

Received: 2009.05.29  
Accepted: 2009.08.31  
Published: 2009.09.21

## Znaczenie diagnostyczne swoistych aloprzeciwciał anty-HLA u chorych przed i po transplantacji nerek. Programy dla wysoko zimmunizowanych

Diagnostic value of specific anti-HLA alloantibodies before and after renal transplantation. Programs for highly sensitized recipients

Hanna Zielińska<sup>1</sup>, Maciej Zieliński<sup>1</sup>, Grażyna Moszkowska<sup>1</sup>,  
Alicja Dębska-Ślizień<sup>2</sup>, Magdalena Maria Jankowska<sup>2</sup>,  
Bolesław Rutkowski<sup>2</sup>, Piotr Trzonkowski<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zakład Immunologii Klinicznej i Transplantologii, Gdański Uniwersytet Medyczny

<sup>2</sup> Katedra i Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, Gdański Uniwersytet Medyczny

### Streszczenie

Obecność swoistych aloprzeciwciał anty-HLA u chorego oczekującego na przeszczep nerki jest główną barierą zabiegu transplantacji. Brak odpowiednich dawców dla wysoko zimmunizowanych pacjentów powoduje, że okres oczekiwania na przeszczep jest znacznie dłuższy, co przekłada się na niski odsetek przeszczepów w tej grupie. Przeszczep dla pacjenta zimmunizowanego jest też obciążony większym ryzykiem powikłań. Aby zwiększyć dostęp tym pacjentom do transplantacji powstało wiele programów. Postęp w zakresie możliwości określania HLA-akceptowalnych niezgodności umożliwił znaczny rozwój programów dla nich, z których już wdrożone (ET-AMP, UNOS, algorytm Emory) przynoszą bardzo dobre rezultaty zwiększając zarówno dostęp do przeszczepu jak i jego przeżycie. Odrębny problem stanowi humoralny aspekt procesu odrzucania. Wykazano silny związek między odrzucaniem a obecnością aloprzeciwciał – zarówno w okresie okołoprzeszczepowym, jak i długo po przeszczepie (chronic allograft nephropathy – CAN). Stąd wydaje się, że niewystarczające jest ograniczenie badań diagnostycznych z zakresu wykrywania aloprzeciwciał anty-HLA jedynie do okresu przedtransplantacyjnego, jak to się dzieje obecnie. Monitorowanie aloprzeciwciał może stanowić doskonały wskaźnik prognostyczny dla funkcjonowania przeszczepu, a narastanie miana może wyprzedzać inne objawy umożliwiając szybką interwencję.

### Słowa kluczowe:

transplantacja nerki • swoiste aloprzeciwciała anty-HLA • programy dla wysoko zimmunizowanych • oznaczanie aloprzeciwciał • odrzucanie zależne od przeciwciał • odrzucanie humoralne

### Summary

Anti-HLA alloantibodies are the main barrier in kidney transplantation. Lack of appropriate donors for highly sensitized (HS) recipients makes access to transplantation very difficult and results in a significant increase in both the time on the waiting list and the number of post-transplant complications in these patients. The transplantation itself is also associated with higher risk in the HS. There are many programs aimed at increasing access to renal transplantation for

this group of recipients. It is noteworthy that new acceptable HLA-mismatches allowed significant progress in programs for HS recipients. Currently implemented programs (ET-AMP, UNOS, Emory algorithm) proved useful as they increased access to transplantation and graft survival in HS patients. Nevertheless, even with these programs there is still the problem of humoral rejection in these patients. The strong correlation between donor-specific antibodies (DSA) and graft rejection seen both immediately after transplantation and in long-term complications such as CAN (chronic allograft nephropathy) may be the simplest explanation for this effect. Hence the assessment of alloantibodies limited to the pre-transplant period, which is nowadays routine, seems insufficient. Current evidence suggests that early detection of post-transplant DSA may be an excellent prognostic marker of graft function and may allow implementing the necessary treatment prior to rejection.

**Key words:** Renal transplantation • specific anti-HLA alloantibodies • programs for highly sensitized recipients • alloantibody assay • antibody-dependent graft rejection • humoral rejection

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=894846>

**Word count:** 6272

**Tables:** 2

**Figures:** 2

**References:** 85

**Adres autorki:** mgr Hanna Zielińska, Zakład Immunologii Klinicznej i Transplantologii, Gdański Uniwersytet Medyczny, ul. Dębinki 7, 80-952 Gdańsk; e-mail: hzielinska@ack.gdansk.pl

## 1. WPROWADZENIE

Wśród przyczyn odrzucania alop przeszczepu jako podstawowe określa się czynniki immunologiczne, tj. niezgodność antygenów transplantacyjnych HLA i wcześniejsze uczulenie biorców. Obecność swoistych alop przeciwciał anti-HLA to zasadniczy wykładnik tego uczulenia, który u chorych oczekujących na przeszczep jest główną przyczyną niepowodzenia zabiegu przeszczepienia. Problem dotyczy zarówno pacjentów, którzy oczekują na pierwszy przeszczep, jak i na kolejne. Szanse na przeszczep dla wysoko zimmunizowanego chorego są drastycznie mniejsze w porównaniu do biorcy, u którego nie obserwuje się alop przeciwciał. Efektem jest często wieloletni okres oczekiwania na przeszczep i znacząco wyższe koszty leczenia (wydłużony czas dializ, leczenie powikłań) [10,11]. Słabo rozwinięta diagnostyka immunizowanych chorych potęguje niepewność rezultatu zabiegu transplantacji. Wśród uczulonych chorych przeszczepianych w głównej mierze na podstawie ujemnej próby krzyżowej obserwuje się prawie dwukrotnie krótsze przeżycie przeszczepu w porównaniu do biorców niezimmunizowanych [73]. Wynik ten można znacząco poprawić stosując nowoczesne techniki badawcze i specjalne programy. Badania ostatnich lat wykazują skuteczność już wdrożonych programów przeszczepiania uczulonych biorców na świecie. W oparciu o diagnostykę wykorzystującą analizę swoistości alop przeciwciał u biorcy i dobór na tej podstawie dawcy można wydłużyć czas przeżycia przeszczepu tak, iż jest on zbliżony do czasu przeżycia po transplantacji nieobarczonej ryzykiem. Skuteczne postępowanie z uczulonymi biorcami pozwala obniżyć ich liczbę na liście oczekujących jak i poprawić dostęp do przeszczepu.

Odrębnym problemem jest diagnostyka postransplantacyjna, określająca swoistą odpowiedź biorcy na antygeny

konkretnego przeszczepu. Liczne badania wykazują, że monitorowanie swoistych alop przeciwciał przeciw antygenom dawcy może być wysoce użytecznym wskaźnikiem prognostycznym funkcjonowania przeszczepu.

## 2. PROBLEM ALOIMMUNIZACJI

Antygeny układu HLA należą do jednych z najsilniej uczulających. W przybliżeniu, pojedyncza komórka APC prezentująca obcy antygen HLA aktywuje 1/100 do 1000 (1–10%) naiwnych limfocytów T. Dla porównania, na ekspozycję cząstek wirusa lub innych uczulających peptydów odpowiada tylko 1/200 000 nieimmunizowanych limfocytów [8,70]. Pojęcie immunizacji zgłoszonego do przeszczepu oznacza najczęściej obecność preformowanych przeciwciał przeciwko antygenom HLA klasy I (najczęściej HLA-A, -B i/lub II (HLA-DR) [10]. Rzadziej, odrzucanie zależne od przeciwciał może być powodowane alop przeciwciałami anti-MICA, anti-MICB, anti-endotelium [19]. Do aloimmunizacji, tj. uczulenia na antygeny własnego gatunku, najczęściej dochodzi podczas transfuzji. U 10% chorych wytwarzają się przeciwciała anti-HLA już po pierwszej transfuzji, po wielokrotnych odsetek sięga 70%. Warto tu podkreślić, że tylko filtrowanie preparatu krwiopochodnego zabezpiecza przez aloimmunizacją. Naświetlanie zapobiega jedynie proliferacji limfocytów pasażerskich, a tym samym uzasadnione jest jedynie w przypadkach zagrożenia wystąpieniem reakcji TA-GVHD (poprzetoczeniowa reakcja przeszczep przeciwko gospodarzowi). Wśród innych aloimmunizacji należy wymienić przebyte poronienia i ciąże. Uważa się, że około 5% kobiet zostaje zimmunizowanych antygenami HLA ojca dziecka. Pozostałe to uogólnione infekcje poprzedzające przeszczep. Prowadzą one do uczulenia około 10% chorych na zasadzie mimikry molekularnej czyli podobieństwa antygenów patogenu i antygenów przeszczepionego narządu [10]. Na podobnej



zasadzie może dojść do spontanicznego odrzucenia przeszczepionego narządu w reakcji komórkowej. Mechanizm opiera się na indukowanej przebytymi zakażeniami wirusowymi aloreaktywnej odpowiedzi cytotoksycznych limfocytów T. W tym wypadku, ponowne zakażenie danym wirusem biorcy alogenicznego przeszczepu może spowodować zniszczenie przeszczepu przez jego własne limfocyty. Ponowne zakażenie wirusem, którego struktury antygenowe zbliżone są do antygenów przeszczepu powoduje równoległą odpowiedź gospodarza, zarówno przeciwwirusową, jak i skierowaną przeciwko antygenom przeszczepu. Mechanizm odporności heterologicznej (heterologous immunity) uważany jest za jedną z barier w indukcji swoistej tolerancji przeszczepu [1].

Przeciwdziałanie aloimmunizacji jest niezwykle istotne, gdyż nawet po jednokrotnym zetknięciu z aloantygenem HLA komórki pamięci mogą zachować gotowość do odpowiedzi wtórnej wiele lat po ekspozycji na antygen, wedle niektórych doniesień nawet przez cały okres życia organizmu [14]. Tym samym ujemny wynik próby krzyżowej zimmunizowanego wcześniej biorcy z potencjalnym dawcą nie wyklucza zwiększonego ryzyka takiej transplantacji, zwłaszcza jeśli próba krzyżowa przeprowadzana jest metodą serologiczną w cytotoksyczności zależnej od dopełniacza (complement dependent cytotoxicity cross-match – CDC CM).

Stopień zimmunizowania, tj. obecność aloprzeciwciał w surowicy ocenia się za pomocą parametru PRA (panel reactive antibodies). Szczegóły tego testu zostaną omówione w dalszej części pracy. W zależności od poziomu PRA, pacjentów można podzielić na nisko zimmunizowanych (PRA<10%), średnio (PRA10–80%) i wysoko zimmunizowanych (PRA>80%).

Problem zimmunizowanych dotyczy znacznej liczby biorców nerek, szacuje się, że jest to średnio 20–30% pacjentów. W USA na przeszczep oczekuje prawie 78 000 pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek, z czego w 2008 r. przeprowadzono 18 000 transplantacji. Dostęp do przeszczepu dla osób immunizowanych jest znacznie mniejszy, mimo że stanowią około 1/3 listy oczekujących, co-roczenie otrzymują tylko 15% przeszczepionych nerek od zmarłych dawców. Zimmunizowani wysoko (PRA>80%) otrzymują mniej niż 5% przeszczepów [3,77]. Czas oczekiwania na przeszczep wysoko zimmunizowanego biorcy (PRA >80%) jest średnio o 1563 dni (4,3 roku) dłuższy od średniego [58]. W Wielkiej Brytanii zimmunizowani stanowią 23% listy oczekujących, a większość (52%) stanowią zgłoszeni do kolejnej transplantacji [76]. Średni czas oczekiwania na przeszczep w grupie wysoko zimmunizowanych pacjentów z PRA >84% wynosi 6,2 roku w porównaniu do 2,16 lat w grupie nieuczulonych [24].

W Polsce instytucją nadzorującą działalność transplantacyjną jest Centrum Organizacyjno-Koordynacyjne ds. Transplantacji „Poltransplant”, które na mocy ustawy prowadzi krajową listę oczekujących na przeszczepienie [79]. W 2008 roku na krajowej liście oczekujących na przeszczepienie nerki lub nerki i trzustki zarejestrowanych było 2651 osób. Problem aloimmunizacji, podobnie do statystyk światowych dotyczy znaczącej liczby biorców – to około 30% zgłoszonych do transplantacji nerki, z tego

5–10% jest uczulonych (PRA>50%). Średni czas oczekiwania zgłoszonych do pierwszej transplantacji wynosił 2 lata 10 miesięcy, natomiast wysoko zimmunizowanych (37 biorców z PRA>80%) 4 lata 6 miesięcy.

Czas oczekiwania na przeszczep w tej grupie jest ściśle uzależniony od typu odpowiedzi humoralnej: jeśli odpowiedź biorcy na aloantygeny ma charakter poliklonalny, jego czas oczekiwania będzie znacznie dłuższy i może wynosić nawet kilkanaście lat (najdłuższy odnotowany czas oczekiwania wynosił 18 lat i 5 miesięcy). W 2008 r. spośród 111 zimmunizowanych (PRA>50%) oczekujących przeszczepiono tylko 11 nerek [69].

Szacuje się, że czas przeżycia przeszczepu wśród immunizowanych biorców jest prawie dwa razy krótszy w porównaniu do biorców nieuczulonych [73]. Według danych UNOS (United Sharing of Organ Transplantation) z lat 2002–2005, po 5 latach od przeszczepu funkcjonuje ponad 10% mniej przeszczepów u wysoko zimmunizowanych w porównaniu do pozostałych biorców. Roczne przeżycie przeszczepu u wysoko zimmunizowanych różni się względem grupy nieobarczonej ryzykiem o 3,3%. Czas przeżycia przeszczepu (graft survival – GS) wśród biorców zimmunizowanych jest też znacznie uzależniony od pozostałych czynników ryzyka, takich jak wiek dawcy, czas zimnego niedokrwienia czy niezgodność w zakresie HLA-DR [6].

### 3. HUMORALNA TEORIA TRANSPLANTACJI

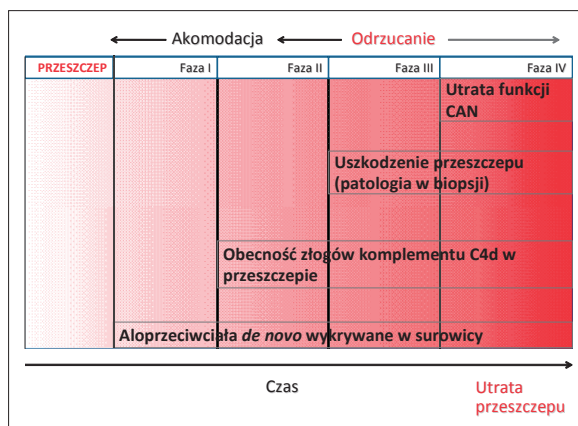
Od blisko pół wieku przyjmuje się tzw. komórkową teorię odrzucania, w myśl której jedynie usunięcie limfocytów T hamuje odpowiedź biorcy na aloprzeszczep [37].

Według humoralnej teorii odrzucania, każdy jego rodzaj jest powiązany z niszczącym wpływem aloprzeciwciał. Wykrywanie i monitorowanie swoistych aloprzeciwciał anty-HLA może także stanowić miarodajny wskaźnik zagrożenia wystąpieniem odrzucania (zarówno postaci ostrej jak i przewlekłej), który wyprzedza pojawienie się objawów klinicznych i innych markerów laboratoryjnych. Etapy patogenezy przedstawiono na ryc.1.

Wedle uaktualnionej nomenklatury kryteriów Banff 07, zamiast odrzucania nadostrego (hyperacute rejection) i występującego po 24 godzinach przyspieszonego ostrego (accelerated acute rejection), odrzucanie zależne od przeciwciał dzieli się na trzy podtypy:

- ostre odrzucanie zależne od przeciwciał (acute antibody mediated rejection – **ostre AMR**),
- **przewlekły aktywny AMR** (chronic active AMR) oraz
- złogi fragmentu dopełniacza C4d bez morfologicznych znamion aktywnego odrzucania [68].

W **ostrym i przewlekłym aktywnym AMR** zasadniczą rolę odgrywa aktywacja dopełniacza przez aloprzeciwciała. Powoduje to martwicę komórek śródbłonna i koagulopatię prowadzącą do objawów odrzucania. W późniejszych fazach wytwarzanie aloprzeciwciał *de novo* przyspiesza rozwój arteriosklerozy naczyń przeszczepu skracając czas jego funkcji. W późnym okresie po transplantacji, przeciwciała wiążąc się ze śródbłonkiem naczyń i komórkami mięśni gładkich aktywują je, stymulując do proliferacji. Indukują też zwiększoną ekspresję czynników wzrostu (czynnik



Ryc. 1. Kolejne etapy odrzucania indukowanego przeciwciałami. Pominięto odrzucanie nadostre u preimmunizowanych (wg [18] zmodyfikowano)

wzrostu fibroblastów – FGF, FGF- $\beta$ , płytkowy czynnik wzrostu – PDGF), co także nasila proliferację komórek ściany naczyń. Są one także odpowiedzialne za włóknienie podścieliska w przeszczepionym narządzie. Z obecnością aloprzeciwciał jest też związana aktywacja czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, który z kolei zwiększa transkrypcję genów cytokin prozapalnych i czynników antyapoptotycznych [10,45]. Paradoksalnie, pewne elementy tego procesu mogą się przyczyniać do tolerancji przeszczepu: jeśli śródbłonek naczyń pokryty zostanie proliferującą warstwą komórek gospodarza, proces odrzucania zostanie zahamowany. Wariant taki nazywany jest akomodacją [54]. Jeśli jednak dojdzie do reekspresji antygenów dawcy na komórkach śródbłonek, proces odrzutu rozpoczyna się na nowo.

Niszczący wpływ aloprzeciwciał kojarzony jest przede wszystkim z **ostrym AMR**, którego skutki mogą być widoczne już po kilku minutach od reperfuzji. Wśród narządów „wrażliwych” na ostry AMR znajdują się nerka, serce płuca, incydentalnie wątroba [72]. Preformowane aloprzeciwiata biorcy wiążąc się z antygenami HLA komórek przeszczepu i aktywując dopełniacz doprowadzają do lizy komórek, głównie śródbłonek i w efekcie martwicy ścian naczyń, zakrzepicy i krwawień do tkanki śródmiąższowej [37,43]. Nadostre odrzucanie może być powodowane także obecnością przeciwciał wobec antygenów grup krwi. Jednak w praktyce, wobec zasady przeszczepiania nerek dawca/biorca identyczny (względnie, dopuszczalnie niezgodny) w zakresie antygenów grup krwi ABO, odrzucania nadostrego powodowanego obecnością tych naturalnych aloprzeciwciał udaje się uniknąć. Wydawało się, że problem odrzucania występującego w pierwszej dobie został już dawno rozwiązany dzięki próbie krzyżowej limfocytów dawcy i surowicy biorcy (metoda serologiczna, CDC CM) oraz doborze w zakresie układu ABO. Ciągłe jednak obserwuje się incydenty ostrego odrzucania zależnego od przeciwciał, zwłaszcza wśród wysoko zimmunizowanych: 8% z 778 przeszczepionych po raz pierwszy, 14% z 1471 przy drugim przeszczepie, 20% z 224 przy trzecim przeszczepie [62,71,73]. Wykazano, że ostre odrzucanie wiąże się z obecnością aloprzeciwciał anti-HLA, niezależnie czy odrzucanie na podstawie biopsji klasyfikowano jako mediowane reakcją komórkową (acute cellular rejection – ACR) czy humoralną (acute humoral rejection – AHR).

Pozostaje pytanie, czy to naciekające limfocyty lokalnie wytwarzają swoiste aloprzeciwiata czy też obecne złogi, powodują naciek komórkowy [85].

Duże oczekiwania wiązano z zastosowaniem cytometru przepływowego do wykonywania próby krzyżowej (flow cytometry cross-match – FCXM). Jest to metoda wykrywająca znacznie niższe miana aloprzeciwciał w porównaniu do klasycznej, serologicznej próby krzyżowej. Negatywny wynik FCXM ogranicza wystąpienie wczesnego odrzucania zależnego od przeciwciał, jednak kosztem zwiększonego odsetka wyników fałszywie pozytywnych (IgG<sub>4</sub> niewiążące dopełniacza). Stąd dodatni wynik FCXM nigdy nie stanowił bezwzględnego przeciwwskazania do przeszczepu, jak w przypadku klasycznej, serologicznej próby krzyżowej. Najważniejszą przyczyną słabych efektów FCXM był brak ujednoliconego systemu oceny wyniku testu, który ograniczałby wpływ aloprzeciwciał nieistotnych klinicznie. W Polsce kryteria doboru do przeszczepu obejmują ujemny wynik próby krzyżowej opisaną w 1964 r. przez Patela i Terasakiego. Wydaje się jednak, że rutynowe wykonanie FCXM niezależnie od serologicznej próby krzyżowej przyniosłoby istotne korzyści w postaci informacji o zwiększonym zagrożeniu wystąpieniem AMR. W grupie pacjentów z (+) FCXM dochodzi dwukrotnie częściej do odrzucania naczyniowego 28,9% z (+) FCXM vs. 12,6% z (-) FCXM w grupie 455 biorców, a roczne przeżycie przeszczepu jest o 10% niższe (84% vs. 94%) [38,60]. Obiecujące wydają się ostatnie wyniki badań S. Limaye’a i wsp. [46], w których zgłębiono problem wyników fałszywie dodatnich, utrudniających właściwe wykorzystanie testu. Kryteria kwalifikacji wyniku jako dodatni (i istotny klinicznie) ustalono na podstawie retrospektywnych wyników FCXM dla pacjentów, u których w ciągu 6 tygodni od przeszczepu doszło do odrzucania zależnego od przeciwciał. Takie ustalenie linii odcięcia pozwoliło na wyraźne zwiększenie użyteczności diagnostycznej testów FCXM ograniczając wpływ aloprzeciwciał nieistotnych klinicznie. Dodatnią wartość predykcyjną (swoistość) FCXM do wystąpienia AMR określono na poziomie 83%, czułość na poziomie 90%. Wprowadzenie do procedury diagnostycznej FCXM z nowo ustalonymi poziomami odcięcia umożliwiło osiągnięcie 4-letniego przeżycia przeszczepu na poziomie 89% wśród wysoko zimmunizowanych.

Udział swoistych aloprzeciwciał w **AMR przewlekłym aktywnym** różni się od poprzedniego mianem preformowanych aloprzeciwciał u biorcy. Ich liczba jest niewystarczająca do inicjacji koagulopatii o nasileniu obserwowanym w ostrym AMR, jednak wystarcza, aby przeciwiata te wiążąc się bezpośrednio ze śródbłonkiem naczyń krwionośnych przeszczepu, aktywowały dopełniacz i wywoływały martwicę komórek (kryteria – tab. 1) [18].

Jako złoty standard, w rozpoznaniu AMR obecnie uznaje się immunohistochemiczne badanie biopsjatu na obecność fragmentu C4d dopełniacza wg Feuchta. Swoistość i czułość badania określana jest na poziomie odpowiednio 92 i 76% [28]. Wadą jest inwazyjność. Rola C4d nie ogranicza się do wczesnych faz odrzutu nadostrego: 6 miesięcy po przeszczepie pozytywne barwienie C4d stwierdzono u 45% pacjentów z cechami odrzucania ostrego (AR). Rok po przeszczepie 65% z tej grupy utraciło nerkę [61]. Unowocześnieoną wersję oznaczenia może stanowić po-



Tabela 1. Kryteria ostrego odrzucania [18]

|   |
|---|
| ✓ Objawy kliniczne ostrego odrzucania   |
| ✓ Potwierdzenie histologiczne cech ostrego odrzucania (nacieki komórkowe, złogi włóknika w kapilarach, cechy nekrozy, martwica kanalikowa)  |
| ✓ Identyfikacja cech komponenty humoralnej: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Złogi składowej C4d w kapilarach</li> <li>– Potwierdzenie obecności aloprzeciwciał anti-HLA lub innych aloprzeciwciał swoistych dla antygenów dawcy</li> </ul> |

miar składowej C4d w surowicy reagującej z aloantygenami HLA umieszczonymi w fazie stałej (mikrosfery). Materiałem badanym jest surowica krwi, a pomiaru dokonuje się techniką fluorymetrii przepływowej (aplikacje na cytometr przepływowy lub fluorymetr typu Luminex®, tzw. [C4d]FlowPRA). Czulość oznaczenia określa się na poziomie 94% kosztem mniejszej swoistości (60%) w relacji do barwienia biopatu na obecność C4d [5,67]. Na etapie przewlekłego odrzucania (wg nowszej nomenklatury: **przewlekłej nefropatii nerki przeszczepionej. CAN** – chronic allograft nephropathy lub IF/TA – interstitial fibrosis/tubular atrophy), złogi C4d pozwalają odróżnić odrzucanie przewlekłe o podłożu humoralnym od nieimmunologicznej nefropatii, co ma istotne znaczenie ze względu na odmienny sposób leczenia. Ponadto, według kryteriów przyjętych w Banff [68] uznano, że w razie selektywnej obecności złogów C4d bez innych cech morfologicznych odrzutu, zastosowanie terapii powstrzymującej AMR znacząco poprawia funkcjonowanie przeszczepu. Należy jednak podkreślić, że w przypadku CAN, wykazanie złogów C4d ma drugorzędne znaczenie, gdyż obrazuje etap nieodwracalnych zmian. Marker odrzucania humoralnego na etapie inicjacji wytwarzania przeciwciał *de novo* wydaje się więc w tym przypadku bardziej użyteczny [9].

Powikłanie w postaci CAN jest istotnym problemem wśród przeszczepionych biorców. Szacuje się, że co roku powraca na leczenie dializoterapią 3–5% chorych z przeszczepem, w tym prawie połowa z powodu przewlekłej nefropatii przeszczepionej nerki. U 20% chorych z przewlekłą dysfunkcją nerki przyczyną jest CAN [11].

Silną zależność między obecnością aloprzeciwciał przeciwko antygenom HLA dawcy DSA (donor specific antibodies) a CAN dowiedziono zarówno eksperymentalnie jak i klinicznie. Jako jedni z pierwszych, Lee i wsp. [44] (2002 r.) wykazali, że DSA w grupie 14 biorców zawsze poprzedzało rozwinięcie CAN zależnej od przeciwciał. Oprócz wpływu aloprzeciwciał anti-HLA, CAN poprzedza też w części przypadków wytworzenie innych aloprzeciwciał, zwłaszcza anti-MICA [32,52,66,82]. Rodzaj aloprzeciwciał wykrytych u pacjenta istotnie wiąże się z rokowaniem [75]. Roczne przeżycie biorców z wykrytymi DSA wynosiło 64,3%. Obecność aloprzeciwciał anti-HLA innych niż antygeny dawcy (NDSA-non DSA) wiązała się z przeżyciem na poziomie 66,2% (wysokie miana), 85,8% (umiarkowane) i odpowiednio 95,2% w grupie bez aloprzeciwciał.

Mao i wsp. [49] wykazali silną zależność między obecnością DSA a rozwinięciem CAN w 5-letnim okresie od przeszczepu. Jeśli wykryto aloprzeciwciała, ich swoistość oceniano za pomocą testów typu SA (single antigen). Zasada tego rodzaju testów polega na inkubacji badanej surowicy

z mieszaniną fluorescencyjnych mikrosfer, z których każda opłaszczona jest wybranym, rekombinowanym typem aloantygeny HLA. Swoiste związanie aloprzeciwciała surowicy umożliwia przyłączenie koniugatu (przeciwciało anti-IgG sprzężone z fikoerytryną). Pomiaru dokonuje się poprzez detekcję fluorescencji charakterystycznej dla mikrosfery (informacja o antygenie HLA obecnym na mikrosferze) oraz swoistej fluorescencji emitowanej przez fluorochrom koniugatu, w razie gdy swoiste aloprzeciwciało w surowicy było obecne. Zaletą testów SA jest możliwość selektywnego pomiaru do 100 rodzajów aloprzeciwciał w pojedynczym oznaczeniu. Ten poziom rozdzielczości jest konieczny w relacji do heterogenności aloprzeciwciał anti-HLA i uniemożliwiał przez lata możliwość precyzyjnego oznaczania ich swoistości. W projekcie Mao zbadano łącznie 493 próbki pochodzące od 54 biorców nerki. Wykazanie DSA u biorycy w badanym, 5-letnim okresie wiązało się z odrzucaniem nerki u 17 z 32 pacjentów, w relacji do 3 przypadków odrzucania spośród 22 pacjentów bez DSA. Przyjmując jako punkt odniesienia dla funkcji przeszczepu poziom kreatyniny >4 mg/dL, u 4 z 22 pacjentów bez DSA rozwinęła się niewydolność w porównaniu do 21 z 32 z obecnymi DSA. U pacjentów DSA negatywnych z niewydolnością przeszczepu nie wykazano też złogów C4d. Ponadto, DSA znacząco wyprzedzało narastanie poziomu kreatyniny w surowicy.

Wśród pacjentów z DSA wytworzonymi *de novo*, przeszczepioną nerkę odrzuciło w badanym okresie 6 z 11 pacjentów. Dla porównania, nerkę odrzuciło jedynie 4 z 22 pacjentów bez DSA. Podobne wyniki uzyskali Mizutani i wsp. [51]. W grupie 65 biorców, u których aloprzeciwciała anti-HLA wytworzone zostały *de novo*, 39 biorców odrzuciło przeszczep, co wiązało się ze znacząco wyższymi mianami aloprzeciwciał. W tym samym czasie, u 26 pozostałych biorców, u których nie zanotowano cech odrzucania, nie obserwowano znaczącej zmiany w mianie przeciwciał. Jak widać na tym przykładzie nie tylko rodzaj aloprzeciwciał, ale i ich siła wraz ze zmianą natężenia w czasie wydaje się kompletną informacją do zastosowania klinicznego. Zaznaczona jest też silna współzależność między wzrostem miana aloprzeciwciał DSA (testy typu SA) i następującym dopiero potem wzrostem poziomu kreatyniny. Dla porównania, w grupie 26 pacjentów z dobrze funkcjonującym przeszczepem, tylko u jednego wykryto DSA. Wydaje się, że nawet u pacjentów nieobarczonych ryzykiem przed transplantacją, okresowy pomiar DSA może stanowić czynnik prognostyczny monitorowania funkcji przeszczepu. W relacji do obecnego „złotego standardu” – wykrywania złogów C4d, oznaczenie DSA przynosi istotne korzyści:

1. Złogi fragmentów dopełniacza C4d pojawiają się wtórnie do DSA, ponadto narastanie miana DSA informuje o patologii niezależnej od dopełniacza [13].

Tabela 2. Zasady alokacji nerek w Polsce [40]

| Parametr   | Warunek             | Punkty preferencyjne Przeszczep wyprzedzający (chory dializowany) (CKr <15 ml/min/1,73 m <sup>2</sup> )     |  |
|--|---------------------|---|--|
| <b>PRZESZCZEP OBLIGATORYJNY</b>  |                     |   |  |
| Biorca bez dostępu do dializ – tryb nagły  | (–) próba krzyżowa  | przeszczep obligatoryjny  |  |
| 6 wspólnych antygenów dawcy i biorcy w układzie HLA-A, -B, -DR                                 | (–) próba krzyżowa  | przeszczep obligatoryjny  |  |
| Dawca przed 16 r.ż. dla biorcy z listy pediatrycznej   | (–) próba krzyżowa  | przeszczep obligatoryjny  |  |
| PRA > 80%  | (–) próba krzyżowa  | przeszczep obligatoryjny  |  |
| Biorca >60 lat, jeśli biorca >65 lat   | (–) próba krzyżowa  | przeszczep obligatoryjny  |  |
| Biorca przeszczepu nerki i jednorazowego przeszczepi innego narządu (serce, wątroba, trzustka) | (–) próba krzyżowa  | przeszczep obligatoryjny  |  |
| <b>Punkty preferencyjne</b>  |                     |   |  |
| Za każdy wspólny antygen   | HLA-A               | 1   | 1  |
|  | HLA-B               | 4   | 4  |
|  | HLA-DR              | 7   | 7  |
| PRA  | 50–79%              | 7   |  |
| Biorca z Regionalnego Centrum Kwalifikacyjnego zespołu pobierającego                           |                     | 4   | 4  |
| Czas dializowania (dla chorych zgłoszonych do retransplantacji – łączny czas dializ)           |                     | każdy kolejny rok dializ: <b>2 punkty</b> ,<br>maksymalnie <b>15 punktów</b> za czas dializ > <b>10 lat</b> |  |
| Nefropatia cukrzycowa (transplantacja nerki z trzustką)  |                     | 3   | 3<br>(CKr >20 ml/min/1,73 m <sup>2</sup> ) |
| Biorca z niewydolnością przeszczepu (retransplantacja)   |                     | 0   | 1  |
| Biorca po transplantacji innego narządu i z PNN  |                     | 15  | 15   |
| Wiek biorcy  | <12 lat lub >60 lat | 2   | 2  |

- Obecność DSA (anty-HLA i/lub anty-MICA) poprzedza wystąpienie AMR (antibody mediated rejection) [13,75]. Czas wystąpienia zmian jest zróżnicowany i może być odległy, nawet 3–4 czy 12 lat po wykryciu DSA. [49,83]. Narastanie miana DSA umożliwi odpowiednio szybką interwencję i przedłużenie funkcji przeszczepu [24].
- Pomiar DSA jest mniej inwazyjny od biopsji protokolarnych. Badanym materiałem jest kilka mikrolitrów surowicy [13].

#### 4. DIAGNOSTYKA TRANSPLANTACYJNA W POLSCE – STAN AKTUALNY

Diagnostyka immunologiczna chorych kwalifikowanych do przeszczepu nerki obejmuje dobór dawcy i biorcy na poziomie antygeny w zakresie HLA klasy I i II (*locus* A, B, DR). Mimo skutecznych leków immunosupresyjnych, liczba niezgodności między dawcą a biorcą nadal jest istotnym czynnikiem warunkującym czas przeżycia przeszczepu, niezależnie od innych czynników, takich jak np. czas zimnego niedokrwienia [56,57]. Zasady alokacji nerek w Polsce zostały znacząco zmodyfikowane w 2007 r. [40]. Istotna zmiana wystąpiła w zakresie punktów przyznawanych za czas dializy; obecnie są to dwa punktu za

każdy rok dializoterapii, wcześniejszy system przyznawał 1 punkt powyżej 4 roku dializoterapii. Punktacja za zgodność tkankową pozostała bez zmian (tab. 2).

Ocena stopnia uczulenia potencjalnego biorcy rutynowo oceniana jest metodą serologiczną w teście mikrolimfocytotoksycznym (PRA CDC). Test polega na ocenie obecności aloprzeciwciał wiążących dopełniacz w surowicy biorcy z panelem limfocytów pochodzących od 30 niespokrewnionych dawców (indeks PRA – panel reactive antibodies) i ustaleniu odsetka reakcji dodatnich. Test powtarzany jest u zakwalifikowanego do przeszczepienia biorcy nerki co 12 tygodni w celu obserwowania tendencji. Test mikrolimfocytotoksyczny PRA CDC ma ograniczoną wartość, gdyż wykrywa tylko przeciwciała w wysokim mianie, których liczba jest wystarczająca do wywołania u biorcy odrzucenia ostrego AMR już w pierwszej dobie po przeszczepie. Pełen obraz poziomu zimmunizowania powinien także obejmować wykrywanie niskich mian preformowanych przeciwciał. W klasycznej postaci PRA (bez dodatku ditiotreitolu – DTT) istnieje również odsetek wyników fałszywie dodatnich powodowanych niewiązącymi dopełniacza IgM. Wynik testu PRA jest ściśle uzależniony od



dostępnego fenotypu HLA panelu limfocytów, stąd pojedynczy wynik PRA=0% nie wyklucza obecności aloprzeciwciał wiążących dopełniacz, nawet w wysokim mianie. Ze względu na ograniczoną czułość oznaczenia, test PRA metodą CDC nie nadaje się do monitorowania aloprzeciwciał po przeszczepie, w warunkach immunosupresji.

Zmienność międzylaboratoryjną oceny preformowanych przeciwciał u biorcy obrazują przeprowadzone w 2004 r. przez „Poltransplant” [55] badania porównawcze. Badania obejmowały wykonanie testu PRA w czterech nadesłanych surowicach oraz próby krzyżowej potencjalnego dawcy z tymi samymi surowicami (jako potencjalnymi biorcami). W próbie krzyżowej u średnio zimmunizowanego biorcy (jedna z czterech nadesłanych surowic) prawie połowa laboratoriów typujących określiła obecność preformowanych przeciwciał przeciwko dawcy (3 z 7 laboratoriów). Kolejne 3 pracownie nie stwierdziły obecności swoistych aloprzeciwciał. Jedna z pracowni wynik określiła niejednoznacznie. Podobne rozbieżności zaobserwowano w zakresie testu PRA, standardowo przeprowadzanego metodą serologiczną (test mikrolimfocytotoksyczny – CDC). Trudności w ocenie pacjentów średnio zimmunizowanych są przypisane do metody serologicznej (CDC), stąd rozbieżności będą niezależne od fachowości personelu. Wyniki porównań międzylaboratoryjnych przeprowadzonych w 2004 r. z dużym prawdopodobieństwem można uznać za wciąż aktualne, ponieważ stosowane w laboratoriach techniki badawcze nie uległy zmianie.

## 5. FUNKCJONUJĄCE PROGRAMY DLA WYSOKO ZIMMUNIZOWANYCH

W odpowiedzi na problem znalezienia odpowiedniego dawcy dla pacjenta wysoko zimmunizowanego, stosuje się dwa podejścia:

- **Biologiczne** oparte o zasadę możliwie najlepszego doboru immunologicznego dawcy i zimmunizowanego biorcy. Doboru dokonuje się w oparciu o analizę rodzaju i swoistości odpowiedzi humoralnej biorcy. Najważniejszą zaletą tego rodzaju programów jest przeżycie przeszczepu podobne do transplantacji nieobarczonej ryzykiem oraz możliwość stosowania standardowej immunosupresji farmakologicznej [7,12,16,36,50,84]. Możliwe jest też precyzyjne określenie ryzyka (rokowania) transplantacji. Programy tego typu mają sens, gdy realizowane są na możliwie dużym obszarze geograficznym z szerokim dostępem do dawców (skala minimum krajowa).
- **Farmakologiczne** skupiają się na fizycznym eliminowaniu przyczyny problemu (plazmafereza/immunosorpcja/IVIg) i odpowiednim schemacie czterolekowej immunosupresji po przeszczepie. W niektórych przypadkach jest to jedyne możliwe rozwiązanie. Programy takie poprawiają dostęp do transplantacji, jednak nie usuwają pierwotnej przyczyny problemu zimmunizowanych komórek pamięci i tym samym zwiększonego ryzyka.

**Podejście biologiczne** rozwinęło się wraz z technikami umożliwiającymi lepszą ocenę aloprzeciwciał powodujących odrzucanie przeszczepu u biorców. Metodami serologicznymi (test CDC-PRA z panelem potencjalnych dawców) taka analiza była niemożliwa z powodu zbyt małej czułości i rozdzielczości testów. PRA metodą CDC nie dostarcza informacji o klasie, rodzaju i mianie aloprzeciwciał. Stąd, metody użyte do identyfikacji aloprzeciwciał w celu

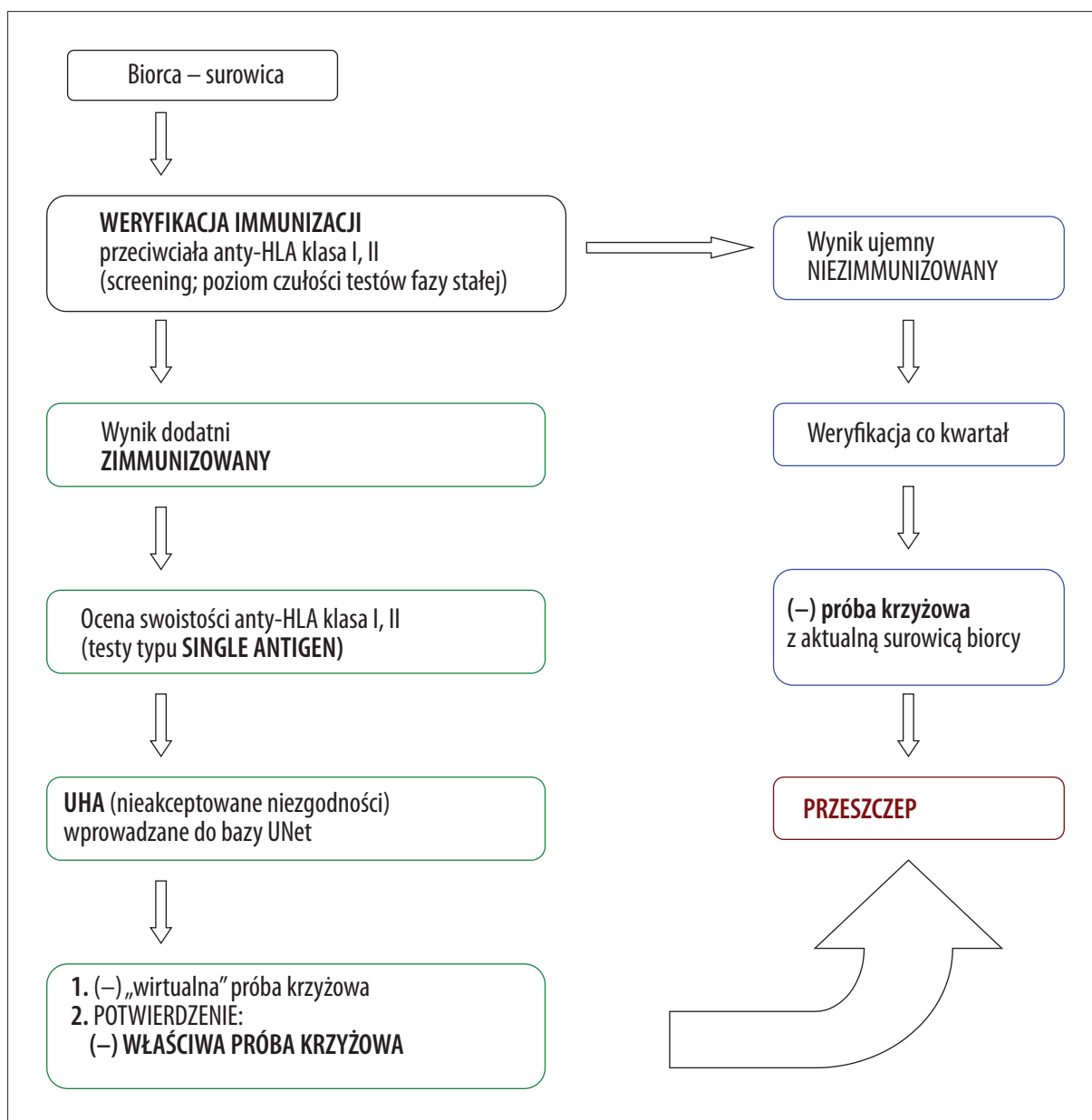
zastosowania podejścia biologicznego powinny być oparte o czulsze testy fazy stałej (aplikacje na cytometr przepływowy, luminex® lub ELISA) [59,78]. Rozdzielczość tego rodzaju testów zrewolucjonizowało wprowadzenie technologii multipleksu (mikrosfery opłaszczane antygenami HLA). W pojedynczym oznaczeniu możliwa jest identyfikacja prawie stu rodzajów aloprzeciwciał, w tym HLA-Cw, DR i DQ [48]. Diagnostyka tego typu pozornie jest kosztowna, jednak z innej perspektywy, cena jednego oznaczenia nie przekracza ceny pojedynczego zabiegu dializy.

Podejście biologiczne zawiera programy takie jak amerykański „algorytm Emory” i „HLA-matchmaker”, europejski Acceptable-Mismatch Program (ET-KIDNEY ALLOCATION SYSTEM), kataloński FAMHS (Find Acceptable Mismatches for Highly Sensitized Patients), programy British Transplantation Society czy UNOS. Inne warianty podejścia biologicznego, oparte o alokację od żyjącego dawcy to „paired donor exchange” [65,81] lub „proxy donation”. Poniżej przedstawiono wybrane algorytmy.

### Algorytm Emory

Program pochodzi z Uniwersytetu Medycznego w Atlancie, USA. Doświadczenia programu opierają się o 5-letnią praktykę i około 500 przeszczepów, z czego 220 wykonanych u pacjentów zimmunizowanych (lata 1999–2003). Na uwagę zasługują nie tylko wyniki, ale i prostota algorytmu [12]. Algorytm przedstawia się następująco (ryc. 2):

1. **Badanie wstępne (screening):** weryfikacja obecności aloprzeciwciał anty-HLA. Oznaczenie jest powtarzane w klasycznym cyklu (kwartalnie). Surowica pacjenta jest inkubowana z mieszaniną mikrosfer opłaszczonych antygenami HLA wszystkich znaczących typów. Dodanie koniugatu (przeciwciała anty-ludzkie IgG sprzężone z fluorochromem) umożliwia identyfikację pozytywnych reakcji na cytometrze przepływowym bądź luminexie. Metoda jest wysoko przepustowa (100 oznaczeń w około 3,5 godz) i powtarzalna. Oprócz lepszej czułości testu w relacji do metod serologicznych, oznaczenie umożliwia różnicowanie aloprzeciwciał w klasie (HLA klasy I i/lub II). Wynik oznaczenia nie jest też uzależniony od panelu komórek (wyniki fałszywie ujemne).
2. **Identyfikacja swoistości aloprzeciwciał** w odpowiadającym rezultatowi skryningu klasie HLA. Identyfikację przeprowadzono na poziomie pojedynczego antygeny (testy typu single antygen).
3. **Baza danych:** oznaczone swoistości aloprzeciwciał wprowadzane są do bazy danych UNOS „UNet”, do której szpitali dostęp mają jedynie ośrodki przeszczepiające w ramach UNOS. Wynik oznaczeń stanowi odpowiednik nieakceptowanych niezgodności antygenowych z potencjalnym dawcą. (Od kwietnia 2008 r. w Polsce również alokacja narządów dokonywana jest w oparciu o krajową bazę internetową Poltransplantu. Dostępne dane immunologiczne obejmują zgodność w zakresie HLA-A, B, DR oraz poziom PRA metodą testu mikrolimfocytotoksycznego CDC).
4. **Wirtualna próba krzyżowa:** nieakceptowalne niezgodności stanowią podstawę tzw. wirtualnego cross-matchu. Kiedy rezultat jest ujemny (brak aloswoistości odpowiadającym antygenom dawcy w zakresie *locus* HLA-A, B oraz DR), biorca jest wstępnie kwalifikowany do transplantacji z danym dawcą.



Ryc. 2. Schemat algorytmu do oceny zimmunizowanych pacjentów (wg [12] zmodyfikowano)

5. **Właściwa próba krzyżowa** w ośrodku przeszczepiającym. Do przeszczepu dochodzi jedynie, gdy próba krzyżowa na cytometrze przepływowym z limfocytami T i B jest negatywna z bieżącą surowicą (pobraną w dniu transplantacji) oraz z dwiema surowicami pobranymi w ciągu ostatniego roku. Wyniki „właściwej” próby krzyżowej w więcej niż 80% przypadków odpowiadały sugerowanemu przez wirtualny cross-match rezultatowi.

Założenia programu zakładały standardowy, trzylekowy protokół immunosupresji po przeszczepie, tożsamy z leczeniem po przeszczepie dla nieimmunizowanych (glikokortykosteroidy + inhibitor kalcyneuryny + cytostatyk). Pięcioletnie doświadczenia ośrodka i wynik przeszczepienia 220 zimmunizowanych pozwolił na dwukrotne zwiększenie dostępu zimmunizowanych (z PRA>30%) do

przeszczepu: 25 vs. 12% średniej w UNOS w tym czasie. Najbardziej interesujące jest to, że wyniki GS wśród zimmunizowanych (PRA>80%) nie odbiegały od grupy nieobciążonej ryzykiem. Pięcioletnie przeżycie przeszczepu (GS) w grupie pacjentów z PRA powyżej 30% wyniosło 69 vs. 70% w grupie nieobciążonej ryzykiem.

#### UNOS, postępowanie ze zimmunizowanymi

Zasady alokacji UNOS (United Sharing of Organ Transplantation) dostępne są na stronach <http://optn.transplant.hrsa.gov/policiesAndBylaws/policies.asp> Komitet zgodności tkankowej działający przy UNOS (Histocompatibility Committee) także pracuje nad programem alokacji nerek w oparciu o wynik wirtualnej próby krzyżowej [15,42]. Podejście takie umożliwia prowadzenie programu na dużym obszarze, co zwiększa szanse





doboru określonego dla danego biorcy akceptowalnych niezgodności w zakresie ABDR (permissible donor mismatches). W programie bierze udział 14 laboratoriów typujących. Wyniki programu (6 620 FCXM dla 225 pacjentów) wskazują, że dzięki identyfikacji UHA (unacceptable HLA antigens), wirtualna próba krzyżowa jest wysoce zbieżna z właściwą, dokonaną w dniu przeszczepu (FCXM). Korelacja między wirtualnym XM a FCXM jest na poziomie 85% dla komórek T i 95% dla komórek B. Warto zaznaczyć, że dobierając do przeszczepu w zakresie antygenów HLA-A,-B,-DR, nigdy nie zostanie osiągnięta korelacja 100%. Jest to związane z wpływem na wynik próby krzyżowej takich czynników jak aloprzeciwciała anti-MICA, przeciwendotelialne, poliklonalna aktywacja po masowym zakażeniu itp. Jako pewne niezgodności (UHA) traktuje się te antygeny, przeciw którym biorca ma aloprzeciwciała w wysokim mianie (identyfikacja swoistości na poziomie czułości nie niższej niż poziom cytometru przepływowego) oraz dodatkowo retrospektywne wyniki próby krzyżowej (FCXM), w której zaobserwowano wynik pozytywny. Akceptowalne, prawdopodobne zgodności określa się przez dodanie antygenów zbliżonych pod względem strukturalnym do antygenów biorcy, tj. węższe swoistości (split) w obrębie grupy antygenów oraz grupa antygenów reagujących krzyżowo (cross reactivity antigens group – CREG). Antygeny te będą traktowane jako mniej ryzykowne.

W tej sytuacji indeks PRA przedstawiony jako odsetek panelu, który reaguje dodatnio w reakcji CDC przestaje być użyteczny. Pojawiły się próby zastąpienia PRA tzw. cPRA (calculated PRA) lub inaczej – prawdopodobieństwa (+) cross-matchu (probability of positive XM). Program cPRA dostępny jest na stronie internetowej [http://www.unos.org/resources/frm\\_CPRA\\_Calculator.asp](http://www.unos.org/resources/frm_CPRA_Calculator.asp) i polega na wprowadzeniu UHA (nieakceptowanych antygenów HLA), co umożliwi wyliczenie cPRA, jednak nie w oparciu o panel (30 lub 50 dawców), a o realne częstości występowania HLA w populacji dawców zgłaszanych w OPTN (71% stanowi tam rasa kaukaska). Wynik cPRA ma charakter czysto informacyjny i służy kwalifikacji pacjenta do wybranej grupy (nisko/średnio/wysoko zimmunizowany). Zapis o zastąpieniu konwencjonalnego PRA wynikiem cPRA, którego rezultat opiera się o wynik oznaczenia swoistości aloprzeciwciał, został wprowadzony do polityki alokacji nerek UNOS (pkt. 3.5.11.3) w czerwcu 2008 r. Pojawiła się też adnotacja, że przynajmniej jedna technika z opracowanych do określania UHA powinna się opierać o test fazy stałej (mikrosfery w FC, fluorometr typu luminex).

#### **Program akceptowalnych niezgodności (Acceptable Mismatch Program – AMP)**

To program wdrożony w krajach należących do Eurotransplantu (ET). Pierwotną postać AMP wdrożono już w 1985 r. i jest stale aktualizowana [26]. Pacjent, zanim zostanie włączony do programu musi spełniać określone kryteria dotyczące poziomu immunizacji. Wytyczne do oceny stanu immunizacji w krajach ET wskazują na konieczność określania obecności aloprzeciwciał przeciwko HLA klasy I i II. Standardowy test PRA CDC z pełną pulą limfocytów umożliwia jedynie ocenę aloprzeciwciał anti-HLA klasy I. Stąd, dodatkowo do oceny używane są jakościowo oceniające obecność aloprzeciwciał w kla-

sie I i II testy fazy stałej. Jeśli laboratorium oprócz oceny jakościowej ocenia też swoistość aloprzeciwciał, wyniki przedstawiane są w postaci v-PRA (virtual PRA) [27]. Oprogramowanie to działa na podobnej zasadzie jak wcześniej opisane cPRA działające w ramach UNOS. Oprócz znacznie większej wiarygodności testów fazy stałej do określania obecności aloprzeciwciał, zaletą są częstości antygenowe charakterystyczne dla populacji europejskiej. Ocena swoistości aloprzeciwciał jest obecnie ograniczona do pacjentów włączonych do programu AMP.

Kryteria przyjęcia pacjenta do programu AMP obejmują:

1. Wynik testu PRA > 85% stwierdzony co najmniej dwukrotnie.
2. Jednakowo traktowany jest wynik testu PRA aktualny i archiwalny.
3. Wynik testu PRA określony na podstawie rozszerzonego panelu 50 populacji limfocytów od potencjalnych dawców.
4. Wykluczenie obecności autoprzeciwciał anti-HLA u biorcy (próba autologiczna) oraz przeciwciał klasy IgM (test mikrolimfocytotoksyczny PRA z dodatkiem ditiotreitolu-DTT).

Jeśli indeks PRA jest równy 100%, program naturalnie nie ma zastosowania. Wtedy konieczne jest wprowadzenie algorytmu z zakresu podejścia farmakologicznego.

Następnym krokiem jest określenie u zakwalifikowanego akceptowalnych niezgodności (acceptable mismatch – AM). Według założeń programu AMP, niemożliwe jest określenie wszystkich aloswoistości dla wysoko uczulonego, z różnicowaniem ich natężenia oraz znaczenia klinicznego. Stąd, podstawę do określenia AM u biorcy stanowią aloprzeciwciała wykryte w teście mikrolimfocytotoksycznym według następującego algorytmu:

1. Surowica pacjenta testowana w PRA metodą CDC z dodatkiem DTT z rozszerzonym panelem limfocytów od 50 dawców.
2. W puli limfocytów testowych, jeśli nie odnotowano reakcji z surowicą biorcy oznacza się antygeny zgodności tkankowej w zakresie *locus* HLA-A,B,DR (w praktyce dawcy, których limfocyty są włączane do panelu PRA stanowią grupę, która ma oznaczone antygeny HLA w celu doboru preparatów krwiopochodnych dla aloimmunizowanych pacjentów. W laboratoriach ET oznaczonych w zakresie układu HLA honorowych dawców jest ponad 20 tys).
3. Porównanie antygenów HLA limfocytów z panelu z antygenami HLA biorcy.
4. Ostateczna lista akceptowalnych niezgodności ustalana jest przez ETRL (Eurotransplant Reference Laboratory) lub laboratorium typujące mające akredytację EFI (European Federation for Immunogenetics) lub ASHI (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics). Standardy EFI i/lub ASHI określają metody oznaczania swoistości aloprzeciwciał, co zapewnia powtarzalność wyniku [25]. Zgodnie z nimi, ocena aloprzeciwciał jest przeprowadzana jednocześnie dwiema metodami. Jedną z nich jest identyczna jak w przypadku techniki stosowanej przy próbie krzyżowej (tu CM-CDC), a czułość drugiej metody nie może być mniejsza. Metodą najbardziej wiarygodną, stąd stosowaną z wyboru jest ocena typu SA na mikrosferach,

gdzie swoistości oznaczane są na cytometrze lub fluorymetrze przepływowym. Antygeny, przeciwko którym biorca nie ma wykrywalnych aloprzeciwciał są traktowane jako akceptowalne niezgodności (AM).

5. Dodatkowe AM określa się w oparciu o program HLA-Matchmaker, którego zasadę działania przedstawiono w dalszej części opracowania.
6. Komplet AM wraz z nieakceptowanymi niezgodnościami (swoistości HLA, wobec których pacjent posiada przeciwciała w wysokim mianie) wprowadzone są do bazy ENIS (Eurotransplant Information Systems). Do nieakceptowanych niezgodności zalicza się MM (mismatch) z poprzednich transplantacji, o ile obecności swoistych aloprzeciwciał nie wykluczają wyniki przeprowadzonych badań.
7. HLA każdego zgłoszonego dawcy nerek porównywane jest z bazą danych. W przypadku pełnego dopasowania dla określonego biorcy (pula HLA biorcy + AM), nerek oraz materiał do wykonania próby krzyżowej kierowany jest do ośrodka, gdzie znajduje się biorca. Próba krzyżowa jest wykonywana z surowicą biorcy pobraną w tym samym dniu oraz z surowicą historyczną, z najwyższą odnotowaną wartością testu PRA. Do programu włączono też minimalne kryterium zgodności dawca-biorca: zgodność w *locus* HLA-DR lub po jednym zgodnym antygenie HLA-A, B.

Pacjenci przeszczepiani według zasad ET-AMP uzyskują znacznie większą szansę na transplantację w porównaniu do pacjentów zimmunizowanych niezgłoszonych do programu, oczekujących według klasycznych zasad ET-KAS (Eurotransplant Kidney Allocation System). W ciągu jednego roku (2002–2003) wśród 129 wysoko zimmunizowanych pacjentów, przeszczepiono 68 nerek. 57 pacjentów otrzymało nerkę z programu ET-AMP (średnia oczekiwania 9,7 miesiący, w tym większość znalazła odpowiedniego dawcę w pierwszych sześciu miesiącach). W oparciu o klasyczne zasady ET-KAS, dokonano 11 transplantacji (średnia oczekiwania 18,6 miesiący). Największe trudności w znalezieniu odpowiedniego dawcy istnieją dla biorców z rzadkim układem haplotypu układu HLA, należącym np. do mniejszości etnicznych. W takich przypadkach należy rozważyć wariant farmakologiczny, podobnie jak dla biorców z długą utrzymującym się indeksem PRA rzędu 100%. Czas przeżycia przeszczepu (GS), podobnie jak w innych programach tego typu nie różni się istotnie z grupą niezimmunizowanych [17].

W ustaleniu akceptowalnych niezgodności (AM) istotną rolę pełni algorytm komputerowy wprowadzony w 2004 r. HLA-Matchmaker. Oprogramowanie jest bezpłatne, dostępne na stronie <http://www.hlamatchmaker.net/>. Program oparty jest na analizie strukturalnego polimorfizmu HLA. Pozwala na określenie stopnia zgodności między dawcą a biorcą na zasadzie identyfikacji i porównania zewnętrznie położonych, immunogennych dla biorcy epitopów. Immunogenne epitopy definiuje się jako poszczególne trójki aminokwasowe, które mogą być celem aloprzeciwciała (triplet matching – TM) [20,53]. Poprzez analizę homologii trójek aminokwasowych biorcy i dawcy, można określić prawdopodobieństwo wytworzenia aloprzeciwciał w odpowiedzi na niezgodny antygen. W wielu przypadkach, niezgodności (MM) są tylko pozorne, gdy immunogenne epitopy obecne na niezgodnym antygenie dawcy są obecne

w genotypie HLA biorcy. W takim przypadku wytworzone aloprzeciwciała wiązałyby antygeny HLA biorcy [21,23]. Zasada dopasowania trójek aminokwasowych TM wykazuje częściową homologię z grupami CREG określonymi dla danych antygenów. W celu empirycznego potwierdzenia przydatności programu HLA-Matchmaker, przeprowadzono próbę krzyżową z wyselekcjonowanymi potencjalnymi dawcami z brakiem niezgodności w zakresie immunogennych dla biorcy trójek aminokwasowych (triplet mismatches – TMM) oraz z 1 TMM. W zakresie *locus* A, nawet pojedyncza TMM nie dała rezultatu w postaci dodatniej próby krzyżowej. W *locus* B, jedna TMM dała dodatni wynik CM w dwóch przypadkach na 133 badanych, stąd przyjęto zasadę 0 TMM dla przeszczepu [17]. Należy też zwrócić uwagę na porównywalny czas przeżycia przeszczepu dla biorców przeszczepionych z 0 TMM w zakresie *locus* HLA-DR z biorcami 0 TMM dla *locus* HLA-A, B, DR. Może to stworzyć dodatkową szansę dla wysoko zimmunizowanych [22]. Aplikacja HLA-Matchmaker znacząco zwiększa prawdopodobieństwo znalezienia dawcy (probability of finding a donor – PFD). Można to przedstawić na podanym przykładzie: szanse pacjenta z PRA=94% o genotypie HLA-A24; B38,35; Cw4,-, na znalezienie HLA-identycznego dawcy wynoszą PFD=0,007% (1 na 14000 dawców). Zastosowanie aplikacji HLA-Matchmaker w połączeniu z danymi płynącymi z analizy PRA-CDC (panel 50-dawców o znanych HLA), PFD zwiększa do 0,115% (1/870 dawców). W grupie zimmunizowanych, zastosowanie HLA-Matchmaker umożliwiło określenie dodatkowych AM dla 37 spośród 54 badanych, dzięki czemu zwiększono szansę na przeszczep 12,7-krotnie. Dodatkowe AM określa się na podstawie kombinacji TAA (triplet amino acids) które tworzą HLA pacjenta. Antygeny HLA, które mają wspólne TAA w odniesieniu do całego genotypu HLA pacjenta uznawane są za akceptowalne [20].

Na wyniki długości życia przeszczepu u zimmunizowanych może mieć wpływ również ograniczona zapadalność na infekcje (krótki okres po transplantacji) i nowotwory (długi okres), osiągnięta dzięki zmniejszonej dawce leków immunosupresyjnych. Czynniki te przemawiają na korzyść „podejścia biologicznego”, w relacji do rozmiaru powikłań, które towarzyszą podejściu „farmakologiczemu”. Droga farmakologiczna powinna być zachowana dla biorców, dla których niemożliwe jest znalezienie dawcy, przeciwko któremu biorca nie posiada aloprzeciwciał (PRA=100%).

### Podejście farmakologiczne

Podejście farmakologiczne obejmuje wiele metod, których główną rolą jest usunięcie/eliminacja wpływu aloprzeciwciał swoistych dla biorcy przed przeszczepem, zapobieganie powstawaniu nowych przeciwciał anti-HLA oraz agresywna immunosupresja hamująca wytwarzanie aloprzeciwciał po transplantacji. Obecnie, odczulanie prowadzi się do chwili uzyskania ujemnego wyniku próby krzyżowej w cytotoxyczności zależnej od dopełniacza (metoda CDC). Leczenie jest jednak niezwykle kosztowne, a odsetek niepowodzeń zbyt znaczący, stąd próby szacowania dopuszczalnych przed transplantacją poziomów aloprzeciwciał u biorcy po odczulaniu. Według Reinsmoena i wsp., bezpieczny poziom DSA nie powinien przekraczać  $10^5$  jednostek SFI (standard fluorescent intensity) mierzonej na fluorymetrze typu luminex w testach typu SA (single antygen) lub odpowiednio



200 MCS (mean channel shift), gdy pomiaru dokonuje się na cytometrze przepływowym (FCXM). Powyżej tych wartości obserwowano zwiększone ryzyko AMR potwierdzone badaniem obecności złożeń C4d w biopsji. Obserwacje mają charakter poglądowy, opierają się o wyniki uzyskane w 16 transplantacjach zimmunizowanych pacjentów po odczulaniu (IVIg z rituximabem) [63].

Wśród metod obniżających miano aloprzeciwciał przed przeszczepem wymienia się:

1. **Infuzje dożylnie immunoglobulin** (intravenous immunoglobulin: IVIg): Sposób zastosowania preparatu i efekty odczulania przedstawił Glotz i wsp. w 2002 r. Mechanizm działania IVIg podawanych przed/po transplantacji jest wielokierunkowy. Przeciwciała antyidiotypowe zawarte w preparacie wiążą obecne w osoczu aloprzeciwciała hamując jednocześnie wytwarzanie nowych. IVIg hamuje również aktywność składowych dopełniacza, wpływają na proliferację i aktywację limfocytów T, B zwiększając dodatkowo apoptozę tych ostatnich [34,35].

Selektywna terapia IVIg przynosi dobre rezultaty w przypadkach poliklonalnej odpowiedzi na antygeny HLA (wysoki wskaźnik PRA), ale w niskich mianach aloprzeciwciał [3,33]. Postępowanie pozostaje nieefektywne u pacjentów wysoko zimmunizowanych z „koktajlem swoistości”. Blisko 30% takich przeszczepów kończy się ostrym odrzucaniem (AMR), kolejne 20% odpowiada odrzutem zależnym od odpowiedzi komórkowej [39].

2. **Plazmaferezę (PL):** Wymiana osocza skutecznie usuwa przeciwciała u biorcy, nawet w wysokim mianie. Efekt zabiegu utrzymuje się jednak krótko, stąd największe zastosowanie znajduje u wysoko uczulonych z planowaną przeszczepem od dawcy rodzinnego. Modyfikacja PL poprzez dodatek immunoglobuliny anty-CMV dodatkowo hamuje resyntezę aloprzeciwciał anty-HLA. Według niektórych schematów, PL uzupełnia się także o włączenie przeciwciał anti-CD20 (rituximab). Jako najskuteczniejszą metodę, uznaje się stosowanie wspólnie plazmaferezy i IVIG. Postępowanie to pozwala na zmniejszenie incydentów ostrego odrzucania z 80% (grupa otrzymująca selektywnie IVIg) do 29% [24]. Metoda nie jest u wszystkich skuteczna: niektóre raporty mówią o konieczności nawet 20-krotnego powtórzenia cyklu plazmaferez z IVIg, co nie pozostaje bez znaczenia dla kosztów postępowania [29].

Mimo pozornej prostoty zabiegu, u około jednej trzeciej chorych mogą wystąpić powikłania (m.in. reakcje uczuleniowe na płyny substytucyjne, zaburzenia rytmu serca, zaburzenia krzepliwości).

3. **Immunoadsorpcję (IA):** Zabieg polega na separacji osocza za pomocą aferezy, a następnie przepuszczeniu przez kolumny zawierające białko gronkowca typu A. IA najczęściej wykonuje się przed planowanym zabiegiem transplantacji i następnie co 2–3 dni po przeszczepieniu, aż do uzyskania stabilizacji narządu. Szacuje się, że pojedynczy zabieg IA obniża miano przeciwciał IgG o 80% [47].

Czyniono też próby zastosowania IA z rituximabem w przeszczepach niezgodnych w układzie ABO, przy czym nie

wykazano istotnej różnicy w przeszczepach grupowo zgodnych w odniesieniu do przeżycia przeszczepu w krótkim okresie po transplantacji i incydentów AMR [31].

4. **Przeciwciało anti-CD20 (rituximab):** Mechanizm działania leku polega na eliminacji tkankowych i krążących limfocytów B poprzez zależną od dopełniacza lizę. Efekt działania utrzymuje się długo, dopiero po około roku od zakończenia leczenia następuje regeneracja puli limfocytów B w stopniu umożliwiającym ich wykrycie w krwi obwodowej [24]. Genberg i wsp [30] badając skutki jednorazowej dawki rituximabu u 49 biorców nerki, u 88% z nich nie wykazali obecności limfocytów B nawet po 15 miesiącach zarówno we krwi obwodowej, jak i w tkance przeszczepionej nerki. Zastosowanie leku obejmuje zarówno leczenie odrzucania zależnego od przeciwciał, jak i odczulanie pacjentów wysoko zimmunizowanych. Ze względu na odległy czas działania, rituximab daje szansę pacjentom oczekującym na przeszczep od zmarłego dawcy.

Dobre efekty obniżania poziomu aloprzeciwciał są osiągane przez skojarzenie rituximabu z IVIg – 80% pacjentów odpowiada w stopniu umożliwiającym transplantację z rocznym przeżyciem przeszczepu na poziomie 94% [39,80].

Powodzenie transplantacji wysoko uczulonym biorcom najczęściej opiera się o kombinację wyżej przedstawionych metod odczulania. Kim i wsp. przedstawili wyniki przeszczepienia siedmiu pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek oczekujących na przeszczep od żywego dawcy, przeciwko któremu w wysokim mianie posiadali aloprzeciwciała. Zastosowano plazmaferezę z IVIg w wysokich dawkach. Przed planowanym zabiegiem PL włączano MMF i Tac. Podano jednorazową dawkę rituximabu (375 mg/m<sup>2</sup>). U wszystkich pacjentów wyeliminowano DSA do poziomu niewykrywalnego w próbie krzyżowej (CM CDC). Po zabiegu transplantacji, u dwóch pacjentów wystąpiło ACR reagujące na steroidy, AMR rozpoznano u jednego pacjenta. Efekty odrzucania humoralnego powstrzymano poprzez zabiegi plazmaferezy. U wszystkich pacjentów przeszczep funkcjonuje prawidłowo (dane w 24 miesiącu po transplantacji) [41].

Schemat leczenia pacjentów wysoko zimmunizowanych **po przeszczepie**, oprócz standardowego leczenia podtrzymującego, obejmuje włączenie środków zapobiegających odrzutowi zależnemu od przeciwciał. Zastosowanie znajduje surowica antytymocytarna (antithymocyte globulin – ATG), przeciwciała monoklonalne anti-IL2R, rituximab z/bez IVIg, przeciwciało anti-CD52 (alemtuzumab, CAMPATH). Obecnie, brak jest jednoznacznego schematu postępowania, a wiele ośrodków wprowadza własne modyfikacje. Wpływ na ten stan mają różnice w odpowiedzi biorców na leczenie uzależnione od rodzaju i stopnia ich zimmunizowania utrudniające ustalenie jednego „złotego standardu” dla ogółu zimmunizowanych [22,24].

Mimo dostępnych leków, odrzucanie zależne od przeciwciał (AMR) nadal jest powikłaniem występującym u 20–30% chorych, gdyż obniżając poziom aloprzeciwciał nie usuwamy komórek pamięci. Możliwość monitorowania DSA stwarza w tym obszarze możliwość szybkiej interwencji dającej szansę na przedłużenie funkcjonowania przeszczepu [64].

Wspólnym powikłaniem po zastosowaniu schematu farmakologicznego jest obniżenie odporności i podatność na zakażenia oraz zwiększone ryzyko wystąpienia scho-

zeń limfoproliferacyjnych w porównaniu do schematu leczenia przyjętego u pacjentów nieobciążonych ryzykiem.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Adams A.B., Williams M.A., Jones T.R., Shirasugi N., Durham M.M., Kaech S.M., Wherry E.J., Onami T., Lanier J.G., Kokko K.E., Pearson T.C., Ahmed R., Larsen C.P.: Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance. *J. Clin. Invest.*, 2003; 111: 1887–1895
- [2] Akalin E., Watschinger B.: Antibody mediated rejection. *Semin. Nephrol.*, 2007; 27: 393–407
- [3] Algorithm helps highly sensitized kidney transplant patients; Emory University, published online 2007/03/03; <http://www.whatsnextnetwork.com/technology/index.php/2007/03/03/p4676> (13.05.2009)
- [4] Amico P., Honger G., Mayr M., Schaub S.: Detection of HLA antibodies prior to renal transplantation: prospects and limitations of new assays. *Swiss. Med. Wkly*, 2008; 138: 472–476
- [5] Bartel G., Wahrmann M., Exner M., Regele H., Huttary N., Schillinger M., Kormoczi G.F., Horl W.H., Bohmig G.A.: *In vitro* detection of C4d-fixing HLA alloantibodies: associations with capillary C4d depositions in kidney allografts. *Am. J. Transplant.*, 2008; 8: 41–49
- [6] Bersztel A., Wadström J., Tufveson G., Gannedahl G., Bengtsson M., Bergström C., Frödin L., Claesson K., Wikström B., Wahlberg J.: Is kidney transplantation in sensitized recipients justified? *Transpl. Int.*, 1996; 9: S49–S53
- [7] Biellmann D., Honger G., Lutz D., Mihatsch M.J., Steiger J., Schaub S.: Pretransplant risk assessment in renal allograft recipients using virtual crossmatching. *Am. J. Transplant.*, 2007; 7: 626–632
- [8] Blattman J.N., Antia R., Sourdive D.J., Wang X., Kaech S.M., Murali-Krishna K., Altman J.D., Ahmed R.: Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *J. Exp. Med.*, 2002; 195: 657–664
- [9] Böhmig G.A., Exner M., Habicht A., Schillinger M., Lang U., Kletzmayer J., Säemann M.D., Hörl W.H., Watschinger B., Regele H.: Capillary C4d deposition in kidney allografts: a specific marker of alloantibody-dependent graft injury. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2002; 13: 1091–1099
- [10] Boratyńska M.: Transplantacja nerki wysoko uczulonym biorcom. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2005; 56: 377–385
- [11] Boratyńska M., Lao M.: Przewlekła niewydolność allop przeszczepu. W: *Transplantologia kliniczna*, red.: Rowiński W., Wydawnictwo Lekarskie PZWL Warszawa 2004; 707–720
- [12] Bray R.A., Nolen J.D.L., Larsen C., Pearson C., Newell K.A., Kokko K., Guasch A., Tso P., Mendel J.B., Gebel H.M.: Transplanting the highly sensitized patient: the Emory Algorithm. *Am. J. Transplant.*, 2006; 6: 2307–2315
- [13] Cai J., Terasaki P.I.: Post-transplantation antibody monitoring and HLA antibody epitope identification. *Curr. Opin. Immunol.*, 2008; 20: 602–606
- [14] Campos M., Godson D.L.: The effectiveness and limitations of immune memory: understanding protective immune response. *Int. J. Parasitol.*, 2003; 33: 655–661
- [15] Cherikh W.S., Baker T., Nelson K., Land G., Leffell M., Nikaein A.: Broader geographic sharing through accurate prediction of crossmatch results. *Am. J. Transplant.* 2006; (6Suppl.): 360
- [16] Claas F.H., Dankers M.K., Oudshoorn M., van Rood J.J., Mulder A., Roelen D.L., Duquesnoy R.J., Doxiadis I.I.: Differential immunogenicity of HLA mismatches in clinical transplantation. *Transpl. Immunol.*, 2005; 14: 187–191
- [17] Claas F.H., Witvliet M.D., Duquesnoy R.J., Persijn G.G., Doxiadis I.I.: The acceptable mismatch program as a fast tool for highly sensitized patients awaiting a cadaveric kidney transplantation: short waiting time and excellent graft outcome. *Transplantation*, 2004; 78: 190–193
- [18] Colvin R.B., Smith R.N.: Antibody-mediated organ allograft rejection. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005; 5: 807–817
- [19] Cozzi E., Besenozon F., Bosio E., Valente M., Severo M.: Antibody-mediated rejection: an update. *Organs, Tissue Cells*, 2009; 12: 97–105
- [20] Duquesnoy R.J., Howe J., Takemoto S.: HLA Matchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. An alternative strategy to increase the number of compatible donors for highly sensitized patients. *Transplantation*, 2003; 6: 889–897
- [21] Duquesnoy R.J., Marrari M.: HLA Matchmaker: A molecularly based algorithm for histocompatibility determination II. Verification of the algorithm and determination of the relative immunogenicity of amino acid triplet-defined epitopes. *Hum. Immunol.*, 2002; 63: 353–363
- [22] Duquesnoy R.J., Takemoto S., De Lange P., Doxiadis I.I., Schreuder G.M., Persijn G.G., Claas F.H.: HLA Matchmaker: A molecularly based algorithm for histocompatibility determination. III. Effect of matching at the HLA-A, B amino acid triplet level on kidney transplant survival. *Transplantation*, 2003; 75: 884–889
- [23] Duquesnoy R.J., Witvliet M., Doxiadis I.I., de Fijter H., Claas F.H.: HLA Matchmaker-based strategy to identify acceptable HLA-Class I mismatches for highly sensitized kidney transplant candidates. *Transpl. Int.*, 2004; 17: 22–30
- [24] Durlik M., Gozdowska J.: Przeszczenie nerki u chorych wysoko zimmunizowanych. *Forum Nefrologiczne*, 2008; 1: 127–133
- [25] European Federation for Immunogenetics, Standards for Histocompatibility Testing, 2008, version 5.6, pkt. G 3.110, [http://www.efiweb.eu/fileadmin/user\\_upload/pdf/EFI\\_Standards\\_version\\_5.6.pdf](http://www.efiweb.eu/fileadmin/user_upload/pdf/EFI_Standards_version_5.6.pdf) (13.05.2009)
- [26] Eurotransplant Reference Laboratory – acceptable mismatch program <http://etrl.eurotransplant.nl/cms/index.php?page=amprogram> (13.05.2009)
- [27] Eurotransplant Reference Laboratory – Virtual PRA calculation <http://www.etrl.org/etrlpra/webform1.aspx> (13.05.2009)
- [28] Feucht H. E., Felber E., Gokel M.J., Hillebrand G., Nattermann U., Brockmeyer C., Held E., Reithmuller G., Land W., Albert E.: Vascular deposition of complementsplit products in kidney allografts with cell-mediated rejection. *Clin. Exp. Immunol.*, 1991; 86: 464–470
- [29] Gebel H.M., Bray R.A.: Approches for transplanting the sensitized patient: biology versus pharmacology. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2008; 23: 2454–2457
- [30] Genberg H., Hansson A., Wernerson A., Wannberg L., Tyden G.: Pharmacodynamics of rituximab in kidney transplantation. *Transplantation*, 2007; 84: S33–S36
- [31] Geyer M., Fischer K.G., Drognitz O., Walz G., Pisarski P., Wilpert J.: ABO-incompatible kidney transplantation with antigen-specific immunoabsorption and rituximab-insights and uncertainties. *Contrib. Nephrol.*, 2009; 162: 47–60
- [32] Gibney E.M., Cagle L.R., Freed B., Warnell S.E., Chan L., Wiseman A.C.: Detection of donor-specific antibodies using HLA-coated microspheres: another tool for kidney transplant risk stratification. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2006; 21: 2625–2629
- [33] Gloor J.: Kidney transplantation in the hyperimmunized patient. *Contib. Nephrol.*, 2005; 146: 11–21
- [34] Gloor J.M., DeGoe S.R., Pineda A.A., Moore S.B., Prieto M., Nyberg S.L., Larson T.S., Griffin M.D., Textor S.C., Velosa J.A., Schwab T.T., Fix L.A., Stegall M.D.: Overcoming a positive crossmatch in living-donor kidney transplantation. *Am. J. Transplant.*, 2003; 3: 1017–1023
- [35] Glotz D., Antonie C., Julia P., Suberbielle-Boissel C., Boudjeltia S., Fraoui R., Hacen C., Duboust A., Bariety J.: Desensitization and subsequent kidney transplantation of patient using IVIg. *Am. J. Transplant.*, 2002; 2: 758–760
- [36] Goodman R., Taylor C., O'Rourke C., Lynch A., Bradley J.A., Key T.: Utility of HLA Matchmaker and single-antigen HLA antibody detection beads for identification of acceptable mismatches in highly sensitized patients awaiting kidney transplantation. *Transplantation*, 2006; 61: 1331–1336
- [37] Hancock W.W., Gao W., Shemmeri N., Shen X.D., Gao F., Busuttill R.W., Zhai Y., Kupiec-Weglinski J.W.: Immunopathogenesis of accelerated allograft rejection in sensitized recipients: humoral and non-humoral mechanisms. *Transplantation*, 2002; 73: 1392–1397
- [38] Ilham M.A., Winkler S., Coates E., Rizzello A., Rees T.J., Asderakis A.: Clinical significance of a positive flow crossmatch on the outcomes of cadaveric renal transplants. *Transplant. Proc.*, 2008; 40: 1839–1843



- [39] Jordan S.C., Tyan D., Stablein D., McIntosh M., Rose S., Vo A., Toyoda M., Davis C., Shapiro R., Adey D., Milliner D., Graff R., Steiner R., Ciancio G., Sahney S., Light J.: Evaluation of intravenous immunoglobulin as an agent to lower allosensitization and improve transplantation in highly sensitized patients with end-stage renal disease: report of NIH IG02 trial. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2004; 15: 3256–3262
- [40] Kaliciński P.: Zasady alokacji nerek. *Poltransplant Biuletyn Informacyjny*, 2007; 1: 53–54
- [41] Kim S.M., Lee C., Lee J.P., Kim E.M., Ha J., Kim S.J., Park M.H., Ahn C., Kim Y.S.: Kidney transplantation in sensitized recipients; a single center experience; *J. Korean Med. Sci.*, 2009; 24: S143–S147
- [42] Kreuziger, K., Holden, E., Klohe.: A PC based program to match highly sensitized kidney patients with potentially compatible donors. 2004; Inland Northwest Blood Center, Spokane, WA
- [43] Lechler R., George A.J.: *Przeszczep i odrzucanie*. W: *Immunologia*, red. D. Male, J. Brostoff, D.B. Roth, I. Roitt; red. I wyd. polskiego: J. Zeromski, Elsevier Urban&Partner, Wrocław 2008; 387–388
- [44] Lee P.C., Terasaki P.I., Takemoto S.K., Lee P.H., Hung C.J., Chen Y.L., Tsai A., Lei H.Y.: All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation*, 2002; 74: 1192–1194
- [45] Lepin E.J., Reed E.F.: Complement independent mechanisms of anti-graft antibodies in transplant arteriosclerosis and accommodation. *Curr. Opin. Transpl.*, 2004; 9: 10–15
- [46] Limaye S., O'Kelly P., Harmon G., O'Neill D., Dorman A.M., Walshe J., Donohoe J., Little D., Conlon P.J., Keogan M.T.: Improved graft survival in highly sensitized patients undergoing renal transplantation after the introduction of a clinically validated flow cytometry crossmatch. *Transplantation*, 2009; 87: 1052–1056
- [47] Lorenz M., Regele H., Schillinger M., Kletzmayer J., Haidbauer B., Derfler K., Druml W., Böhmig G.A.: Peritransplant immunoadsorption: a strategy enabling transplantation in highly sensitized crossmatch-positive cadaveric kidney allograft recipients. *Transplantation*, 2005; 79: 696–701
- [48] Luminex Corporation – strona producenta [http://www.luminexcorp.com/applications/hla\\_testing.html](http://www.luminexcorp.com/applications/hla_testing.html) (13.05.2009)
- [49] Mao Q., Terasaki P.I., Cai J., Briley K., Catrou P., Haisch C., Rebellato L.: Extremely high association between appearance of HLA antibodies and failure of kidney grafts in a five-year longitudinal study. *Am. J. Transplant.*, 2007; 7: 864–871
- [50] McLaughlin K., Manns B., Nickerson P.: The routine use of high resolution immunological screening of recipients of primary deceased donor renal allografts is cost effective. *Transplantation*, 2006; 81: 1278–1284
- [51] Mizutani K., Terasaki P.I., Hamdani E., Esquenazi V., Rosen A., Miller J., Ozawa M.: The importance of anti-HLA strength in monitoring kidney transplant patients. *Am. J. Transplant.*, 2007; 7: 1027–1031
- [52] Mizutani K., Terasaki P.I., Rosen A., Esquenazi V., Miller J., Shih R.N., Pei R., Ozawa M., Lee J.: Serial ten-year follow-up of HLA and MICA antibody production prior to kidney graft failure. *Am. J. Transplant.*, 2005; 5: 2265–2272
- [53] Nambiar A., Duquesnoy R.J., Adams S., Zhao Y., Oblitas J., Leitman S., Stroncek D., Marincola F.: HLA Matchmaker-driven analysis of responses to HLA-typed platelet transfusions in alloimmunized thrombocytopenic patients. *Blood*, 2006; 107: 1680–1687
- [54] Narayanan K., Jaramillo A., Phelan D.L., Mohanakumar T.: Preexposure to sub-saturating concentrations of HLA class I antibodies confers resistance to endothelial cells against antibody complement-mediated lysis by regulating bad through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Eur. J. Immunol.*, 2004; 34: 2303–2312
- [55] Nowaczyk M., Górski A.: Omówienie wykonania prób krzyżowych i ocena PRA w ramach warsztatów Zakładu Immunologii Klinicznej CLO. *Poltransplant Biuletyn Informacyjny*, 2005; 1: 31–33
- [56] Opelez G.: Unrelated living donors, short ischemia, HLA matching. *Newsletter 2*: 2004: <http://www.ctstransplant.org/public/newsletters.shtml> (13.05.2009)
- [57] Opelez G.: Completeness of follow up: HLA matching and short ischemia. *Newsletter 1*: 2007: <http://www.ctstransplant.org/public/newsletters.shtml> (13.05.2009)
- [58] Organ Procurement and Transplantation Network. Kaplan-Meier median waiting times for registrations listed 1999–2004. Based on OPTN data as of May 8, 2009 <http://optn.transplant.hrsa.gov/latestData/rptStrat.asp> (13.05.2009)
- [59] Pei R., Lee J.H., Shih N.J., Chen M., Terasaki P.I.: Single human leukocyte antigen flow cytometry beads for accurate identification of human leukocyte antibody specificities. *Transplantation*, 2003; 75: 43–49
- [60] Piątosza B., Rubik J., Grenda R.: Is positive flow cytometric cross-match a risk factor for early cadaveric kidney graft dysfunction? *Transplant. Proc.*, 2006; 38: 53–55
- [61] Poduval R.D., Kadambi P.V., Josephson M.A., Cohn R.A., Harland R.C., Javadi B., Huo D., Manaligod J.R., Thistlethwaite J.R., Meehan S.M.: Implications of immunohistochemical detection of C4d along peritubular capillaries in late acute renal allograft rejection. *Transplantation*, 2005; 79: 228–235
- [62] Racusen L.C., Colvin R.B., Solez K., Mihatsch M.J., Halloran P.F., Campbell P.M., Cecka M.J., Cosyns J.P., Demetris A.J., Fishbein M.C., Fogo A., Furness P., Gibson I.W., Glotz D., Hayry P., Hunsicker L., Kashgarian M., Kerman R., Magil A.J., Montgomery R., Morozumi K., Nickleleit V., Randhawa P., Regele H., Seron D., Seshan S., Sund S., Trpkov K.: Antibody-mediated rejection criteria – an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am. J. Transplant.*, 2003; 3: 708–714
- [63] Reinsmoen N.L., Lai C.H., Vo A., Cao K., Ong G., Naim M., Wang Q., Jordan S.C.: Acceptable donor-specific antibody levels allowing for successful deceased and living donor kidney transplantation after desensitization therapy. *Transplantation*, 2008; 86: 820–825
- [64] Remuzzi G., Chiaramonte S., Perico N., Ronco C.: Posttransplant immunosuppression in highly sensitized patients. Humoral immunity in kidney transplantation. What clinicians need to know. *Contrib. Nephrol.*, 2009; 162: vii–ix
- [65] Roth A.E., Sönmez T., Unver M.U., Delmonico F.L., Saidman S.L.: Utilizing list exchange and nondirected donation through 'chain' paired kidney donations. *Am. J. Transplant.*, 2006; 6: 2694–2705
- [66] Scornika J.C., Guerra G., Schold J.D., Srinivas T.R., Dragun D., Meier-Kriesche H.U.: Value of posttransplant antibody tests in the evaluation of patients with renal graft dysfunction; *Am. J. Transplant.*, 2007; 7: 1808–1814
- [67] Smith J.D., Hamour I.M., Banner N.R., Rose M.L.: C4d fixing, Luminox binding antibodies – a new tool for prediction of graft failure after heart transplantation. *Am. J. Transpl.*, 2007; 7: 2809–2815
- [68] Solez K., Colvin R.B., Racusen L.C., Haas M., Sis B., Mengel M., Halloran P.F., Baldwin W., Banfi G., Collins A.B., Cosio F., David D.S., Drachenberg C., Einecke G., Fogo A.B., Gibson I.W., Glotz D., Iskandar S.S., Kraus E., Lerut E., Mannon R.B., Mihatsch M., Nankivell B.J., Nickleleit V., Papadimitriou J.C., Randhawa P., Regele H., Renaudin K., Roberts I., Seron D., Smith R.N., Valente M.: Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am. J. Transplant.*, 2008; 8: 753–760
- [69] Strycka-Rowińska D., Lewandowska D., Czerwiński J., Hermanowicz M., Przygoda J., Podobińska I., Hatliński R., Marcinkowska J., Melanowski P.: Krajowa lista osób oczekujących na przeszczepienie narządów. *Poltransplant Biuletyn Informacyjny*, 2009; 1: 16–27
- [70] Suchin E.J., Langmuir P.B., Palmer E., Sayegh M.H., Wells A.D., Turka L.A.: Quantifying the frequency of alloreactive T cells *in vivo*: new answers to an old question. *J. Immunol.*, 2001; 166: 973–981
- [71] Takemoto S.K., Zeevi A., Feng S., Colvin R.B., Jordan S., Kobashigawa J., Kupiec-Węgliński J., Matas A., Montgomery R.A., Nickerson P., Platt J.L., Rabb H., Thistlethwaite R., Tyan D., Delmonico F.L.: National conference to assess antibody-mediated rejection in solid organ transplantation. *Am. J. Transplant.*, 2004; 4: 1033–1041
- [72] Terasaki P.I.: Humoral theory of transplantation. *Am. J. Transplant.*, 2003; 3: 665–673
- [73] Terasaki P.I., Cai J.: Humoral theory of transplantation: further evidence. *Curr. Opin. Immunol.*, 2005; 17: 541–545
- [74] Terasaki P.I., Ozawa M.: Predictive value of HLA antibodies and serum creatinine in chronic rejection: results of a 2-year prospective trial. *Transplantation*, 2005; 80: 1194–1197
- [75] Terasaki P.I., Ozawa M., Castro R.: Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival. *Am. J. Transplant.*, 2007; 7: 408–415
- [76] UK transplant (Directorate of Organ Donation & Transplantation) [http://www.uktransplant.org.uk/ukt/statistics/transplant\\_activity\\_report/current\\_activity/ukt/transplant\\_activity\\_uk\\_2007-2008.pdf](http://www.uktransplant.org.uk/ukt/statistics/transplant_activity_report/current_activity/ukt/transplant_activity_uk_2007-2008.pdf) (13.05.2009)
- [77] United Network for Organ Sharing, Annual Report 2007 [http://www.ustransplant.org/annual\\_reports](http://www.ustransplant.org/annual_reports) (13.05.2009)
- [78] United Network for Organ Sharing. Rekomendacje zawarte w polityce alokacji nerek. [http://www.optn.org/PoliciesandBylaws2/policies/pdfs/Policy\\_7.pdf](http://www.optn.org/PoliciesandBylaws2/policies/pdfs/Policy_7.pdf) (13.05.2009)
- [79] Ustawa z dn. 1 lipca 2005 r. o pobieraniu, przechowywaniu i przeszczepianiu komórek, tkanek i narządów. *Dz. Ustaw*, 2005; nr 169: poz. 1411

- [80] Vo A.A., Lukovsky M., Toyoda M., Wang J., Reinsmoen N.L., Lai C.H., Peng A., Villicana R., Jordan S.C.: Rituximab and intravenous immunoglobulin for desensitization during renal transplantation. *N. Engl. J. Med.*, 2008; 359: 242–251
- [81] Woodle E.S.: The potential of paired donation programs: modeling and reality. *Am. J. Transplant.*, 2005; 5: 1787–1788
- [82] Worthington J.E., Martin S., Al-Husseini D.M., Dyer P.A., Johnson R.W.: Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. *Transplantation*, 2003; 75: 1034–1040
- [83] Worthington J.E., McEwen A., McWilliam L.J., Picton M.L., Martin S.: Association between C4d staining in renal transplant biopsies, production of donor-specific HLA antibodies, and graft outcome. *Transplantation*, 2007; 83: 398–403
- [84] Zangwill S., Ellis T., Stendahl T., Zahn A., Berger S., Tweddell J.: Practical application of the virtual crossmatch. *Pediatr. Transplant.*, 2007; 11: 650–654
- [85] Zhang Q., Liang L.W., Gjertson D.W., Lassman C., Wilkinson A.H., Kendrick E., Pham P.T., Danovitch G.M., Gritsch H.A., Reed E.F.: Development of posttransplant antidonor HLA antibodies is associated with acute humoral rejection and early graft dysfunction. *Transplantation*, 2005; 79: 591–598

---

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.

