Rejekce zprostředkovaná protilátkami po transplantaci srdce – přehled současných poznatků

Tomáš Gazdič, Ivan Málek, Josef Kautzner

Klinika kardiologie, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha, Česká republika

Gazdič T, Málek I, Kautzner J. **Rejekce zprostředkovaná protilátkami po transplantaci srdce – přehled současných poznatků.** *Cor Vasa* 2010;52:713–720.

Jedním z faktorů, které zásadně ovlivňují prognózu pacientů po transplantaci srdce, je absence rejekce – odhojení štěpu. Pokud k rejekci dojde, může být zprostředkována imunokompetentními buňkami nebo protilátkami. Historicky lépe prozkoumanou i terapeuticky lépe zvládnutou je buněčná rejekce, která byla v popředí výzkumu a zájmu posledních 45 let. K výraznému oživení zájmu o protilátkami zprostředkovanou rejekci došlo poté, co byla prokázána kauzální souvislost s rozvojem dysfunkce až selháním štěpu v časném potransplantačním období a s koronární nemocí štěpu v pozdějším období. Tento přehledový článek si klade za cíl seznámit čtenáře se současnými možnostmi diagnostiky a léčby rejekce zprostředkované protilátkami.

Klíčová slova: Transplantace srdce – Rejekce zprostředkovaná protilátkami – Diagnostika – Léčba

Gazdič T, Málek I, Kautzner J. **Antibody-mediated rejection after heart transplantation – an overview of current concepts.** *Cor Vasa* 2010;52:713–720.

A factor shown to heavily impact the prognosis of heart transplant recipients is absence of rejection, i.e., the failure of the body to accept a transplanted tissue. Historically, a better characterized and more readily treatable type is cellular rejection which has been at the forefront of research and interest over the past 45 years. There has been an appreciable renewal of interest in antibody-mediated rejection after graft dysfunction up to graft failure in the early post-transplant period had been shown to be causally related to transplant coronary artery disease at a later time. This review article aims at keeping the reader up to date about current options in diagnosing and treating antibody-mediated rejection.

Key words: Heart transplantation – Antibody-mediated rejection – Diagnosis – Treatment

Adresa: MUDr. Tomáš Gazdič, Klinika kardiologie, IKEM, Vídeňská 1958/9, 140 21 Praha 4, Česká republika, e-mail: t.gazdic@gmail.com

Rejekce štěpu po transplantaci srdce je jedním z klíčových momentů, které ovlivňují životy pacientů v potransplantačním období. V případě optimální imunologické shody mezi dárce a příjemcem, respektive při účinné imunosupresivní terapii dochází k postupné adaptaci imunitního systému na přítomnost štěpu. V případě neshody mezi dárce a příjemcem dochází k rejekci – odhojení štěpu. Imunitní systém reaguje na přítomnost cizích antigenů – aloantigenů (tj. antigenů od jiného jedince stejného druhu) buď infiltrací aktivovaných lymfocytů – buněčnou rejekcí, nebo tvorbou specifických protilátek – humorální rejekcí.

Existenci rejekce zprostředkované protilátkami (humorální, vaskulární) nebyla dlouho věnována adekvátní pozornost. Teprve výzkum a vývoj nových citlivých analytických metod umožnil v posledních deseti letech spolehlivou

detekci protilátek a průkaz poškození tkání způsobeného protilátkami. Rejekce štěpu je způsobena protilátkami proti specifickým dárceovským HLA antigenům (human leucocyte antigen – HLA), antigenům krevních skupin (AB0-izohemaglutininům) nebo non-HLA antigenům endoteliálních buněk.^{1,2} Protilátky mohou být spojeny s hyperakutní, akutní a chronickou rejekcí.³ Tato rejekce se objevuje častěji brzy po transplantaci, zvláště v případě pozitivního donor-specifického crossmatch (viz dále), nebo v případě senzitizedovaných recipientů s preformovanými anti-HLA protilátkami. Humorální rejekce se však může objevit i později po transplantaci. Akutní humorální rejekce vede k poškození a funkční poruše srdečního štěpu se závažnými hemodynamickými důsledky (hypotenze, šok); chronická humorální rejekce pak způsobuje koronární nemoc štěpu.⁴

Práce byla podpořena výzkumným grantem IGA MZ ČR NT 11262–6/2010.

Incidence humorální rejekce

S ohledem na počet transplantací srdce a různorodost používaných metod při vyšetřování protilátek nelze incidenci rejekce zprostředkované protilátkami odhadnout zcela spolehlivě. Mnohé z dostupných údajů pocházejí ze studií s transplantovanými ledvinami. Použitím screeningových testů však lze odhadnout přítomnost protilátek HLA až u 14–23 % recipientů transplantovaných orgánů s funkčním štěpem. V jednoročném sledování bylo pozorováno, že u 8,6 % pacientů s pozitivními protilátkami došlo k rozvoji rejekce graftu, což je signifikantně více než u pacientů s negativními protilátkami (3 %).⁵

Incidence humorální rejekce je vyšší u pacientů s preformovanými protilátkami. Proces vzniku specifických protilátek před transplantací se označuje jako senzitivace. Příčiny alosenzitizace zahrnují předchozí transfuze erytrocytů a krevních destiček, těhotenství, implantace mechanické srdeční podpory,^{6,7} předchozí transplantace (retransplantace) nebo použití homografů (např. při korekci vad u dětí).⁸

Senzitivace pacientů s implantovanou mechanickou srdeční podporou souvisí s použitím krevních derivátů v perioperačním období a dále s typem konkrétního zařízení. Srovnávací studie pulsatilního typu mechanické podpory (HeartMate I) využívajícího biomateriály a typy s axiálním průtokem (HeartMate II a DeBakey) bez biologických membrán ukázala, že u přístrojů s axiálním průtokem byl výskyt senzitivace statisticky významně nižší.⁹

Protilátky humorální rejekce

Na humorální rejekci se mohou podílet tři skupiny protilátek. Nejdéle a snad i nejlépe prozkoumanou je hyperakutní rejekce v případě transplantace u jedinců s inkompatibilní krevní skupinou (AB0).^{10,11} Další dvě skupiny aloprotilátek představují protilátky proti **HLA a non-HLA antigenům**. Hyperakutní, akutní i chronickou rejekci mohou spustit protilátky jak proti HLA třídy I (označovány HLA A, B, C), tak proti HLA třídy II (HLA DP, DR, DQ). HLA třídy I jsou exprimovány na povrchu všech buněk s jádrem v lidském organismu, HLA třídy II jsou přítomny na tzv. antigen prezentujících buňkách, ke kterým patří B-lymfocyty a endotelové buňky. Jako HLA třídy III označujeme komponenty komplementu. Tzv. non-HLA antigeny představují heterogenní skupinu antigenů přítomných na endotelových buňkách, doposud ne zcela přesně definovanou. Tyto antigeny však mohou spustit imunologickou odpověď stejně silně jako dvě výše uvedené skupiny. K těmto non-HLA antigenům řadíme tzv. MIC antigeny (major histocompatibility complex [MHC] class I-related chain antigens – řetězcové antigeny související s hlavním histokompatibilním komplexem). MIC antigeny (MICA, MICB) jsou kódovány geny, které jsou v těsné blízkosti genů kódujících MHC na šestém chromosomu a mohou zprostředkovat humorální rejekci vedoucí k poškození cév.¹² Mezi non-HLA protilátky pak řadíme i autoprotilátky (tzv. anti-heart antibodies),

protilátky proti vimentinu,¹³ srdečnímu myosinu,¹⁴ proteiny tepelného šoku¹⁵ a další.

Endotelové buňky dárcovského orgánu mohou být primárně poškozeny aloprotilátkami, které vznikly buď v pretransplantačním období (proces **senzitivace**, viz výše), nebo se vyvinou *de novo* po transplantaci. V pretransplantačním období se aloprotilátky objevují v různých podskupinách čekatelů ve 13–70 % (opakovaně těhotné ženy po četných transfuzích).¹⁶ Prakticky v kterémkoli období po transplantaci lze vyšetřit HLA protilátky přibližně u 20 % recipientů.⁵ Význam přítomnosti těchto protilátek je však nejednoznačný. U těchto pacientů je vyšší pravděpodobnost, že dojde k selhání štěpu v důsledku humorální rejekce.¹⁷ Probíhající humorální rejekce není zjevná z klinických vyšetření, dokud parenchym orgánu není poškozen na jistou kritickou úroveň, při které již žádná imunosupresivní léčba nemůže zvrátit poškození štěpu. Zjištění vzestupu protilátek by proto mohlo vést k intervenci, která by zabránila poškození štěpu. Na druhé straně je však známo, že ne u všech pacientů s přítomnými protilátkami dojde k rejekci. Tento fakt by mohl svědčit pro podíl protilátky na procesu orgánové akomodace.¹⁸

Byl vysloven předpoklad, že by bylo možné redukovat imunosupresi za pravidelné monitorace protilátek a teprve v případě signifikantního vzestupu protilátek zintenzivnit imunosupresivní terapii.^{19,20} To by ovšem znamenalo, že mnoho pacientů má aktuálně imunosupresi nadbytečnou. V současnosti nemáme spolehlivý klíč k diferenciaci pacientů, u kterých by mohla být imunosuprese bezpečně redukována.

Metody monitorace cirkulujících protilátek

Výrazný rozvoj laboratorních technik v nedávné době umožňuje detekci specifických protilátek proti HLA i non-HLA antigenům, a to i ve velmi nízkých koncentracích.

Úroveň senzitivace v pretransplantačním období je určována stanovením tzv. panel-reaktivních protilátek (panel-reactive antibody – PRA). Historicky nejstarší metodika je založena na protilátkami zprostředkované reakci komplementu (complement dependent cytotoxicity – CDC) a lymfocytů – tzv. cell-dependent metodika. Jde o rychlé a levné screeningové vyšetření, které slouží k odhadu přítomnosti, respektive absence protilátek; je nejméně senzitivní. Při vyšetření se používá sérum příjemce, které reaguje s panelem lymfocytů získaných z teoreticky zdravé populace jednotlivců (potenciální dárce). Výsledek je pak uváděn jako procento usmrcených lymfocytů z celkového přítomného počtu buněk.^{2,21}

Vzhledem k opakovaně dokumentované vazbě protilátek příjemce na HLA třídy I panelu vyšetřovaných lymfocytů, avšak bez indukce cytotoxicity (tzv. fenomén CYNAP – cytotoxicity negative adsorption positive) byla účinnost této metodiky zvýšena přidáním anti-human imunoglobulinu (AHG-CDC), senzitivita tohoto testu se zvýšila.²² Nevýhodou tohoto testu však bylo, že byly opakovaně zaznamenány falešně pozitivní výsledky na základě reakce non-HLA protilátek.

Využití dalších metod v devadesátých letech umožnilo výrazné zpřesnění nálezů a zvýšení jejich prediktivní hodnoty u senzitivizovaných pacientů před transplantací srdce.²³ Jde především o možnost stanovení HLA třídy I a současně HLA třídy II pomocí screeningového vyšetření průtokovou cytometrií (FC-PRA – flow cytometry PRA). Při této metodě se používají mikrokuličky (microbeads), z nichž každá je potažena určitým množstvím (2–6) purifikovaných HLA antigenů zvláště I. nebo II. třídy, které pak reagují s protilátkami ze séra příjemce.²⁴ Později byla zavedena metoda s použitím jednotlivých izolovaných HLA antigenů, což umožnilo detekci více než 100 specifických HLA antigenů.²⁵ Po přidání fluorescenčního média jsou tyto mikrokuličky analyzovány v průtokovém cytometru. Procento PRA je určeno množstvím mikrokuliček, které pozitivně reagují se sérem příjemce. Stanovení PRA průtokovou cytometrií má vyšší senzitivitu než AHG-CDC.

Další, v devadesátých letech zavedenou metodou stanovení PRA, je metoda ELISA (ELISA-PRA). Při této metodě jsou použity destičky s adsorbovanými jednotlivými HLA antigeny a po přidání séra příjemce dojde k vyvázání protilátek. Následným přidáním anti-human IgG protilátek označených např. alkalickou fosfatázou a promytím kolorimetrickým substrátem je možné identifikovat navázané protilátky.²⁶ Zdokonalení této metody představuje použití jednotlivých izolovaných HLA antigenů připravených rekombinantními technikami (tzv. single-HLA antigen-based ELISA), amplifikaci cílového signálu pak umožnilo zavedení barvení zprostředkovaného peroxidázou.

Poslední nejnovější metodou stanovení HLA protilátek je tzv. Luminex. Jde o průtokovou cytometrii, která umožňuje simultánní měření více než 100 analytů za použití mikrokuliček s navázanými antigeny. Tato metoda je výhodná pro svou jednoduchost a je plně srovnatelná s referenčními metodami.²⁷

Tyto metody založené na detekci jednotlivých HLA antigenů mohou detekovat pouze HLA-specifické protilátky, proto nepredikují humorální rejekci způsobenou non-HLA protilátkami, které mohou být detekovány tradičním stanovením CDC.

Procentuální vyjádření hodnoty PRA vyjadřuje procento populace, která je z hlediska příjemce neakceptovatelná pro riziko možné humorální rejekce. Na základě iniciálních studií je za hranici významnosti přijímaných nejčastěji 10 % PRA.^{28,29} Tato hranice však není obecně akceptovaná a různá pracoviště si stanovují různou hranici (> 0 %, 10 %, 25 %) pro určení významnosti PRA.^{30,31} Tato hodnota by měla odrážet riziko humorální rejekce po transplantaci s ohledem na senzitivitu vyšetřovací metody. Z doporučení konsensuální konference o senzitivizovaných pacientech vyplývá, že ke stanovování PRA by se měla přednostně používat nejspíše metoda stanovení PRA pomocí průtokové cytometrie.³²

Ze stanovení významného rizika u konkrétního pacienta vyplývají závažné důsledky. Senzitivizovaní pacienti jsou zařazeni na čekací listinu k transplantaci déle než pacienti s nižší hodnotou PRA. Ze senzitivizace vyplývá

nutnost provedení křížové zkoušky (crossmatch – CM) před transplantací, tzn. reakce séra příjemce s tkání dárce k ověření přítomnosti tzv. donor-specifických protilátek. Pokud se CM provádí před zahájením transplantace, nazýváme ho prospektivní, po transplantaci retrospektivní. V případě pozitivního prospektivního CM je provedení transplantace kontraindikováno a transplantovaný orgán dostává náhradní příjemce. Tato situace je medicínsky, organizačně a nezřídka i psychologicky pro všechny zúčastněné strany náročná.

Křížová zkouška – crossmatch

Analogicky jako při stanovení PRA v období před transplantací za účasti směsi lymfocytů několika jednotlivců lze využít komplement-dependentní cytotoxicity k provedení křížové zkoušky proti izolovaným lymfocytům u konkrétního dárce (CDC-crossmatch – CDC-CM). Tento test se využívá od šedesátých let minulého století.³³ Použitím T-lymfocytů dárce lze stanovit protilátky proti HLA třídy I, použitím B-lymfocytů pak protilátky proti HLA třídy II. Testem lze také prokázat protilátky proti non-HLA antigenům. Ze všech testů je tento nejbližší skutečným poměrům *in vivo* (usmrcení cílových buněk). Cytotoxickou aktivitu protilátek proti dárce lze jednoduše a přímo odečíst kvantifikací usmrčených buněk z jejich celkového počtu použitého v testu.

Tento test má však několik jednoznačných nedostatků. Je méně senzitivní ve srovnání s jinými testy; izolace B- a T-lymfocytů zvyšuje časovou náročnost testu; detekované protilátky musejí mít cytotoxickou aktivitu a aktivovat komplement, což se neděje ve všech případech humorální rejekce (viz dále). V tomto případě může dojít k rejekci i v případě negativního testu CDC-CM. A dále lymfocyty nejsou identické s *in vivo* cílem protilátek – endotelovými buňkami.

Křížová zkouška metodou průtokové cytometrie (FC-CM) má oproti CDC-CM vyšší senzitivitu³⁴ a je více reprodučibilní. Krevní buňky dárce jsou inkubovány se sérem příjemce a následně jsou inkubovány s fluorescenčně značeným anti-human imunoglobulinem. V případě, že má příjemce protilátky proti dárce, fluorescenční protilátky se navážou na protilátky proti lymfocytům, které jsou již navázány na lymfocyty dárce.

K výhodám tohoto testu patří, že detekuje HLA třídy I i II, stejně jako non-HLA protilátky, a v případě použití vhodných fluorescenčních protilátek umožňuje také detekovat protilátky, které ke svému účinku nevyžadují komplement. Fyzická izolace B- a T-lymfocytů před testem není nutná, třídění subpopulací lze provést elektronicky v průběhu průtokové cytometrie. Tato metoda představuje t.č. referenční metodu stanovení donor-specifických HLA protilátek.

Nevýhodou testu je, že prokazuje pouze vazbu donor-specifických protilátek na lymfocyty; vazba protilátek však ještě neznamená usmrcení, proto pozitivní test neznamená nevyhnutelně patologický účinek na cílové buňky.²

Virtuální crossmatch

Nutnou podmínkou výše uvedených metod je přítomnost buněk dárce v reálném čase před transplantací. V případě potenciálního dárce z velké geografické vzdálenosti nastává časový problém s dopravením dárce a jeho vyšetřením na pracovišti, kde má být provedena transplantace, předně s ohledem na ischemii štěpu. To vede k nutné preferenci lokálních dárců. Důsledkem jsou dlouhé čekací doby senzitivizovaných příjemců.³⁵ Problém je ještě markantnější v případě transplantace srdce u dětí.^{36,37} Zavedení nových vyšetřovacích metod využívajících průtokovou cytometrii, které umožňují rychlé vyšetření specifických protilátek proti jednotlivým HLA antigenům u příjemce a stanovení konkrétních HLA antigenů dárce (tzv. HLA typizace),³⁸ vedlo k možnosti predikce kompatibility dárce a štěpu. Tento přístup se nazývá virtuální crossmatch. Vede ke zvýšení pravděpodobnosti provedení transplantace, a tím umožňuje vyrovnat šance na transplantaci mezi senzitivizovanými a nesenzitivizovanými čekateli.³⁹ Problémem je senzitivita testu, negativní virtuální crossmatch může být falešně negativní, a proto je vždy nutné doplnit retrospektivní crossmatch k jeho ověření.⁸

Monitorace protilátek po transplantaci

Úloha protilátek v rozvoji dysfunkce štěpu po transplantaci není dostatečně definována. Vztah mezi komplementem fixujícími protilátkami a rozvojem koronární nemoci štěpu byl opakovaně prokázán.^{40,41} Podobný vztah byl popsán mezi protilátkami a rozvojem bronchiolitis obliterans po transplantaci plic.^{42,43} Z recentních studií vyplývá, že opakované vyšetření protilátek v potransplantačním období by mohlo sloužit jako časný varovný signál aktivace T-lymfocytů anebo aktivity B-lymfocytů a možných následných imunologických komplikací.²⁰ Frekvence vyšetření protilátek by se měla odvíjet od odhadu potenciálního rizika vzniku rejekce. U nesenzitivizovaných pacientů se jako racionální přístup jeví monitorace každé tři měsíce v prvním roce, později dvakrát ročně.¹⁹

V případě rozvoje humorální rejekce se monitorace protilátek jeví jako vhodný nástroj sledování účinnosti anti-rejekční terapie. Tím by byl definován nový cílový ukazatel v terapii – léčit protilátky, a nikoli histologický nález. Studie zkoumající účinnost anti-rejekční terapie po transplantaci ledvin ukázala, že i v případě vymizení histologických známek rejekce při přetrvávající vyšší koncentraci detekovaných protilátek došlo ke ztrátě štěpu. Naopak po dosažení alespoň 50% redukce protilátek oproti maximální hodnotě ke ztrátě štěpu nedošlo.⁴⁴

Srovnávací studie pacientů s HLA protilátkami nebo bez nich v pre- nebo potransplantačním období ukázala, že bytí má přítomnost protilátek v pretransplantačním období vliv na jednoroční přežití, výraznější vliv na dlouhodobé přežití (deset let) nemá. Jako nejhorší se jeví přítomnost protilátek vzniklých *de novo* po transplantaci. Pravděpodobným vysvětlením je, že v potransplantačním období vznikají donor-specifické protilátky.⁴⁵

Mechanismus protilátkami zprostředkované rejekce

Potenciální cílové buňky rejekce představují mezi jinými endotelové buňky a myocyty koronárních cév, které tvoří bariéru mezi buňkami imunitního systému příjemce a dárcovským alograftem. Imunitní odpověď proti alograftu je složena z mnoha způsobů aktivace a poškození cizího orgánu.

Rejekce zprostředkovaná protilátkami představuje proces, který je důsledkem působení imunoglobulinů (protilátek) proti dárcovským antigenům umístěným na endotelu mikrovaskulatury alograftu. Deponované imunoglobuliny a komplement s rezultujícími zánětlivými procesy poškozují stěny cév činností neutrofilů a makrofágů vedoucí k arteriitidě a venulitidě, které lze pozorovat v endomyokardiální biopsii.^{3,46}

Interakce mezi protilátkou a antigenem vede k primárnímu poškození endotelu čtyřmi různými cestami:

1. přímou formací komplexů atakujících membrány (membrane attack complex – MAC),
2. zánětlivými buňkami aktivovanými rozpustnými fragmenty komplementu,
3. fagocyty, které rozpoznávají fragmenty komplementu deponované v endotelových buňkách cestou receptorů pro komplement,
4. buněčnou cytotoxicitou dependentní na protilátkách, **bez účasti komplementu.**

První tři cesty jsou závislé na komplementu. Nálež fragmentu komplementu C4d v kapilárách graftu poskytuje jasný důkaz pro tuto „komplement-dependentní“ hypotézu. Za jednoznačné potvrzení humorální rejekce se pak považuje imunohistochemický průkaz přítomnosti fragmentů komplementu C4d.^{47,48}

Sekundární důsledky po poškození endotelu zahrnují aktivaci destiček a trombózu, proliferaci endotelových buněk a buněk hladkého svalstva a tkáně/orgánu poškozených humorální anebo buněčnou infiltrací. Pochopení těchto mechanismů vedlo k vypracování kritérií pro stanovení diagnózy humorální rejekce. Jejich souhrn uvádí *tabulka 1*.

Prezentace dárcovských antigenů antigen-prezentujícími buňkami T-lymfocytům příjemce vede k aktivaci a klonální proliferaci v přítomnosti kostimulačních molekul. Endotelové buňky srdečního alograftu hrají v procesu rejekce kritickou roli. Up-regulace endoteliálních adhezivních molekul vede k „přilepení“ aktivovaných cirkulujících lymfocytů a extravasaci do intersticia štěpu. Produkce a uvolnění cytokinů z aktivovaných T-lymfocytů a up-regulace jejich povrchových receptorů vede k proliferaci buněk imunitního systému a infiltraci makrofágů. Výsledkem těchto dějů je pak poškození myocytů a nekróza, které lze rozeznat, ale také odstupňovat histologickým vyšetřením myokardiální tkáně získané při endomyokardiální biopsii. Tato technika představuje základní kámen identifikace **buněčné rejekce**.

Hyperakutní reakce je nejlépe dokumentovaným příkladem rejekce zprostředkované protilátkami. Je způsobena preexistujícími protilátkami (např. protilátky proti antigenu A nebo B krevních skupin nebo anti-HLA protilátky), které se vážou na endotel a aktivují komplement. Endotelové

Tabulka 1 Nález při akutní rejekci srdce zprostředkované protilátkami

1. Klinický důkaz akutní dysfunkce štěpu
2. Histologický důkaz akutního poškození kapilár (požaduje se *a* a *b*)
 - a) Změny endotelu kapilár: otok nebo obnažení s kongescí
 - b) Makrofágy v kapilárách
 - c) Neutrofilové v kapilárách (v těžších případech)
 - d) Intersticiální edém anebo krvácení (v těžších případech)
3. Imunopatologický důkaz poškození zprostředkovaného protilátkami (v případě absence indukce OKT3) (požaduje se *a* nebo *b* nebo *c*)
 - a) Ig (G, M, anebo A) + imunofluorescenční průkaz C3d anebo C4d nebo C1q (ekvivalentní barvení difúzně v kapilárách)
 - b) CD68 pozitivita pro makrofágy v kapilárách anebo imunohistochemický průkaz C4d v kapilárách
 - c) Fibrin v cévách (volitelné, pokud je potvrzen, proces se popisuje jako závažnější)
4. Sérologický průkaz protilátek anti-HLA třídy I anebo anti-HLA třídy II nebo jiných anti-donor protilátek (např. non-HLA, AB0) v čase biopsie (podporuje klinické anebo morfologické nálezy)

buňky jsou stimulovány k sekreci von Willebrandova faktoru, který zprostředkovává adhezi destiček a jejich agregaci. Série těchto procesů pak vede k trombóze a vaskulární okluzi a následně dochází k ireverzibilnímu ischemickému poškození orgánu.

Od zavedení vyšetření senzitivace v pretransplantačním období klesla incidence protilátkami zprostředkované hyperakutní a akutní rejekce dramaticky. Nová imunosupresiva umožňují, že drtivá většina transplantovaných orgánů je v průběhu prvního roku po transplantaci plně funkční. Avšak dlouhodobé přežívání po transplantaci se za posledních 20 let podstatně nezměnilo.^{49,50}

Při chronické rejekci, která se manifestuje jako koronární nemoc transplantovaného orgánu, je intimální ztlustění důsledkem proliferativního účinku anti-HLA protilátek. Je pravděpodobné, že po poškození endotelu vede humorální anebo celulární infiltrace k přímému poškození orgánového parenchymu. Rychlost tohoto procesu pak závisí na třech faktorech: na množství aloprotilátek, schopnosti transplantovaného orgánu reparovat tkáň a imunosupresivní a další podpůrné terapii.

Prvním faktorem je množství aloprotilátek. Recipienti s vyšším titrem protilátek proti antigenům krevních skupin měli vyšší incidenci časného selhání štěpu. Pacienti s méně než 10 % panel-reaktivních protilátek měli signifikantně delší přežívání než pacienti s vyšší mírou senzitivace.^{8,51}

Druhým faktorem je schopnost transplantovaného orgánu reparovat tkáň. Jde o hlavní mechanismus, který může rejekci zpomalit, nebo oddálit. Závisí však na typu tkáně. Buňky některých tkání mají kapacitu k regeneraci po poškození (např. endotelové buňky, tubulární buňky ledvin, hepatocyty). Jiné, jako jsou myocyty, se regenerovat nemohou a po nevratném poškození a ztrátě buňky jsou nahrazeny jizvou (typicky fibrózou).

Třetím faktorem je imunosupresivní a další podpůrná terapie. Různá imunosupresiva mohou mít různé účinky na inhibici tvorby protilátek (tabulka 2). Na základě hypotézy, že prevence vzniku trombózy může oddálit rejekci štěpu,

byla použita antikoagulační terapie v kombinaci s léčbou vedoucí k depleci či supresi tvorby protilátek u AB0 inkompatibilní transplantace.⁵²

V klinické praxi však zjišťujeme probíhající chronickou rejekci až ve stadiu, kdy dojde k morfologickým změnám na cévách, resp. k poškození štěpu. Z metod, které využíváme k určení vaskulopatie, se za zlatý standard považuje intravaskulární ultrazvukové vyšetření (IVUS) v průběhu selektivní koronarografie.⁵³ Další upřesnění nálezů lze očekávat od implementace virtuální histologie do klinické praxe. Tuto metodu by pak bylo možné využít i k monitoraci vlivu použitých léčebných postupů. Nevýhodou je invazivní charakter vyšetření.

Prevence a léčba humorální rejekce

B-lymfocyty, přesněji plazmatické buňky, jsou hlavními buňkami produkujícími protilátky. Z toho důvodu se k dosažení prevence rejekce zprostředkované protilátkami stává inhibice a deplece buněk produkujících protilátky extrémně důležitá.

Ve snaze o zvýšení pravděpodobnosti úspěšné transplantace u senzitivovaného pacienta se rozvíjí koncept desenzitizace. Jde o provedení léčebného úkonu či úkonů, které povedou ke snížení koncentrace anti-HLA protilátek, a tím zvýší šanci na úspěšnou transplantaci a potransplantační průběh. Tento postup se nazývá preemptivní desenzitizace. Jako potenciálně slibná se jeví (pravděpodobně) kombinace vysokodávkovaných i.v. imunoglobulinů, plazmaferézy a rituximabu (viz dále). V případě, že dojde k tvorbě protilátek *de novo* po transplantaci s hrozícím potenciálním poškozením štěpu, léčebný postup vedoucí k záchraně štěpu (pokud je možný) označujeme jako záchranná (rescue) desenzitizace.⁵⁴

Obecně řečeno všechna aktuálně používaná imunosupresiva mají přímý nebo nepřímý účinek na inhibici/depleci B-lymfocytů. Nejčastěji používaná imunosupresiva (cyklosporin A, tacrolimus – tzv. kalcineurinové inhibitory a sirolimus [rapamycin], everolimus – tzv. mTOR inhibitory) jsou silnými imunosupresivy, která interferují se signalizací T-lymfocytů. Úspěšné prodloužení přežití štěpu používáním těchto léčiv vedlo k mylnému názoru, že T-lymfocyty jsou jedinými hráči, kteří způsobují rejekci štěpu. Protože však mnoho aloantigenů vyvolávajících protilátkovou odpověď jsou proteiny (např. HLA, MIC) a protilátková odpověď na proteinové antigeny vyžaduje pomoc antigen-specifických T-lymfocytů, látky ovlivňující T-lymfocyty nepůsobí preventivně pouze na T-lymfocytární – buněčnou, ale také na protilátkami (B-lymfocytární) zprostředkovanou imunitní odpověď. Tento mechanismus vysvětluje, proč tato primární imunosupresiva mohou být použita samotná nebo v kombinaci s další léčbou k terapii humorální rejekce.

Sirolimus a everolimus inhibují buněčnou proliferaci a jsou schopny redukovat, a dokonce zvrátit intimální růst v koronárních tepnách. Ve srovnávacích studiích (s azathioprinem^{55,56} a kalcineurinovými inhibitory⁵⁷) byl u obou přípravků pozorován příznivý účinek a signifikantní redukce intimálního růstu. Tyto látky představují

Tabulka 2 Vliv různých imunosupresivních modalit na tvorbu protilátek

Kategorie	Léčba	Hlavní mechanismus
Inhibice a deplece buněk produkujících protilátky	Cyklosporin A Tacrolimus (FK 506) Sirolimus (rapamycin)	Nepřímo sekundárně inhibují proliferaci B-lymfocytů v důsledku redukované produkce cytokinů T-lymfocyty.
	Azathioprin Cyklofosfamid Mykofenolát mofetil (MMF)	Inhibují DNA syntézu v dělicích se buňkách (T- a B-lymfocytech a dalších dělicích se buňkách).
	Rituximab	Anti-CD20 (marker povrchu B-lymfocytů) monoklonální protilátka, vede k depleci B-buněk.
	Bortezomib	Proteasomový inhibitor, indukuje apoptózu plazmatických buněk.
	OKT3	Anti-CD3 (marker povrchu T-lymfocytů) protilátka, nepřímo inhibuje proliferaci B-buněk.
	Antithymocytární globulin (ATG) a antilymfocytární globulin (ALG)	Vede přímo k depleci a nepřímo k inhibici B-lymfocytů.
	Campath-1H	Anti-CD52 (marker povrchu thymocytů, B- a T-lymfocytů a dalších), vede přímo k depleci B-buněk.
	Splenektomie	Chirurgicky odstraňuje orgán produkující lymfocyty (oboje B- i T-lymfocyty).
Odstranění nebo zablokování preexistujících nebo <i>de novo</i> vzniklých protilátek	Imunoadsorpce	Odstraňuje protilátky z periferní krve (antigeny krevní skupiny, protein A nebo sloupce potažené anti-human Ig protilátkami).
	Plazmaferéza (PPH) nebo výměna plazmy (PE)	Odstraňuje protilátky a další humorální faktory (komplement, cytokiny atd.) z periferní krve.
	Intravenózní imunoglobulin (IVIG)	Anti-idiotypový účinek (blokuje místa vázající antigen protilátek proti dárce) a další.
Zpomalení, nebo oddálení protilátkami zprostředkovaného primárního nebo sekundárního poškození	Antikoagulační terapie	Inhibuje vznik krevních sraženin.
	Glukokortikoidy	Protizánětlivý účinek, apoptóza B-lymfocytů.

významnou a v kontextu ostatních doposud zavedených imunosupresiv i výjimečnou možnost ovlivnění probíhající chronické koronární vaskulopatie po transplantaci srdce.^{58,59}

Další podskupina imunosupresiv interferuje se syntézou DNA a jejich hlavní účinek je na dělicí se tkáň. Tyto látky (azathioprin, cyklofosfamid a mykofenolát mofetil) mají přímý inhibiční účinek na B-lymfocyty – aktivně se dělicí buňky. Je pozoruhodné, že vzhledem k vlivu mykofenolátu na biosyntetickou *de novo* purinovou cestu může inhibovat lidské lymfocyty (B a T) specifitěji a účinněji než jiné buňky.

Antilymfocytární protilátky. Protilátky proti povrchovým molekulám lymfocytů působí odstraněním specifické podskupiny lymfocytů, resp. inhibicí jejich buněčných funkcí. Mezi těmito monoklonálními či polyklonálními protilátkami působí **rituximab** specificky proti povrchovému markeru B-lymfocytů CD20. Použití jediné dávky rituximabu, doplněné kortikosteroidy a plazmaferézou, příp. antithymocytárním globulinem vede k úspěšné léčbě.^{60–62} Předpokládá se, že použití rituximabu přispěje ke zlepšení výsledků těžké, na steroidy rezistentní, respektive protilátkami zprostředkované rejekce.

Novým, velmi slibným lékem s apoptotickým účinkem na plazmatické buňky je **bortezomib**. Mechanismem jeho účinku je proteasomová inhibice, která vede k depleci plazmatických buněk.⁶³ Původní indikace bortezomibu je léčba mnohočetného myelomu, aktuálně se přidává jako rescue léčba refrakterní humorální rejekce.^{64–66}

Splenektomie. Slezina je orgán, který produkuje lymfocyty, filtruje krev, zajišťuje zásoby krevních buněk a destruuje stárnoucí buňky. Odůvodněním splenektomie je odstranění hlavního zdroje lymfocytů, včetně B-lymfocytů produkujících protilátky. Užitek splenektomie vzhledem k přetrvávání štěpu a přežití pacienta je však sporný. Bylo doloženo, že splenektomovaní pacienti měli redukovanou incidenci a intenzitu epizod rejekce a lepší přežití; tento prospěšný účinek byl však krátkodobý. Dlouhodobý prospěch ze splenektomie ustupuje hlavně riziku fatální infekce a sepse.

Imunoadsorpce. Tento přístup *in vitro* specificky odstraňuje imunoglobuliny z periferní krve pacienta užitím antigenů krevní skupiny A nebo B, proteinu A (komponenta buněčné stěny *Staphylococcus aureus* se silnou vazebnou afinitou ke konstantnímu Fc-segmentu IgG protilátek) nebo sloupce potaženého antigeny proti lidským Ig. Původně byl tento přístup použit jako preemptivní terapie pro AB0-inkompatibilní nebo presenzitizované pacienty. V dalším období však bylo popsáno i úspěšné použití během rejekce zprostředkované protilátkami.⁶⁷

Plazmaferéza/výměna plazmy. Odstranění protilátek a dalších plazmatických faktorů je účinnou antirejekční terapií. Na rozdíl od imunoadsorpce odstraňuje plazmaferéza nejen protilátky, ale i další humorální faktory, jakými jsou komplement a cytokiny. Teoreticky by proto měla být plazmaferéza účinnější v prevenci anebo zvládnutí humorální rejekce. Doposud dostupné nekontrolované studie však

přinesly kontroverzní výsledky,^{68–70} které podtrhují nutnost dalšího klinického výzkumu.

Intravenózní imunoglobuliny (IVIG). Intravenózní imunoglobuliny jsou připraveny z poolu plazmy několika tisíců zdravých dárců krve, a proto se předpokládá, že obsahují téměř neomezené množství specifických protilátek. Mechanismus suprese PRA u pacientů čekajících na transplantaci není zcela spolehlivě objasněn. Lze předpokládat, že se zde uplatňuje efekt vazby protilátky na protilátku, který vede k potlačení jejího účinku. Byla však popsána i řada dalších potenciálních mechanismů, které zahrnují inhibici aktivace komplementu, zablokování down-regulace Fc-receptorů a modulaci aktivace a diferenciaci T- a B-lymfocytů.

Aktuální protokoly léčby využívají IVIG ve vysokých (2–3 g/kg) nebo nízkých dávkách (100 mg/kg).⁷¹ Na základě reakce protilátek na podanou iniciální léčbu pak lze stanovit nutnost rozšíření o další modalitu – např. rituximab.⁵⁴ IVIG se jeví jako optimální možnost léčby u pacientů s rejekcí a přidruženou infekcí. Umožňuje imunomodulaci nutnou ke zvládnutí rejekce a současně posiluje imunitní odpověď ke zvládnutí infekce.⁷² Na základě provedených srovnání se jeví IVIG jako účinná léčba humorální rejekce, ne však v preemptivní desenzitizaci. Vyšší úspěšnost léčby humorální rejekce mají protokoly kombinující plazmaferézu s IVIG a imunosupresiv.^{73,74}

Glukokortikoidy. Jsou často aplikovanými látkami užívanými široce v transplantologii k inhibici škodlivého vlivu imunitní odpovědi indukované rejekcí štěpu. I když mohou glukokortikoidy přímo indukovat apoptózu B-buněk a inhibovat tvorbu alopřilátek, hlavní smysl užití glukokortikoidů spočívá v jejich silném protizánětlivém účinku. Farmakologický účinek kortikosteroidů na rejekci vyplývá hlavně z inhibice produkce cytokinů. Vzhledem k jejich silnému imunosupresivnímu a protizánětlivému účinku jsou nyní glukokortikoidy léky první volby v léčbě rejekce. Výhody vyplývající z pokračující léčby rejekce kortikoidy musejí být vyváženy rizikem závažných, někdy až fatálních nežádoucích účinků.

Závěry

Protilátky jsou spojeny s hyperakutní, akutní i chronickou rejekcí srdečního štěpu. Klinickou důležitost mají protilátky proti HLA antigenům třídy I i II, zvláště pokud jsou donor-specifické, ale neméně závažné důsledky mohou mít i protilátky proti non-HLA antigenům. Poškození cílových buněk štěpu je většinou důsledkem aktivace komplementu, ale uplatňují se i mechanismy, které nejsou komplement-dependentní.

I přes velký pokrok, který byl učiněn na poli výzkumu rejekce zprostředkované protilátkami, není tento stav doposud uspokojivě patologicky ani klinicky charakterizován a vyžaduje další upřesnění a standardizaci diagnostických a léčebných postupů.⁷⁵ Techniky stanovení protilátek byly do klinické praxe zavedeny před 50 lety a doposud se dál vyvíjejí a zdokonalují. Umožňují nejenom diagnostiku, ale i monitoraci průběhu rejekce zprostředkované protilátkami. Jako důležitá a smysluplná se jeví monitorace protilátek v pre- i potransplantačním období.

Přiblížení se porozumění mechanismům účasti protilátek na poškození štěpu umožnilo zavedení velmi účinných, agresivních a často i ekonomicky velmi nákladných léčebných postupů, které zvyšují šance pacienta na přežití.

Přesto zůstává mnoho nejasností. V diagnostice humorální rejekce se doposud neobejdeme bez endomyokardiální biopsie, která je vzhledem ke svému invazivnímu charakteru potenciálně riziková. Probíhá diskuse ohledně možného zavedení podrobnějšího gradingu humorální rejekce. Není objasněn jednoznačný vztah mezi cirkulujícími protilátkami a rozvojem rejekce. Zůstává nejasné, proč někteří pacienti mají dobrou funkci štěpu i přes přítomnost protilátek, a jiní nikoli.

Přetrvává nejistota ohledně léčby presenzitizovaných pacientů a dopadu léčby na potransplantační průběh. Není jasný rozsah a intenzita léčby v pretransplantačním období, které by vedly k optimálnímu výsledku – přežití štěpu i pacienta bez vlivu na zhoršení kvality života.

Literatura

1. Singh N, Pirsch J, Samaniego M. Antibody-mediated rejection: treatment alternatives and outcomes. *Transplant Rev (Orlando)* 2009;23:34–46.
2. Cai J, Terasaki PI. Incidence and role of antibody in graft injury: how can it best be monitored? *Transplant Rev* 2004;18:192–203.
3. Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant* 2003;3:665–673.
4. Michaels PJ, Espejo ML, Kobashigawa J, et al. Humoral rejection in cardiac transplantation: risk factors, hemodynamic consequences and relationship to transplant coronary artery disease. *J Heart Lung Transplant* 2003;22:58–69.
5. Terasaki PI, Ozawa M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am J Transplant* 2004;4:438–443.
6. Freudenberger RS, Tawfik I, Shinnar M, Pendergast T. Panel-reactive screening and treatment practices following bridge to transplantation ventricular assist device placement. *Transplant Proc* 2009;41:1813–1815.
7. Massad MG, Cook DJ, Schmitt SK, et al. Factors influencing HLA sensitization in implantable LVAD recipients. *Ann Thorac Surg* 1997;64:1120–1125.
8. Wright EJ, Fiser WP, Edens RE, et al. Cardiac transplant outcomes in pediatric patients with pre-formed anti-human leukocyte antigen antibodies and/or positive retrospective crossmatch. *J Heart Lung Transplant* 2007;26:1163–1169.
9. George I, Colley P, Russo MJ, et al. Association of device surface and biomaterials with immunologic sensitization after mechanical support. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;135:1372–1379.
10. Harada H, Togashi M, Seki T, et al. Hyperacute onset of haemolytic-uraemic syndrome associated with hyperacute rejection in the recipient of an ABO-incompatible kidney. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:1009–1012.
11. Montgomery RA. ABO incompatible transplantation: to B or not to B. *Am J Transplant* 2004;4:1011–1012.
12. Zwirner NW, Fernandez-Vina MA, Stastny P. MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes. *Immunogenetics* 1998;47:139–148.
13. Jurcevic S, Ainsworth ME, Pomerance A, et al. Antivimentin antibodies are an independent predictor of transplant-associated coronary artery disease after cardiac transplantation. *Transplantation* 2001;71:886–892.
14. Warraich RS, Pomerance A, Stanley A, et al. Cardiac myosin autoantibodies and acute rejection after heart transplantation in patients with dilated cardiomyopathy. *Transplantation* 2000;69:1609–1617.
15. Latif N, Rose ML, Yacoub MH, Dunn MJ. Association of pretransplantation antiheart antibodies with clinical course after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1995;14:119–126.
16. Hardy S, Lee SH, Terasaki PI. Sensitization 2001. *Clin Transpl* 2001:271–278.
17. Reed EF, Demetris AJ, Hammond E, et al. Acute antibody-mediated rejection of cardiac transplants. *J Heart Lung Transplant* 2006;25:153–159.
18. Lynch RJ, Platt JL. Accommodation in organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2008;13:165–170.
19. Everly MJ, Terasaki PI. Monitoring and treating posttransplant human leukocyte antigen antibodies. *Hum Immunol* 2009;70:655–659.
20. Rose ML. De novo production of antibodies after heart or lung transplantation should be regarded as an early warning system. *J Heart Lung Transplant* 2004;23:385–395.
21. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969;280:735–739.

22. Fuller TC, Fuller AA, Golden M, Rodey GE. HLA alloantibodies and the mechanism of the antiglobulin-augmented lymphocytotoxicity procedure. *Hum Immunol* 1997;56:94–105.
23. Ciciarelli J, Helstab K, Mendez R. Flow cytometry PRA, a new test that is highly correlated with graft survival. *Clin Transplant* 1992;6:159–164.
24. Pei R, Wang G, Tarsitani C, et al. Simultaneous HLA class I and class II antibodies screening with flow cytometry. *Hum Immunol* 1998;59:313–322.
25. Pei R, Lee J, Chen T, et al. Flow cytometric detection of HLA antibodies using a spectrum of microbeads. *Hum Immunol* 1999;60:1293–1302.
26. Kaufman A, de Souza Pontes LF, Queiroz Marques MT, et al. Analysis of AHG-PRA and ELISA-PRA in kidney transplant patients with acute rejection episodes. *Transpl Immunol* 2003;11:175–178.
27. Cesbron-Gautier A, Simon P, Achard L, et al. [Luminex technology for HLA typing by PCR-SSO and identification of HLA antibody specificities.] *Ann Biol Clin (Paris)* 2004;62:93–98.
28. Betkowski AS, Graff R, Chen JJ, Hauptman PJ. Panel-reactive antibody screening practices prior to heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2002;21:644–650.
29. Lavee J, Kormos RL, Duquesnoy RJ, et al. Influence of panel-reactive antibody and lymphocytotoxic crossmatch on survival after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1991;10:921–929; discussion 929–930.
30. Nwakanma LU, Williams JA, Weiss ES, et al. Influence of pretransplant panel-reactive antibody on outcomes in 8,160 heart transplant recipients in recent era. *Ann Thorac Surg* 2007;84:1556–1562; discussion 1562–1563.
31. Ballew CC, Bergin JD. Management of patients with preformed reactive antibodies who are awaiting cardiac transplantation. *Am J Crit Care* 2005;14:46–51.
32. Kobashigawa J, Mehra M, West L, et al. Report from a consensus conference on the sensitized patient awaiting heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2009;28:213–225.
33. Terasaki PI, Marchioro TL, Strazl TE. Sero-typing of human lymphocyte antigens: preliminary trials on long-term kidney homograft survivors. In: Council NAOs-NR, ed. *Histocompatibility Testing*. Washington, DC: National Academy Sciences, 1965:83–96.
34. Pelletier RP, Adams PW, Hennessy PK, Orosz CG. Comparison of crossmatch results obtained by ELISA, flow cytometry, and conventional methodologies. *Hum Immunol* 1999;60:855–861.
35. Jordan SC, Vo A, Bunnapradist S, et al. Intravenous immune globulin treatment inhibits crossmatch positivity and allows for successful transplantation of incompatible organs in living-donor and cadaver recipients. *Transplantation* 2003;76:631–636.
36. Stehlik J, Islam N, Hurst D, et al. Utility of virtual crossmatch in sensitized patients awaiting heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2009;28:1129–1134.
37. Yang J, Schall C, Smith D, et al. HLA sensitization in pediatric pre-transplant cardiac patients supported by mechanical assist devices: the utility of Luminex. *J Heart Lung Transplant* 2009;28:123–129.
38. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DRB1*01 subtyping by allele-specific PCR amplification: a sensitive, specific, and rapid technique. *Tissue Antigens* 1991;37:197–204.
39. Bray RA, Nolen JD, Larsen C, et al. Transplanting the highly sensitized patient: the emory algorithm. *Am J Transplant* 2006;6:2307–2315.
40. Suciu-Foca N, Reed E, Marboe C, et al. The role of anti-HLA antibodies in heart transplantation. *Transplantation* 1991;51:716–724.
41. Rose EA, Pepino P, Barr ML, et al. Relation of HLA antibodies and graft atherosclerosis in human cardiac allograft recipients. *J Heart Lung Transplant* 1992;11:S120–S123.
42. Sundaresan S, Mohanakumar T, Smith MA, et al. HLA-A locus mismatches and development of antibodies to HLA after lung transplantation correlate with the development of bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation* 1998;65:648–653.
43. Palmer SM, Davis RD, Hadjiliadis D, et al. Development of an antibody specific to major histocompatibility antigens detectable by flow cytometry after lung transplant is associated with bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation* 2002;74:799–804.
44. Everly MJ, Everly JJ, Arend LJ, et al. Reducing de novo donor-specific antibody levels during acute rejection diminishes renal allograft loss. *Am J Transplant* 2009;9:1063–1071.
45. Ho EK, Vlad G, Colovai AI, et al. Alloantibodies in heart transplantation. *Hum Immunol* 2009;70:825–829.
46. Terasaki PI, Cai J. Humoral theory of transplantation: further evidence. *Curr Opin Immunol* 2005;17:541–545.
47. Feucht HE. Complement C4d in graft capillaries – the missing link in the recognition of humoral alloreactivity. *Am J Transplant* 2003;3:646–652.
48. Loy TS, Bulatao IS, Darkow GV, et al. Immunostaining of cardiac biopsy specimens in the diagnosis of acute vascular (humoral) rejection: a control study. *J Heart Lung Transplant* 1993;12:736–740.
49. Cecka M. Clinical outcome of renal transplantation. Factors influencing patient and graft survival. *Surg Clin North Am* 1998;78:133–148.
50. Nishikawa K, Terasaki PI. Outcome of preemptive renal transplantation versus waiting time on dialysis. *Clin Transpl* 2002;367–377.
51. Takemoto S. Sensitization and crossmatch. *Clin Transpl* 1995:417–432.
52. Takahashi K, Saito K, Takahara S, et al. Excellent long-term outcome of ABO-incompatible living donor kidney transplantation in Japan. *Am J Transplant* 2004;4:1089–1096.
53. Ramzy D, Rao V, Brahm J, et al. Cardiac allograft vasculopathy: a review. *Can J Surg* 2005;48:319–327.
54. Zachary AA, Leffell MS. Detecting and monitoring human leukocyte antigen-specific antibodies. *Hum Immunol* 2008;69:591–604.
55. Eisen HJ, Tuzcu EM, Dorent R, et al. Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients. *N Engl J Med* 2003;349:847–858.
56. Keogh A, Richardson M, Ruygrok P, et al. Sirolimus in de novo heart transplant recipients reduces acute rejection and prevents coronary artery disease at 2 years: a randomized clinical trial. *Circulation* 2004;110:2694–2700.
57. Raichlin E, Bae JH, Khalpey Z, et al. Conversion to sirolimus as primary immunosuppression attenuates the progression of allograft vasculopathy after cardiac transplantation. *Circulation* 2007;116:2726–2733.
58. Zakliczynski M, Swierad M, Nozynski J, et al. Survival benefit in heart transplant recipients who have coronary artery disease confirmed using angiography and are receiving sirolimus. *Transplant Proc* 2009;41:285–288.
59. Delgado JF, Manito N, Segovia J, et al. The use of proliferation signal inhibitors in the prevention and treatment of allograft vasculopathy in heart transplantation. *Transplant Rev (Orlando)* 2009;23:69–79.
60. Fagher S, Kamar N, Guilbeaud-Frugier C, et al. Rituximab therapy for acute humoral rejection after kidney transplantation. *Transplantation* 2007;83:1277–1280.
61. Aranda JM, Jr., Scornik JC, Normann SJ, et al. Anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) therapy for acute cardiac humoral rejection: a case report. *Transplantation* 2002;73:907–910.
62. Baran DA, Lubitz S, Alvi S, et al. Refractory humoral cardiac allograft rejection successfully treated with a single dose of rituximab. *Transplant Proc* 2004;36:3164–3166.
63. Luo H, Wu Y, Qi S, et al. A proteasome inhibitor effectively prevents mouse heart allograft rejection. *Transplantation* 2001;72:196–202.
64. Everly MJ, Everly JJ, Susskind B, et al. Bortezomib provides effective therapy for antibody- and cell-mediated acute rejection. *Transplantation* 2008;86:1754–1761.
65. Perry DK, Burns JM, Pollinger HS, et al. Proteasome inhibition causes apoptosis of normal human plasma cells preventing alloantibody production. *Am J Transplant* 2009;9:201–209.
66. Trivedi HL, Terasaki PI, Feroz A, et al. Abrogation of anti-HLA antibodies via proteasome inhibition. *Transplantation* 2009;87:1555–1561.
67. Hickstein H, Korten G, Bast R, et al. Immunoabsorption of sensitized kidney transplant candidates immediately prior to surgery. *Clin Transplant* 2002;16:97–101.
68. Abraham KA, Brown C, Conlon PJ, et al. Plasmapheresis as rescue therapy in accelerated acute humoral rejection. *J Clin Apher* 2003;18:103–110.
69. Alarabi A, Backman U, Wikstrom B, et al. Plasmapheresis in HLA-immunosensitized patients prior to kidney transplantation. *Int J Artif Organs* 1997;20:51–56.
70. Grauhan O, Knosalla C, Ewert R, et al. Plasmapheresis and cyclophosphamide in the treatment of humoral rejection after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2001;20:316–321.
71. Montgomery RA, Zachary AA. Transplanting patients with a positive donor-specific crossmatch: a single center's perspective. *Pediatr Transplant* 2004;8:535–542.
72. Moger V, Ravishanker MS, Sakhuja V, et al. Intravenous immunoglobulin: a safe option for treatment of steroid-resistant rejection in the presence of infection. *Transplantation* 2004;77:1455–1456.
73. Pisani BA, Mullen GM, Malinowska K, et al. Plasmapheresis with intravenous immunoglobulin G is effective in patients with elevated panel reactive antibody prior to cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1999;18:701–706.
74. Leech SH, Rubin S, Eisen HJ, et al. Cardiac transplantation across a positive prospective lymphocyte cross-match in sensitized recipients. *Clin Transplant* 2003;17(Suppl 9):17–26.
75. Kfoury AG, Hammond ME. Controversies in defining cardiac antibody-mediated rejection: need for updated criteria. *J Heart Lung Transplant* 2010;29:389–394.

Došlo do redakcije 18. 5. 2010

Prijeto 24. 8. 2010