

Detekce anti-HLA protilátek pomocí metody Luminex®

Eng HS, Bennett G, Tsiopelas E, et al. Anti-HLA donor-specific antibodies detected in positive B-cell crossmatches by Luminex® predict late graft loss. Am J Transplant 2008;8:2335–2342.

Lymfocytotoxický cross-match (komplement-dependentní CDC) je běžně používanou metodou pro detekci dárcovských specifických anti-HLA protilátek po transplantacích. Přítomnost těchto protilátek před transplantací vede ke vzniku hyperakutní rejekce s následnou ztrátou štěpu. V současnosti jsou již používá-

ny i citlivější metody než CDC cross-match. Luminex® je metoda využívající navázané HLA glykoproteiny na pevnou matrix a vazba protilátek je prokázána průtokovou cytometrií s dvojitým laserem. Luminex® má větší specifitu než CDC cross-match a není ovlivněn přítomností non-HLA protilátek, autoreaktivních protilátek nebo lymfocytotoxických protilátek (například ATG).

Pozitivní T lymfocytární CDC cross-match (TXM) prokazuje protilátky proti antigenům HLA I. třídy a představuje kontraindikaci provedení transplantace. Na druhou stranu pozitivní B lymfocytární cross-match (BXM) je odrazem přítomnosti protilátek proti antigenům HLA II. třídy nebo nízkých koncentrací protilátek proti antigenům HLA I. třídy. Negativní CDC cross-match snižuje

je významně riziko hyperakutní rejekce, ale i pokud je negativní, může se vyvinout časná akutní rejekce zprostředkovaná protilátkami, takže je možné, že CDC cross-match není schopen zachytit přítomnost nízkých koncentrací anti-HLA protilátek. Klinický význam T⁺ B⁺ CDC cross-match tak zatím není jasná. Cílem této komentované práce bylo pomocí metody Luminex® vyšetřit původ anti-HLA protilátek a osudy štěpů v případě, kdy nemocní podstoupili transplantaci ledviny při negativním TXM, ale pozitivním BXM.

Autoři analyzovali soubor 471 nemocných po transplantaci ledviny z let 1987–2005 v malém transplantačním centru v jihoaustralském Adelaide. Studovaný soubor tvořili nemocní, kteří měli T⁺ B⁺ CDC cross-match, kontrolní soubor pak pacienti s T⁺ B⁺ CDC cross-match.

Z uvedených 471 nemocných bylo 85 transplantováno přes T⁺ B⁺ CDC cross-match, jak bylo zjištěno vyšetřením aktuálních sér nemocných. Z těchto nemocných mělo 59 % (n = 50) vyšší frekvenci protilátek proti panelu (PRA > 10 %). Podobně skupina T⁺ B⁺ měla vyšší frekvence protilátek proti panelu oproti kontrolní skupině a rovněž v ní bylo zastoupeno více původních domorodých obyvatel Austrálie.

V této práci nebyli vyšetřováni nemocní s humorální rejekcí, protože tyto metody byly k dispozici v centru v Adelaide až v roce 2005. Výskyt akutních rejekcí v souboru byl 36 % v kontrolní skupině a 42 % ve sledované skupině. Autoři pozorovali vyšší výskyt vaskulárních rejekcí ve skupině T⁺ B⁺ CDC cross-match. Pomocí metody Luminex® bylo zjištěno, že nemocní ve skupině T⁺ B⁺ cross-match měli protilátky bez přítomnosti IgG anti-HLA (n = 30), s protilátkami IgG bez dárcovské specifity (n = 21) a konečně s dárcovsky specifickými anti-HLA protilátkami (n = 27). První dvě skupiny měly stejný výskyt rejekcí jako v kontrolní skupině, nemocní s dárcovsky specifickými protilátkami měli rejekce častější (41 % vs. 36 %). Dárcovsky specifické protilátky byly také rizikem pro vznik vaskulární rejekce. Autoři nepozorovali žádné rozdíly ve funkci transplantované ledviny ve skupině sledované a kontrolní. Celkové přežití štěpů bylo 88 % v prvním roce, 80 % ve třetím roce a 70 % v pátém roce po transplantaci ledviny. Přežití štěpů ve skupině kontrolní a sledované (T⁺ B⁺) bylo podobné. Rozdíly ale byly pozorovány mezi skupinami podle specifity protilátek uvnitř sledovaného souboru. Nemocní s dárcovsky specifickými protilátkami měli významně vyšší výskyt ztrát štěpů oproti kontrolní skupině (44 % vs. 27 %), jednorocní přežití štěpů bylo pouze 80 % a 58 % v pátém roce. Relativní riziko ztráty štěpu do pěti let bylo v této skupině 1,8 oproti kontrolní skupině. Dále autoři zjistili, že pozitivní prediktivní hodnota B⁺ cross-match na ztrátu štěpu byla 34 % a negativní prediktivní hodnota byla 69 %.

Tato studie prokázala, že protilátky odpovědné za B⁺ cross-match jsou heterogenní. Pouze jedna třetina z B⁺ cross-match byla způsobena dárcovsky specifickými protilátkami a tato podskupina byla spojena s horšími výsledky. Daleko lepší interpretaci významu B⁺ cross-match poskytuje vyšetření specifity protilátek pomocí metody Luminex®.

■ KOMENTÁŘ

Doc. MUDr. Ondřej Viklický, CSc.

Protilátková teorie rejekcí se v posledních třech letech stala ústředním tématem vědeckých diskusí transplantologů. I když Patel a Terasaki předpovídali ústřední roli dárcovsky specifických protilátek na osud štěpu již před více než 40 lety (Patel et al., 1969), byla jimi vysvětlována tzv. hyperakutní rejekce. Buněčná teorie se následně stala ústředním dogmatem transplantační imunologie,

a také imunosupresivní terapie bylo vždy cílena pouze na lymfocyty T a jejich produkty. Teprve poznání, že se dlouhodobé výsledky transplantací bez ohledu na výborné jednorocní výsledky významně nezměnily, vedlo k intenzivnímu výzkumu chronických změn v transplantované ledvině. Opuštění nespecifického pojmu chronická nefropatie štěpu a zavedení humorálních rejekcí (zprostředkovaných protilátkami) do Banffské klasifikace bylo vlastně připuštěním faktu, že kromě rejekcí zprostředkovaných lymfocyty T existují také rejekce zprostředkované protilátkami, a to jak akutní, tak chronické. Blíže se o změnách provedených v Banffské klasifikaci dočte čtenář v Perspektivách v úvodu tohoto čísla. Tak jak pokračuje výzkum patogeneze a klinického významu humorálních rejekcí, věnuje se pozornost nejenom detekci humorální rejekce, ale rovněž detekci jednotlivých protilátek odpovědných za humorální rejekci. Banffská klasifikace definuje chronickou rejekci zprostředkovanou protilátkami jako přítomnost morfologických kritérií a zachycení dárcovsky specifických protilátek spolu se známkami dysfunkce štěpu. V současnosti se ukazuje, že protilátek, které mohou hrát roli v poškození štěpu, je celá řada, od protilátek proti endotelu po nespecifické anti-HLA protilátky až po dárcovsky specifické anti-HLA protilátky.

Komentovaná práce ukázala, že jedině výskyt posledních z nich, a to i v malém množství, které nelze zachytit klasickým cross-match před transplantací (T⁺ cross-match a následně vyšetřením B⁺ cross-match), hraje svoji významnou roli pro přežití štěpů a výskyt závažných vaskulárních rejekcí. Tato práce nevyšetřovala přítomnost protilátek po transplantaci a rovněž v ní autoři vůbec nevyšetřili biotický materiál na přítomnost C4d, který odráží humorální rejekci. To je největší nedostatek této studie a bylo by jistě žádoucí ověřit, zda vaskulární rejekce byly ve skutečnosti také C4d pozitivní. Stejně tak by bylo zajímavé vědět, jaký byl výskyt chronických změn v protokolárních biopsiích. Bohužel tato vyšetření provedena nebyla.

Ale i tak je tato práce velmi přínosná. Ukazuje nám, že se nelze spokojit pouze s jednou metodou vyšetření klasického CDC cross-match, a rovněž ukazuje na klinickou nepoužitelnost výsledku B lymfocytárního cross-match. Jedině rychlé plošné zavedení nových technik, jakým je například Luminex®, do rutinní klinické praxe umožní vyjádřit se ke klinickému významu protilátek pomocí technik cross-match v době transplantace.

Metoda Luminex® (Ozawa et al., 2007) může přispět k monitoraci výskytu dárcovsky specifických protilátek po transplantaci. To je velmi důležité před případnou nežádoucí redukcí imunosuprese. Dnes víme, že se dárcovsky specifické protilátky mohou objevit kdykoli po transplantaci a jsou vždy spojeny s rizikem následné ztráty štěpu pro chronickou, protilátkami zprostředkovanou rejekci.

Metody cross-match předpokládají archivaci lymfocytů dárce, což není metoda praktická pro dvacetileté sledování. Hlavním problémem je jako vždy cena vyšetření. Je ale možno soudit, že s odstupem bude možno vyšetřovat všechny nemocné s rizikem rejekce zprostředkované protilátkami ve všech transplantačních centrech v České republice; koneckonců rozšiřující se povědomí o humorálních rejekcích nakonec vedlo i k zajištění vyšetření přítomnosti C4d složky komplementu v biopsiích ve většině z nich.

Literatura

- Ozawa M, Terasaki PI, Lee JH, et al. 14th International HLA and Immunogenetics Workshop: report on the Prospective Chronic Rejection Project. Tissue Antigens 2007;69(Suppl 1):174–179.
- Patel R, Terasaki P. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. N Engl J Med 1969;280:735–739.