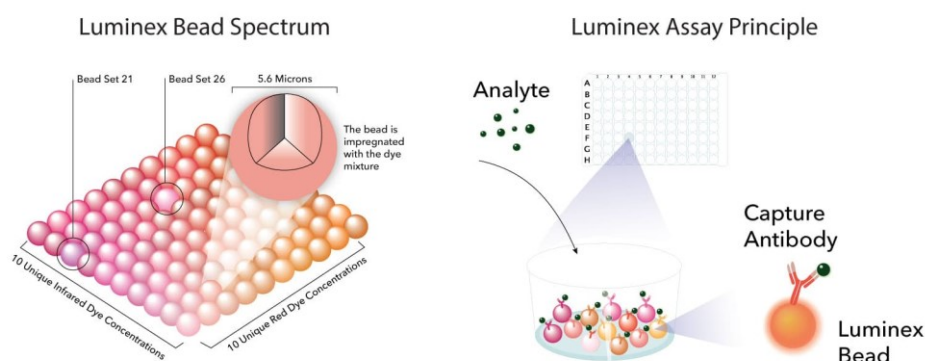
## **6.6 Luminex (xMap, SAB)**

V průběhu devadesátých let došlo k revolučnímu posunu v oblasti testování HLA protilátek s příchodem fluorescenčně značených kuliček. V současných laboratorních podmínkách jsou široce zavedeny metody na pevné fázi (SPI). Na rozdíl od testů založených na buňkách, které nebyly specifické pro HLA protilátky, byly časově náročné a vyžadovaly dostatečný přísun životaschopných lymfocytů, využívají SPI testy solubilizované molekuly HLA imobilizované na pevné matrici. Vývoj imunoanalýz na pevné fázi v polovině 90. let, počínaje enzymatickou imunoanalýzou s použitím rozpustných HLA molekul, představoval výrazné zdokonalení testování protilátek. Nicméně s nástupem možnosti multiplexního testování na platformě Luminex byly tyto testy rychle nahrazeny. Systém Luminex slouží k detekci, sběru a analýze dat, přinášející zvýšenou úroveň přesnosti, selektivity a rychlosti. V oblasti transplantací orgánů se v současnosti celosvětově nejčastěji používají testy na bázi Luminexu, a HLA protilátky jsou nyní široce uznávány za klinicky relevantní jak před, tak po transplantaci orgánu. (Süsal C, 2013), (Lachmann N, 2013), (R&D Systems, 2023)

### 6.6.1 Princip

Screening protilátek se provádí sadou polystyrenových mikrokuliček o velikosti 5,6  $\mu\text{m}$ . Sada obsahuje 100 populací mikrokuliček, které jsou impregnovány dvěma různými fluorofory o různé koncentraci. Populace těchto mikrokuliček se od sebe liší díky svému vnitřnímu spektrálnímu kódu, který je utvářen kombinací dvou fluorescenčních barviv v různém poměru. Test zahrnuje nejprve inkubaci pacientova séra s kuličkami. Pokud má pacient protilátky proti HLA antigenům, sérum bude reagovat s kuličkou exprimující příslušnou molekulu HLA. Po promytí jsou kuličky inkubovány se sekundární protilátkou, obvykle s anti-lidským IgG značeným fykoerythrinem (PE). (Lachmann L, 2013)

**Obrázek 3: Princip testu Luminex**

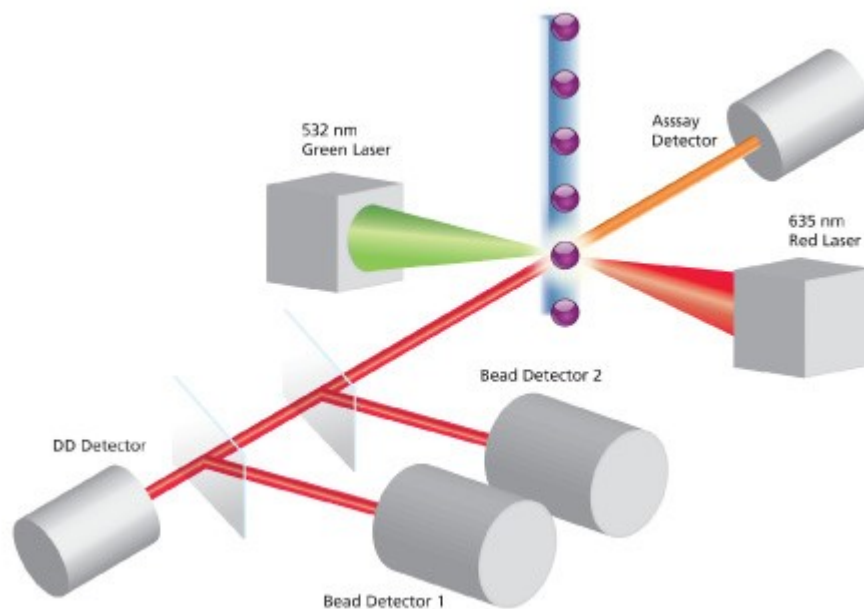


*zroj: R&D Systems, 2024*

Analyzátor Luminex je přístroj podobného principu jako průtokový cytometr s excitačním systémem obsahujícím dva lasery. Červený laser (klasifikační) excituje fluorofor v kuličce, který poskytuje jedinečný signál, čímž identifikuje připojenou molekulu HLA. Zelený laser (reportérový) excituje fykoerythrin navázaný na druhou protilátku proti lidskému IgG, což ukazuje, že protilátka IgG v testovacím séru se navázala na příslušnou molekulu HLA připojenou ke kuličce. Kuličky jsou současně excitovány červeným laserem při 635 nm. Emitované světlo lze detekovat při vlnových délkách 660 nm (červená) a 730 nm (infračervená) pomocí specializovaného detektoru. Měřením intenzit emise pro oba kanály lze současně identifikovat až 100 odlišných mikrokuliček s unikátním HLA antigenem. Detekce HLA protilátek se dosahuje pomocí sekundární protilátky konjugované s fluoroforem fykoerythrinem, který je excitován

zeleným laserem (532 nm) a detekován při 576 nm. Kombinace těchto dvou signálů indikuje zaprvé přítomnost a zadruhé specifitu HLA protilátky v testovaném séru. Stupeň fluorescence je vyjádřen jako střední intenzita fluorescence (MFI), která je normalizována tím, že se vezme v úvahu stupeň fluorescence pozorovaný u negativního séra a u kuliček, ke kterým není připojena žádná molekula HLA. Pozitivní kontrola se skládá z kuliček navázaných s PE značeným lidským IgG. Měření MFI nelze přímo převést na titry protilátek, protože MFI představuje zástupnou jednotku pro množství navázané protilátky a je ovlivněn několika faktory, včetně koncentrace protilátky v séru, ale také hustoty, konformace a orientace antigenu, stejně jako aviditou protilátky vůči příslušnému antigenu (Tait B, 2016)

**Obrázek 4: Princip testu Luminex**



Zdroj: Thermo Fisher Scientific Inc., 2024

### 6.6.2 Vyšetření metodou Luminex u transplantace ledviny

Před transplantací se provádí CDC test, aby se zjistilo, zda příjemce má specifické protilátky proti HLA antigenům dárce. Následně se protilátky stanovují pomocí vysoce citlivého Luminexu. Veškeré laboratoře musí mít systém pravidelného screeningu vzorků séra od každého pacienta, aby zjistily, zda obsahují protilátky namířené proti HLA antigenům. Tento screening provádí laboratoř, která je přidružená k transplantačnímu středisku, kde je příjemce evidován. Do databáze Koordinačního

střediska transplantací se zaznamenávají informace o provedeném screeningu. Vyšetření se provádí jednou ročně u pacientů, kteří jsou na čekací listině. Tito pacienti mají často diagnostikované akutní či chronické ledvinové selhání a dochází na dialýzu a jsou tedy před transplantací ledviny. Pacienti po transplantaci ledviny se vyšetřují individuálně dle klinické potřeby. Jsou pravidelně kontrolováni a na základě například biochemických markerů se zjišťuje, zda u nich nedochází k chronické rejekci. U těchto pacientů je možné zhodnotit donor specifické protilátky. V případě detekce a definice protilátek proti HLA I. a II. třídy se seznam HLA antigenů předá dialyzačnímu středisku, kde je pacient evidován. (Česká nefrologická společnost, 2014)

### **6.6.3 Algoritmus vyšetření protilátek**

#### **6.6.3.1 Screening**

Metodou luminex se nejprve provádí screeningové vyšetření - analýza LSM (Labscreen mix). Na jednotlivých kuličkách jsou absorbované extrahované antigeny, které jsou nativní. Tyto antigeny jsou vyzolovány z lidských buněčných kultur a jsou přichyceny na polystyrenové kuličky. Screen obsahuje 19 kuliček, přičemž každá kulička má více specifit (5-8 HLA specifit). Tyto specifity vznikají nejčastější kombinací, které se nachází v populaci. Například u HLA I. třídy obsahuje 36 kombinací a u HLA II. třídy 20 kombinací. V případě, že se u nějaké specifity projeví reaktivita, dojde k navázání protilátky na kuličku. V tomto případě však nelze určit, o jakou konkrétní specifitu se jedná. Screening sleduje reaktivitu v I. a II. třídě. V případě positivity se provádí typizace. (Lachmann N, 2013), (Jankovičová K, 2023)

#### **6.6.3.2 Typizace**

V případě positivity screeningu se dále vyšetřují zvlášť protilátky proti HLA I. třídy a II. třídy. Jedná se o typizaci protilátek, kdy se provádí analýza LSA1 (Labscreen single antigen HLA I) a LSA2 (Labscreen single antigen HLA II). U typizace LSA1 i LSA2 je k dispozici 98 kuliček, přičemž každá kulička má svůj jedinečný antigen. Tyto antigeny jsou vyrobeny rekombinantní technologií a reprezentují nejčastěji se vyskytující specifity. U HLA I. třídy rozlišuje 21 serologických specifit HLA-A, 45 specifit HLA-B a 15 specifit HLA-C. V rámci HLA II. třídy rozlišuje 18 specifit HLA-DR, 7 specifit HLA-DQ

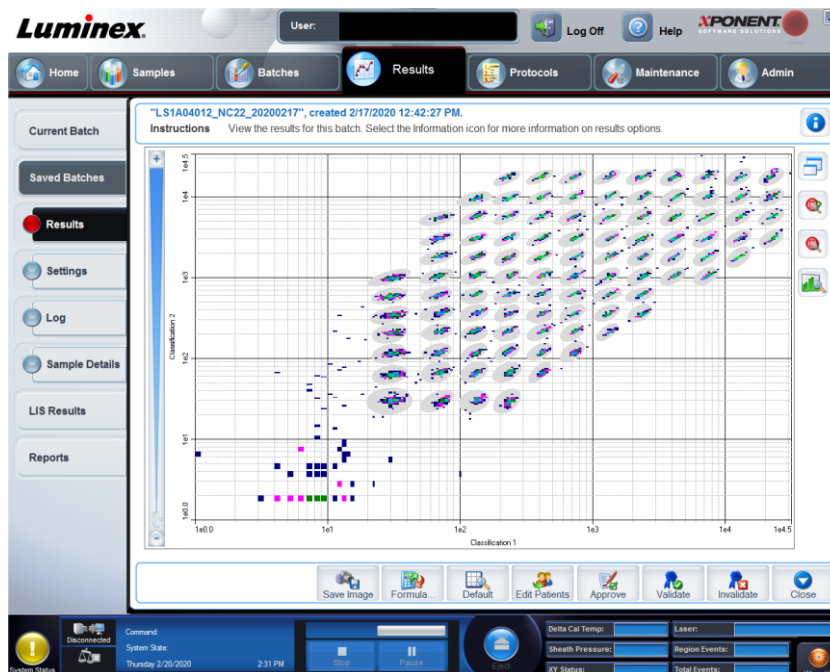


a 18 specifit HLA-DP. Výsledkem jsou naměřené MFI hodnoty u konkrétních HLA molekul.(Lachmann N, 2013), (Jankovičová K, 2023)

#### 6.6.4 Vyhodnocení

Pro získání a analýzu dat se používá analyzátor Luminex s programem xPONENT a software HLA-Fusion. Po proběhlé analýze je možné v programu XPONENT zjistit jedinečnou spektrální adresu jednotlivých kuliček. Ta vzniká kombinací 10 koncentrací dvou fluorochromů a udává specifitu kuličky, která má na sobě navázané antigeny. V softwaru vzniká akviziční gate , kde lze pozorovat změřené kuličky dle koncentrace jednoho či druhého fluorochromu. Klasifikační laser tedy určuje spektrální adresu a reportérový měří koncentraci analytu, který je zjišťován. V programu xPONENT probíhá měření, ale také verifikace i kalibrace přístroje. (Lachmann N, 2013)

**Obrázek 5: Akviziční gate**



*Zdroj: Ústav Klinické imunologie a alergologie FNHK, 2023*

Analyzační software HLA fusion hodnotí MFI a zpracovává informaci o tom, jaký antigen (HLA molekula) je navázan na kuličce. Hodnoty MFI následně porovnává s hodnotami MFI negativního séra, které slouží jako vnitřní kontrola analyzačního kitu, a v kterém nebyla zjištěna žádná reaktivita vůči kterémukoli lokusu HLA. (Jankovičová K, 2023)

Výsledky analýzy každého vzorku jsou zahrnuty v datových souborech v xPONENT. Tyto soubory jsou pak interpretovány softwarem HLA-Fusion, který generuje grafy výsledků pro každé sérum. Na ose X jsou uvedeny všechny kuličky s HLA molekulami na jejich povrchu. Na ose Y lze odečíst MFI kuličky. (Tait B, 2016)

Hranice (cut-off hodnoty) jsou určeny a vypočítány na základě hodnot fluorescence získaných z analýzy negativního kontrolního séra a také hodnot fluorescence negativních a pozitivních kontrolních kuliček. (Süsal C, 2013)

V rámci hodnocení screeningového vyšetření LSM se hodnotí normalizovaný poměr NGB (Normalized Background Ratio). Hodnota cut-off je pro HLA I. třídy nastavena na 2, u HLA II. třídy je cut-off 2,5. Hodnoty cut-off jsou doporučené, ne však striktně dané. V rámci typizace se hodnotí MFI, které je pro LSA1 nastaveno na 1500 a u LS2 na 2000. (Gandhi M, 2013)

**Tabulka 2: Cut-off hodnoty pro analýzu LSM**

	HLA I. třídy index	HLA II. třídy index
<b>Cut-off</b>	>2	>2,5

**Tabulka 3: Cut-off hodnoty pro analýzu LSA1 a LSA2**

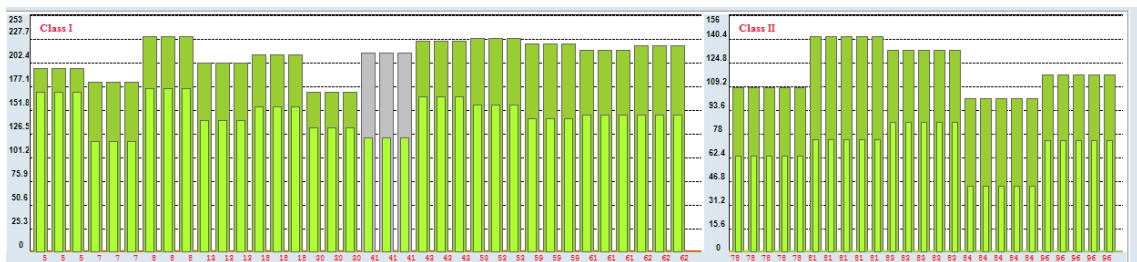
MFI proti antigeny:	HLA I. třídy	HLA II. třídy
<b>Nízké riziko</b>	do 1 500 – 2 000	do 2 000 – 3 000
<b>Středně vysoké riziko</b>	do 10 000	do 10 000
<b>Vysoké riziko</b>	10 000 a více	10 000 a více

Software HLA Fusion také hodnotí hodnoty MFI v čase, v rámci kterého lze u pacienta kontrolovat například účinnost léčby. Může také hodnotit kalkulované PRA (panel reaktivních protilátek), které je obdobou PRA hodnoceného v rámci cytotoxického crossmatch testu. Obecně se PRA udává jako procento, které vyjadřuje vůči jakému podílu potenciálních dárců je sérum pacienta na čekací listině schopné reagovat. Čím více je pacient senzibilizovaný, tím vyšší hodnotu PRA bude mít. V rámci Luminexu lze

provádět také virtuální crossmatch, který hodnotí reaktivitu s potenciálním souborem dárců na základě zjištěných specifit anti HLA protilátek. (Süsal C, 2013)

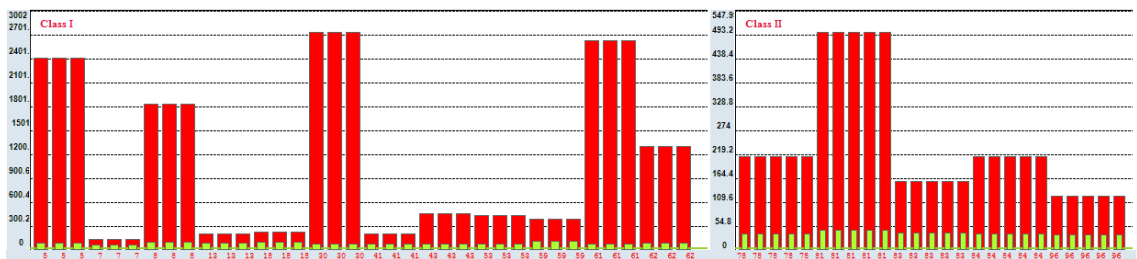
Předtransplantační přítomnost donor-specifických protilátek identifikovaných pomocí Luminexu nemusí automaticky znamenat, že nelze provést transplantaci. V situaci, kdy je před transplantací CDC crossmatch test negativní a zároveň jsou detekovány donor-specifické HLA protilátky třídy I. nebo II. metodou pevné fáze, se riziko odmítnutí hodnotí právě na základě MFI. (Česká nefrologická společnost, 2014)

**Obrázek 6: Labscreen mix - negativní**



Zdroj: Ústav Klinické imunologie a alergologie FNHK, 2023

**Obrázek 7: Labscreen mix - pozitivní**



Zdroj: Ústav Klinické imunologie a alergologie FNHK, 2023

**Obrázek 8: LSA1- pozitivní**



Zdroj: Ústav Klinické imunologie a alergologie FNHK, 2023

## **7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **7.1 Příprava sér**

Pro metodu Luminex jsou k dispozici tři alikvoty. První alikvot je uchován v mrazicím boxu při  $-40^{\circ}\text{C}$ . Druhý alikvot slouží k archivaci vzorku pro Luminex a je uchován při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$ . Třetí alikvot je použit pro analýzu. Před zpracováním sér je nutné si ještě připravit 3 alikvoty vzorků negativního séra. Před samotným zpracováním séra je nutné je inaktivovat v termální lázni při  $56^{\circ}\text{C}$  po dobu 30 minut nebo v boxu po dobu 45 minut.

### **7.2 Příprava reagensí a přístroje**

Pacientské alikvóty je důležité spolu s promývacím pufrem (ze sady Kit LABScreen™) a jednotlivé mixy mikrosfér uchovávat v chladu až do doby použití. Kozí PE-konjugované antisérum (konjugát) proti lidskému IgG a mixy mikrosfér je nutno také uchovávat v temnu, přičemž jejich stabilita je 6 měsíců. Dále je nutno naředit 10x promývací pufr (ze soupravy LABScreen™) destilovanou vodou. Před započítím práce s přístrojem Luminex Bio-Plex™-200 je potřeba přístroj zapnout a nechat zahřát lasery a následně zkalibrovat podle pokynů výrobce. Před započítím měření je třeba spustit proceduru Fluidics Preparation v panelu Maintenance. Po ukončení měření před vypnutím stroje minimálně dvakrát spustit proceduru System Shutdown v panelu Maintenance. Dodržování těchto pokynů zajistí správnou přípravu reagensí a provoz přístroje, což je klíčové pro úspěšné provedení analýzy vzorku.

### **7.3 Kalibrace přístroje**

Pro provedení kalibrace přístroje je nutné připravit kalibrační destičku. Dle návodu se do ní napipetují 4 ml destilované vody, 4 ml 70% ethanolu nebo isopropylalkoholu a směs 400  $\mu\text{l}$  SAVA a 3,6 ml destilované vody. Poté je v počítači otevřen panel Maintenance, kde lze vybrat ze dvou možností: 1. Calibration Verification, které se provádí 1x týdně nebo 2. Performance Verification, který je prováděn před každým měřením. Následně jsou na destičku umístěny stripy, do nichž se nakapají

kalibrační mikrosféry, které jsou pečlivě roztřepány na vortexu po dobu přibližně 30 sekund. Následně se postupuje podle instrukcí softwaru. Příslušné kalibrační roztoky se po 5 kapkách nakapají do odpovídajících jamek na destičce. Po spuštění kalibrace a verifikace probíhá celý proces automaticky. Po úspěšném dokončení kalibrace nebo verifikace je nutné zálohovat report v programu xPONENT. Je důležité dodržovat pokyny výrobce přístroje a standardy kalibrace pro správné fungování a přesnost měření.

#### **7.4 Postup zpracování vzorku**

Nejprve jsou zcentrifugovány alikvóty séra při 10000 RPM po dobu 2 minut a mixy mikrosfér při 2500 otáčkách také po dobu 2 minut. Následně jsou pečlivě roztřepány mixy mikrosfér na vortexu po dobu 20 sekund. Do každé jamky se napipetuje 20  $\mu$ l séra, které se opatrně promíchá 5krát pipetou. Následně se napipetuje 5  $\mu$ l suspenze mikrosfér do destičky. Poté se destička zakryje aluminiovou folií. Následně je destička jemně protřepána na vortexu a inkubována po dobu 30 minut při pokojové teplotě, přičemž třepání (750 RPM) probíhá za tmy. Po skončení inkubace je přidáno 200  $\mu$ l 10x ředěného promývacího pufru a centrifugováno při 1300 RCF. Po centrifugaci se opatrně, avšak důrazně otočí-klepne destičkou, tak, aby se odstranil supernatant. Destička je následně otřena buničinou, aby byly odstraněny zbytky supernatantu. Následně se destička otočí zpět a důkladně protřepe na vortexu. Do zvortexované destičky se přidá 200  $\mu$ l promývacího pufru. Především 3 kroky promytí jsou ještě 3x zopakovány. Po posledním promytí je sediment pouze roztřepán. Během promývání se připraví kozí antisérum (konjugát) proti lidskému IgG, které se naředí 100x (1  $\mu$ l anti IgG-PE + 99  $\mu$ l promývacího pufru). Následně se 100  $\mu$ l takto ředěného konjugátu přidá do každé jamky a jemně promíchá pipetou. Destička je opět zakryta aluminiovou folií, protřepána na vortexu a inkubována po dobu 30 minut při pokojové teplotě a třepána za tmy (750 RPM). Po skončení inkubace se přidá 150  $\mu$ l 10x ředěného promývacího pufru a opět centrifuguje při 1300 RCF. Destička je následně jemným, prudkým pohybem zbavena supernatantu a po-sléze otřena buničinou. Poté se důkladně protřepe na vortexu. Následně se do ní napipetuje 200  $\mu$ l promývacího pufru. Především 3 kroky promytí jsou ještě 3x zopakovány, po posledním promytí se sediment pouze

roztřepe. Do každé jamky je přidáno 50  $\mu$ l PBS. Konečný objem v každé jamce by měl být přibližně 60  $\mu$ l. Nakonec se destička přelepí netransparentní fólií a je připravena k měření.

## **7.5 Postup měření**

Měření začíná vytvořením protokolu na základě specifikací jednotlivých šarží kitu LABScreen™, které je nutné stáhnout z webových stránek firmy One Lambda, Inc., USA (Luminex TEMPLATE). Protokol je nutné označit číslem jednotlivého kitu a šarží. Poté je z připraveného protokolu vytvořen tzv. BATCH (panel), kde se nadefinují jednotlivé jamky a označí se číslem kitu, šarží kitu, číslem negativní kontroly a datem měření. Následně je zadána identifikace pacienta v pořadí: jméno, rodné číslo, datum příjmu a je nadefinována v panelu negativní kontrola, ke které je měření vztaženo. Celý panel se uloží a přistoupí se k měření panelu, který je spuštěn tlačítkem start. Během měření se zobrazuje průběh, který indikuje, které kroky proběhly a zda byly úspěšné. Po skončení měření je třeba uložit analýzu a vyexportovat CFS soubor, který je dále zpracováván v dalším softwaru. Nakonec je nutné minimálně dvakrát spustit proceduru System Shutdown v panelu Maintenance před vypnutím stroje, přičemž se používá 10x ředěné 5% SAVO.

## **7.6 Postup analýzy dat pomocí softwaru HLA-Fusion**

Software HLA-Fusion umožňuje identifikovat a vyhodnotit specifitu i hladinu anti-HLA protilátek při screeningu i přesném typování. Pro určení positivity kuliček software vypočítá Normalizovaný Poměr Pozadí (NBG ratio) podle specifických vzorců závislých na typu testu. Také umožňuje nastavit prahové hodnoty NBG ratio, které určují pozitivitu výsledků. Tyto hodnoty se mohou lišit v závislosti na konkrétním typu testu a jsou doporučeny společností One Lambda.

V rámci sledování screeningového vyšetření LSM se hodnotí naměřený index. Vizualně se jedná o sloupcové grafy, které jsou zelené, pokud je naměřený index pod hranicí stanovené cut-off a červené pokud je pacient nad hranicí. V případě hraničního výsledku je sloupec šedý (obrázek č. 6 a č. 7). Naměřené indexy lze porovnat s negativním sérem. Také lze pozorovat sady specifit, avšak v případě pozitivního

výsledku nelze určit, proti jaké konkrétní specifitě pacient na kuličce reaguje. Pro konkrétní určení se využívají vyšetření LSA1 a LSA2, kde jsou sledovány hodnoty MFI již pro konkrétní HLA specifitu (obrázek č. 8). Důležité jsou zvláště donor specifické protilátky, které software barevně zvýrazní. Velkým plusem jsou údaje o pacientovi a jeho předchozích výsledcích z daného pracoviště.

## **7.7 Statistická analýza dat**

Ke statistickému vyhodnocení dat jsou použity statistické programy GraphPad Prism 10 a MedCalc. V GraphPadu jsou pro experimentální část diplomové práce sestaveny sloupcové a krabicové grafy. Statistická analýza je v závislosti na sledovaném souboru hodnocena pomocí neparametrického testu Mann-Whitney, Two-Way ANOVA a kontingenční analýzy. V případě statistické významnosti je používána p-hodnota, která musí být menší než 0,05, což odpovídá hladině významnosti 5%. Program MedCalc je využit pro sestavení ROC křivky a zhodnocení specifity a senzitivity screeningového vyšetření.

## 8. VÝSLEDKY

### 8.1 Výběrový soubor

Výběrový soubor zahrnuje pacienty, kteří byli v rámci předtransplantačního nebo potransplantačního vyšetření sledováni na Ústavu Klinické imunologie a alergologie v Hradci králové za rok 2023. U těchto pacientů byl za pomoci Luminexu proveden screening, popřípadě typizace protilátek proti HLA antigenům.

Soubor těchto pacientů byl rozdělen podle hodnot – indexu naměřených ve screeningu do čtyř skupin. První skupina obsahuje pacienty s jednoznačně negativními výsledky proti oběma HLA třídám. Druhá skupina zahrnuje pacienty, u nichž byla zaznamenána pozitivita bez ohledu na to, v které konkrétní třídě byla detekována.

Následující dvě skupiny jsou kategorizovány jako tzv. hraniční. První hraniční skupina, nazývána skupina „slabší index“, zahrnuje pacienty s výsledky vykazující hodnoty vyšší než stanovený cut-off screeningového vyšetření, ale s odchylkou pouze do jedné jednotky. V HLA I. třídě jsou sledováni pacienti, kteří měli naměřený index mezi 2-3. U HLA II. třídy jsou sledováni pacienti, kteří hodnoty indexu měli mezi 2,5-3,5. Tyto hodnoty naznačují možnost mírné pozitivní reakce v následující typizaci.

Čtvrtá skupina, označená jako skupina „verifikovat“, obsahuje pacienty s výsledky pod stanoveným cut-off, ale s odchylkou do půl jednotky. V HLA I. třídě jsou sledováni pacienti, kteří měli naměřený index mezi 1,5-2. U HLA II. třídy jsou sledováni pacienti, kteří hodnoty indexu měli mezi 2-2,5.

Tato diplomová práce popisuje všechny 4 skupiny pacientů. Dále bylo nutné posoudit, jak reaguje skupina "slabší index" v typizaci a ověřit, zda je skupina "verifikovat" správně klasifikována jako negativní. Pro tento účel byla tato hraničně negativní skupina také typována, ačkoli hodnoty naměřených indexu jsou pod mezní hodnotou. Následně bylo třeba vyhodnotit přínos a spolehlivost screeningového vyšetření a ověřit meze positivity pro obě třídy HLA protilátek.

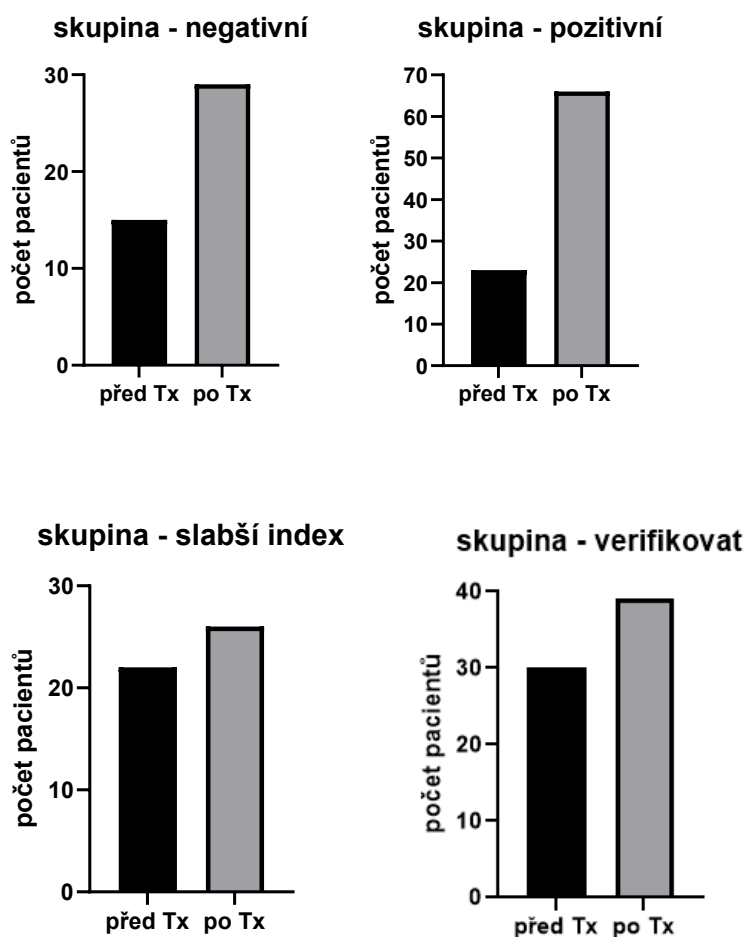


## 8.2 Celkový přehled dat

V průběhu roku 2023 bylo provedeno celkem 243 screeningových vyšetření, přičemž 37 pacientů podstoupilo opakované měření. Typizace proběhla u 129 pacientů v HLA I. třídě a u 93 pacientů v HLA II. třídě.

Z celkového počtu vyšetřených pacientů bylo 161 mužů a 82 žen, V rámci algoritmu vyšetření bylo 86 pacientů před transplantací, zatímco 157 pacientů bylo po transplantaci.

**Graf 1: Soubor grafů před a po transplantaci ledvin u výběrových skupin**

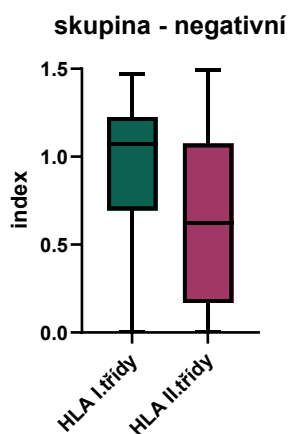


### 8.3 Skupina negativní

Do této skupiny byli zařazeni pacienti, jejichž změřené indexy byly v obou třídách jednoznačně negativní. Celkem bylo provedeno 44 měření a jednalo se o 41 pacientů, z nichž 25 bylo mužů a 16 žen. Z celkového počtu bylo 29 pacientů po transplantaci ledviny a 15 pacientů před transplantací. Dva pacienti, kteří byli sledováni po transplantaci, byli opakovaně zařazeni do této skupiny pacientů, neboť jejich reaktivita zůstávala negativní. U této skupiny byly použity statistické testy Mann-Whitney, Two-Way ANOVA a grafické zobrazení pomocí krabicového grafu.

V rámci porovnání indexů u HLA I. a HLA II. třídy pomocí statistického neparametrického testu Mann-Whitney, byly průměrné hodnoty a medián vyšší v první třídě. (p hodnota = 0,0043) Nicméně, v rámci srovnání tříd před a po transplantaci (graf č. 3) pomocí statistického testu Two-way ANOVA, nebyly zaznamenány významné rozdíly (p hodnota = 0,0927).

**Graf 2: Porovnání hodnot naměřených indexů u skupiny negativní mezi HLA I. a HLA II. třídou**

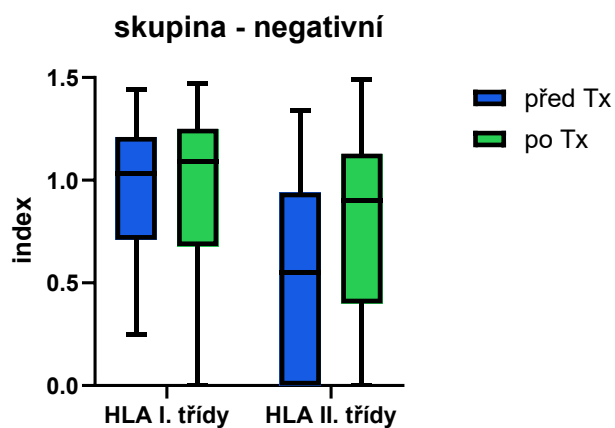


p hodnota = 0,0043

**Tabulka 4: Porovnání hodnot naměřených indexů u skupiny negativní mezi HLA I. a HLA II. třídou**

	skupina negativní - INDEX			
	HLA I. třídy		HLA II. třídy	
	průměr	medián	průměr	medián
	0,96	1,07	0,67	0,63
cut-off	2		2,5	

**Graf 3: Porovnání hodnot naměřených indexů HLA I. a HLA II. třídy u skupiny negativní před a po transplantaci ledviny**



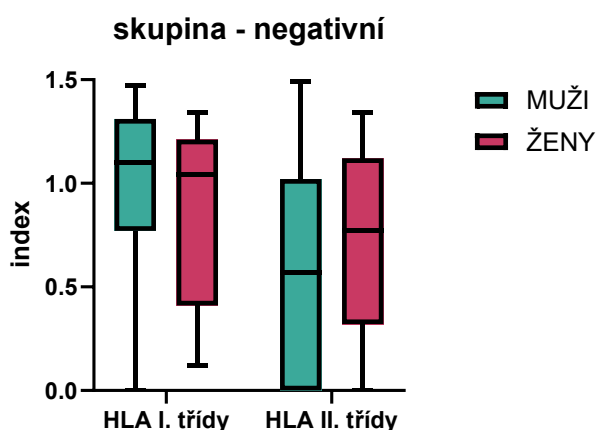
*p hodnota = 0,0927*

**Tabulka 5: Porovnání hodnot naměřených indexů HLA I. a HLA II. třídy u skupiny negativní před a po transplantaci ledviny**

	skupina negativní - INDEX			
	HLA I. třídy		HLA II. třídy	
	průměr	medián	průměr	medián
<b>před Tx</b>	0,93	1,03	0,48	0,55
<b>po Tx</b>	0,98	1,09	0,77	0,9
<b>cut-off</b>	2		2,5	

Medián a průměr u mužů, byl v HLA I. třídě mírně vyšší než u žen. Naopak v HLA II. třídě měly tyto hodnoty mírně vyšší ženy. Ačkoliv byly zjištěny rozdílné hodnoty indexů u mužů a žen, nebyla zjištěna zásadní odlišnost v rámci pohlaví pacientů. Výsledky indexů dosahovaly podobných hodnot. Statistická významnost patrného rozdílu pomocí testu Two-Way ANOVA též nebyla potvrzena. (p hodnota = 0,5105)

**Graf 4: Porovnání hodnot naměřených indexů u HLA I. a HLA II. třídy mezi muži a ženami**



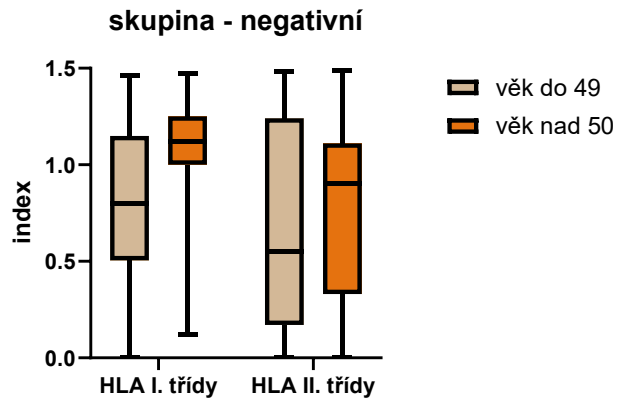
*P hodnota = 0,5105*

**Tabulka 6: Porovnání hodnot naměřených indexů u HLA I. a HLA II. třídy mezi muži a ženami**

	skupina negativní - INDEX			
	HLA I. třídy		HLA II. třídy	
	průměr	medián	průměr	medián
<b>muži</b>	1,03	1,1	0,64	0,57
<b>ženy</b>	0,82	1,04	0,72	0,77
<b>cut-off</b>	2		2,5	

Pro další porovnání byl soubor rozdělen do dvou věkových kategorií. Do první kategorie byli zařazeni pacienti do 49 let a do druhé kategorie byli zařazeni pacienti starší 50 let. Při porovnání jejich hodnot pomocí testu Two-Way ANOVA nebyla prokázána statistická významnost. ( $p$  hodnota=0,1400)

**Graf 5: Porovnání hodnot naměřených indexů u HLA I. a HLA II. třídy mezi věkovými kategoriemi**



$p$  hodnota = 0,1400

**Tabulka 7: Porovnání hodnot naměřených indexů u HLA I. a HLA II. třídy mezi věkovými kategoriemi**

	skupina negativní - INDEX			
	HLA I. třídy		HLA II. třídy	
	průměr	medián	průměr	medián
<b>věk do 49</b>	0,82	0,8	0,67	0,55
<b>věk nad 50</b>	1,07	1,12	0,75	0,91
<b>cut-off</b>	2		2,5	

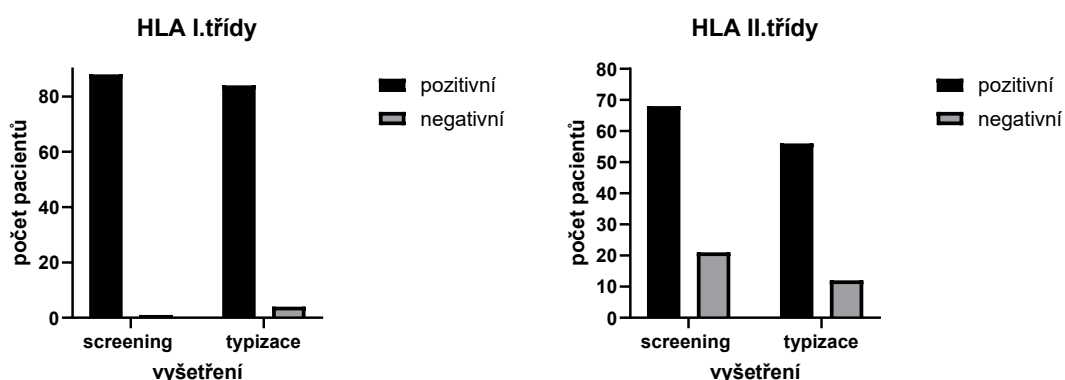
## 8.4 Skupina pozitivní

Do tohoto souboru byli zařazeni pacienti, kteří vykazovali jasně pozitivní index v HLA I. nebo HLA II. třídě. Po screeningovém vyšetření u nich byla prováděná typizace, kde se sledovaly hodnoty MFI.

V první třídě proběhlo 89 měření, přičemž 88 měření mělo index pozitivní a pouze jeden pacient měl index v první třídě negativní. Typování v první třídě obsahovalo 88 měření, přičemž 84 měření mělo pozitivní výsledek a 4 měření negativní.

U HLA II. třídy proběhlo 89 měření, přičemž 68 pacientů bylo ve screeningu pozitivní a 21 pacientů negativní. Následné typování 68 pacientů mělo 56 měření pozitivní výsledek a 12 měření negativní. Výsledky jsou vizualizovány pomocí sloupcového grafu. Dále byly pro skupinu pozitivní použity krabicové grafy, statistická analýza Mann-Whitney a Two-Way ANOVA.

**Graf 6: Porovnání pozitivivity screeningu a typizace u HLA I. a HLA II. třídy**



**Tabulka 8: Porovnání pozitivivity screeningu s následnou typizací u HLA I. třídy**

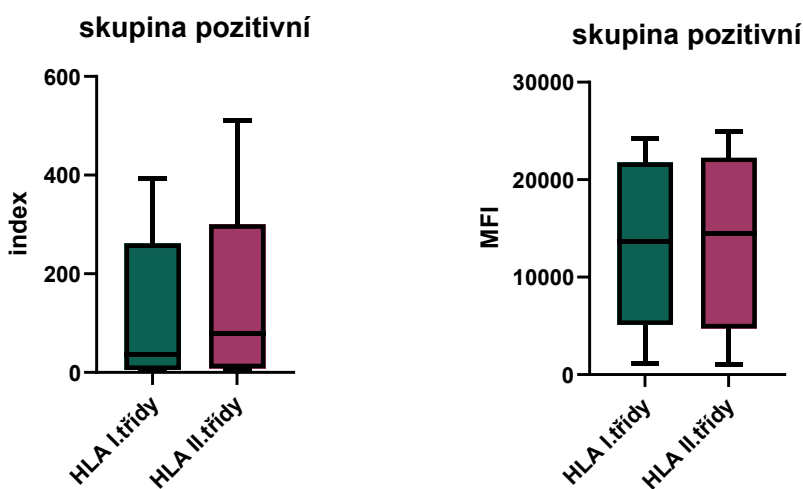
	skupina pozitivní - HLA I. třídy	
počet měření	89	
	pozitivní měření	negativní měření
screening (LSM)	88	1
typizace (LSA1)	84	4

**Tabulka 9: Porovnání pozitivitu screeningu s následnou typizací u HLA II. třídy**

	skupina pozitivní - HLA II. třídy	
počet měření	89	
	pozitivní měření	negativní měření
screening (LSM)	68	21
typizace (LSA2)	56	12

Poté byly porovnávány hodnoty naměřených indexů u HLA I. a HLA II. třídy s následným porovnáním hodnot MFI u typizace pomocí neparametrického testu Mann - Whitney. Výsledky ukazují vyšší průměrné hodnoty a mediány indexů u HLA II. třídy, přičemž p hodnota se pohybuje na hranici statistické významnosti ( $p = 0,0620$ ) Nicméně srovnání hodnot MFI po typizaci byly u obou tříd podobné a pohybují se mezi 13 000-14 000 MFI. V následujících tabulkách můžeme pozorovat hodnoty indexů i MFI a také jak jsou hodnoty MFI rizikové pro vznik rejekce.

**Graf 7: Porovnání hodnot indexů a MFI u HLA I. a HLA II. třídy**



$p$  hodnota = 0,0620

$p$  hodnota = 0,8623

**Tabulka 10: Porovnání hodnot indexů u HLA I. a HLA II. třídy**

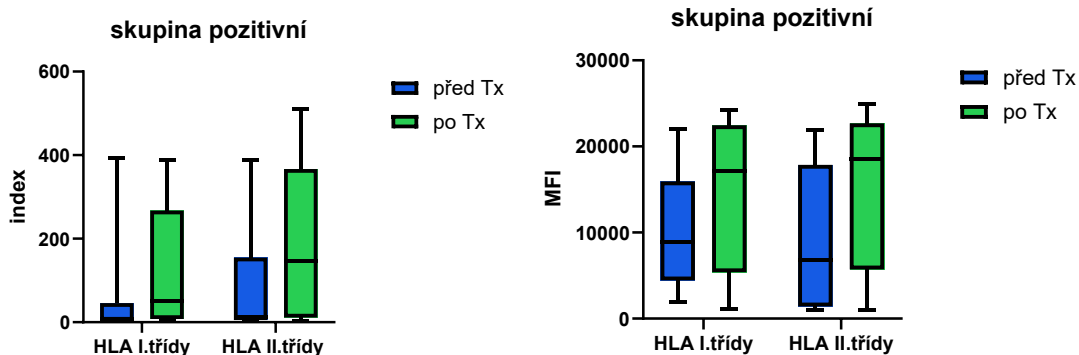
	skupina pozitivní - INDEX			
	HLA I. třídy		HLA II. třídy	
	průměr	medián	průměr	medián
	115,816	36,04	164,834	79,44
cut-off	2		2,5	

**Tabulka 11: Porovnání hodnot MFI u HLA I. a HLA II. třídy**

	skupina pozitivní - MFI			
	HLA I. třídy		HLA II. třídy	
	průměr	medián	průměr	medián
	13267,6	13603,8	13415,1	14498,4
hodnoty MFI pro Ag				
nízké riziko	do 1500 - 2000		do 2000 - 3000	
středně vysoké riziko	do 10 000		do 10 000	
vysoké riziko	10 000 a více		10 000 a více	

Hodnoty u HLA I. a HLA II. třídy byly také porovnány v rámci toho, zda byli pacienti před, nebo po transplantaci ledviny. Pro statistickou analýzu zde byl použit test Two Way ANOVA. Průměry a mediány indexů po Tx u HLA I. a II. třídy byly výrazně vyšší než průměry a mediány indexů před Tx. Tento trend byl též viditelný při sledování hodnot MFI u typizace. Tato skutečnost byla potvrzena statistickou významností  $p = 0,0092$  pro sledování indexu a  $p = 0,0233$  pro hodnoty MFI.

**Graf 8: Porovnání hodnot indexů a MFI u HLA I. a HLA II. třídy u pacientů před a po transplantaci ledviny**



$p$  hodnota = 0,0092

$p$  hodnota = 0,0233

**Tabulka 12: Porovnání hodnot indexů u HLA I. a HLA II. třídy u pacientů před a po transplantaci ledviny**

	skupina pozitivní - INDEX			
	HLA I. třídy		HLA II. třídy	
	průměr	medián	průměr	medián
před Tx	48,56	7,89	48,53	11,75
po Tx	132,28	51,62	183,91	145,64
cut-off	2		2,5	



**Tabulka 13: Porovnání hodnot MFI u HLA I. a HLA II. třídy u pacientů před a po transplantaci ledviny**

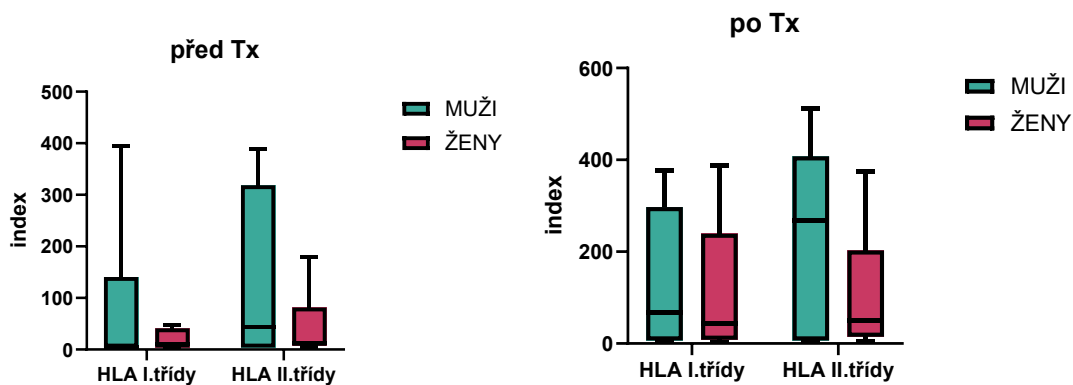
	skupina pozitivní - MFI			
	HLA I. třídy		HLA II. třídy	
	průměr	medián	průměr	medián
<b>před Tx</b>	10357,4	8938,89	9235,42	6831,64
<b>po Tx</b>	13980,3	17146,7	14438,7	18539,3
hodnoty MFI pro Ag				
<b>nízké riziko</b>	do 1500 - 2000		do 2000 – 3000	
<b>středně vysoké riziko</b>	do 10 000		do 10 000	
<b>vysoké riziko</b>	10 000 a více		10 000 a více	

Pacienti byli rozděleni na základě pohlaví a byla sledována hodnota indexu a MFI u HLA I. a HLA II. třídy v jednotlivých grafech (grafy č. 9 a 10) před a po transplantaci ledviny. K vyhodnocení dat byl použit statistický test Two-Way ANOVA.

Při sledování indexu před transplantací byly zjištěny nejednoznačné závěry a nebyla prokázána statistická významnost. ( $p = 0,1585$ ) Hodnoty indexů po transplantaci byly výrazně vyšší u mužů než u žen. Tato skutečnost byla potvrzena statistickou významností  $p = 0,0498$ .

Ačkoliv při sledování MFI u mužů a žen před a po transplantaci nebyla zjištěna statistická významnost (před Tx:  $p = 0,0868$ ; po Tx:  $p = 0,3025$ ) z jednotlivých grafů (graf č. 10) jsou viditelné vyšší hodnoty u mužů než u žen. Průměry a mediány MFI u mužů před transplantací přesahovaly hodnotu MFI 10 000, zatímco průměrné hodnoty a mediány u žen nedosahovaly takto vysokých hodnot.

**Graf 9: Porovnání hodnot indexů a MFI u HLA I. a HLA II. třídy u mužů a žen před a po transplantaci ledviny**



$p$  hodnota = 0,1585

$p$  hodnota = 0,0498

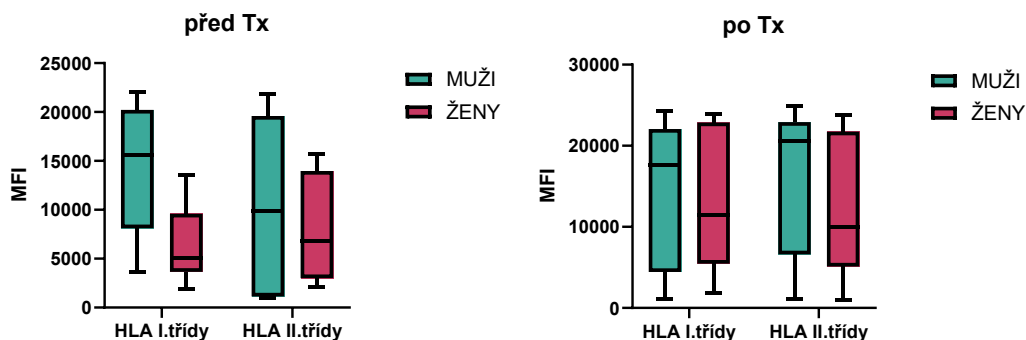
**Tabulka 14: Porovnání hodnot indexů HLA I. a HLA II. třídy u mužů a žen před transplantaci ledviny**

	skupina pozitivní před Tx - INDEX			
	HLA I. třídy		HLA II. třídy	
	průměr	medián	průměr	medián
muži	77,82	4,68	129,82	43,44
ženy	19,30	10,80	44,08	11,75
cut-off	2		2,5	

**Tabulka 15: Porovnání hodnot indexů u HLA I. a HLA II. třídy u mužů a žen po transplantaci ledviny**

	skupina pozitivní po Tx - INDEX			
	HLA I. třídy		HLA II. třídy	
	průměr	medián	průměr	medián
muži	136,78	68,15	232,30	268,41
ženy	126,3	42,94	119,39	50,36
cut-off	2		2,5	

**Graf 10: Porovnání hodnot MFI u HLA I. a HLA II. třídy u mužů a žen před a po transplantaci ledviny**



*p* hodnota = 0,0868

*p* hodnota = 0,3025

**Tabulka 16: Porovnání hodnot MFI u HLA I. a HLA II. třídy u mužů a žen před transplantaci ledviny**

	skupina pozitivní před Tx - MFI			
	HLA I. třídy		HLA II. třídy	
	průměr	medián	průměr	medián
muži	14334,9	15568	10441,8	9882,11
ženy	6379,9	5122,49	8029,08	6831,64
hodnoty MFI pro Ag				
nízké riziko	do 1500 - 2000		do 2000 – 3000	
středně vysoké riziko	do 10 000		do 10 000	
vysoké riziko	10 000 a více		10 000 a více	

**Tabulka 17: Porovnání hodnot indexů a MFI u HLA I. a HLA II. třídy u mužů a žen po transplantaci ledviny**

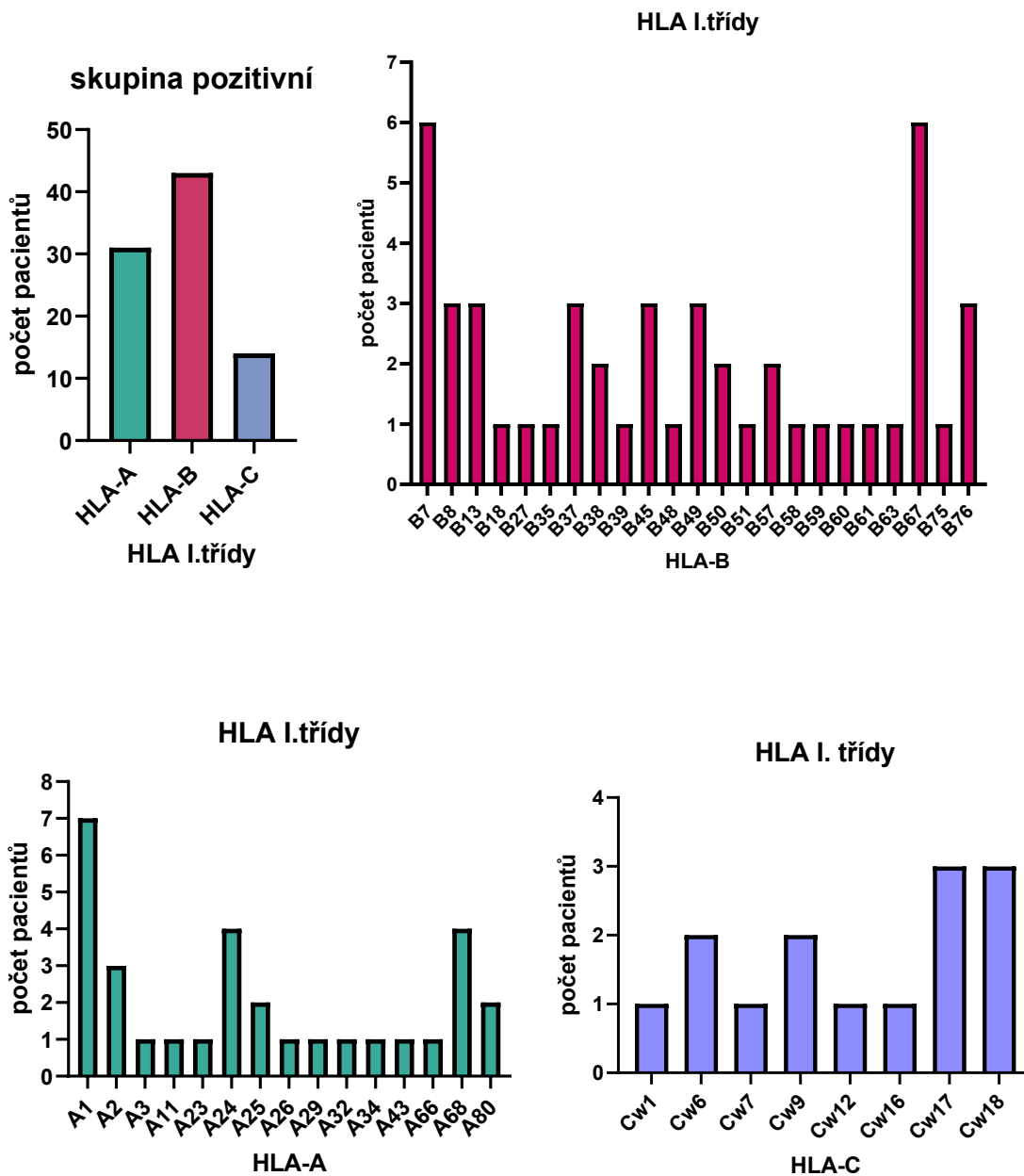
	skupina pozitivní po Tx - MFI			
	HLA I. třídy		HLA II. třídy	
	průměr	medián	průměr	medián
muži	13973,2	17627,3	16013,3	20568,9
ženy	13989,9	11421,5	12339,1	10030,9
hodnoty MFI pro Ag				
nízké riziko	do 1500 - 2000		do 2000 – 3000	
středně vysoké riziko	do 10 000		do 10 000	
vysoké riziko	10 000 a více		10 000 a více	

U skupiny jasně pozitivních pacientů byly v rámci typizace sledovány konkrétní HLA antigeny, na které pacienti reagovali tvorbou protilátek. Pacienti byli nejprve rozděleni do skupin podle reakce na HLA-A, HLA-B a HLA-C u HLA I. třídy (graf č. 11) a na HLA-DP, HLA-DQ a HLA-DR u II. třídy (graf č. 12). Pro každou skupinu byl následně vytvořen graf, který zobrazuje, proti kterým antigenům pacienti reagovali a následně proti jakým konkrétním specifitám.

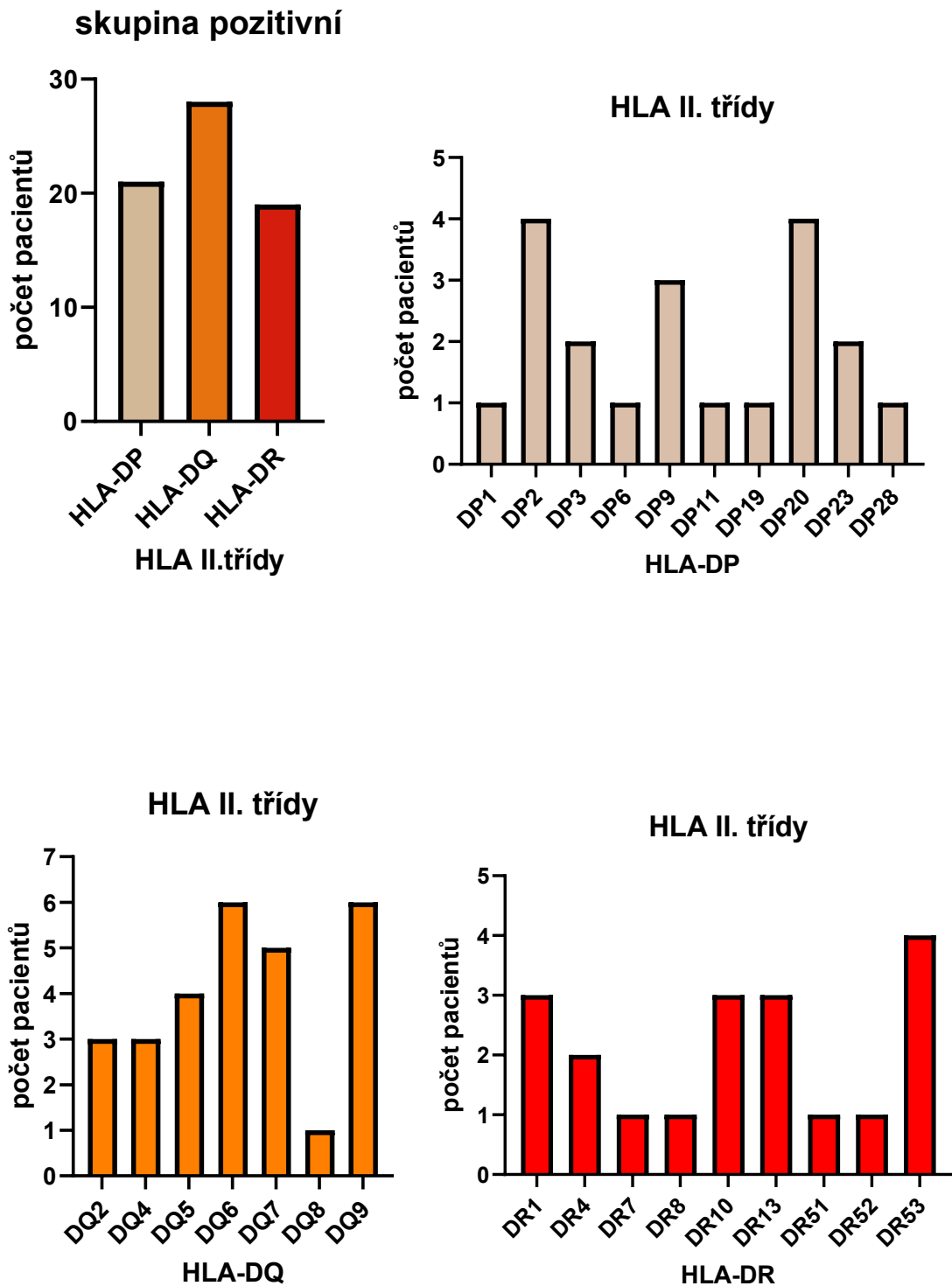
Z celkového počtu pacientů v pozitivní skupině vykazovalo 57,8% pacientů nejvyšší hodnoty MFI proti HLA-B antigenům, přičemž zde bylo pozorováno 23 různých specifit. Nejvíce pacientů reagovalo na specifitu HLA-B7 a HLA-B67. Druhou nejpočetnější skupinou byli pacienti, kteří prokazují nejvyšší hodnoty MFI proti HLA-A antigenům. V této skupině reagovalo nejvíce pacientů proti specifitě HLA-A1. Proti HLA-C reagovalo nejméně pacientů, přičemž nejčastěji opakující se specifity byly HLA-Cw17 a HLA-Cw18.

U HLA II. třídy prokazovalo nejvíce pacientů nejvyšší reaktivitu proti HLA-DQ - 41,2%, a jednalo se o 10 různých HLA specifit, přičemž nejvíce pacientů reagovalo na specifity HLA-DQ6 a HLA-DQ9. Druhým lokusem, proti kterému pacienti vykazovali nejvyšší hodnoty MFI je lokus HLA-DP, kde nejvíce pacientů reagovalo na specifity HLA-DP2 a HLA-DP20. Naopak, nejnižší reaktivita byla pozorována vůči HLA-DR antigenům. Nejčastěji zastoupená anti-HLA-DR specifita protilátek v našem sledovaném souboru je HLA-DR53 dále pak HLA-DR1, HLA-DR10 a HLA-DR13.

**Graf 11: Soubor grafů popisujících početní zastoupení pacientů reagujících na určité HLA antigeny u HLA I. třídy a dále zastoupení pacientů reagujících proti konkrétním HLA specifitám**



**Graf 12: Soubor grafů popisují početní zastoupení pacientů reagujících na určité HLA antigeny u HLA II. třídy a dále zastoupení pacientů reagujících proti konkrétním HLA specifitám**



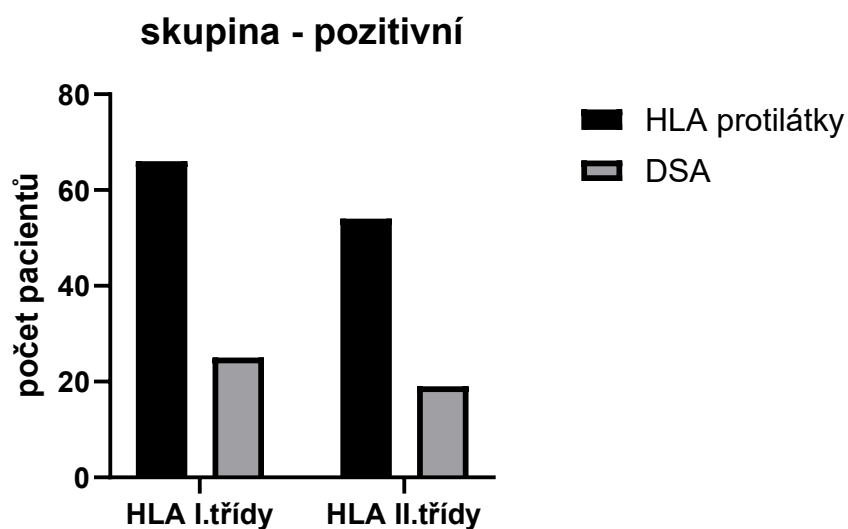
Bylo zjištěno, proti kterým HLA antigenům a jejich konkrétním specifitám pacienti nejvíce reagovali tvorbou specifických protilátek.

Následně byli sledováni pacienti, kteří již podstoupili transplantaci ledviny. U těchto pacientů bylo zjišťováno, zda si vytvořili donor specifické protilátky. Z našeho sledovaného souboru pozitivních pacientů reagovalo 66 pacientů tvorbou protilátek v HLA I. třídě a 54 pacientů v HLA II. třídě.

V HLA I. třídě všech 66 pacientů po transplantaci prokazovali pozitivní HLA protilátky. Z tohoto počtu si 25 pacientů – 37,8 % vytvořilo DSA a z toho 12 pacientů vykazovalo jasně nejvyšší hodnoty MFI právě proti antigenům dárce.

U HLA II. třídy bylo sledováno 54 pacientů. U všech pacientů byly prokázány protilátky a z toho 19 pacientů - 35,1% mělo vytvořeno donor specifické protilátky. Z toho 3 pacienti měli nejvyšší MFI namířené právě proti antigenům dárce.

**Graf 13: Početní zastoupení pacientů s vytvořenými HLA protilátkami, z nichž byly prokázány DSA u HLA I. a HLA II. třídy**



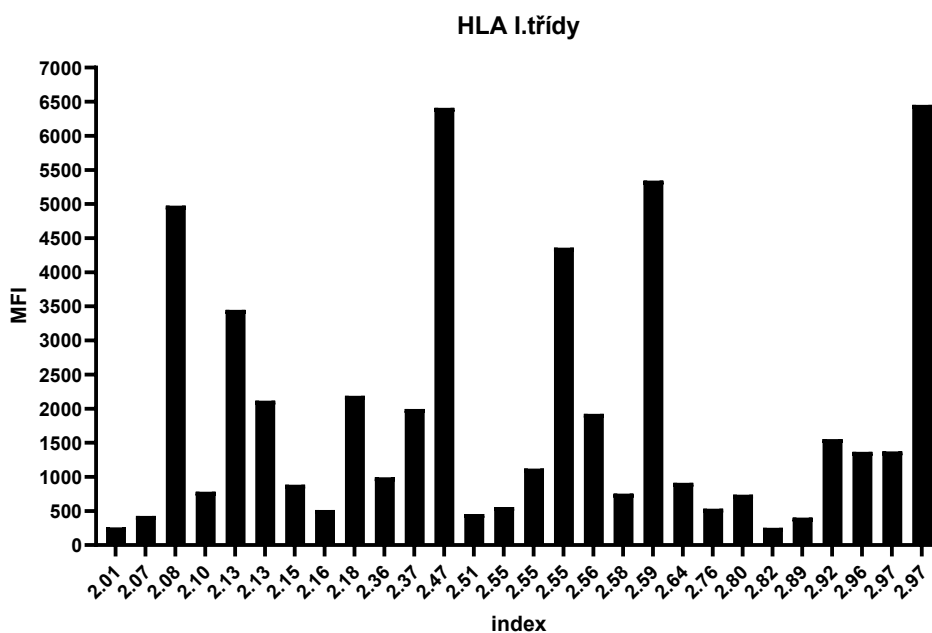
## 8.5 Skupina „slabší index“

V této hraniční skupině byli sledováni pacienti, kteří měli index v HLA I. třídě mezi 2-3 a u HLA II. třídy mezi 2,5-3,5. U těchto pacientů bylo zjišťováno, jak moc silně, pokud vůbec, reagují v následné typizaci a zda cut-off hodnota je pro určitou HLA třídu stanovena správně.

U HLA I. třídy bylo sledováno 28 pacientů, z čehož 13 pacientů bylo před a 15 pacientů po transplantaci, přičemž se jednalo o 23 mužů a 5 žen.

Pro vizualizaci této hraniční skupiny, byl sestaven graf, ve kterém lze pozorovat hodnoty indexu (2-3) na ose x a k nim nejvyšší změřené MFI na ose y.

**Graf 14: Závislost vztahu naměřených hodnot indexu a MFI u HLA I. třídy**



Při pozorování hodnot MFI bylo zjištěno, že z celkového počtu 28 pacientů bylo 17 pacientů v následující typizaci pod hranicí hodnoty 1500 MFI, to znamená že **60,7%** pacientů vyšlo v typizaci negativní a 39,3% pacientů pozitivní.

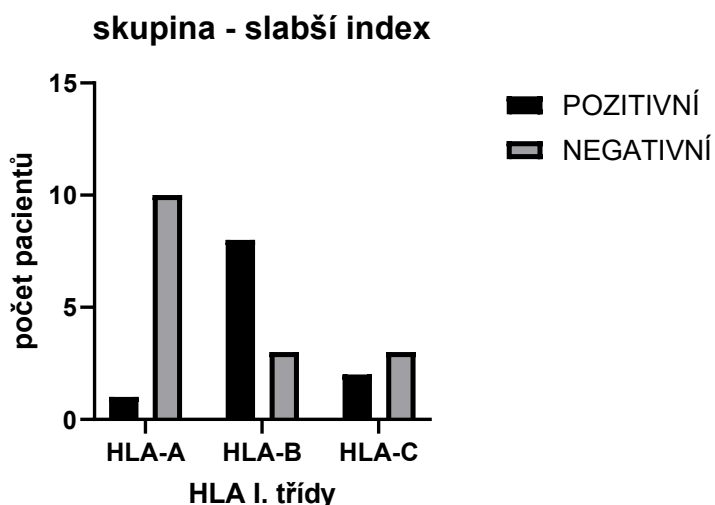


**Tabulka 18: Výsledky typizace u skupiny pacientů se slabším indexem u HLA I. třídy**

skupina slabší index - HLA I. třídy	
	počet pacientů
screening	28
negativní typizace	17
pozitivní typizace	11

V rámci 11 pozitivních pacientů, bylo zjišťováno, proti kterým konkrétním HLA antigenům nejčastěji reagují a o jaké konkrétní specifity se jedná. Z 11 pozitivních pacientů vykazovalo 8 pacientů nejvyšší MFI proti HLA-B antigenům. Proti HLA-C 2 pacienti a proti antigenům HLA-A pouze 1 pacient. Lze tedy říci že 72,7% pacientů, kteří měli v následující typizaci pozitivní výsledek, mají protilátky namířené právě proti HLA-B antigenům. Pro vizualizaci by použit sloupcový graf.

**Graf 15: Početní zastoupení HLA izotypů I. třídy u skupiny slabší index**

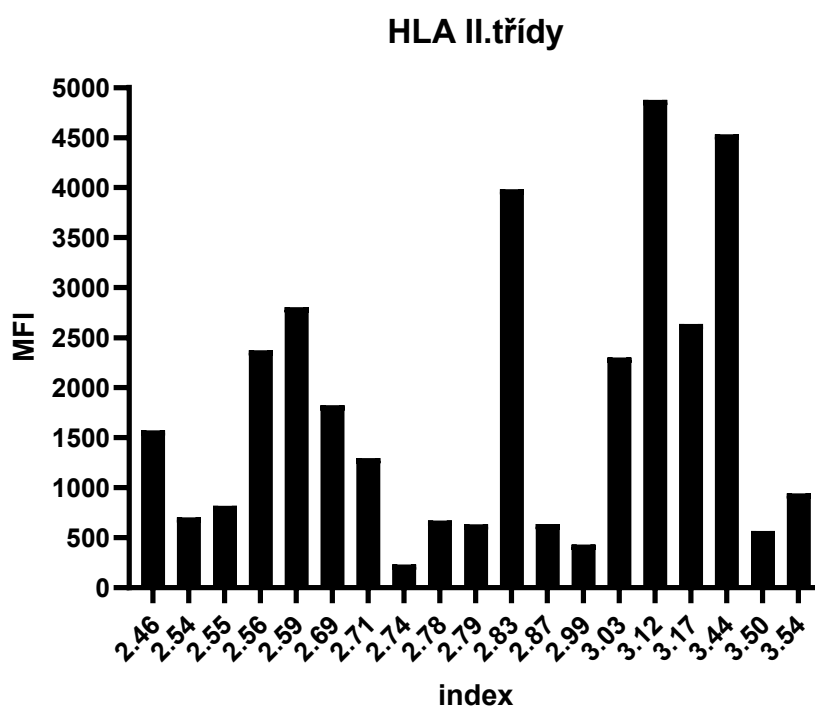


**Tabulka 19: Tabulka popisující početní zastoupení pacientů reagující na určité HLA antigeny u HLA I. třídy**

skupina slabší index - HLA I. třídy		
	počet pacientů	specifity
HLA-A	1	A25
HLA-B	8	B37(3x),B44,B50,B57,B63,B76
HLA-C	2	Cw9,Cw15

V rámci HLA II. třídy bylo sledováno 19 pacientů, kteří měli naměřené indexy mezi 2,5-3,5. Z těchto pacientů bylo 8 před transplantací a 11 pacientů po transplantaci, přičemž se jednalo o 6 žen a 13 mužů. Pro tento účel byl také sestaven graf, kde lze zkoumat hodnoty indexů s následně změřenou nejvyšší hodnotou MFI.

**Graf 16: Závislost vztahu naměřených hodnot indexu a MFI u HLA II. třídy**



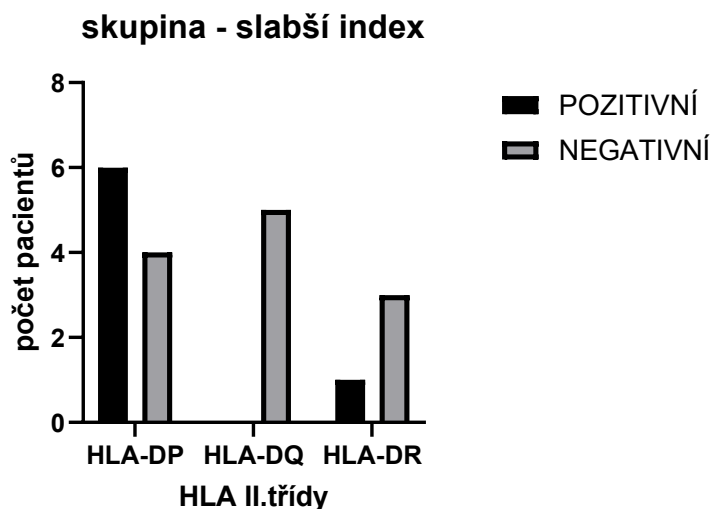
Pozitivita typizace se v případě HLA II. třídy hodnotí nad 2000 MFI, v tomto případě z 19 pacientů vykazovalo pozitivitu 7 pacientů - 36,8% a 63,2% bylo negativních.

**Tabulka 20: Výsledky typizace u skupiny pacientů se slabším indexem u HLA I. třídy**

Skupina slabší index - HLA I. třídy	
	počet pacientů
screening	19
negativní typizace	12
pozitivní typizace	7

Ze sedmi pozitivních pacientů v HLA II. třídě reagovalo nejvíce pacientů na HLA-DP a jeden pacient proti HLA-DR. Protilátky proti HLA-DQ v této skupině pacientů nebyly vyzporovány.

**Graf 17: Početní zastoupení HLA izotypů II. třídy u skupiny slabší index**



**Tabulka 21 Tabulka popisující početní zastoupení pacientů reagující na určité HLA antigeny u HLA II. třídy**

skupina slabší index - HLA I. třídy		
	počet pacientů	specifity
HLA-DP	6	DP1,DP11, DP20(4x)
HLA-DQ	-	-
HLA-DR	1	DR53

## **8.6 Skupina „verifikovat“**

Dále byl proveden průzkum souboru pacientů, kteří vykazovali indexy pod hodnotou stanoveného cut-off.

V HLA I. třídě bylo celkem 32 jedinců, jejichž indexy se pohybovaly v rozmezí mezi 1,5-2. Z této skupiny bylo 10 žen a 22 mužů. Z celkového počtu (32) již 16 pacientů bylo před transplantací a stejný počet po ní.

V HLA II. třídě bylo zahrnuto 37 pacientů, jejichž indexy byly v rozmezí 1,5-2,5. Z této skupiny se jednalo o 9 žen a 28 mužů, přičemž 14 pacientů bylo sledováno před transplantací a 23 po ní.

Pro účely této diplomové práce byli vybráni pacienti, kteří vykazovali indexy nejbližší stanovenému cut-off (tabulka 20) a u nich byla provedena typizace. V tabulce jsou

zeleně zvýrazněny hodnoty, které byly v typizaci negativní a červeně hodnoty, které byly pozitivní.

**Tabulka 22: Hodnoty naměřených indexů u HLA I. a HLA II. třídy u skupiny „verifikovat“**

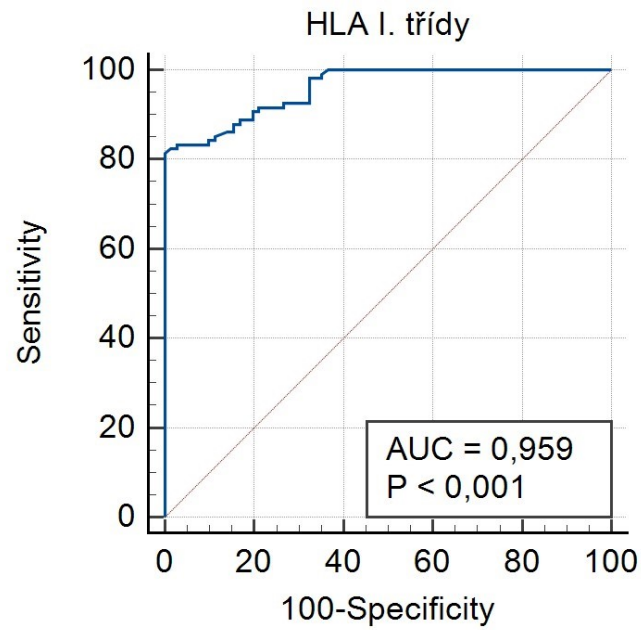
skupina „verifikovat“	
HLA I. třídy	HLA II. třídy
1,68	1,95
1,71	1,98
1,74	2
1,74	2,01
1,76	2,02
1,77	2,09
1,77	2,1
1,78	2,13
1,79	2,13
1,79	2,18
1,8	2,21
1,8	2,23
1,81	2,24
1,85	2,3
1,87	2,34
1,89	2,36
1,89	2,47
1,93	2,47
1,97	-

V HLA I. třídě vykazovalo 52,63% pacientů negativní výsledek, zbytek pacientů vykazovali slabě pozitivní MFI. V HLA II. třídě 55,5% bylo v typizaci negativní, zbytek pacientů pozitivní.

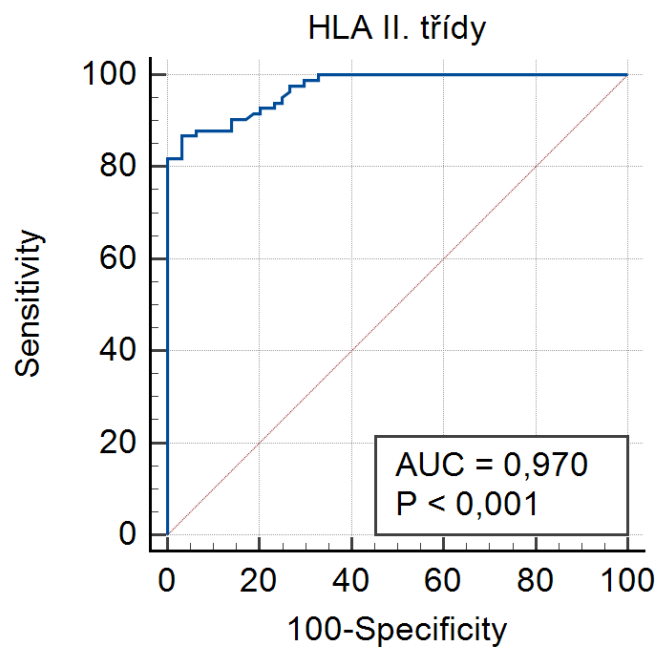
## 8.7 Celkové vyhodnocení

Pro celkové vyhodnocení diagnostického testu Luminex byla sestavena ROC křivka. Bylo zjištěno, že hodnocení anti HLA protilátek screeningovou metodou s následnou typizací protilátek má vysokou senzitivitu a specifitu. Plocha pod křivkou je u HLA I. třídy 0,95 a u HLA II. třídy 0,97.

**Graf 18: ROC křivka screeningového vyšetření protilátek v HLA I. třídě**



**Graf 19: ROC křivka screeningového vyšetření protilátek v HLA II. třídě**



## 9. DISKUSE

V rámci pozorování jasně negativní skupiny by se dalo předpokládat, že do této skupiny byli zařazeni zvláště pacienti, kteří ještě nepodstoupili transplantaci ledviny, neboť po provedeném zákroku by se dalo očekávat, že již došlo k nějaké senzibilizaci. Ze 41 pacientů bylo pouze 15 pacientů před transplantací. Pacienti, kteří byli již po transplantaci, prokázali také negativní výsledky screeningových testů a to i přes to, že u několika pacientů od jejich transplantace uplynulo i několik let. Bohužel, těchto jasně negativních pacientů bylo za celý sledovaný rok nejméně.

Skupina jasně pozitivních pacientů je ovšem nejpočetnější. V této skupině byla převážná většina pacientů po transplantaci. V rámci vyhodnocení průměrných hodnot a mediánu MFI byly u obou HLA tříd hodnoty mezi 13 000-14 000 MFI. Tyto hodnoty mohou souviset s vysokým rizikem spojeným s rejekcí transplantátu. (Česká nefrologická společnost, 2014). MFI představuje zástupný marker pro množství navázané protilátky a je ovlivněn několika faktory, včetně koncentrace protilátky v séru, ale také hustoty, konformace a orientace antigenu, stejně jako aviditou protilátky vůči příslušnému antigenu. (Lachman N, 2013) Zajímavé zjištění bylo, že při porovnání hodnot mezi muži a ženami byly průměrné hodnoty vyšší u mužů, než u žen ačkoli by se dal předpokládat opačný výsledek. Vznik HLA protilátek je následek imunizace, která u žen může vznikat během těhotenství. Avšak nelze dále opominout krevní transfuze (Choo S., 2007) a fakt, že pacienti po transplantaci dostávají imunosupresivní léčbu, která snižuje reaktivitu imunitního systému. Lachman N. (2013) uvádí, že postup imobilizace molekul HLA na kuličky mění terciární strukturu molekul odhalující neoepitopy, což může částečně vést k odchylným reakcím. V textu uvádí, že HLA protilátky byly detekovány u zdravých mužů bez klasických aloimunizačních příhod. Tyto protilátky, označované jako „přirozené“ HLA protilátky reagují na kryptické antigeny, které v přirozeném uspořádání nejsou dostupné. Spouštěč těchto protilátek je stále neznám.

Pro přehled dat byly u této četné jasně pozitivní skupiny sledovány HLA antigeny a následně jejich konkrétní specifity, proti kterým si pacienti vytvořili protilátky. V rámci HLA I. třídy nejvíce pacientů reagovalo na HLA-B antigeny – 57,8%, kde bylo

zjištěno celkem 23 různých specifit. Nejpočetněji zastoupené specifity zde byly HLA-B7 a HLA-67, které patří k nejčastěji se vyskytujícím specifitám v naší populaci - České republice. (The Allele Frequency Net Database, 2020) U HLA-A byla nejvíce zastoupená specifita HLA-A1, která patří spolu s HLA-A2 také k nejčastěji se vyskytujícím v naší populaci. Proti HLA-C reagovalo nejméně pacientů a byly zde nejvíce specifity HLA-Cw17 a HLA-Cw18. Izotyp HLA-C patří k nejméně rizikovým antigenům u transplantace, zatímco izotypy HLA-A a HLA-B patří k těm nejrizikovějším. (Krejsek J, 2016)

U HLA II. třídy vykazovalo nejvíce pacientů nejvyšší reaktivitu proti HLA-DQ – 41,2%, Nejčastější specifity zde byly HLA-DQ6 a HLA-DQ9. Tento izotyp je spojován se středním rizikem pro vznik rejekce. Druhým izotypem, proti kterému pacienti vykazovali nejvyšší hodnoty MFI je izotyp HLA-DP, kde nejvíce pacientů reagovalo na specifity HLA-DP2 a HLA-DP20, které jsou spojeny s nízkým rizikem rejekce. Naopak, nejnižší reaktivita byla pozorována vůči HLA-DR antigenům, kde nejčastěji zastoupená specifita byla HLA-DR53 dále pak HLA-DR1, HLA-DR10 a HLA-DR13. Molekuly HLA-DR patří spolu s HLA-A a HLA-B k nejrizikovějším antigenům u transplantace. (Shang W, 2016)

Dále bylo zjištěno, že z celkového počtu pozitivních pacientů si 37,8% vytvořilo donor specifické protilátky v HLA I. třídě. Ve II. třídě se jednalo o 35,7% pacientů. Tvorba protilátek proti HLA molekulám I. třídy by se dala předpokládat za častější a dostupnější, než je tomu u druhé třídy, neboť tyto antigeny se nachází na všech jaderných buňkách, oproti tomu HLA molekuly II. třídy se nachází pouze na antigen prezentujících buňkách. Podle (Krejsek J, 2004) je nejvyšší exprese HLA I. třídy na T lymfocytech, APC a buňkách epitelu, zatímco buňky ledvin nevykazují tak silnou expresi. Naopak HLA molekuly II. třídy se prakticky na buňkách ledvin nevyskytují, je však třeba brát zřetel na to, že v období zánětu může dojít ke zvýšené expresi HLA antigenů I. a II. třídy na povrchu buněk. Taktéž může dojít ke zvýšené expresi na některých buňkách, které obvykle tyto antigeny neexprimují, jako jsou právě buňky ledvin. Cytokiny mohou spustit zvýšenou nebo novou expresi HLA antigenů a za určitých podmínek je pravděpodobné, že tato nová exprese HLA antigenů hraje hlavní úlohu v patogenezi odmítnutí transplantovaného orgánu. (Javitt A, 2019) Molekuly HLA jsou extrémně polymorfní, v současnosti je u lidí dokumentováno více

než 38 909 HLA a příbuzných alel. Tato vlastnost zvyšuje šanci na senzibilizaci, ke které může dojít při expozici cizím HLA nebo jiným cizím antigenům (Tinckam K, 2006), (HLA Nomenclature, 2024)

U pacientů po transplantaci ledviny se zvláště sledují donor specifické protilátky, které představují vhodný neinvazivní biomarker k identifikaci pacientů se zvýšeným rizikem protilátkami zprostředkované rejekce. (Lachman N, 2013). Pacienti podle klinické potřeby docházejí na vyšetření, kde lze tyto protilátky sledovat v čase.

Nedílnou součástí pacientů za sledovaný rok 2023 tvoří takzvaně „šedá zóna“, pacienti, jejichž změřené hodnoty indexů se pohybují na hranici mezí positivity. V této práci byly dvě skupiny hraničních výsledků: jedna, jejíž hodnoty se pohybovaly na horní hranici (skupina „slabší index“) a druhá (skupina „verifikovat“), která se pohybuje na spodní hranici.

Pacienti, kteří vykazovali tzv. „slabší index“ byli prozkoumány v rámci toho, jakou pozitivitu (hodnotu MFI) vykazovali v typizaci. V HLA I. třídě zde bylo zařazeno 28 pacientů, kteří měli index mezi 2-3. Příznivým zjištěním zde bylo, že v typizaci LSA1 bylo 60,7% pacientů negativních, neboli mělo index pod 1500 MFI. U HLA II. třídy dokonce 63,2%. Při pozorování grafu č. 14 a graf č. 17 je patrné že změřené hodnoty MFI pro konkrétní hodnotu indexu jsou takřka individuální, ačkoli by se dalo předpokládat, že zde bude platit přímá úměra, při které by platilo, že se stoupající hodnotou indexu bude lineárně stoupat i hodnota MFI. Tyto hodnoty byly u každého indexu mezi sebou nezávislé, neboť u nich nebyla prokázána žádná statistická významnost v oblasti porovnání stavu před/po transplantaci, pohlaví nebo věku. Při pozorování anti-HLA protilátek zde nejvíce pacientů reagovalo proti HLA-B antigenům – 72,7%, obdobně jako u skupiny jasně pozitivních pacientů. V rámci HLA II. třídy nejvíce pacientů reagovalo na HLA-DP antigeny.

U skupiny „verifikovat“ byli vybráni pacienti, jejichž indexy se nejvíce blížily stanovému cut-off a byla u nich provedena typizace. V HLA I. třídě bylo 52,63% pacientů negativních a u HLA II. 55,5% pacientů negativních. Ostatní pacienti prokazovali mírnou pozitivitu. Taktéž zde byly hodnoty MFI velice náhodné a nebyla zde prokázána žádná souvislost jako tomu bylo u skupiny „slabší index“. U pacientů, kteří vykazovali mírnou pozitivitu v typizaci, lze uvažovat o tom, zda by byly stejně pozitivní výsledky získány



z čerstvého vzorku, kdy by preanalytická fáze nebyla prodloužena o několik měsíců zamražením vzorku. Topolčan O. a kol. (2013) uvádí, že u některých biomarkerů opakované rozmrazování nezmění výsledek, ale u většiny nových biomarkerů není tento vliv zjištěn.

Pro celkové zhodnocení metody Luminex, tedy zhodnocení dat všech 4 skupin pacientů byla sestavena ROC křivka. Topolčan O., a kol., 2013 ROC křivku popisují jako grafické vyjádření umožňující posoudit vypovídací schopnost diagnostického testu v závislosti na jeho senzitivitě a specificitě. Z našich výsledků bylo zjištěno, že metoda Luminex pracuje s velmi dobrou senzitivitou i specificitou. Topolčan O., a kol. 2013 dále v textu popisují, že na grafu ROC křivky by se nejlepší diagnostický test vyznačoval s největší plochou pod křivkou – AUC (Area Under Curve). Pokud by plocha byla rovná 1, byl by test ideální a měl by 100% senzitivitu i specificitu. Pokud by tato plocha pod křivkou byla například 0.5, pak není test klinicky využitelný. Hodnota naší ROC křivky je u HLA I. třídy 0,95 a u HLA II. 0,97. Toto je velmi přínosné a pozitivní zjištění.

Nicméně, šedá zóna pacientů poukazuje na to, že z popsaných výsledků je patrné, že hodnotu cut-off screeningového vyšetření tedy nelze přesně určit, neboť naměřené hodnoty MFI byly pro dané indexy obou hraničních skupin velice náhodné. Indexy pod mezní hodnotou, u skupiny „verifikovat“, u kterých by se dalo předpokládat, že v typizaci budou negativní prokazovaly slabou pozitivitu, naopak u některých pacientů ze skupiny „slabší index“, byly hodnoty indexů pozitivní a výsledek typizace byl negativní. Nelze tedy stanovit konkrétní hodnotu cut-off, avšak pro přesnější diagnostiku bych se přikláběla k redukci hodnoty cut-off u screeningového vyšetření u obou HLA tříd. Tím by se navýšilo množství pacientů, kteří by museli být typováni. Z výsledků však víme, že u skupiny „slabší index“ více než 60% pacientů vykazovalo výsledky v typizaci negativní, ačkoli jejich naměřené indexy ve screeningu byly na nízké hranici positivity. V případě snížení cut-off hodnoty indexu by docházelo k častější typizaci a procento negativních pacientů v typizaci by se pravděpodobně také trochu zvýšilo.

Screeningové vyšetření anti HLA protilátek a typizace jsou velice nákladné stanovení. V tomto případě lze uvažovat o tom, zda by nebylo přínosné upustit od screeningového testu a u všech pacientů přímo neprovádět typizační vyšetření. Screeningové vyšetření

je provedeno na kuličkách, které mají na sobě extrahované antigeny z lidských buněčných kultur, zatímco antigeny na kukličkách u typizace jsou připraveny rekombinantně. Test LSA1 a LSA2 je více specifický a lze již v něm sledovat konkrétní HLA specifity, zatímco u screeningu sledujeme pouze pozitivitu na kuličkách, která obsahuje více specifit a nelze tedy určit, o jakou konkrétní specifitu se jedná. (Picascia, A., 2012)

Ze získaných dat víme, že pacienti, kteří byli jasně negativní, tvoří nejméně zastoupenou skupinu. Za rok 2023 bylo provedeno 243 screeningových vyšetření a pouze 44 měření prokazovalo velice nízké indexy a byly zcela negativní. U skupiny „verifikovat“ měli pacienti také hodnoty indexů pod stanoveným cut-off avšak po výběru několika pacientů, u kterých se zpětně provedla typizace, také vyjadřovali určitou pozitivitu. U této skupiny běžně není prováděná typizace a tak je vyhodnocování těchto hraničních skupin velice obtížné. Proto bych se přikláněla ke snížení cut-off hodnoty obou HLA tříd nebo provádění pouze typizace, která proběhla u 53% screeningů v HLA I. třídě a v 38% v HLA II. třídě.

## 10. ZÁVĚR

V teoretické části jsem se seznámila s HLA systémem a jeho významem v oblasti transplantologie. V experimentální části jsem se zabývala analýzou protilátek proti HLA antigenům metodou Luminex. Byly zkoumány screeningové testy a také typizační vyšetření. Ve výsledcích jsem popisovala 4 skupiny pacientů podle positivity indexu ve screeningu. První skupinou byli jasně negativní pacienti, kteří měli hodnoty indexu velice nízké a tvoří bohužel nejméně početnou skupinu za rok 2023. Následně jsem sledovala pacienty, kteří vykazovali jasně pozitivní výsledky screeningového vyšetření. Těchto pacientů bylo nejvíce a byla u nich prováděna typizace. Bylo zjištěno, že nejvíce pacientů reaguje proti HLA-B antigenům v HLA I. třídě a proti HLA-DQ antigenům ve II. třídě. Procento pacientů, kteří si vytvořili DSA, nebylo ani 50%. U skupiny „slabší index“, tedy u pacientů s naměřeným nízkým, ale pozitivním indexem, bylo zjištěno, že 60% těchto pacientů bylo v následné typizaci negativní. U skupiny „verifikovat“, tedy u pacientů s naměřeným hraničním index pod stanoveným cut-off byla také v rámci této diplomové práce prováděna následná typizace a bylo zjištěno, že více, jak 50% bylo v typizaci negativní. Celkově jsem prokázala, že metoda Luminex pracuje s velmi dobrou senzitivitou a specifitou, ačkoli redukce stanovené cut-off hodnoty indexu screeningového vyšetření by přinesla přesnější výsledky, ovšem s vyššími náklady.

V diplomové práci jsou splněny všechny cíle vytyčené při jejím zadávání.

## 11. POUŽITÉ ZKRATKY

zkratka	význam zkratky	český význam
<b>ABO</b>	ABO blood group system	Krevní systém ABO
<b>ADCC</b>	Antibody dependent cellular cytotoxicity	Cytotoxicita závislá na komplementu
<b>APC</b>	Antigen presenting cells	Antigen prezentující buňky
<b>AUC</b>	Area under curve	Plocha pod křivkou
<b>BCR</b>	B cell receptor	B buněčný receptor
<b>C konec</b>	Cytoplasmic end	Cytoplazmatický konec
<b>C4</b>	Complement component C4	Složka komplementu C4
<b>C4d</b>	Degradation product of the C4 component of complement	Degradační produkt C4 složky komplementu
<b>CDC crossmatch</b>	Complement-dependent cytotoxicity	Komplement-dependentní mikrolymfocytotoxický test
<b>CDR</b>	Complementarity determining region	Oblasti určující komplementaritu
<b>CFS</b>	Compact file set	Kompaktní sada souborů
<b>CLIP</b>	Class II-associated invariant chain peptide	Peptid s invariantním řetězcem spojený s třídou II
<b>DC</b>	Dendritic cells	Dendritické buňky
<b>DSA</b>	Donor specific antibodies	Protilátky specifické pro dárce
<b>EFI</b>	European Federation for Immunogenetics	Evropská federace pro imunogenetiku
<b>Fab</b>	Fragment antigen-binding	Fragmentová oblast vázající antigen
<b>Fas</b>	Fas receptor	Fas receptor
<b>FasL</b>	Fas ligand	Fas ligand
<b>Fc</b>	Fragment crystallizable region	Oblast krystalizovatelného fragment
<b>FCXM</b>	Flow cytometry cross matching	Cross-matching průtokovou cytometrií
<b>FR</b>	Framework region	Rámcová oblast
<b>HLA</b>	Human leukocyte antigen	Systém lidských leukocytárních antigenů
<b>IgA</b>	Immunoglobulin A	Imunoglobulin A
<b>IgD</b>	Immunoglobulin D	Imunoglobulin D
<b>IgE</b>	Immunoglobulin E	Imunoglobulin E
<b>IgG</b>	Immunoglobulin G	Imunoglobulin G
<b>IgM</b>	Immunoglobulin M	Imunoglobulin M

<b>INF<math>\gamma</math></b>	Interferon gamma	Interferon gamma
<b>LSA1</b>	Labscreen single antigen HLA I	Labscreen jednotlivé antigeny HLA I
<b>LSA2</b>	Labscreen single antigen HLA II	Labscreen jednotlivé antigeny HLA II
<b>LSM</b>	Labscreen mix	Labscreen mix
<b>MFI</b>	Mean fluorescence intensity	Střední intenzita fluorescence
<b>MHC</b>	Major histocompatibility complex	Hlavní histokompatibilní systém
<b>MICA</b>	MHC class I chain-related proteins A	Proteiny A příbuzné hlavnímu histokompatibilnímu komplexu I
<b>MICB</b>	MHC class I chain-related proteins B	Proteiny B příbuzné hlavnímu histokompatibilnímu komplexu I
<b>N konec</b>	Amine end	Aminový konec
<b>NGB</b>	Normalized background ratio	Normalizovaný poměr pozadí
<b>NK</b>	Natural killer	Přirozené zabíječské buňky
<b>NKG2D</b>	Natural killer group 2 member D	Receptor NK buněk skupiny 2D
<b>NKT</b>	Natural killer T cell	Přirození zabíječi T lymfocyty
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline	Fosfátový pufr
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction	Polymerázová řetězová reakce
<b>PE</b>	Phycoerythrin	Fykoerythrin
<b>RCF</b>	Relative centrifugal force	Relativní centrifugační síla
<b>RPM</b>	Revolutions per minute	Otáčky za minutu
<b>SPI</b>	Solid phase assays	Metoda na pevné fázi
<b>Tc</b>	Cytotoxic T cells	Cytotoxický T lymfocyt
<b>TCR</b>	T cell receptor	T buněčný receptor
<b>Tfh</b>	Follicular helper T cells	Folikulární pomocný T lymfocyt
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming growth factor- $\beta$	Transformující růstový faktor- $\beta$
<b>Th1</b>	Helper T cells type 1	Pomocný T lymfocyt typu 1
<b>Th17</b>	Helper T cells type 17	Pomocný T lymfocyt typu 17
<b>Th2</b>	Helper T cells type 2	Pomocný T lymfocyt typu 2
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor alpha	Nádor nekrotizující faktor alfa
<b>Treg</b>	Regulatory T cells	Regulační T lymfocyt
<b>Tx</b>	Transplantation	Transplantace

## 12. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Aktuální počty alel a definovaných proteinů.....	24
Tabulka 2: Cut-off hodnoty pro analýzu LSM.....	42
Tabulka 3: Cut-off hodnoty pro analýzu LSA1 a LSA2 .....	42
Tabulka 4: Porovnání hodnot naměřených indexů u skupiny negativní mezi HLA I. a HLA II. třídou.....	50
Tabulka 5: Porovnání hodnot naměřených indexů HLA I. a HLA II. třídy u skupiny negativní před a po transplantaci ledviny .....	51
Tabulka 6: Porovnání hodnot naměřených indexů u HLA I. a HLA II. třídy mezi muži a ženami	52
Tabulka 7: Porovnání hodnot naměřených indexů u HLA I. a HLA II. třídy mezi věkovými kategoriemi .....	53
Tabulka 8: Porovnání pozitivivity screeningu s následnou typizací u HLA I. třídy .....	54
Tabulka 9: Porovnání pozitivivity screeningu s následnou typizací u HLA II. třídy .....	55
Tabulka 10: Porovnání hodnot indexů u HLA I. a HLA II. třídy .....	55
Tabulka 11: Porovnání hodnot MFI u HLA I. a HLA II. třídy .....	56
Tabulka 12: Porovnání hodnot indexů u HLA I. a HLA II. třídy u pacientů před a po transplantaci ledviny .....	56
Tabulka 13: Porovnání hodnot MFI u HLA I. a HLA II. třídy u pacientů před a po transplantaci ledviny .....	57
Tabulka 14: Porovnání hodnot indexů HLA I. a HLA II. třídy u mužů a žen před transplantaci ledviny .....	58
Tabulka 15: Porovnání hodnot indexů u HLA I. a HLA II. třídy u mužů a žen po transplantaci ledviny .....	58
Tabulka 16: Porovnání hodnot MFI u HLA I. a HLA II. třídy u mužů a žen před transplantaci ledviny .....	59
Tabulka 17: Porovnání hodnot indexů a MFI u HLA I. a HLA II. třídy u mužů a žen po transplantaci ledviny .....	59
Tabulka 18: Výsledky typizace u skupiny pacientů se slabším indexem u HLA I. třídy .....	65
Tabulka 19: Tabulka popisující početní zastoupení pacientů reagujících na určité HLA antigeny u HLA I. třídy.....	65
Tabulka 20: Výsledky typizace u skupiny pacientů se slabším indexem u HLA I. třídy .....	66
Tabulka 21 Tabulka popisující početní zastoupení pacientů reagujících na určité HLA antigeny u HLA II. třídy.....	67
Tabulka 22: Hodnoty naměřených indexů u HLA I. a HLA II. třídy u skupiny „verifikovat“ .....	68

## 13. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: TCR receptor .....	16
Obrázek 2: struktura HLA molekul I. a II. třídy .....	28
Obrázek 3: Princip testu Luminex .....	38
Obrázek 4: Princip testu Luminex .....	39
Obrázek 5: Akviziční gate .....	41
Obrázek 6: Labscreen mix - negativní .....	43
Obrázek 7: Labscreen mix - pozitivní .....	43
Obrázek 8: LSA1- pozitivní.....	43

## 14. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Soubor grafů před a po transplantaci ledvin u výběrových skupin.....	49
Graf 2: Porovnání hodnot naměřených indexů u skupiny negativní mezi HLA I. a HLA II. třídou.....	50
Graf 3: Porovnání hodnot naměřených indexů HLA I. a HLA II. třídy u skupiny negativní před a po transplantaci ledviny.....	51
Graf 4: Porovnání hodnot naměřených indexů u HLA I. a HLA II. třídy mezi muži a ženami .....	52
Graf 5: Porovnání hodnot naměřených indexů u HLA I. a HLA II. třídy mezi věkovými kategoriemi .....	53
Graf 6: Porovnání positivity screeningu a typizace u HLA I. a HLA II. třídy .....	54
Graf 7: Porovnání hodnot indexů a MFI u HLA I. a HLA II. třídy .....	55
Graf 8: Porovnání hodnot indexů a MFI u HLA I. a HLA II. třídy u pacientů před a po transplantaci ledviny.....	56
Graf 9: Porovnání hodnot indexů a MFI u HLA I. a HLA II. třídy u mužů a žen před a po transplantaci ledviny.....	58
Graf 10: Porovnání hodnot MFI u HLA I. a HLA II. třídy u mužů a žen před a po transplantaci ledviny.....	59
Graf 11: Soubor grafů popisují početní zastoupení pacientů reagujících na určité HLA antigeny u HLA I. třídy a dále zastoupení pacientů reagujících proti konkrétním HLA specifitám.....	61
Graf 12: Soubor grafů popisují početní zastoupení pacientů reagujících na určité HLA antigeny u HLA II. třídy a dále zastoupení pacientů reagujících proti konkrétním HLA specifitám.....	62
Graf 13: Početní zastoupení pacientů s vytvořenými HLA protilátkami, z nichž byly prokázány DSA u HLA I. a HLA II. třídy .....	63
Graf 14: Závislost vztahu naměřených hodnot indexu a MFI u HLA I. třídy.....	64
Graf 15: Početní zastoupení HLA izotypů I. třídy u skupiny slabší index.....	65
Graf 17: Závislost vztahu naměřených hodnot indexu a MFI u HLA II. třídy.....	66
Graf 18: Početní zastoupení HLA izotypů II. třídy u skupiny slabší index.....	67
Graf 20: ROC křivka screeningového vyšetření protilátek v HLA I. třídě.....	69
Graf 21: ROC křivka screeningového vyšetření protilátek v HLA II. třídě.....	69

## 15. POUŽITÁ LETERATURA

1. ALEEBRAHIM-DEHKORDI, Elahe, Bahareh MOLAVI, Melika MOKHTARI, et al., 2022. T helper type (Th1/Th2) responses to SARS-CoV-2 and influenza A (H1N1) virus: From cytokines produced to immune responses. *Transplant Immunology* [online]. 70 [cit. 2024-04-27]. ISSN 09663274. Dostupné z: doi:10.1016/j.trim.2021.101495
2. ALELIGN, Tilahun, Momina M. AHMED, Kidist BOBOSHA, Yewondwossen TADESSE, Rawleigh HOWE a Beyene PETROS, 2018. Kidney Transplantation: The Challenge of Human Leukocyte Antigen and Its Therapeutic Strategies. *Journal of Immunology Research* [online]. 2018, 1-18 [cit. 2024-04-28]. ISSN 2314-8861. Dostupné z: doi:10.1155/2018/5986740
3. BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Anna ŠEDIVÁ, 2021. *Imunodeficiency*. 3., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-271-1273-9.
4. BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK, 2011. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3533-7.
5. BENZIMRA, Mark, Greg L. CALLIGARO a Allan R. GLANVILLE, 2017. Acute rejection. *Journal of Thoracic Disease* [online]. 9(12), 5440-5457 [cit. 2024-04-27]. ISSN 20721439. Dostupné z: doi:10.21037/jtd.2017.11.83
6. BERGER, A., 2001. Science commentary: HLA typing. *BMJ* [online]. 322(7280), 218-218 [cit. 2024-04-28]. ISSN 09598138. Dostupné z: doi:10.1136/bmj.322.7280.218
7. BETTINOTTI, Maria P., Andrea A. ZACHARY a Mary S. LEFFELL, 2016. Clinically relevant interpretation of solid phase assays for HLA antibody. *Current Opinion in Organ Transplantation* [online]. 21(4), 453-458 [cit. 2024-01-02]. ISSN 1087-2418. Dostupné z: doi:10.1097/MOT.0000000000000326



8. BILLEN, E. V. A., 2011. HLA antibodies : detection and clinical relevance. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20110608eb>
9. ČESKÁ NEFROLOGICKÁ SPOLEČNOST, 2014. VYŠETŘOVÁNÍ HLA-SPECIFICKÝCH PROTILÁTEK U PACIENTŮ PŘED TRANSPLANTACÍ LEDVINY. Česká nefrologická společnost [online]. [cit. 2024-04-27]. Dostupné z: <https://www.nefrol.cz/odbornici/doporucene-postupy-cns/doporuceni-k-vysetrovani-hla-specifickych-protilatek>
10. DI MARCO, Moreno, Heiko SCHUSTER, Linus BACKERT, Michael GHOSH, Hans-Georg RAMMENSEE a Stefan STEVANOVIĆ, 2017. Unveiling the Peptide Motifs of HLA-C and HLA-G from Naturally Presented Peptides and Generation of Binding Prediction Matrices. The Journal of Immunology [online]. 2017-10-15, 199(8), 2639-2651 [cit. 2024-04-27]. ISSN 0022-1767. Dostupné z: [doi:10.4049/jimmunol.1700938](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700938)
11. FAENZA, Irene a William L. BLALOCK, 2022. Innate Immunity: A Balance between Disease and Adaption to Stress. Biomolecules [online]. 12(5) [cit. 2024-04-26]. ISSN 2218-273X. Dostupné z: [doi:10.3390/biom12050737](https://doi.org/10.3390/biom12050737)
12. FAKULTNÍ NEMOCNICE HRADEC KRÁLOVÉ, 2023. Historie první transplantace ledviny v Československu. Fakultní nemocnice Hradec Králové [online]. [cit. 2024-04-28]. Dostupné z: <https://www.fnhk.cz/mtc/historie-prvni-transplantace-ledviny-v-ceskoslovensku>
13. GANDHI, Manish J., Danielle M. CARRICK, Sarah JENKINS, et al., 2013. Lot-to-lot variability in HLA antibody screening using a multiplexed bead-based assay. Transfusion [online]. 53(9), 1940-1947 [cit. 2024-05-01]. ISSN 0041-1132. Dostupné z: [doi:10.1111/trf.12064](https://doi.org/10.1111/trf.12064)
14. HAMPLOVÁ, Lidmila, 2019. Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena pro bakalářské studium a všechny typy zdravotnických škol. 2., aktualizované vydání. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton. ISBN 978-80-7553-729-4.

15. HLA NOMENCLATURE, 2024. HLA Alleles [online]. [cit. 2024-04-28].  
Dostupné z: <https://hla.alleles.org/alleles/index.html>
16. HOFFMAN, William, Fadi G. LAKKIS a Geetha CHALASANI, 2016. B Cells, Antibodies, and More. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* [online]. 11(1), 137-154 [cit. 2024-04-26]. ISSN 1555-9041.  
Dostupné z: doi:10.2215/CJN.09430915
17. HONSOVÁ, Eva, 2015. Humorální rejekce a aktualizace Banffské klasifikace 2013. *ČESKO-SLOVENSKÁ PATOLOGIE 3* [online]. Pracoviště klinické a transplantační patologie, Transplantcentrum IKEM, 2015(1), 1 [cit. 2024-04-27]. Dostupné z: <https://www.cspatologie.cz/docs/729-abstraktCZ.pdf>
18. HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTŮŇKOVÁ, Tomáš BRDIČKA a Radek ŠPÍŠEK, 2017. *Základy imunologie*. 6., aktualizované vydání. V Praze: Stanislav Juhaňák - Triton. ISBN 978-80-7553-250-3.
19. HWANG, Jeong-Ryul, Yeongseon BYEON, Donghwan KIM a Sung-Gyoo PARK, 2020. Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development. *Experimental & Molecular Medicine* [online]. 52(5), 750-761 [cit. 2024-04-27]. ISSN 1226-3613. Dostupné z: doi:10.1038/s12276-020-0435-8
20. CHIU, Mark L., Dennis R. GOULET, Alexey TEPLYAKOV a Gary L. GILLILAND, 2019. Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies* [online]. 8(4) [cit. 2024-04-27]. ISSN 2073-4468.  
Dostupné z: doi:10.3390/antib8040055
21. CHOO, Sung Yoon, 2007. The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications. *Yonsei Medical Journal* [online]. 48(1), 11-23 [cit. 2024-01-02]. ISSN 0513-5796. Dostupné z: doi:10.3349/ymj.2007.48.1.11
22. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 2001. 5. London: Churchill Livingstone. ISBN 0-8153-3642-X.

23. JANEWAY, Charles A., Paul TRAVERS, Mark WALPORT a Mark J. SHLOMCHIK, 2001. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. 5. New York: Garland Science; 2001. ISBN 0 8153 3642 X.
24. JANKOVIČOVÁ, Karolína, 2023. Stanovení protilátek proti HLA antigenům metodou xMAP LUMINEX. Fakultní nemocnice Hradec Králové.
25. JAVITT, Aaron, Eilon BARNEA, Matthias P. KRAMER, Hila WOLF-LEVY, Yishai LEVIN, Arie ADMON a Yifat MERBL, 2019. Pro-inflammatory Cytokines Alter the Immunopeptidome Landscape by Modulation of HLA-B Expression. *Frontiers in Immunology* [online]. 2019-2-18, 10 [cit. 2024-04-28]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2019.00141
26. JÍLEK, Petr, 2019. Imunologie: stručně, jasně, přehledně. 2., doplněné vydání. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-271-0595-3.
27. KLUSSMEIER, Anja, Kathrin PUTKE, Steffen KLASBERG, et al., 2023. High population frequencies of MICA copy number variations originate from independent recombination events. *Frontiers in Immunology* [online]. 2023-11-15, 14, 1-10 [cit. 2024-01-07]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2023.1297589
28. KOORDINAČNÍ STŘEDISKO TRANSPLANTACÍ, 2019. Transplantace orgánů. Koordinační středisko transplantací [online]. [cit. 2024-04-27]. Dostupné z: <https://kst.cz/o-transplantacich/>
29. KORDULOVÁ, Pavla a Adéla REBCOVÁ, 2019. Education of patients after kidney transplantation. *Urologie pro praxi* [online]. 2019-10-10, 20(4), 191-194 [cit. 2024-01-27]. ISSN 12131768. Dostupné z: doi:10.36290/uro.2019.076
30. KREJSEK, Jan a Otakar KOPECKÝ, 2004. Klinická imunologie. [Hradec Králové]: Nucleus HK. ISBN 80-862-2550-X.
31. KREJSEK, Jan, Ctirad ANDRÝS a Irena KRČMOVÁ, 2016. Imunologie člověka. Hradec Králové: Garamon. ISBN 978-80-86472-74-4.

32. KUMAR, Brahma V., Thomas J. CONNORS a Donna L. FARBER, 2018. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity* [online]. 48(2), 202-213 [cit. 2024-04-26]. ISSN 10747613. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2018.01.007
33. LACHMANN, Nils, Kremena TODOROVA, Harald SCHULZE a Constanze SCHÖNEMANN, 2013. Luminex® and Its Applications for Solid Organ Transplantation, Hematopoietic Stem Cell Transplantation, and Transfusion<sup>\*</sup>. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* [online]. 2013-6-11, 40(3), 182-189 [cit. 2024-01-02]. ISSN 1660-3796. Dostupné z: doi:10.1159/000351459
34. LACHMANN, Nils, Kremena TODOROVA, Harald SCHULZE a Constanze SCHÖNEMANN, 2013. Luminex® and Its Applications for Solid Organ Transplantation, Hematopoietic Stem Cell Transplantation, and Transfusion<sup>\*</sup>. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* [online]. 2013-6-11, 40(3), 182-189 [cit. 2024-04-28]. ISSN 1660-3796. Dostupné z: doi:10.1159/000351459
35. MADDEN, Kathleen a Devon CHABOT-RICHARDS, 2019. HLA testing in the molecular diagnostic laboratory. *Virchows Archiv* [online]. 474(2), 139-147 [cit. 2024-04-27]. ISSN 0945-6317. Dostupné z: doi:10.1007/s00428-018-2501-3
36. MALHOTRA, Divyanshu a Priyanka JETHWANI, 2023. Preventing Rejection of the Kidney Transplant. *Journal of Clinical Medicine* [online]. 12(18) [cit. 2024-04-28]. ISSN 2077-0383. Dostupné z: doi:10.3390/jcm12185938
37. MANDAL, Ananya, 2022. What is an Antibody? *News-Medical.Net* [online]. [cit. 2024-01-07]. Dostupné z: <https://www.news-medical.net/health/What-is-an-Antibody.aspx>
38. MARTINS, Yuri Chaves, Flávia Lima RIBEIRO-GOMES a Cláudio Tadeu DANIEL-RIBEIRO, 2023. A short history of innate immunity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* [online]. 118 [cit. 2024-04-26]. ISSN 1678-8060. Dostupné z: doi:10.1590/0074-02760230023

39. MCKENZIE, Samuel a Tomislav MEŠTROVIĆ, 2019. Flow Cytometry Cross-matching (FCXM). News-Medical.net [online]. [cit. 2024-01-03]. Dostupné z: [https://www.news-medical.net/life-sciences/Flow-Cytometry-Cross-matching-\(FCXM\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/Flow-Cytometry-Cross-matching-(FCXM).aspx)
40. MEDHASI, Sadeep, Narisara CHANTRATITA a Cinzia CICCACCI, 2022. Human Leukocyte Antigen (HLA) System: Genetics and Association with Bacterial and Viral Infections. Journal of Immunology Research [online]. 2022-5-26, 2022(15), 1-15 [cit. 2024-01-02]. ISSN 2314-7156. Dostupné z: [doi:10.1155/2022/9710376](https://doi.org/10.1155/2022/9710376)
41. MEHROTRA, Anita, Jeremy LEVENTHAL, Carolina PURROY a Paolo CRAVEDI, 2015. Monitoring T cell alloreactivity. Transplantation Reviews [online]. 29(2), 53-59 [cit. 2024-04-27]. ISSN 0955470X. Dostupné z: [doi:10.1016/j.trre.2014.11.001](https://doi.org/10.1016/j.trre.2014.11.001)
42. MEI, Shutao, Fuyi LI, André LEIER, et al., 2020. A comprehensive review and performance evaluation of bioinformatics tools for HLA class I peptide-binding prediction. Briefings in Bioinformatics [online]. 2020-07-15, 21(4), 1119-1135 [cit. 2024-04-27]. ISSN 1477-4054. Dostupné z: [doi:10.1093/bib/bbz051](https://doi.org/10.1093/bib/bbz051)
43. MOREAU, A., E. VAREY, I. ANEGON a M.-C. CUTURI, 2013. Effector Mechanisms of Rejection. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine [online]. 2013-11-01, 3(11), a015461-a015461 [cit. 2024-01-02]. ISSN 2157-1422. Dostupné z: [doi:10.1101/cshperspect.a015461](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015461)
44. MUÑIZ-CASTRILLO, Sergio, Alberto VOGRIG a Jérôme HONNORAT, 2020. Associations between HLA and autoimmune neurological diseases with autoantibodies. Autoimmunity Highlights [online]. 11(1) [cit. 2024-04-27]. ISSN 2038-0305. Dostupné z: [doi:10.1186/s13317-019-0124-6](https://doi.org/10.1186/s13317-019-0124-6)
45. NICKELEIT, V., 2003. Kidney transplants, antibodies and rejection: is C4d a magic marker? Nephrology Dialysis Transplantation [online]. 2003-11-01, 18(11), 2232-2239 [cit. 2024-04-27]. ISSN 1460-2385. Dostupné z: [doi:10.1093/ndt/gfg304](https://doi.org/10.1093/ndt/gfg304)

46. NURIEVA, Roza I., Xindong LIU a Chen DONG, 2011. Molecular mechanisms of T-cell tolerance. *Immunological Reviews* [online]. 241(1), 133-144 [cit. 2024-04-26]. ISSN 0105-2896. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01012.x
47. PAI, Joy A. a Ansuman T. SATPATHY, 2021. High-throughput and single-cell T cell receptor sequencing technologies. *Nature Methods* [online]. 18(8), 881-892 [cit. 2024-04-27]. ISSN 1548-7091. Dostupné z: doi:10.1038/s41592-021-01201-8
48. PERDUE, Samuel Scott a John H. HUMPHREY, 2023. Activation of T and B lymphocytes. *Encyclopædia Britannica, Inc.* [online]. [cit. 2024-01-02]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/immune-system/Activation-of-T-and-B-lymphocytes>
49. PETZL-ERLER, Maria Luiza, 2020. Beyond the HLA polymorphism: A complex pattern of genetic susceptibility to pemphigus. *Genetics and Molecular Biology* [online]. 43(3) [cit. 2024-04-27]. ISSN 1678-4685. Dostupné z: doi:10.1590/1678-4685-gmb-2019-0369
50. PICASCIA, Antonietta, Teresa INFANTE a Claudio NAPOLI, 2012. Luminex and antibody detection in kidney transplantation. *Clinical and Experimental Nephrology* [online]. 16(3), 373-381 [cit. 2024-04-28]. ISSN 1342-1751. Dostupné z: doi:10.1007/s10157-012-0635-1
51. R&D SYSTEMS, INC. ALL RIGHTS RESERVED, 2023. What is a Luminex® Assay? R&D Systems, Inc. All Rights Reserved [online]. [cit. 2024-04-27]. Dostupné z: <https://www.rndsystems.com/what-luminex-assay>
52. RAPID NOVOR, INC, 2023. Antibody Affinity and Avidity – The Strength of a Single Interaction Versus a Multivalent Interaction. GORSHTAIN, Genya. Rapid Novor, Inc [online]. [cit. 2024-01-07]. Dostupné z: <https://www.rapidnovor.com/antibody-affinity-and-avidity-single-interaction-vs-multivalent-interaction/>

53. RASKOV, Hans, Adile ORHAN, Jan Pravsgaard CHRISTENSEN a Ismail GÖGENUR, 2021. Cytotoxic CD8 T cells in cancer and cancer immunotherapy. *British Journal of Cancer* [online]. 2021-01-19, 124(2), 359-367 [cit. 2024-04-27]. ISSN 0007-0920. Dostupné z: doi:10.1038/s41416-020-01048-4
54. RASTOGI, Ichwaku, Donghwan JEON, Jena E. MOSEMAN, Anusha MURALIDHAR, Hemanth K. POTLURI a Douglas G. MCNEEL, 2022. Role of B cells as antigen presenting cells. *Frontiers in Immunology* [online]. 2022-9-8, 13 [cit. 2024-04-27]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2022.954936
55. REINDL-SCHWAIGHOFER, Roman, Andreas HEINZEL, Guido A. GUALDONI, Laurent MESNARD, Frans H.J. CLAAS a Rainer OBERBAUER, 2019. Novel insights into non-HLA alloimmunity in kidney transplantation. *Transplant International* [online]. 2019-12-16, 33(1), 5-17 [cit. 2024-04-28]. ISSN 0934-0874. Dostupné z: doi:10.1111/tri.13546
56. ŘEHÁČEK, Vít a Jiří MASOPUST, 2013. *Transfuzní lékařství*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4534-3.
57. SCIENTIFIC KNOWLEDGE, 2021. What Is HLA Typing and How Is It Performed? *Cytologics* — All rights reserved. [online]. [cit. 2024-01-02]. Dostupné z: <https://cytologicsbio.com/what-is-hla-typing-and-how-is-it-performed/>
58. SHAH, Kinjal, Amr AL-HAIDARI, Jianmin SUN a Julhash U. KAZI, 2021. T cell receptor (TCR) signaling in health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy* [online]. 6(1) [cit. 2024-04-27]. ISSN 2059-3635. Dostupné z: doi:10.1038/s41392-021-00823-w

59. SHANG, Wenjun, Yuefeng SHEN, Shilin GAO, Guiwen FENG, Yonghua FENG, Zhigang WANG, Xiaobai ZHANG a Fengfeng ZHOU, 2016. Comparison of HLA-A, -B and -DRB1 Loci Polymorphism between Kidney Transplants of Uremia Patients and Healthy Individuals in Central China. PLOS ONE [online]. 2016-10-25, 11(10) [cit. 2024-04-28]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0165426
60. SHI, Huiping a Bojing SHAO, 2023. LFA-1 Activation in T-Cell Migration and Immunological Synapse Formation. Cells [online]. 12(8) [cit. 2024-04-27]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells12081136
61. SCHROEDER, Harry W. a Lisa CAVACINI, 2010. Structure and function of immunoglobulins. Journal of Allergy and Clinical Immunology [online]. 125(2), S41-S52 [cit. 2024-01-07]. ISSN 00916749. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaci.2009.09.046
62. STEPHENS, Henry A.F., 2001. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? Trends in Immunology [online]. 22(7), 378-385 [cit. 2024-01-07]. Dostupné z: doi:doi.org/10.1016/S1471-4906(01)01960-3
63. SÜSAL, Caner, Gerhard OPELZ a Christian MORATH, 2013. Role and Value of Luminex®-Detected HLA Antibodies before and after Kidney Transplantation. Transfusion Medicine and Hemotherapy [online]. 2013-6-11, 40(3), 190-195 [cit. 2024-01-02]. ISSN 1660-3796. Dostupné z: doi:10.1159/000351314
64. TAIT, Brian D., 2016. Detection of HLA Antibodies in Organ Transplant Recipients – Triumphs and Challenges of the Solid Phase Bead Assay. Frontiers in Immunology [online]. 2016-12-09, 7 [cit. 2024-01-02]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2016.00570
65. TAMBUR, Anat R. a Chris WIEBE, 2018. HLA Diagnostics. Transplantation [online]. 102(1S), S23-S30 [cit. 2024-04-27]. ISSN 0041-1337. Dostupné z: doi:10.1097/TP.0000000000001817
66. THE ALLELE FREQUENCY NET DATABASE, 2020. HLA Alleles [online]. [cit. 2024-04-28]. Dostupné z: <https://www.allelefrequencies.net/default.asp>



67. TINCKAM, Kathryn J. a Anil CHANDRAKER, 2006. Mechanisms and Role of HLA and non-HLA Alloantibodies. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* [online]. 1(3), 404-414 [cit. 2024-01-02]. ISSN 1555-9041. Dostupné z: doi:10.2215/CJN.00270106
68. TITTARELLI, Andrés, Mariela NAVARRETE, María Alejandra GLEISNER, Peter GEBICKE-HAERTER a Flavio SALAZAR-ONFRAY, 2020. Connexin-Mediated Signaling at the Immunological Synapse. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 21(10) [cit. 2024-04-27]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21103736
69. TOPOLČAN, Ondřej, Marie KARLÍKOVÁ, Vladimír BARTOŠ, Radek KUČERA, Kristián ŠAFAŘÍK a Jindra WINDRICHOVÁ, 2013. Principy imunoanalytických metod pro mediky [online]. [cit. 2024-04-28]. Dostupné z: <https://oid.fnplzen.cz/sites//users/oid/skripta%20Principy%20imunoanalytick%C3%BDch%20metod%20%282%29.pdf>
70. WANG, Jeffrey H., Melissa A. SKEANS a Ajay K. ISRANI, 2016. Current Status of Kidney Transplant Outcomes: Dying to Survive. *Advances in Chronic Kidney Disease* [online]. 23(5), 281-286 [cit. 2024-04-27]. ISSN 15485595. Dostupné z: doi:10.1053/j.ackd.2016.07.001
71. WEISBERG, Stuart P., Basak B. URAL a Donna L. FARBER, 2021. Tissue-specific immunity for a changing world. *Cell* [online]. 184(6), 1517-1529 [cit. 2024-04-26]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2021.01.042
72. WIECZOREK, Marek, Esam T. ABUALROUS, Jana STICHT, Miguel ÁLVARO-BENITO, Sebastian STOLZENBERG, Frank NOÉ a Christian FREUND, 2017. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Frontiers in Immunology* [online]. 2017-03-17, 8 [cit. 2024-04-27]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2017.00292

73. XING, Y. a K. A. HOGQUIST, 2012. T-Cell Tolerance: Central and Peripheral. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology [online]. 2012-06-01, 4(6), a006957-a006957 [cit. 2024-04-26]. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a006957
74. ZHANG, Rubin, 2018. Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplant Recipients. Clinical Journal of the American Society of Nephrology [online]. 13(1), 182-192 [cit. 2024-01-02]. ISSN 1555-9041. Dostupné z: doi:10.2215/CJN.00700117