

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA



MAGISTRO DARBAS

RECIPIENTŲ SENSITIZACIJOS ŽMOGAUS LEUKOCITŲ ANTIGENAIŠ
ĮVERTINIMAS PRIEŠ IR PO INKSTŲ PERSODINIMO

Magistrantė Ilona Paulauskaitė
Darbo vadovė Med.dr. T. Rainienė

2006

Turinys

Santrumpos	3
Įvadas.....	4
Tikslas ir uždaviniai.....	5
1. Literatūros apžvalga.....	6
1.1 Transplantacijos istorija.....	6
1.2 Transplantacinė imunologija.....	7
1.2.1 ŽLA svarba inkstų transplantacijoje.....	7
1.2.2 Imuninis atsakas į aloantigenus.....	9
1.2.3 Antikūnų struktūra ir svarba transplantato atmetime.....	10
1.2.4 Sensitizacija žmogaus leukocitų antigenais.....	14
1.3 Transplantato atmetimas.....	16
1.3.1 Alostransplantato atmetimo mechanizmai.....	16
1.3.2 Alostransplantato atmetimo tipai.....	18
1.3.2.1 Žaibiškas transplantato atmetimas.....	18
1.3.2.2 Ūmus transplantato atmetimas.....	19
1.3.2.3 Lėtinis transplantato atmetimas.....	20
2. Medžiaga ir metodai.....	21
2.1 Tiriamoji grupė.....	21
2.2 Metodai.....	25
2.2.1 Mikrolimfocitotoksinis metodas.....	25
2.2.2 Imunof fermentinis metodas.....	26
2.2.3 Tėkmės citometriniis metodas.....	27
3. Rezultatai.....	29
4. Rezultatų aptarimas.....	36
5. Išvados.....	39
6. Santrauka.....	40
7. Literatūros sąrašas.....	41

Santrumpos

ADCC – nuo antikūnų priklausomas ląstelių citotoksiškumas.

APL – antigeną pateikianti ląstelė.

CD (angl. *cluster of differentiation*) – leukocitų diferenciacijos antigenai.

CD4 – T helperiai limfocitai (T_H).

CD8 – T citotoksiniai limfocitai (TCL).

F_{ab} (angl. *fragment antigen binding*) – antigeną sujungianti dalis.

F_c (angl. *fragment crystallizable*) – efektorinė dalis.

FcR – receptorius antikūno Fc fragmentui.

FITC (angl. *fluorescein isothiocyanate*) – fluoresceino izotiocianatas.

IFN γ – interferonas γ .

Ig – imunoglobulinas.

IL – interleukinas.

MHC (angl. *major histocompatibility complex*) – pagrindinis audinių dermės kompleksas.

NK – (angl. *natural killer*) – ląstelė „natūralus kileris“.

PRA – (angl. *panel reactive antibodies*) - teigiamai su limfocitų panele reaguojančių antikūnų skaičius, išreikštas procentais.

TCR – (angl. *T cell receptor*) – antigenui specifinis T limfocitų receptorius.

TNF – (angl. *tumor necrosis factor*) – navikų nekrozės faktorius.

ŽLA – (angl. *human leukocyte antigens - HLA*) – žmogaus leukocitų antigenai.

Ivadas

Ligoniai, kuriems konstatuojama lėtinio inkstų funkcijos nepakankamumo galutinė stadija, gydomi dializėmis. Alternatyvus gydymo metodas yra alogeninio inksto persodinimas, kuris, jei operacija yra sėkminga, pagerina gyvenimo kokybę, pailgina ligonio gyvenimą ir yra pigesnis, nei ilgalaikis gydymas dializėmis [40].

Transplantato atmetimą gali sąlygoti ląsteliniai ir humoraliniai veiksniai. Esminis šio imuninio atsako veiksnys - donoriniai antigenai. Žmogaus leukocitų antigenai (ŽLA) yra ląstelės paviršiaus molekulės, randamos ant visų branduolį turinčių ląstelių. Kiekvienas individas turi unikalų tokių antigenų rinkinį, paveldėjęs po pusę iš kiekvieno tėvo. Svetimiems antigenams patekus į recipiento organizmą prieš juos aktyvinama šeimininko imuninė sistema. Siekiant to išvengti prieš transplantaciją atliekamas audinių tipavimas, tam kad parinkti kiek įmanoma artimesnį pagal ŽLA fenotipą donora, o po transplantacijos taikoma imunosupresija [18]. Dažnai būna neįmanoma parinkti tokį transplantatą, kuris neskatinėtų antikūnų gamybos (išskyrus monozigotinių dvynių atveju).

Daliai recipientų, turėjusių kraujo perpylimų, ankstesnių transplantacijų, o moterims ir dėl ankstesnių nėštumų, kraujo serume jau yra antikūnų, kurie gali reaguoti su transplantato antigenais [26]. Tokie antikūnai, esantys recipiento kraujo serume, labai padidina žaibiško, bei ūmaus atmetimo riziką, o dažnai būna ir kontraindikacija transplantacijai.

Ūmaus atmetimo metu lemiamą vaidmenį vaidina IL-2 receptoriai, per kuriuos skatinama greita T-ląstelių proliferacija. Užblokavus šiuos receptorių yra slopinamas imuninis atsakas. Kombinuojant imunosupresiją su monokloniniais antikūnais prieš IL-2 receptorių, ūmaus atmetimo epizodų per šešis mėnesius sumažėja 49 % [12].

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI:

Darbo tikslas – įvertinti sensitizaciją žmogaus leukocitų antigenais, inksto transplantato recipientams, kurie greta standartinės imunosupresijos vartojo monokloninius antikūnus prieš IL-2 receptorių ir kitoje grupėje, kuri jų nevartojo.

Darbo uždaviniai:

1. Įvertinti sensitizaciją žmogaus leukocitų antigenais prieš inkstų transplantaciją.
2. Įvertinti sensitizaciją žmogaus leukocitų antigenais, po inkstų persodinimo, recipientų grupėje, kuri greta standartinės imunosupresijos vartojo monokloninius antikūnus.
3. Įvertinti sensitizaciją žmogaus leukocitų antigenais, po inkstų persodinimo, ligoniams vartojusiems tik įprastinę imunosupresiją.
4. Palyginti sensitizaciją žmogaus leukocitų antigenais, po transplantacijos, monokloninius antikūnus vartojusių recipientų grupėje su jų nevartojusios grupės rezultatais.

1. Literatūros apžvalga

1.1 Transplantacijos istorija

Transplantacija gali būti apibūdinama kaip organų, audinių ar pačių ląstelių perkėlimas iš vieno individo (donoro) kitam (recipientui, šeiminkui). Jos ištakos siekia gilią senovę, nors pradžia buvo daugiau eksperimentinių bandymų pavidalo. Šiandien, pasinaudojus dabartinės medicinos duomenimis, galima sėkmingai atlikti kaulų čiulpų, širdies, plaučių, kepenų, venų, akies rainelės, odos, taip pat ir inkstų transplantacijas.

Pirmieji eksperimentiniai bandymai transplantacijos srityje buvo atlikti su gyvūnais. Yra duomenų, kad pirmasis sėkmingas eksperimentas inkstų transplantacijoje buvo atliktas 1902 m. Austrijoje panaudojus gyvūnus. Vėliau sekė daugybė eksperimentinių bandymų. Buvo pastebėta, kad autotransplantatai dažniausiai būdavo sėkmingi, o štai alotransplantatai buvo atmetami. Pirmoji inkstų transplantacija, kuomet donoro inkstas buvo persodintas kitam žmogui, buvo atlikta 1933 m. [21]. Ji buvo nesėkminga, inkstas nefunkcionavo. Tuo metu dar nebuvo žinoma nei kraujo grupių, nei kitų antigeninių sistemų svarba. Dėl visų šių nesėkmių buvo pradėta intensyviai ieškoti “biologinių barjerų”, kurie neleidžia inkstui ilgiau funkcionuoti. Ypač didelę reikšmę turėjo Peter B. Medawar 1940 m. atlikti darbai.

P.B. Medawar dirbdamas su pacientais, nukentėjusiais nuo nudegimų II Pasaulinio karo metais pastebėjo, kad pacientams bandant persodinti jo paties odą ši prigydo, o giminių transplantatai dažniausiai būdavo atmetami. Savo darbe P.B. Medawar pastebėjo, kad vienam pacientui persodinus jo brolio transplantatą, jis buvo atmestas, o pabandžius dar kartą persodinti to paties brolio transplantatą, atmetimo reakcija vis tiek įvyko ir ji buvo gerokai stipresnė ir greitesnė. Savo spėjimus patvirtinęs eksperimentiniais bandymais su gyvūnais jis pirmasis 1945 m. paskelbė apie imunologinę žmonėms persodintos odos atmetimo priežastį [31]. Jis nurodė, kad ankstesnė recipiento sensitizacija donorinėmis ląstelėmis sąlygoja spartesnę transplantato atmetimą. Už savo nuopelnus P.B. Medawar 1960-aisiais metais buvo apdovanotas Nobelio premija.

Pirmoji sėkminga inkstų transplantacija tarp identiškų dvynių buvo atlikta Joseph Murray ir Hartwell Harrison 1954 m. gruodžio 23 dieną [44]. Po šio įvykio sekė daug sėkmingų transplantacijų tarp identiškų dvynių, o bandymai persodinti kadaverinius inkstus praktiškai visuomet baigdavosi nesėkme. Vėliau, buvo pradėti naudoti efektyvūs imunosupresiniai vaistai, kurie gerokai sumažino transplantato atmetimo riziką [54].

1.2 Transplantacinė imunologija

1.2.1 Žmogaus leukocitų antigenų svarba inkstų transplantacijoje

Tiriant transplantacinį imunitetą, perversmą padarė didžiojo audinių dermės komplekso (angl. MHC, *major histocompatibility complex*) ir žmogaus leukocitų antigenų (ŽLA, angl. HLA, *human leukocyte antigens*) atradimas. Šiuo metu santrumpos MHC ir ŽLA vartojamos kaip sinonimai didžiajam audinių dermės kompleksui žymėti. Žmogaus leukocitų antigenai (ŽLA) pirmą kartą buvo identifikuoti 1950 metais kraujo banko darbuotojų, kurie pastebėjo, kad sumaišius baltųjų kraujo ląstelių su serumu pacientų, turėjusių daug kraujo perpylimų, įvyksta agliutinacija [9].

Aštuntojo dešimtmečio pabaigoje paaiškėjo pagrindinis MHC genų vaidmuo. Tuomet buvo nustatyta, kad antigenui specifiniai T limfocitai nesugeba atpažinti laisvo ar tirpaus baltyminio antigeno, tačiau atpažįsta baltyminių antigenų dalis (peptidus), kai jie yra nekovalentiškai sujungti su MHC genų produktais – MHC molekulėmis. Paaiškėjo, kad MHC genų koduojami produktai yra atsakingi už antigeninių peptidų generaciją, transportą ir pateikimą ląstelės paviršiuje. MHC molekulės nėra sekretuojamos iš ląstelės, jos yra susijusios su membrana. Taigi, pagrindinė imunologinė MHC molekulių funkcija – „surišti“ ir pateikti antigeninius peptidus ant ląstelių paviršiaus tam, kad jie būtų atpažinti ir sujungti antigenui specifinių T limfocitų per jų specifinį TCR receptorių [1].

ŽLA kompleksas randamas 6-osios chromosomos trumpajame petyje. Jis skirstomas į tris pagrindines klases. Pirmos klasės antigenai – A, B ir C randami visų branduolį turinčių ląstelių paviršiuje. Jie sudaryti iš sunkiosios grandinės (transmembraninio glikoproteino), nekovalentine jungtimi sujungtos su lengvąją grandine (β_2 mikroglobulinu). Sunkioji grandinė sudaryta iš α_1 , α_2 , α_3 , domenų. Pagrindiniu amino rūgščių sekos skirtumų rasta α_1 ,

α_2 domenuose, tai ir nulemia ŽLA-A, -B ir -C polimorfizmą. Antrosios klasės genai koduoja DR, DQ ir DP molekules. Šios klasės antigenų randama B-limfocitų, aktyvintų T-limfocitų, dendritinių ląstelių ir kai kurių epitelinių ląstelių paviršiuje. Antrosios klasės molekulė – tai heterodimeras, sudarytas iš sunkiosios α ir lengvosios β grandinės. Kiekvieną šių grandinių sudaro du ekstramembraniniai domenai. Polimorfizmą daugiausiai nulemia β_1 domenas. Trečios klasės ŽLA genai koduoja kai kuriuos komplemento komponentus, medžiagas, dalyvaujančias uždegime.

ŽLA sistema – viena polimorfiškiausių žmogaus organizme, todėl nelengva rasti tinkamą donorą giminystės ryšiais nesusijusiam recipientui. Tam laboratorijoje atliekamas audinių tipavimas, t.y. ŽLA-A, -B ir -DR tipo ištyrimas donorui ir recipientui. Tipuojant ŽLA I klasės antigenus atsižvelgiama tik į ŽLA-A ir ŽLA-B, ŽLA-C aleliai netipuojami, nes manoma, kad šios genetinės srities koduojamos molekulės yra mažesnis taikinyš aloreaktyviems T-limfocitams. ŽLA II klasės tapatumas įvertinamas pagal bendrus ŽLA-DR alelius, į ŽLA-DQ neatsižvelgiama, nes ŽLA-DR ir ŽLA-DQ genetinės sritys yra glaudžiai sukibusios ir paveldimos kartu, o ŽLA-DP aleliai netipuojami [1]. Todėl inkstų transplantacijoje galimas donoras parenkamas atsižvelgiant į bendrus ŽLA-A, -B ir -DR antigenus. Kadangi iš abiejų tėvų gauname po vieną šių antigenų, donoras ir recipientas derinamas pagal šešis galimus antigenus (2DR, 2B ir 2A). ŽLA tapatumas – svarbus veiksnys ilgam transplantato funkcionavimui. Kai kurių autorių duomenimis, pirmą kartą persodinant, vienerių metų transplantato funkcionavimas, nesutampant visiems 6 antigenams, yra 10% blogesnis, nei sutapus visiems antigenams. Trejų metų transplantato funkcionavimas skiriasi net 19% [43; 51; 56].

Be ŽLA sistemos antigenų šeimininko imuninė sistema dar gali reaguoti ir į mažuosius audinių suderinamumo antigenus, dar vadinamus mažaisiais H antigenais [1] Šiuos antigenus transplantatai taip pat ekspresuoja. Atsakas į šiuos antigenus vyksta vangiai, transplantato atmetimas remiantis šiais antigenais būna lėtas. Kaip pavyzdį mažųjų audinių suderinamumo antigenų galima paminėti vyrų Y antigeną [43].

Antigeniniai peptidai sujungti su ŽLA molekulėmis yra savotiški taikiniai šeimininko imuninėms ląstelėms, be to, tokie kompleksai turi ilgesnį gyvavimo pusperiodį. ŽLA molekulės be antigeninių peptidų turi trumpą gyvavimo pusperiodį ir greitai „pametamos“ nuo ląstelės paviršiaus [43].

1.2.2 Imuninis atsakas į aloantigenus

Pasirodė, kad TCR gali atpažinti tiek pačios ŽLA molekulės struktūrą, tiek patį antigeninį peptidą [5]. Ši išskirtinė savybė rodo, kad T-ląstelės yra labai specifinės ir genetiškai determinuotos skirtingiems individams. Yra nustatyta, kad apie 2% šeimininko T-ląstelių gali atpažinti svetimą ŽLA molekulę ir į ją sureaguoti. Toks didelis T-ląstelių, reaguojančių į alogenines ŽLA molekules skaičius ir lemia tai, kad alotransplantato atmetimo reakcija yra stiprus imuninis atsakas [1]. Aišku, persodinant genetiškai tapačių individų organus šie mechanizmai neaktyvinami, tačiau transplantacijoje tai ganėtinai retai pasitaiko.

Į transplantuoto inksto ekspresuojamas ŽLA molekules šeimininko imuninė sistema gali reaguoti keliais būdais: tiesioginiu ir netiesioginiu [45]. Persodintuose organuose visuomet aptinkama donoro antigeną pateikiančių ląstelių, kurias visiškai pašalinti yra ganėtinai sunku. Šios donorinės antigeną pateikiančios ląstelės, kaip ir kitos branduolį turinčios ląstelės, ant savo paviršiaus ekspresuoja donoro ŽLA I klasės molekules su donoro antigeniniais peptidais. Be to, jos ekspresuoja koaktyvacijos molekules, kaip kad CD40, bei B7-1/2. Aloantigeniniai peptidai pateikiami donoro ŽLA I klasės molekulių yra pagrindiniai taikiniai, kuriuos atpažįsta ir reaguoja T-limfocitai. ŽLA I klasės molekulės antigeninius peptidus pateikia CD8⁺ T-limfocitams, šie gauna kostimuliacinių signalų, tampa aktyvinti ir dalyvauja imunologinėse reakcijose, nukreiptose prieš transplantatą. Tiesioginis antigeno pateikimo kelias yra ypač svarbus ūmiai atmetimo reakcijai, tačiau mažiau reikšmingas lėtinėms transplantato atmetimo reakcijoms [43].

Netiesioginis antigeno pateikimo kelias remiasi teorija, kad transplantuoti donoriniai antigenai gali „nusišerti“ nuo ląstelių paviršiaus, endocitozės būdu patekti į šeimininko APL, ten būti perdirbti, sujungti su šeimininko nuosavomis ŽLA II klasės molekulėmis, bei iškelti ant ląstelės paviršiaus šeimininko CD4⁺ T-limfocitų atpažinimui. Pagrindinis skirtumas nuo tiesioginio antigenų pateikimo būdo yra tas, kad šiuo atveju svetimus antigeninius peptidus imuninei sistemai pateikia šeimininko antigeną pateikiančios ląstelės. CD4⁺ T-limfocitai aktyvuojasi ir gali atsakomai veikti transplantatą. Netiesioginis antigeno pateikimo kelias yra pagrindinis lėtinėse transplantato atmetimo reakcijose [43].

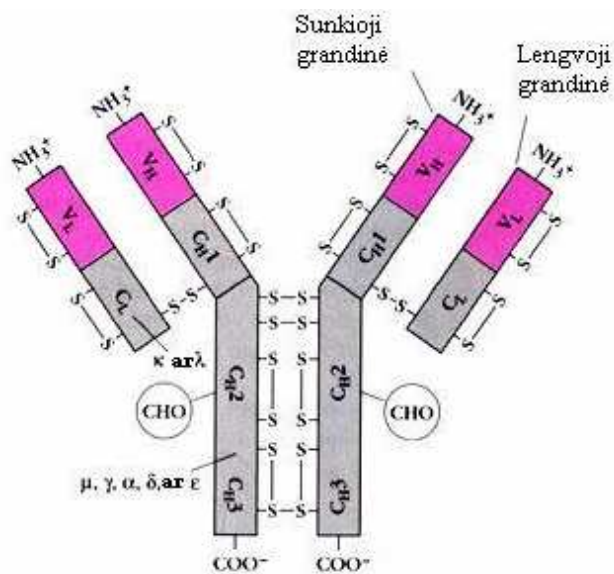
Antigeną pateikiančios ląstelės migruoja į T-ląstelių zonas antriniuose limfiniuose organuose. Jos pateikia donoro antigenus „naiviems“ ir atminties T-ląstelėms. T-ląstelės

aktyvuojamos, pasireiškia selektyvaus limfocitų klonų proliferacija ir diferencijacija. Diferencijuotos T-ląstelės išskiria citokinus, kurie yra signalas B-ląstelėms proliferuoti ir gaminti specifinius antikūnus. B-ląstelė negali pradėti diferenciacijos į efektorinę, antikūnus sintetinančią, ląstelę kol negauna citokinų signalo iš aktyvintų T-ląstelių. Pagrindiniai šiame procese dalyvaujantys citokinai yra IL-2, IL-4, IL-5. Susintetinti antikūnai gali specifiškai jungtis prie konkretaus antigeno ir sunaikinti jį palengvindami fagocitozę, ar komplemento baltymų pagalba [20].

1.2.3 Antikūnų struktūra ir svarba transplantato atmetime

Antikūnai yra pagrindinė kraujo plazmos γ globulinų frakcijos dalis. Tačiau ne visi γ globulinai yra antikūnai. Jų frakcijoje migruojantys antikūnai, norint atskirti nuo kitų baltymų, dar vadinami imunoglobulinais (Ig). Imunoglobulinai yra glikoproteinai, kuriuose yra nuo 2 iki 14% angliavandenių. Imunoglobulinai sudaro apie 20 % plazmos baltymų, bet jų yra ir ekstravaskuliniame skystyje, gleivių sekretuose, kai kurių limfocitų membranose. Imunoglobulinus sintetina ir sekretuoja plazminės ląstelės, kurios išsivysto iš B limfocitų, šiems proliferuojant ir diferencijuojantis po stimuliacijos antigenais. Imuninio atsako metu antikūnai gali būti sintetinami limfmazgiuose, blužnyje, gleivinių imuninėje sistemoje, kaulų čiulpuose [1].

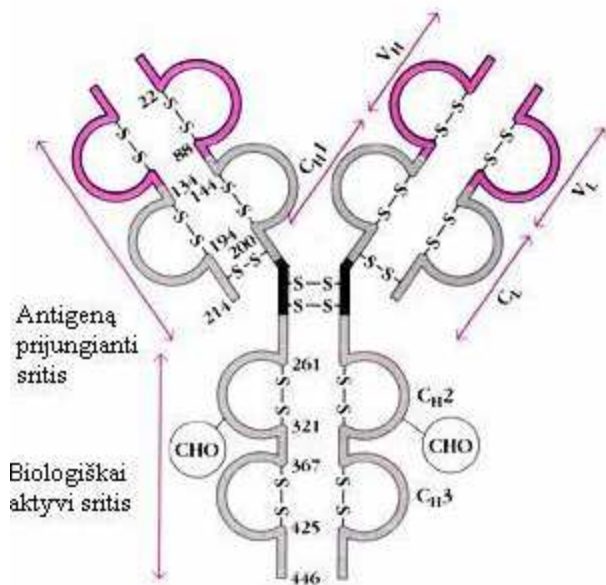
Imunoglobulinų molekulės pagrindinis struktūrinis vienetas yra **Y** formos monomeras, sudarytas iš dviejų porų identiškų polipeptidinių grandinių. Viena pora grandinių turi dvigubai daugiau amino rūgščių, tai sunkiosios grandinės – **H** (angl. *heavy*). Mažesnės molekulinės masės grandinės vadinamos lengvosiomis – **L** (angl. *light*). Keturios grandinės laikomos vienoje molekulėje nekovalentinėmis ir disulfidinėmis (-S-S-) jungtimis. Kiekviena **L** grandinė sujungta su **H** grandine disulfidine jungtimi, o **H** grandinės šiomis jungtimis sujungtos ir tarpusavyje [22].



Paveikslėlis 1. Imunoglobulinų struktūra [19].

Lengvosios (L) grandinės, gali būti arba κ arba λ . Sunkiosios grandinės gali būti μ , γ , α , δ ar ϵ . Lengvoji grandinė sudaryta iš dviejų domenų: VL (variabilaus) ir CL (pastovaus). Imunoglobulinų molekulėje kiekviena polipeptidinė grandinė turi kintamąją dalį (V) ir pastoviąją (C), todėl visų vienos klasės imunoglobulinų molekulių C dalys bus vienodos, o skirsis tik jų V dalys, priklausomai nuo to, koks antigenas sukėlė jų pasigaminimą. Sunkiosios grandinės kintamojoje dalyje taip pat yra vienas variabilus VH domenai, o pastoviojoje H grandinės dalyje esančių domenų skaičius priklauso nuo imunoglobulinų klasės, jų gali būti trys arba keturi (CH1; CH2; CH3; CH4).

Funkciniu požiūriu imunoglobulinų molekulėje galima išskirti dvi sritis: antigeną sujungiančią **F_{ab}** (angl. *fragment antigen binding*) ir efektorinę **F_c** (angl. *fragment crystallizable*). Antikūnas su antigenu reaguoja savo **F_{ab}** fragmentais.



Paveikslėlyje 4. pavaizduoti antigeną sujungiantys F_{ab} ir efektorinė funkcija pasižymintis F_c fragmentas. Variabilios dalys pavaizduotos raudona spalva. F_{ab} ir F_c fragmentai parodyti rodyklėmis.

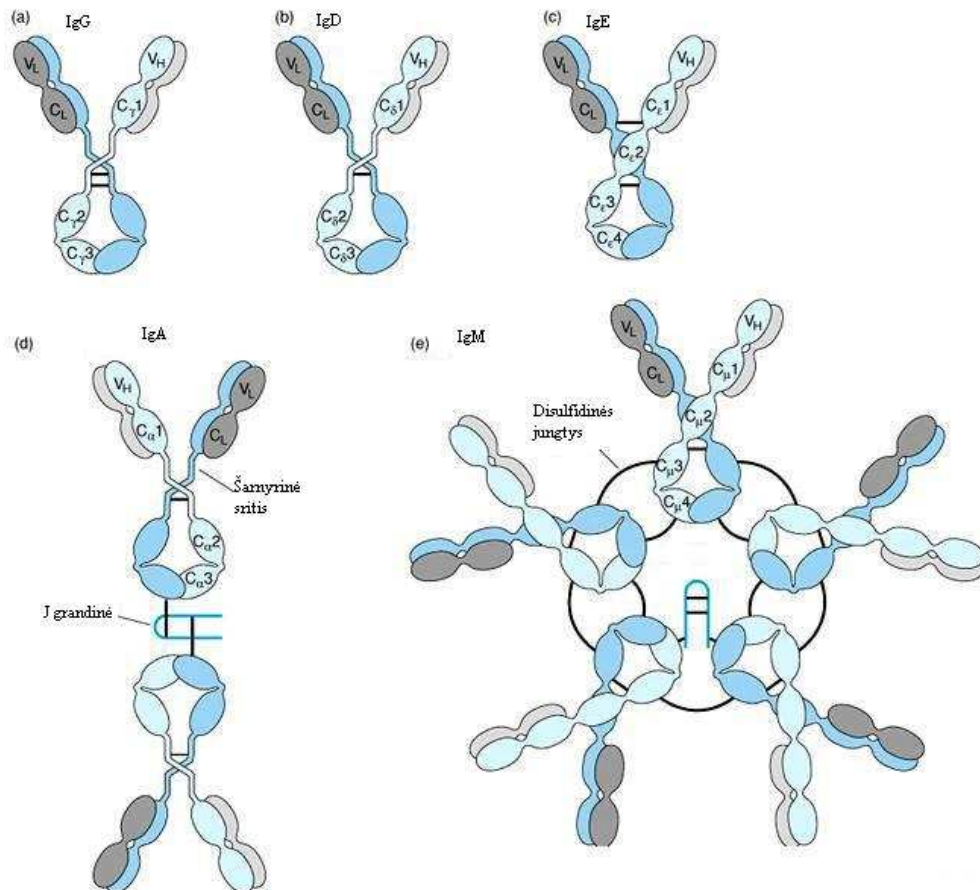
Paveikslėlis 4. Imunoglobulinų struktūra [19].

Efektorinės antikūnų funkcijos inicijuojamos tik imunoglobulinų molekulių abiemis F_{ab} fragmentams sujungus antigenus, o jos realizuojamos per F_c fragmentą. Svarbiausios funkcijos yra fagocitozės pagerinimas (opsonizacija), kuomet F_c fragmentas jungiasi su neutrofilų ir makrofagų $Fc\gamma R$ receptoriais ir imuninis kompleksas fagocituojamas; komplemento aktyvinimas (IgM klasės, IgG1 ir IgG3 poklasių antikūnai susijungę su antigenu aktyvina komplementą); nuo antikūnų priklausomas citotoksiškumas (APLC) – antikūnais padengta ląstelė prijungiama prie $Fc\gamma R$ eozinofilų, makrofagų, NK ląstelių, neutrofilų, o jų išskiriamos medžiagos (lizosominiai fermentai, perforinas, $TNF\alpha$) saugo ląstelę-taikinį, bei uždegimo reakcijų indukcija (aktyvinant komplementą, bei per IgE skatinant putliąsias ląsteles degranuliuoti ir išskirti uždegimo mediatorius) [1].

Priklausomai nuo **H** grandinių ypatumų skiriamos penkios imunoglobulinų klasės:

- IgG – sunkioji grandinė γ (gama);
- IgM – sunkioji grandinė μ (mi);
- IgA – sunkioji grandinė α (alfa);
- IgE – sunkioji grandinė ϵ (epsilon);
- IgD – sunkioji grandinė δ (delta).

Imunoglobulinų molekulėje tarp CH1 ir CH2 susidaro kampas, ši sritis vadinama šarnyrine, jos neturi IgE ir IgM klasės molekulės. Įvairių imunoglobulinų klasių ir poklasių molekulių šarnyrinės sritys skiriasi aminorūgščių liekanų ir disulfidinių jungčių skaičiumi. Šarnyrinė sritis jautresnė nei kitos molekulės dalys įvairių chemikalų, bei fermentų poveikiui.

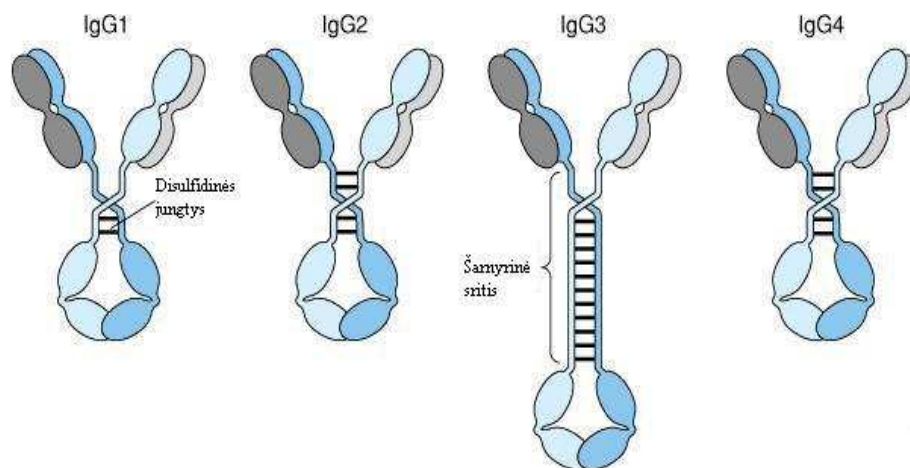


Paveikslėlis 5 Atskirų antikūnų klasių struktūra [23].

Paveikslėlyje 5. shematiškai pavaizduota žmogaus imunoglobulinų skirtingų klasių struktūra. Pagrindinis imunoglobulinų molekulės struktūrinis vienetas yra monomeras, sudarytas iš dviejų porų identiškų polipeptidinių grandinių. Įvairių imunoglobulinų klasių monomerų **H** grandinės skirtingos, bet kiekviena imunoglobulinų molekulė turi bent vieną monomerą. IgG, IgD ir IgE yra tik monomerai, IgA – sekrecine forma dimeras, kraujyje cirkuliuoja monomero forma, IgM – pentameras.

Imunoglobulinų klasės dar skirstomos į poklasius, pavyzdžiui, IgG klasėje yra IgG1, IgG2, IgG3 ir IgG4 poklasiai. IgG poklasių sunkiosiose grandinėse aminorūgščių sekos skirtumai

nežymūs, molekulės skiriasi disulfidinių jungčių skaičiumi ir išsidėstymu, taip pat amino rūgščių skaičiumi šarnyrinėse srityse.



Paveikslėlis 6 IgG klasės antikūnų atskirų poklasių struktūra [24].

Organizmui susidūrus su tam tikru antigenu pasigamina specifiniai antikūnai, tai vadinama sensitizacija. Dažniausiai antikūnai būna nukreipti prieš ŽLA I klasės molekules, tačiau gali būti ir prieš ŽLA II klasės molekules, arba prieš kitas ne ŽLA molekules. Normaliai žmogus antikūnų prieš audinių antigenus nesintetina, tačiau po transplantacijų, kraujo perpylimų, moterims po nėštumų, yra stebima sensitizacija ŽLA antigenais [4; 33; 49; 52]. Buvo pastebėta, kad serume pacientų, pas kuriuos išsivystė ūmi inksto transplantato atmetimo reakcija, buvo aukšti antikūnų prieš ŽLA antigenus titrai. Svarbu tai, kad šie antikūnai gali persistuoti metais, todėl tokių antikūnų, nukreiptų prieš įvairius donoro ląstelinius “taikinius” išaiškinimas yra svarbus uždavinys transplantacijoje [26].

1.2.4 Sensitizacija ŽLA antigenais

Po širdies, inkstų ir plaučių alotransplantacijos ŽLA sensitizacija, įvairių autorių duomenimis, randama nuo 28 % iki 70 % [40]. Sensitizacija ŽLA antigenais yra didelė problema transplantacijoje. Labai sensitizuotiems pacientams yra sunkiau parinkti donorą, jie ilgiau laukia transplantacijos, be to, turi didesnę transplantato atmetimo riziką [50].

Viena iš sensitizacijos žmogaus leukocitų antigenais priežasčių yra ankstesnės transplantacijos [39]. Buvo pastebėta, kad po pakartotinių transplantacijų transplantatai buvo dažniau prarandami dėl atmetimo, nei pirminiai inkstų alotransplantatai skiriant įprastinę imunosupresiją. Transfuzijos yra laikomos sensitizacijos žmogaus leukocitų antigenais priežastimi, kurių galima išvengti, tačiau daugelio autorių duomenimis jos išlieka svarbia priežastimi, lemiančią sensitizaciją [48]. Dar viena sensitizacijos ŽLA antigenais priežastis moterims yra nėštumai, tai susiję su tuo, kad ŽLA antigenai yra paveldimi kodominantiniu principu, ir imuninis atsakas moters organizme būna nukreiptas prieš vaisiaus ekspresuojamus tėvinius antigenus. Manoma, kad 15-30% besilaukiančių moterų sensitizuojasi tėviniiais antigenais. Kai kurie transplantacijos centrai vengia persodinti gimdžiusioms moterims tokius organus, kurie turi tokius pat antigenus kaip ir jų sutuoktiniai [8].

Sensitizacijos lygiui nustatyti yra naudojamas PRA (angl. *panel reactive antibodies*) t.y. teigiamai su limfocitų panele reaguojančių antikūnų skaičius, išreikštas procentais. Yra nustatyta tiesinė priklausomybė tarp limfocitotoksinių antikūnų lygio ir žaibiško, bei ūmaus transplantato atmetimo pasireiškimo [42].

Prieš transplantaciją, periodiškai, ne mažesniais kaip 3 mėnesių intervalais, bei po transplantacijos yra tiriamas serumas PRA nustatyti [34]. Jei pacientui nustatomas PRA yra nuo 0 iki 10%, jis laikomas nesensitizuotu, nuo 11% iki 50% - vidutiniškai sensitizuotu, o jei nuo 51% iki 100% - labai sensitizuotu. Kuo aukštesnis PRA, tuo daugiau kraujo serume yra antikūnų, galinčių reaguoti su įvairiais antigenais. Todėl dauguma populiacijos narių negali būti donorais tam asmeniui, nes jo kraujo serume jau yra antikūnų, galinčių reaguoti su jų antigenais.

Inkstų transplantatų recipientai, kurių PRA pikas $\geq 20\%$, donorinio organo laukia dukart ilgiau, nei nesensitizuoti, o jei PRA pikas $\geq 80\%$, laukimo laikas dar pailgėja. Bendrai paėmus moteris transplantacijos laukia ilgiau nei vyrai, tai susiję su sensitizacija dėl nėštumų [15].

Prognozuojant transplantato išlikimą labiau tinka didžiausia PRA vertė (PRA pikas), nei paskutinio tyrimo rezultatai. Taip yra todėl, kad po tam tikro laiko antikūnų kraujo serume gali nebelikti, tačiau atminties T-ląstelės išlieka ir antrą kartą susidūrusios su antigenu proliferuoja, išskiria citokinus, kaip atsakas į kuriuos B-limfocitai proliferuoja ir pasigamina

atitinkami antikūnai. Dėl to, laukiantiems inkstų transplantacijos kryžminis dermės mėginys su potencialiais donorais atliekamas su tais kraujo serumais, kuriuose buvo nustatytas didžiausias PRA [34]. Asmenys, kurių PRA pikai nuo 51% iki 100% turi panašią transplantato išėitį, nepriklausomai nuo vėliausiųjų PRA verčių [35]. Tačiau kai kurių autorių duomenimis, sensitizuoti pacientai, kurių PRA pikas >50%, o paskutinės PRA vertės „nukrito“ iki <26%, turi mažesnę riziką transplantato praradimui nei asmenys, kurių PRA „laikosi“ aukštas [46]. Labai sensitizuoti pacientai (PRA>50%) turi ne tik didesnę ūmaus transplantato atmetimo riziką, jiems taip pat dažniau pasireiškia lėtinės transplantato atmetimo reakcijos [3; 14]. Asmenims, kurių PRA yra aukštas ne tik pasireiškia daugiau atmetimo reakcijų, jiems taip pat sutrumpėja laiko tarpas iki jų pasireiškimo [6]. Jei prieš transplantaciją recipientas buvo nesensitizuotas, o po jos kraujo serume nustatomas aukštas antikūnų titras, tai gali būti prognostinis žymuo lėtiniam transplantato atmetimui [52].

Antikūnai prieš žmogaus leukocitų antigenus svarbūs ne tik prieš transplantaciją, jų nustatymas po transplantacijos, prieš tai nesensitizuotiems asmenims, labai svarbus prognozuojant transplantato išlikimą. Jei recipientas neturėjo nei kraujo perpylimų, nei nėštumų, antikūnų prieš ŽLA antigenus gamyba siejama su donoro ir recipiento ŽLA neatitikimu. Asmenys, kurie po transplantacijos sintetina aukštus antikūnų prieš ŽLA antigenus titrus turi didesnę transplantato praradimo, bei kitų komplikacijų riziką [38; 57].

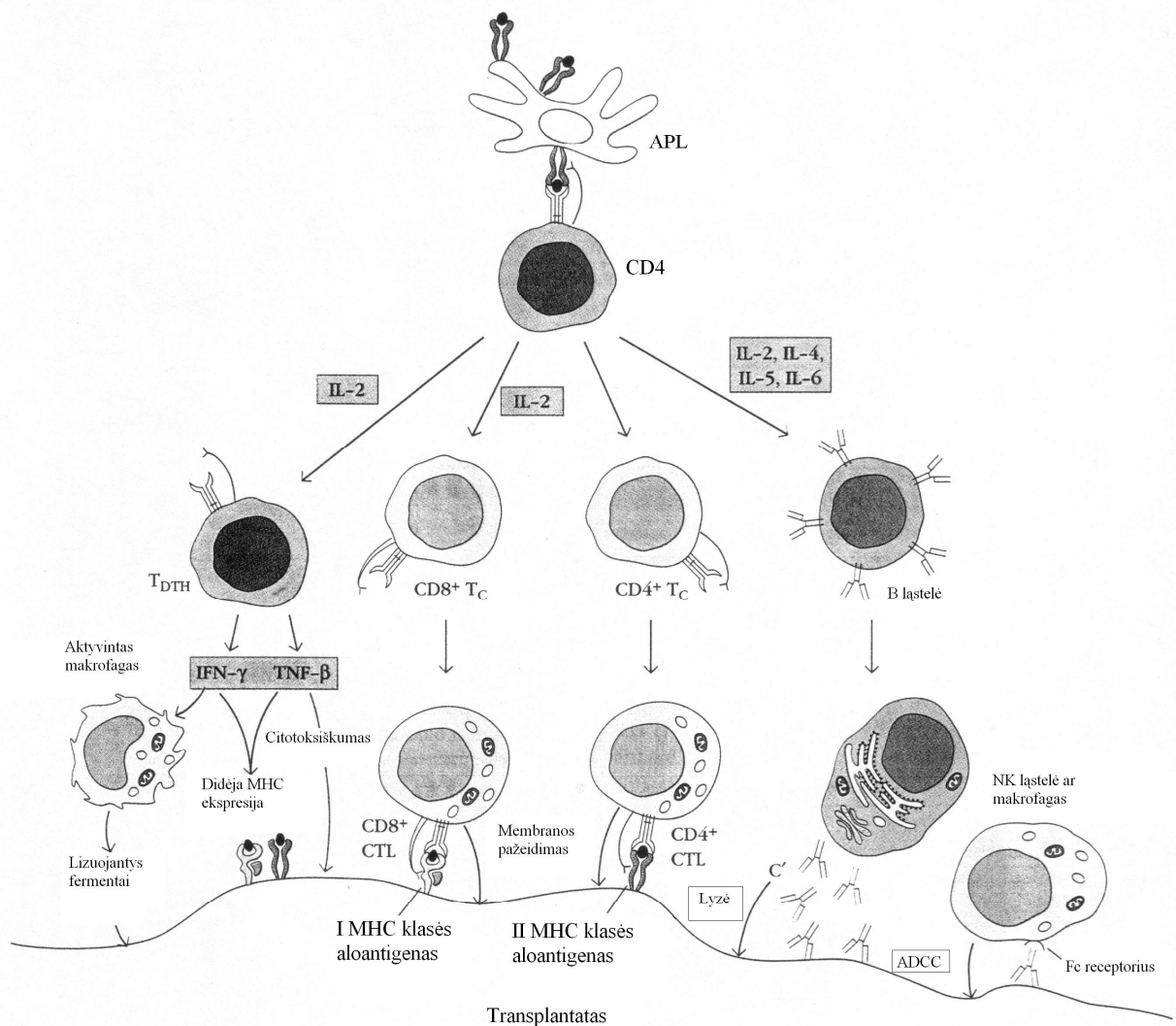
Ženkli sensitizacija ŽLA antigenais blogina ne tik inkstų transplantacijos rezultatus, yra duomenų, kad užfiksuotas aukštas PRA rezultatas prieš plaučių transplantaciją lemia blogesnę išgyvenamumą, ypač ankstyvame potransplantaciniame periode [16].

1.3 Transplantato atmetimas

1.3.1 Alotransplantato atmetimo mechanizmai

Labai trūkstant donorinių organų ne visuomet pavyksta parinkti idealų pagal ŽLA fenotipą transplantatą. Tokiu atveju recipiento imuninė sistema susiduria su svetimais ŽLA antigenais. Be to, peptidai sujungti alogeninių ŽLA molekulių taip pat svetimi. Tokie alogeniniai ŽLA-peptidų kompleksai natūraliai stimuliuoja T-ląstelių atsaką, kas sąlygoja ląstelinį organo atmetimą. Imuninių ląstelių „taikiniai“ alotransplantate yra jo kraujagyslių

endotelio ir parenchimos ląstelės. Transplantato atmetimą skirtingais mechanizmais sukelia aloreaktyvūs CD4 T-efektoriai, CD8 T-efektoriai, bei aloantikūnai (paveikslėlis 7). Aloreaktyvūs CD4 susitelkia transplantate ir aktyvina makrofagus, sukeldami transplantato pažeidimą pagal lėtą padidėjusio jautrumo reakciją. CD8 T-efektoriai tiesiogiai lizuoja transplantato endotelio ir parenchimos ląsteles, o tuo tarpu aloantikūnai jungiasi prie endotelio ląstelių, aktyvina komplementą ir sukelia transplantato kraujagyslių pažeidimus [1].



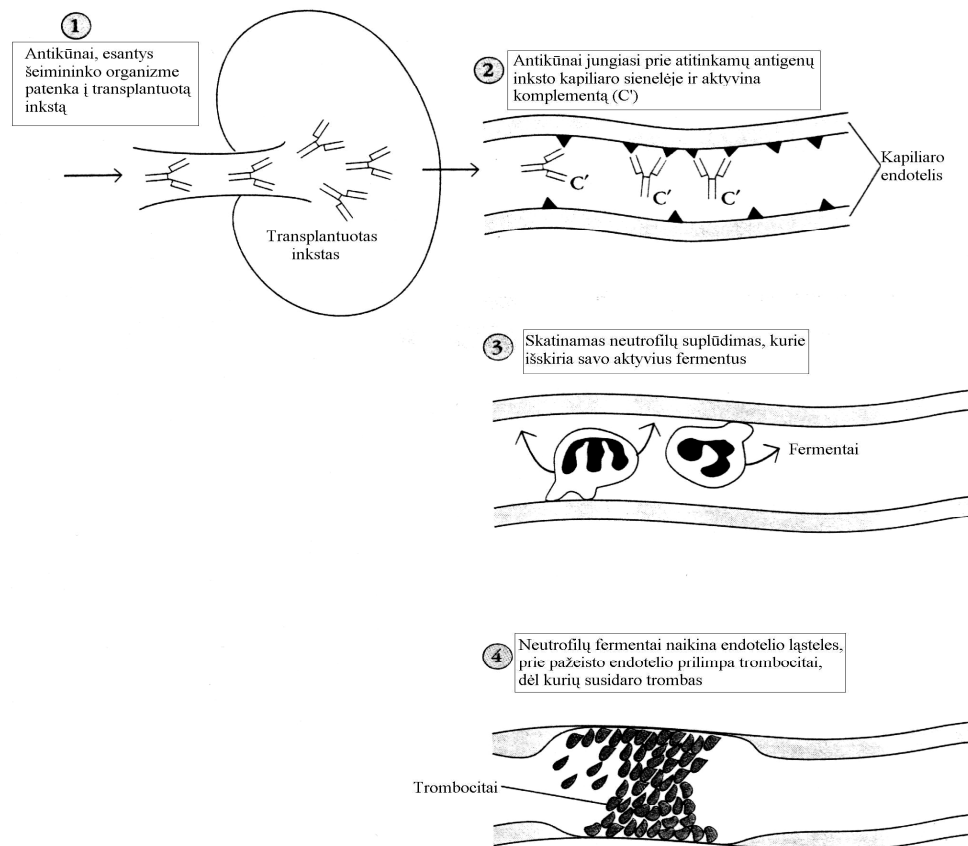
Paveikslėlis 7. Alotransplantato atmetimo mechanizmai [31].

1.3.2 Alotransplantato atmetimo tipai

1.3.2.1 Žaibiškas transplantato atmetimas

Transplantato atmetimas gali būti žaibiškas, ūminis ir lėtinis. Žaibiškas, arba hiperūmus, atmetimas gali prasidėti jau valandų bėgyje po transplantacijos. Šios reakcijos pagrindą sudaro recipiento kraujo serume esantys antikūnai nukreipti prieš donoro paviršinius antigenus. Iš tokių antigenų galima paminėti antikūnus prieš svetimą ŽLA molekules, tokiu atveju susidarys IgG klasės antikūnai. Sensitizacija tokiais antikūnais stebima po transplantacijų, kraujo transfuzijų, o moterims ir po pakartotinių nėštumų, šiuo atveju imuninis atsakas bus nukreiptas prieš vaisiaus ekspresuojamus tėvinius antigenus, nes ŽLA genai paveldimi kodominantiniu principu. Labai sensitizuotiems pacientams sunku parinkti donorą, jie ilgiau laukia transplantacijos ir turi didesnę transplantato atmetimo riziką [2; 29; 37].

Antikūnai taip pat gali būti nukreipti ir prieš eritrocitų ABO antigenus. Tokiu atveju susidarys IgM klasės, vadinami “natūralieji” antikūnai. Jų galima išvengti donorą ir recipientą parenkant tos pačios kraujo grupės. Abiem atvejais, organizme esantys antikūnai su krauju pateks į persodintą inkstą, jungsis prie atitinkamų antigenų, esančių ant transplantato kraujagyslių endotelio ir aktyvins komplementą. Dėl šių prižasčių endotelis pradeda sekretuoti didelės molekulinės masės von Willebrand faktorių, kuris sukelia trombocitų adheziją ir agregaciją. Be to, susitelkusios imuninės ląstelės taip pat išskiria savo aktyvius fermentus, dėl kurių endotelis pažeidžiamas ir prie jo prilimpa trombocitai, susidaro trombas, išemija ir transplantuoto organo nekrozė (paveikslėlis 8.).



Paveikslėlis 8 Žaibiško inksto transplantato atmetimo schema[1].

1.3.2 Ūmus transplantato atmetimas

Ūmaus transplantato atmetimo reakcijos prasideda praėjus maždaug savaitei po transplantacijos. Tokio tipo reakcijas sukelia donoro ŽLA fenotipo neatitikimas. Pagrindinė priežastis, dėl ko iki jos pasireiškimo praeina savaitė yra ta, kad tiek laiko reikia T-limfocitams diferencijuotis ir antikūnams pasigaminti.

Ūminės transplantato atmetimo reakcijos pasireiškia transplantato kraujagyslių endotelio ir parenchimos ląstelių pažeidimu. Jį sukelia IgG klasės antikūnai sąveikaujantys su endotelio antigenais (svetimomis ŽLA molekulėmis, bei kitais antigenais). Dėl antígeno-antikūno sąveikos aktyvinamas komplementas. Endotelį pažeisti gali ir T-limfocitai, išskirdami įvairius fermentus. Aktyvinti T-limfocitai išskiria citokinus, skatina uždegiminių ląstelių

chemotaksi, dėl ko galiausiai sukeliama transplantato nekrozė. Tiriant histologiškai pažeidimo vietose matomas vaskulito vaizdas. Ūminis transplantato atmetimas taip pat gali būti pavadintas IV tipo ląstelių sąlygota uždelsto tipo hiperjautrumo reakcija. Ūmaus atmetimo rizika yra didžiausia per pirmus tris mėnesius po transplantacijos, ją galima sumažinti taikant imunosupresiją [53].

1.3.3 Lėtinis transplantato atmetimas

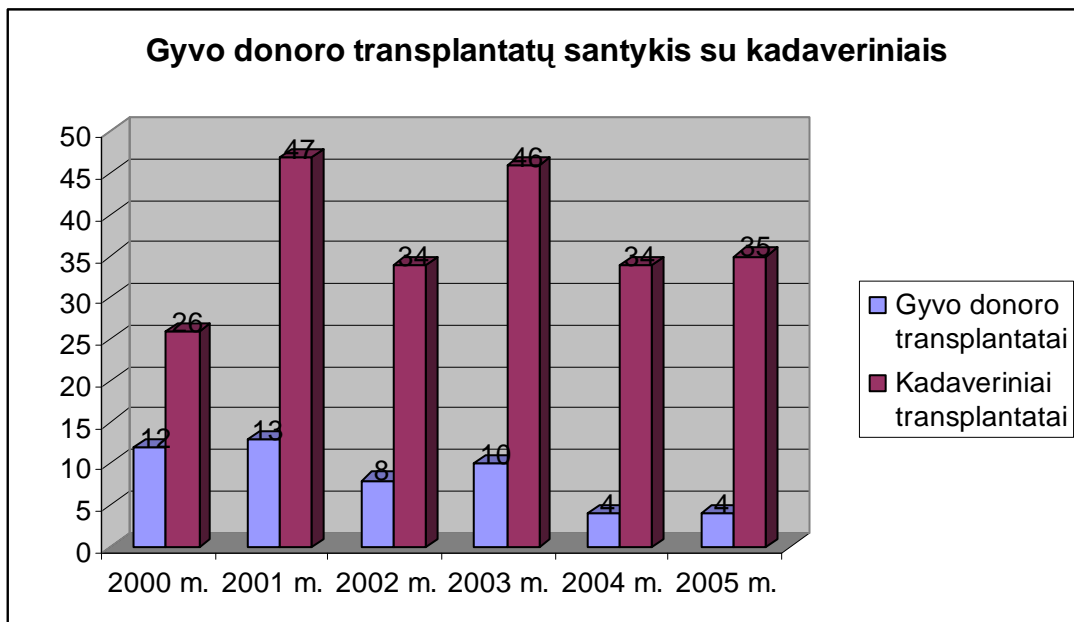
Lėtinis transplantato atmetimas prasideda praėjus mėnesiams ar metams po transplantacijos. Jis gali būti apibudinamas kaip progresuojanti lėtinė transplantato disfunkcija drauge su chronine intersticine fibroze, kanalėlių atrofija, kraujagyslių patologija, bei glomeruloskleroze. Tai yra pagrindinė transplantato praradimo priežastis nepaisant ryškių pokyčių imunosupresijoje [10]. Kol kas dar nėra tiksliai apibrėžta kas sukelia lėtinį transplantato atmetimą, tačiau neabejojama, kad svarbus ne vienas, o visa eilė veiksnių. Yra dvi didelės grupės veiksnių, darančių įtaką lėtiniam transplantato atmetimo išsivystymui, pirmoji grupė – imunologiniai rizikos veiksniai, kita – neimunologiniai. Ūmaus atmetimo epizodai yra pagrindinis imunologinis rizikos veiksnys - vienas ūmaus atmetimo epizodas padidina lėtinio atmetimo riziką apytiksliai 60 %, o pakartotini atmetimo epizodai šią riziką dar labiau padidina [55]. Tuo tarpu neimunologiniams rizikos veiksniams priklauso: hipertenzija, hiperlipidemija, išemija, chroninis toksinis kalcineurino inhibitorių poveikis, lėtinė CMV ar kitos virusinės infekcijos ir kt.[27; 36; 47].

2. Medžiaga ir metodai

2.1 Tiriamoji grupė

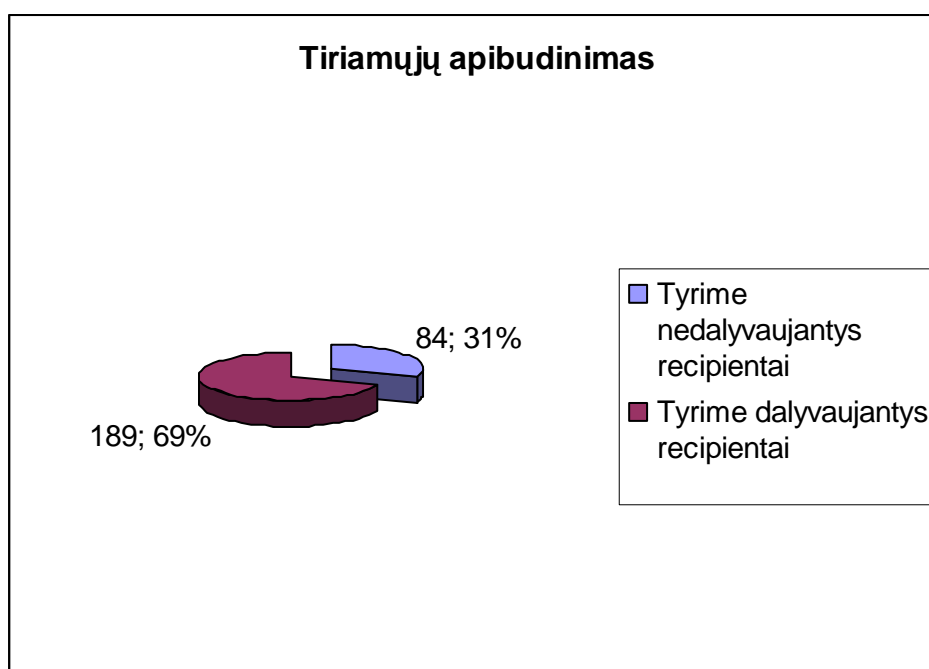
Šiame tyrime yra analizuojami Vilniaus universiteto ligoninės „Santariškių klinikos“ (VULSK), pacientai, kuriems 2000-2005 metais imtinai buvo atliktos inkstų transplantacijos. Per šiuos šešerius metus iš viso buvo atliktos 273 transplantacijos. 51 atveju buvo persodinti gyvų donorų transplantatai, o 222 - kadaverinių.

2000-2005 metais atliktų transplantacijų dinamika:



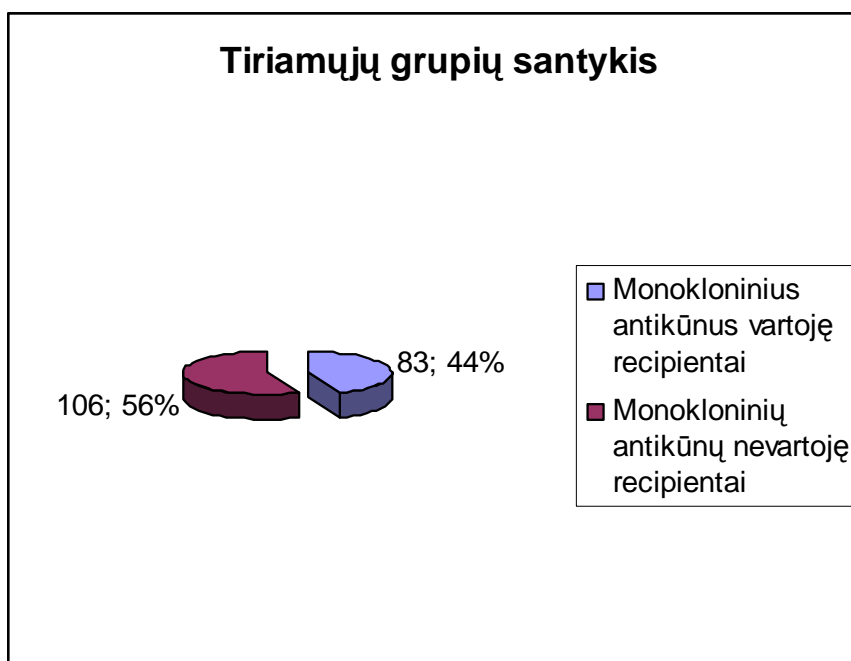
Tyrime dalyvauja asmenys, kurie prieš ir po transplantacijos buvo tirti dėl teigiamai su limfocitų panele reaguojančių antikūnų. Asmenys, kuriems buvo atliktos pakartotinės transplantacijos tyrime dalyvauja, atsižvelgiant į tyrimus atliktus prieš ir po paskutiniosios transplantacijos. Per visus metus visai arba nepakankamai tirti, todėl tyrime nedalyvauja, 31% visų recipientų, tai yra 84 asmenys.

Metai:	Atliktų transplantacijų skaičius:	Gyvo donoro transplantatų santykis su kadaveriniais:	Tyrime dalyvauja (n=189):	Tyrime nedalyvauja (n=84):
2000 m.	38	12/26	25	13
2001 m.	60	13/47	43	17
2002 m.	42	8/34	33	9
2003 m.	56	10/46	42	14
2004 m.	38	4/34	26	12
2005 m.	39	4/35	20	19



Tyrime dalyvaujantys (n=189) asmenys suskirstyti į dvi grupes, pagal tai ar greta standartinės imunosupresijos vartojo monokloninius antikūnus prieš IL-2 receptorių - basiliksimabą (Simultect) ar daklizumabą (Zenapax), ar nevartojo. Per šešerius metus monokloninius antikūnus vartojusių buvo 83 (44%), o nevartojusių – 106 (56%) asmenys.

Metai:	Recipientai, vartoję monokloninius antikūnus (n=83):	Recipientai, nevartoję monokloninių antikūnų (n=106):
2000 m.	4	21
2001 m.	6	37
2002 m.	15	18
2003 m.	23	19
2004 m.	17	9
2005 m.	18	2



Vidutinis, visos imties (n=189) transplantato recipientų amžius – $39,8 \pm 12,1$ (7-68). Iš viso buvo atlikta 764 tyrimų, vidutinis tyrimų skaičius, tenkantis vienam asmeniui: $4,04 \pm 2,01$ (2-14).

Tiriamųjų grupių apibūdinimas:

Požymis:	Recipientai, vartoję monokloninius antikūnus (n=83):	Recipientai, nevartoję monokloninių antikūnų (n=106):
Transplantato recipientų amžiaus vidurkis (ribos) metais:	37,5±11,4 (7-64)	41,2±12,6 (17-68)
Vyrų ir moterų santykis:	44/39=1,2	62/44=1,4
Gimdžiusių moterų skaičius (procentai):	12/39 (30,8%)	21/44 (47,7%)
Santykis asmenų turėjusių kraujo perpylimus su neturėjusiais:	31/12 n=43	39/29 n=68
Recipientai, turėję pakartotines transplantacijas:	8/83	8/106
Gyvo donoro transplantatų santykis su kadaveriniais:	20/63	19/87
Tyrimų skaičius, tenkantis vienam asmeniui:	4,07±1,4 (2-7)	5,6±3,1 (2-14)

Monokloninius antikūnus vartojusių recipientų grupė buvo „jaunesnė“, nei monokloninių antikūnų nevartojusių (amžiaus vidurkis: 37,5±11,4 vs. 41,2±12,6). Vyrų ir moterų santykis šiek tiek didesnis buvo monokloninių antikūnų nevartojusių grupėje (1,1 vs. 1,4). Moterų skaičius abiejose grupėse buvo panašus, tik gimdžiusių moterų procentas, monokloninių antikūnų nevartojusių grupėje, buvo didesnis (47,7% vs. 30,8%). Iš monokloninių antikūnų vartojusių grupės 31 asmuo turėjo kraujo perpylimus, dvylikai buvo pažymėta, kad jie negavo kraujo perpylimų, o likusiems (n=40) trūksta duomenų. 39 monokloninių antikūnų nevartoję asmenys turėjo kraujo perpylimus, 29 – neturėjo, o likusiems (n=38) trūksta duomenų. 72% (n=43) monokloninius antikūnus vartojusiųjų grupėje gavo kraujo perpylimus, tai daugiau nei kitoje grupėje, kur kraujo perpylimus gavo 57,3% (n=68). Pakartotinių transplantacijų skaičius abiejose grupėse buvo vienodas (8 vs. 8), tačiau dėl

mažesnio žmonių skaičiaus 9,6% monokloninius antikūnus vartojusiųjų turėjo daugiau nei vieną persodinimą, lyginant su 7,5% kitoje grupėje. Monokloninius antikūnus vartojusiųjų grupėje didesnis recipientų procentas gavo gyvo donoro transplantatą (24,1% vs. 17,9%). Monokloninių antikūnų nevartojusių grupė vidutiniškai buvo daugiau tirta, nei monoklonius antikūnus vartojusi grupė ($5,6\pm 3,1$ vs. $4,07\pm 1,4$).

2.2 Metodai

Šiame darbe antikūnams prieš ŽLA antigenus nustatyti yra naudojamas mikrolimfocitotoksinis testas. Be jo dar galima naudoti tėkmės citometrinių ir imunofermentinį metodą. Jie yra taip pat jautrūs, bei kai kuriais atvejais pranašesni, pvz., mikrolimfocitotoksinis mėginys jautriausias komplementą fiksuojančių antikūnų prieš ŽLA I klasės antigenus (IgG₁, IgG₃, IgM), nes šio metodo principas – komplemento fiksacija. Jis mažiau jautrus nustatant antikūnus prieš ŽLA II klasės antigenus ir nenustato komplemento nefiksuojančių antikūnų (IgG₂, IgG₄) [34]. Tuo tarpu, komplemento nefiksuojančius antikūnus geriau nustatyti tėkmės citometriniu metodu. Šis metodas yra ganėtinai jautrus, juo galima nustatyti turint labai nedidelį kiekį dominančių anti-ŽLA antikūnų. Tačiau tik mikrolimfocitotoksiniu testu yra atliekamas tiriamojo asmens serumo titravimas, taip išvengiama prozone efekto, kuomet prie didelių antikūnų koncentracijų reakcija neįvyksta, tai yra, išvengiama klaidingai neigiamų rezultatų.

2.2.1 Mikrolimfocitotoksinis mėginys

Mikrolimfocitotoksiniu mėginiu nustatomi citotoksiniai antikūnai prieš audinių antigenus. Šis tyrimas svarbus organų ir audinių transplantacijoje, parenkant kraują transfuzijoms, kai kurių ligų diagnostikoje.

Metodo principas:

Žinomo ŽLA fenotipo limfocitai paveikiami tiriamo asmens kraujo serumu. Jeigu serume yra antikūnų, pridėjus triušio komplemento pažeidžiama limfocitų, turinčių antikūnams specifišką ŽLA antigeną, membrana. Įlašinus fluorescentinio dažo tokie limfocitai nusidažo raudonai (teigiama reakcija). Tai reiškia, kad tiriamajame serume yra antikūnų prieš

specifinius ŽLA antigenus. Neigiama reakcija – limfocitai nusidažo žaliai – serume antikūnų prieš specifinius ŽLA antigenus nėra. Tiriamo asmens limfocitotoksiniams antikūnams nustatyti naudojamos žinomo ŽLA fenotipo ląstelės iš atsitiktinių, giminystės ryšiais nesusietų, mažiausiai 30 sveikų asmenų.

2.2.2 Imunofermentinis metodas

Imunofermentinis metodas sukurtas remiantis imuninės reakcijos antigenas ir antikūnas principu. Reakcijos metu susidaręs antigeno ir antikūno kompleksas išryškinamas įvedus fermentu žymėtų rūšių specifinių izotopinių antikūnų (konjugato). Fermentui skaidant substratą, ryškėja spalva, kuri padeda įvertinti imunofermentinės reakcijos rezultatus.

Imunofermentinės reakcijos metodas taikomas kokybiniais ir kiekybiniais įvairių virusinių, bakterinių infekcijų, ląstelių faktorių, ląstelių paviršiaus struktūrų, autoimuninių faktorių tyrimams ir diagnostikai [25].

Metodo principas:

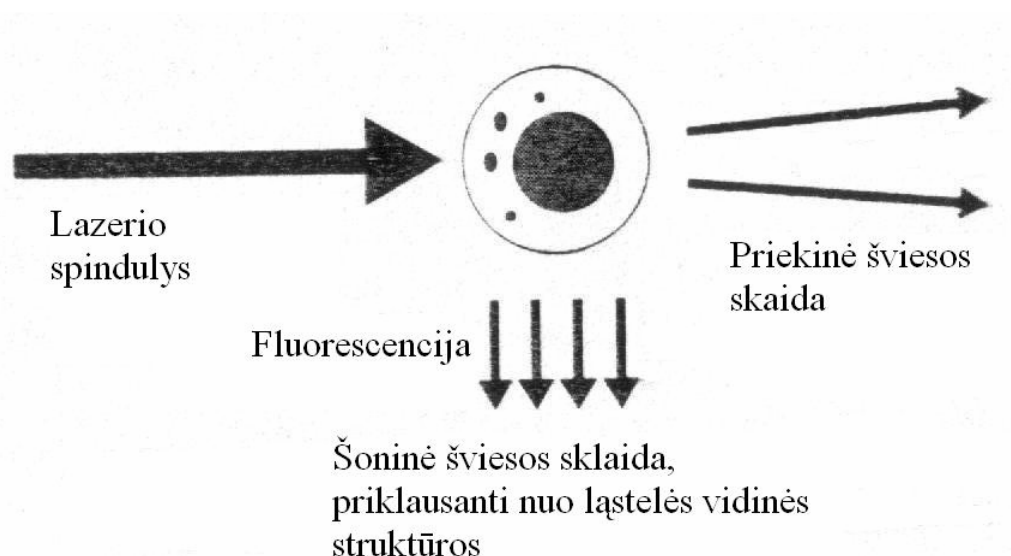
Mikroplokštelės šulinėliuose yra imobilizuotas išgrynintas tam tikros ŽLA klasės ir fenotipo antigenas. Į mikroplokštelės šulinėlius įlašiname praskiesto paciento serumo, kuriame gali būti specifinių antikūnų, nukreiptų prieš tam tikrą ŽLA antigeną. Jei serume yra antikūnų – jie jungsis su antigenais ir sudarys imuninius kompleksus. Po inkubacijos mėginys praplaunamas, kad pašalinti nesusijungusius antikūnus tam, kad jie netrukdytų tolesnei reakcijai. Po to į kiekvieną mikroplokštelės šulinėlį įlašiname praskiesto anti-IgG reagento, konjuguoto su fermentu. Vėl praplauname, kad pašalinti anti-IgG reagentą, kuris būtų nefiksuotas tuo atveju jei serume nebuvo antigeną atitinkančių antikūnų, o jei imuninis kompleksas susiformavo – jis prisijungtų prie antikūno ir būtų fiksuotas. Toliau į kiekvieną mikroplokštelės šulinėlį įdedame specifinio fermentui substrato ir inkubuojame tamsoje ir kambario temperatūroje. Šioje reakcijoje yra ypač svarbūs laikas ir temperatūra, todėl negalima viršyti rekomenduojamo inkubacijos laiko. Jei imuniniai kompleksai buvo susiformavę, fermentas skaldys savo substratą ir reakcijos metu atsiras spalva. Reakcija stabdoma su specifiniu ELISA stabdymo tirpalu. Galiausiai, yra vertinama kiekvieno šulinėlio absorbcija (optinis tankis – OT) spektrofotometru prie 405 ar 410 nm. per 15 minučių po reakcijos sustabdymo.

2.2.3 Tėkmės citometrinis metodas

Srautinė tėkmės citometrija yra metodas, kuriuo atliekamas dalelių, judančių viena paskui kitą, skysčio srovėje matavimas. Srautinis citometras sudarytas iš hidrodinaminės sistemos, lazerinės optikos, elektroninių šviesos detektorių, įrenginio moduluojančio signalus į skaitmeninį konverterį ir kompiuterinės sistemos. Ląstelių suspensija švirksčiama į hidrodinaminę sistemą, kurioje ląstelės viena paskui kitą teka pro lazerio spindulį. Kiekviena ląstelė sklaido lazerio šviesą ir jo sužadintos išspinduliuoja fluorescencinę šviesą [30].

Srautiniu citometru galima iš karto matuoti kelis parametrus:

- priekinę šviesos sklaidą, kuri susijusi su ląstelės dydžiu;
- šoninę šviesos sklaidą, kuri susijusi su ląstelės vidine struktūra, granuliuotumu;
- kelių bangų ilgių (530 nm, 585 nm, 630 nm.) fluorescencijos intensyvumą.



Paveikslėlis 9. Šoninė ir priekinė šviesos sklaida [13].

Tėkmės citometriniu metodu galima nustatyti citotoksinius antikūnus prieš audinių antigenus, tuomet atliekamas kryžminis donoro ir recipiento dermės mėginys. Tai svarbu organų ir audinių transplantacijoje.

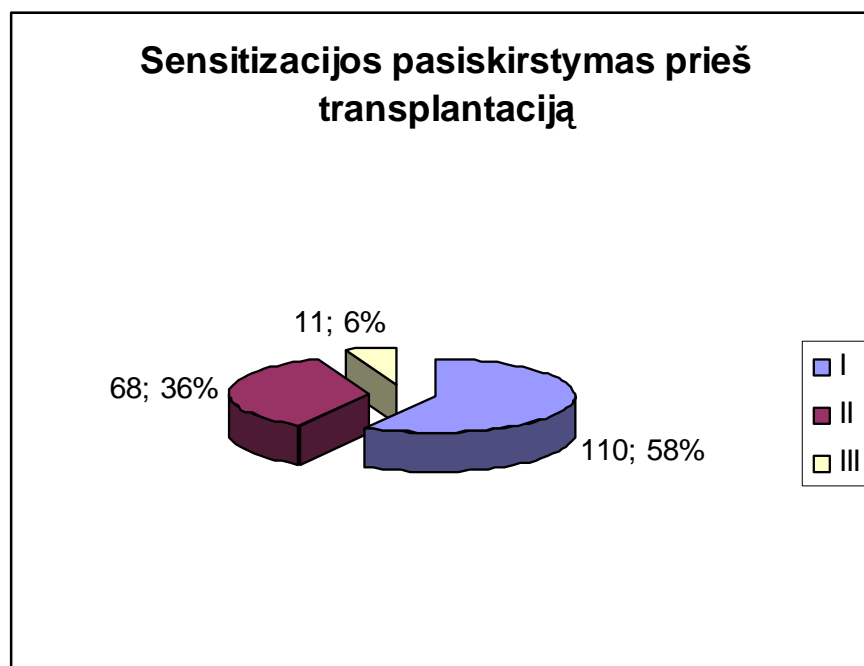
Metodo principas:

Donoro limfocitai paveikiami tiriamojo asmens (recipiento) serumu. Jeigu serume yra antikūnų, jie jungsis prie donoro limfocitų. Nesusijungę antikūnai pašalinami kelis kartus praplaunant. Prisijungę prie ląstelės antikūnai vizualizuojami inkubuojant su FITC, konjuguotu su anti-IgG antikūnu. Jei imuniniai kompleksai nebuvo susiformavę konjugatas (anti-IgG su FITC) neturės prie ko prisijungti ir bus pašalintas praplaunant. Toliau tėkmės citometro yra analizuojamos priekinė ir šoninė šviesos sklaidos, kelių bangos ilgių fluorescencijos intensyvumas, viso iki šešių parametrų vienu metu. Tėkmės citometriniu metodu geras tuo, kad vienu metu galima vertinti įvairias ląstelių populiacijas ir nebūtina jų gryninti.

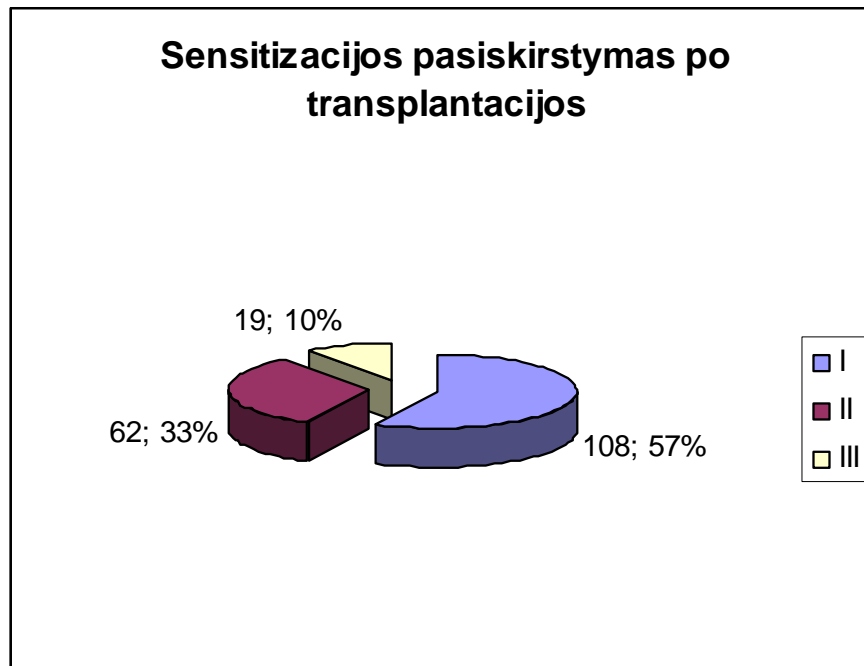
3. Rezultatai

Sensitizacijos žmogaus leukocitų antigenais lygiui įvertinti buvo pasinaudota PRA (angl. *panel reactive antibodies*) arba teigiamai su limfocitų panele reaguojančių antikūnų skaičiumi išreikštu procentais. Atsižvelgiant į didžiausio PRA duomenis asmenys buvo priskiriami nesensitizuotiems (I, PRA – 0-10%), vidutiniškai sensitizuotiems (II, PRA – 11%-50%), arba labai sensitizuotiems (III, PRA – 51%-100%). Duomenys buvo analizuojami Exel, Statistica5,5 programomis. Tirtos ligonių grupės palygintos taikant χ^2 kriterijų, skirtumas laikytas statistiškai reikšmingas, kai $p < 0,05$.

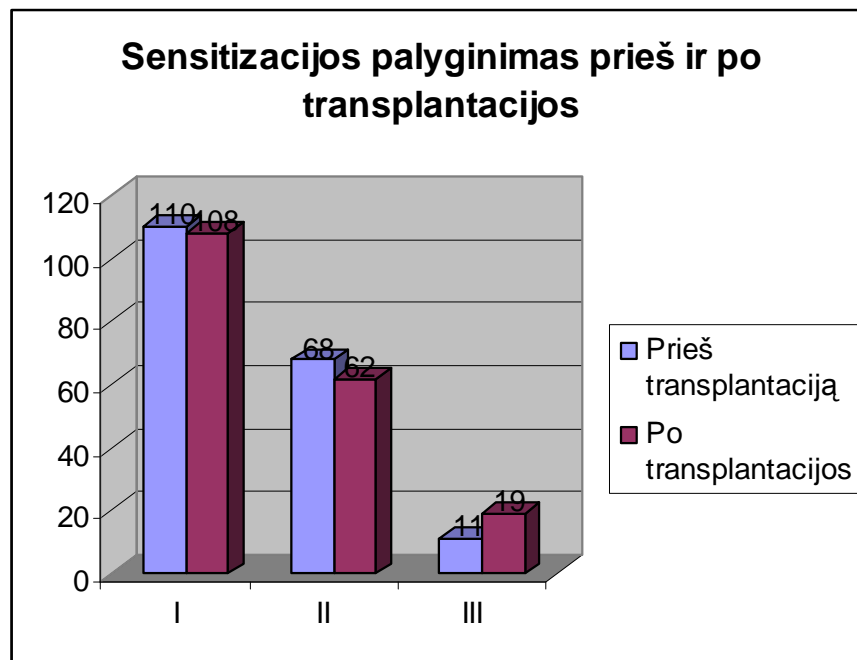
Tyrime dalyvaujantys asmenys (n=189) buvo tirti prieš ir po transplantacijos. Bendrai paėmus, prieš transplantaciją 58% (n=110) visų tiriamųjų inksto transplantato recipientų buvo nesensitizuoti, tai yra, jų didžiausia PRA vertė buvo intervale nuo 0 iki 10%. 36% (n=68) buvo vidutiniškai sensitizuoti, mažiausiai – 6% (n=11) buvo labai sensitizuoti.



Po transplantacijos tiriamieji labiau sensitizavosi žmogaus leukocitų antigenais. Tiriamųjų grupėje sumažėjo nesensitizuotų recipientų (57%, n=108), bei vidutiniškai sensitizuotų (33%, n=62) ir 4% padaugėjo labai sensitizuotų (10%, n=19).

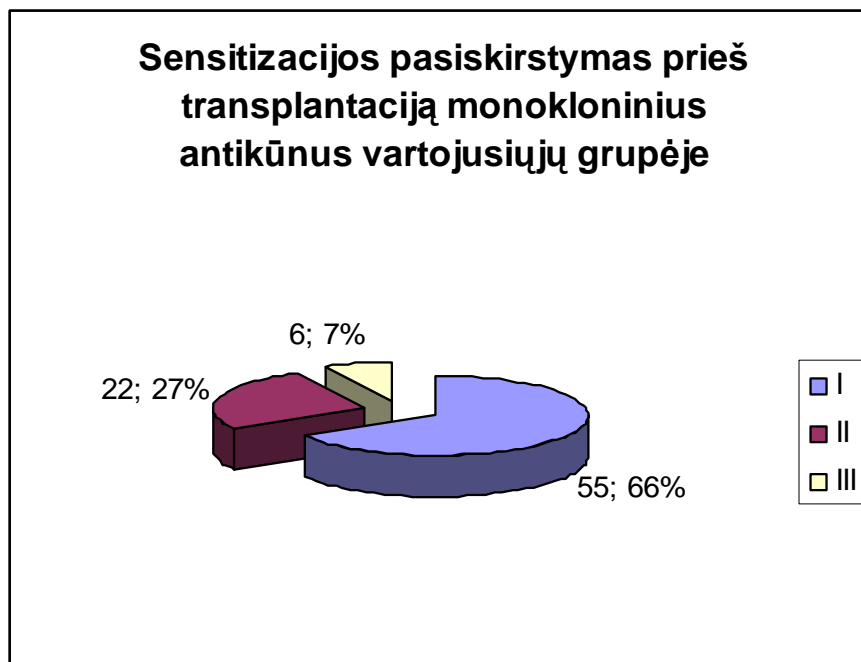


Tačiau dėl nelabai ryškių pokyčių statistškai patikimo skirtumo tarp sensitizacijos prieš ir po transplantacijos aptikti nepavyko ($\chi^2=2,45$, $p=0,29$).

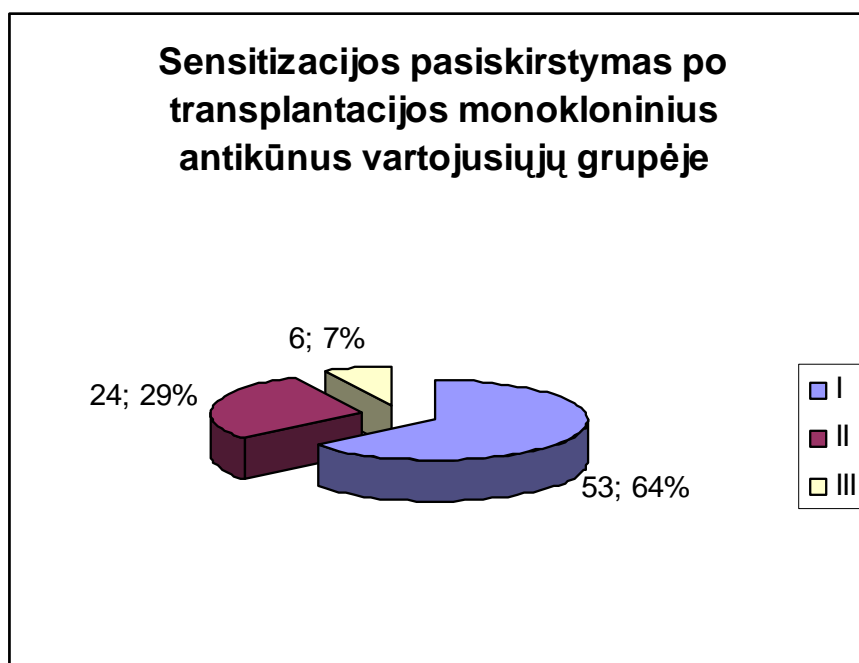


Tiriamųjų grupėje ($n=83$), kuri greta standartinės imunosupresijos vartojo monokloninius antikūnus prieš IL-2 receptorių (basiliksimumą ar daklizumabą), 66% ($n=55$) visų

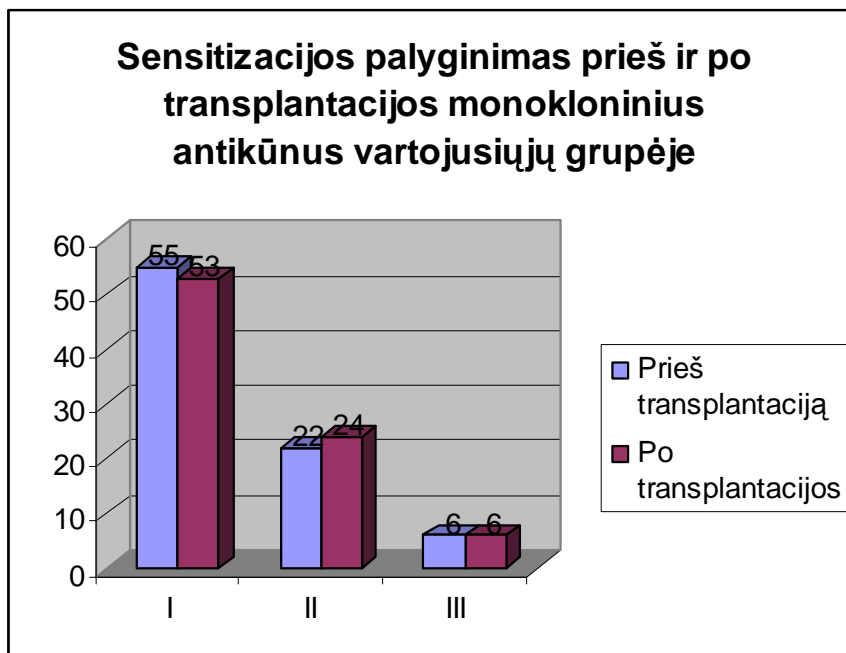
recipientų buvo nesensitizuoti, 27% (n=22) vidutiniškai sensitizuoti ir 7% (n=6) labai sensitizuoti.



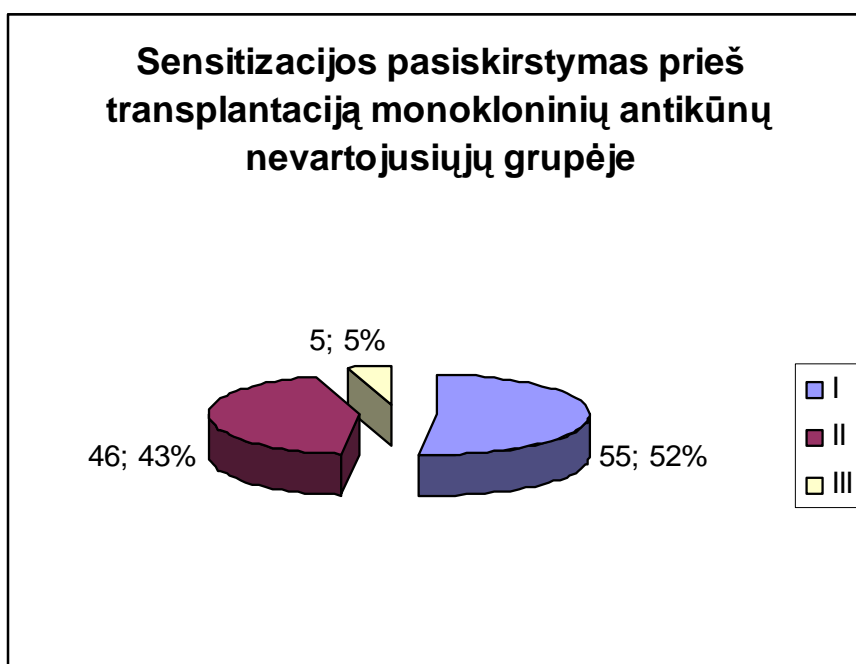
Po transplantacijos, monokloninius antikūnus vartojusiųjų grupėje sumažėjo nesensitizuotų (64%, n=53), vidutiniškai sensitizuotų skaičius padidėjo (29%, n=24), tuo tarpu labai sensitizuotų recipientų skaičius išliko toks pat (7%, n=6).



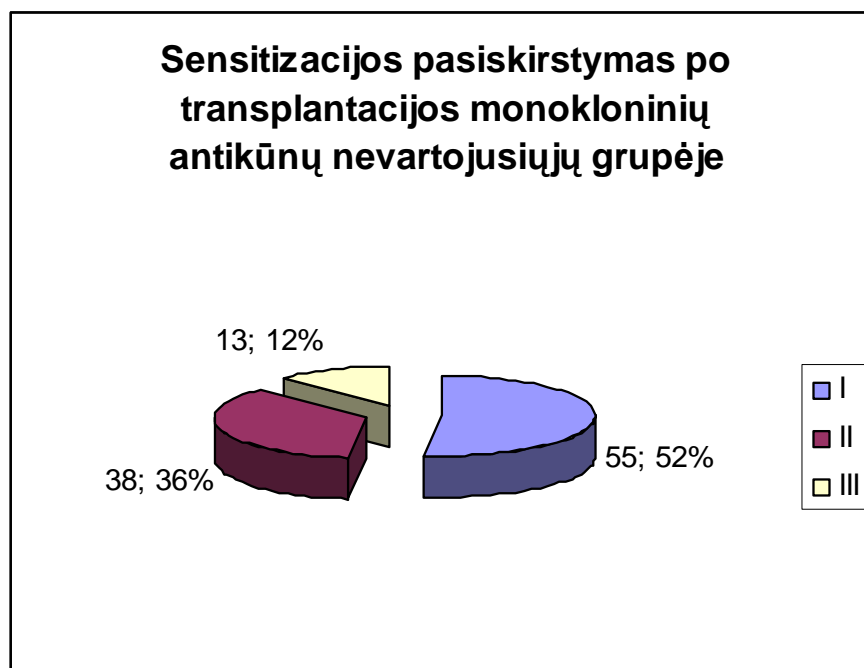
Dėl nedidelio rezultatų skirtumo, gauto prieš ir po transplantacijos, tarp šių grupių taip pat negauta statistiškai patikimo rezultato ($\chi^2=0,12$, $p=0,93$).



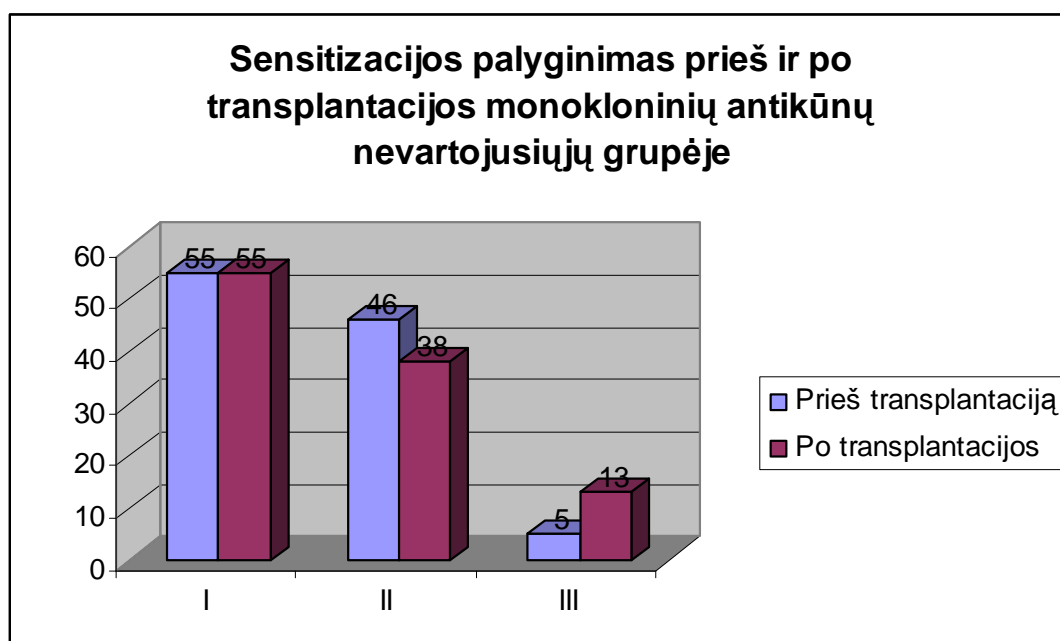
Recipientų, kurie gavo tik standartinę imunosupresiją buvo 106, prieš transplantaciją 52% (n=55) jų buvo priskirti nesensitizuotiems, 43% (n=46) – vidutiniškai sensitizuotiems, 5% (n=5) – labai sensitizuotiems.



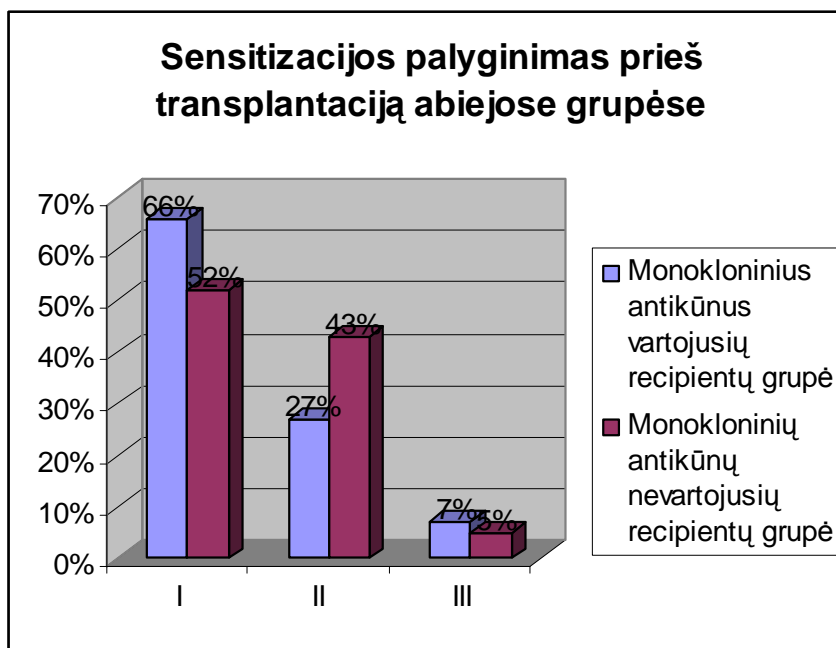
Po transplantacijos tiek pat recipientų šioje grupėje liko nesensitizuotų (52%, n=55), vidutiniškai sensitizuotų sumažėjo iki 36% (n=38), o tuo tarpu labai sensitizuotų atsirado beveik pustrėčio karto daugiau (12%, n=13).



Lyginant šios grupės duomenis prieš ir po transplantacijos ir šiuo atveju nebuvo gautas statistiškai reikšmingas skirtumas ($\chi^2=4,44$, $p=0,1$).



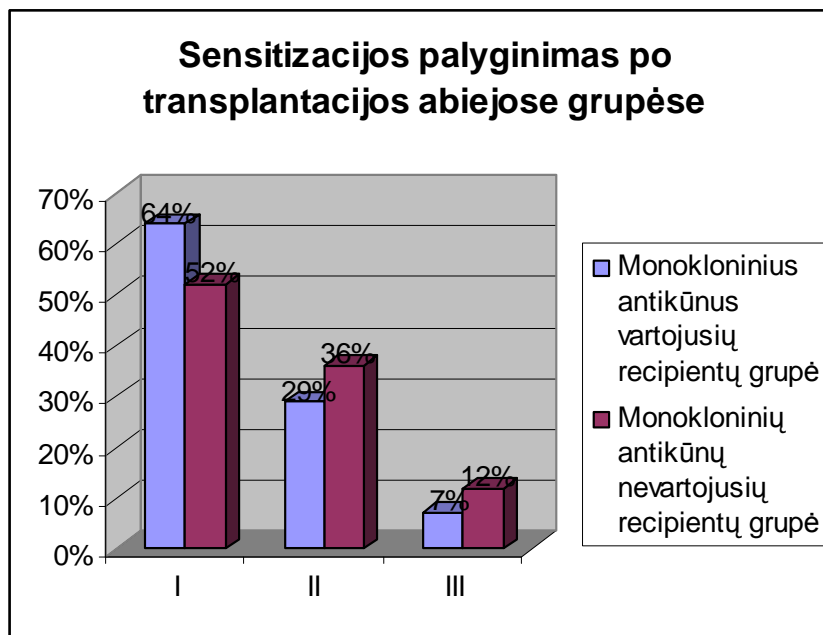
Prieš transplantaciją didesnė monokloninius antikūnus vartojusiųjų dalis buvo nesensitizuoti, (66% vs. 52%), tuo tarpu vidutiniškai sensitizuotų net pusantro karto daugiau buvo monokloninių antikūnų nevartojusioje grupėje (43% vs. 27%). Labai sensitizuotų buvo beveik pusantro karto daugiau monokloninius antikūnus vartojusioje grupėje (7% vs. 5%).



Tai, kad prieš transplantaciją, monokloninius antikūnus vartojusiųjų, daugiau buvo labai sensitizuotų, galima paaiškinti tuo, kad monokloniniai antikūnai yra skiriami transplantatų recipientams, pasižymintiems didele rizika transplantato atmetimui, pvz. asmenys po pakartotinių transplantacijų, labai sensitizuoti (PRA>50%), nelabai tinkamas donoras, daugiau nei 4 ŽLA neatitikimai ir t.t. [28; 41]. Dėl to šioje grupėje, lyginant su kita, prieš transplantaciją daugiau buvo labai sensitizuotų. Tačiau statistiškai reikšmingo skirtumo tarp monokloninius antikūnus vartojusių ir nevartojusių grupių prieš transplantaciją, nustatyti nepavyko ($\chi^2=5,94$, $p=0,051$).

Po transplantacijos rezultatai išsidėstė panašiai, abiejose grupėse daugiausiai recipientų buvo nesensitizuoti, mažiau - vidutiniškai ir mažiausiai labai sensitizuotų. Monokloninius antikūnus vartojusiųjų grupėje toks pat recipientų procentas liko labai sensitizuoti, tačiau monokloninių antikūnų nevartojusių grupėje jis išaugo apie pustrėčio karto daugiau (12%). Monokloninius antikūnus vartojusiųjų grupėje vidutiniškai sensitizuotų padaugėjo iki

29%, o nesensitizuotų sumažėjo iki 64%. Monokloninius antikūnus nevartojusių grupėje nesensitizuotų procentas išliko nepakitęs, o vidutiniškai sensitizuotų sumažėjo iki 36%.



Lyginant abiejų grupių duomenis po transplantacijos statistiškai reikšmingo skirtumo nustatyti nepavyko ($\chi^2=3,02$, $p=0,21$).

5. Rezultatų aptarimas

Transplantato atmetime didelę reikšmę vaidina aktyvinti T-limfocitai, jų aktyvinime ypač svarbus IL-2, kuris prisijungęs prie IL-2 receptoriaus skatina greitą šių ląstelių proliferaciją. Atliekant eksperimentus su pelėmis (Kirkman et al.) pirmą kartą buvo pastebėta, kad užblokavus IL-2 receptorius monokloniniais antikūnais gaunamas imuninio atsako slopinimas su minimaliais pašaliniais efektais. Vėliau tai buvo patvirtinta eksperimentais su primatais (Cooper et al.) [11].

Pirmasis tyrimas panaudojus daklizumabą inkstų transplantatų recipientams buvo paskelbtas 1997 m. Vincenti et al. Buvo nustatyta, kad tiriamiesiems, gavusiems pirminį kadaverinį inksto transplantatą ir greta standartinės imunosupresijos vartojusiems daklizumabą, per pirmus tris mėnesius po transplantacijos buvo statistiškai patikimai mažiau transplantato atmetimų, lyginant su kontroline grupe, kuri daklizumabo nevarėjo. Be to, atmetimo epizodų skaičius, bei laikas transplantato atmetimo reakcijai pasireišti buvo ilgesnis lyginant su kontroline grupe. Lyginant abi grupes nebuvo nustatytas didesnis pašalinių reakcijų, infekcijos pasireiškimo ar malignizacijos atvejų skaičius [11].

Yra nemažai darbų, patvirtinančių, kad monokloniniai antikūnai prieš IL-2 receptorių mažina ūmaus, bei lėtinio transplantato atmetimo riziką. Taip pat yra žinoma, kad ženkli sensitizacija žmogaus leukocitų antigenais blogina transplantacijos rezultatus, didindama ūmaus, bei lėtinio transplantato atmetimo riziką. Kazuo Mizutani et al, [32] išanalizavęs prieš transplantaciją nesensitizuotų inksto transplantato recipientų serumus, padarė išvadą, kad po transplantacijos maždaug penktadalis recipientų pradėjo gaminti antikūnus prieš žmogaus leukocitų antigenus, be to 72% recipientų, kuriems išsivystė atmetimo reakcijos, sintetino antikūnus prieš žmogaus leukocitų antigenus, lyginant su 46% kontrolinės grupės recipientų, kuriems atmetimo reakcijų nebuvo. Dėl to galima daryti išvadą, kad aukštas PRA, nustatytas po transplantacijos, koreliuoja su blogesne transplantacijos baigtimi.

Beniaminovitz A. et al, [7] išanalizavęs 55 nesensitizuotus širdies transplantato recipientus, padarė išvadą, kad monokloninius antikūnus prieš IL-2 receptorių vartojusiųjų grupėje (n=28) ūmių atmetimo epizodų skaičius buvo statistiškai patikimai mažesnis (18% vs. 63%), lyginant su kontroline grupe, kuri monokloninių antikūnų nevarėjo. Beniaminovitz A. et al,

taip pat pastebėjo, kad monokloninius antikūnus vartojusiųjų grupėje, antikūnų prieš žmogaus leukocitų antigenus produkcija potransplantaciniu periodu buvo ženkliai mažesnė, nei kontrolinėje grupėje. Dvidešimt vienas procentas monokloninius antikūnus vartojusių recipientų sintetino IgG klasės anti-ŽLA antikūnus, lyginant su 70% kontrolinėje, monokloninių antikūnų nevartojusioje grupėje. Panaši situacija buvo ir su IgM klasės anti-ŽLA antikūnais, 10% monokloninius antikūnus vartojusioje grupėje sintetino šiuos antikūnus, lyginant su 45%, kontrolinėje grupėje.

Hideki Ishida et. al, [17] išanalizavęs 238, pirminį inksto transplantatą gavusių asmenų, serumus pastebėjo, kad recipientų, vartojusių monokloninius antikūnus prieš IL-2 receptorių (basiliximabą), po transplantacijos PRA titrai buvo žemesni, nei prieš transplantaciją.

Šiame tyrime analizuojami Vilniaus universiteto ligoninės „Santariškių klinikos“ pacientai, kuriems 2000-2005 metais imtinai buvo atliktos inkstų transplantacijos. Tyrimo tikslas buvo įvertinti sensitizaciją ŽLA antigenais, inksto transplantatų recipientams, kurie greta standartinės imunosupresijos vartojo monokloninius antikūnus prieš IL-2 receptorių (basiliximabą ar daklizumabą) ir monokloninių antikūnų nevartojusiems recipientams. Tyrime dalyvauja tik tie inksto transplantato recipientai, kurie prieš ir po transplantaciją buvo tirti dėl teigiamai su limfocitų panele reaguojančių antikūnų skaičiaus išreikšto procentais (PRA). Iš viso tyrime dalyvauja 189 recipientai. Dalis jų (n=83) greta standartinės imunosupresijos vartojo monokloninius antikūnus prieš IL-2 receptorių (basiliximabą ar daklizumabą), kiti (n=106) gavo tik standartinę imunosupresiją. Pagrindinės sensitizacijos priežastys, kurios galėtų lemti didesnę sensitizaciją žmogaus leukocitų antigenais vienoje ar kitoje grupėje pasiskirstė nevienodai: didesnė dalis monokloninius antikūnus vartojusių recipientų turėjo kraujo perpylimus (72% vs. 57,3%), asmenų, gavusių pakartotines transplantacijas skaičius taip pat didesnis buvo monokloninius antikūnus vartojusių grupėje (9,6% vs. 7,5%), tik gimdžiusių moterų dalis, monokloninių antikūnų nevartojusių grupėje, buvo didesnė (47,7% vs. 30,8%).

Išanalizavus inksto transplantato recipientų sensitizaciją prieš Tx paaiškėjo, kad dauguma - 58% (110/189) buvo nesensitizuoti (PRA 0-10%), likę 42% (79/189) - sensitizuoti, iš kurių 14% (11/189) – labai sensitizuoti (PRA 50-100%). Po transplantacijos monokloninius antikūnus vartojusių recipientų grupėje (n=83) 2% padaugėjo vidutiniškai sensitizuotų (PRA 11-50%), tuo tarpu monokloninių antikūnų nevartojusioje grupėje po transplantacijos net 7%

padaugėjo labai sensitizuotų. Lyginant abiejų grupių rezultatus po Tx, gauta, kad monokloninius antikūnus vartojusių grupėje po transplantacijos „de novo“ stipriai sensitizuotų neatsirado, tuo tarpu, monokloninių antikūnų nevartojusioje grupėje net 7% padaugėjo stipriai sensitizuotų, tačiau statistiškai reikšmingo skirtumo tarp šių grupių nustatyti nepavyko ($\chi^2=3,02$, $p=0,21$).

Išanalizavus šiuos duomenis negalima teigti, kad monokloniniai antikūnai prieš IL-2 receptorių (basiliximabas ar daklizumabas), pakankamai efektyviai apsaugo nuo sensitizacijos žmogaus leukocitų antigenais po inkstų transplantacijos.

5. Išvados

Išanalizavus Vilniaus universiteto ligoninės „Santariškių klinikos“ (VULSK) pacientų, kuriems 2000-2005 metais imtinai buvo atliktos inkstų transplantacijos, sensitizaciją žmogaus leukocitų antigenais, prieš ir po transplantacijos, galima padaryti šias išvadas:

1. Prieš transplantaciją 42 % (79/189) inksto transplantato recipientų buvo sensitizuoti ŽLA antigenais, iš jų 14 % (11/79) buvo stipriai sensitizuoti.
2. Po transplantacijos, monokloninius antikūnus vartojusioje grupėje, 2% padaugėjo vidutiniškai sensitizuotų recipientų.
3. Po transplantacijos, monokloninių antikūnų nevartojusioje grupėje, 7% padaugėjo labai sensitizuotų recipientų.
4. Lyginant abiejų grupių rezultatus nustatyta, kad monokloninius antikūnus vartojusioje recipientų grupėje po transplantacijos „de novo“ stipriai sensitizuotų neatsirado, tuo tarpu, monokloninių antikūnų nevartojusioje grupėje net 7% padaugėjo stipriai sensitizuotų, tačiau statistiškai reikšmingo skirtumo tarp šių grupių nustatyti nepavyko ($\chi^2=3,02$, $p=0,21$).

Išanalizavus šiuos duomenis negalima teigti, kad monokloniniai antikūnai prieš IL-2 receptorių (basiliximabas ar daklizumabas), pakankamai efektyviai apsaugo nuo sensitizacijos žmogaus leukocitų antigenais po inkstų transplantacijos.

6. Santrauka

THE EVALUATION OF SENSITIZATION WITH HUMAN LEUKOCYTE ANTIGENS IN KIDNEY TRANSPLANT RECIPIENTS, BEFORE AND AFTER TRANSPLANTATION

The aim of this study was to evaluate the sensitization with HLA antigens in kidney transplant recipients, who received induction therapy with monoclonal antibodies against IL-2R and in the group of patients, who were only under the triple drug therapy. This study comprises recipients, who received kidney transplant in the year 2000-2005, and who were tested for panel reactive antibody test before and after transplantation (Tx). The total number of 189 kidney transplant recipients takes part in this study. 83 received monoclonal antibodies against IL-2R (basiliximab or daclizumab), others (n=106) – did not. These groups were unequal in comparison to the main factors causing sensitization with HLA antigens. The group of patients, who received induction therapy with monoclonal antibodies had more blood transfusions (72% vs. 57,3%), and previous transplantations (9,6% vs. 7,5%), in comparison with the other group. Only the number of pregnancies was higher in the group of patients who were only under the triple drug therapy (47,7% vs. 30,8%). Statistical analyses were carried out using chi-square test, differences were considered significant at $p < 0,05$. 58% (110/189) of kidney transplant recipients were unsensitized (PRA 0-10%) before Tx, the rest 42% (79/189) were sensitized, from which 14% (11/189) were highly sensitized (PRA 50-100%). After Tx the number of medium sensitized (PRA 11-50%) kidney transplant recipients, who received induction therapy by monoclonal antibodies, increased by 2%. The group of patients, who were only under the triple drug therapy, increased the number of highly sensitized patients by 7%. Comparing the results of these groups after Tx, clears out, that both groups increased the number of sensitized patients after Tx, only the increase in the group, which was only under the triple drug therapy was greater, because this group increased the number of highly sensitized, while the other group did not increase the number of highly sensitized patients. But the differences between the groups were not statistically significant. The results showed that induction therapy with monoclonal antibodies was not very effective in preventing the rate of sensitization in posttransplant period, it could be due to the higher number of sensitizing factors in the group, or indicate us that induction therapy is not sufficient enough to prevent sensitization after kidney transplantation.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Adomaitienė D, Janulevičiūtė N, Kazakevičius R, Vaičiuvėnas V, Klinikinės imunologijos įvadas. Kaunas, 2001. p. 24-34;
2. Ahsan N. et al, Limited Dose Monoclonal IL-2R Antibody Induction Protocol after Primary Kidney Transplantation, American Journal of Transplantation, Volume 2 Issue 6, July 2002;
3. Arias M, Impact of delayed graft function in hypersensitized kidney transplant patients, Transplant Proc, 2003 Aug; 35(5):1655-7;
4. Arnold M.L, Pei R, Spriewald B, Wassmuth R, Anti-HLA class II antibodies in kidney retransplant patients, Tissue Antigens, Vo.65, Issue 4, April, 2005;
5. Austen Frank, Burakoff Steven J, Rosen Fred S, Ston Terry S, Therapeutic Immunology, II ed. 2001;
6. Barama et al, Effect of recipient sensitization (peak PRA) on graft outcome in haploidentical living related kidney transplants, Clinical Transplantation, Volume 14 Issue 3, June 2000;
7. Beniaminovitz A. et al, Prevention of Rejection in Cardiac Transplantation, by Blockade of the Interleukin-2 Receptor with a Monoclonal Antibody, The New England Journal of Medicine, Vo.342:613-619, March 2, 2000;
8. Boogaardt D et al, The influence of inherited and noninherited parental antigens on outcome after transplantation, Transplant International, Volume 19 Issue 5, May 2006;
9. Bradley John, Clurkey Jim, Clinical Immunology, 1997;
10. Brian J. Nakivell et al, The Natural History of Chronic Allograft nephropathy, The New England Journal of Medicine, December 11, 2003;
11. Church A.C, Clinical advances in therapies targeting the interleukin-2 receptor, QJMed 2003, 96:91-102;
12. Dawomoa Adu et al, Interleukin-2 receptor monoklonal antibodies in renal transplantation: metaanalysis of randomised trials, BMJ 2003, 326:789 (12 April);
13. Desmond A. Mc.Carty, Marion G. Macey, Cytometric Analysis of Cell Phenotype and Function, 2001;
14. Fernandez-Fresnedo Gema et al, Relationship of donor-specific class-I anti-HLA antibodies detected by ELISA after kidney transplantation, on the development of acute rejection and graft survival, Nephrology Dialysis Transplantation (2003) 18:990-995;

15. Gaston S. Robert et al, Kidney and pancreas transplantation, American Journal of Transplantation, Vo.3, issue s4, April 2003;
16. Hadjiliadis D. et al, Pre-transplant panel reactive antibody in lung transplant recipients is associated with significantly worse post-transplant survival in a multicenter study, Heart Lung Transplantation, 2005, Jul; 24(7 Suppl):S249-54;
17. Hideki Ishida et. al, Evaluation of flow cytometric panel reactive antibody in renal transplant recipients – examination of 238 cases of renal transplantation, Transplant International, Volume 18 Issue 2, February 2005;
18. HLA typing, BMJ 2001; 322:218 (27 January);
19. <http://pim.medicine.da.ca/abfab.htm>;
20. <http://www.edu/classes/bios/bios100/lecturesf04am/lec23.htm>;
21. <http://www.stanford.edu/dept/MPS/transplant/html/history.html>;
22. <http://www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm>;
23. <http://www.whfreeman.com/immunology/CH05/figure05-15.htm>;
24. <http://www.whfreeman.com/immunology/CH05/figure05-16.htm>;
25. Imunologijos metodai, 1997m;
26. Ingelfinger Julie, Agonistic Autoantibodies and Rejection of Renal Allografts, The New England Journal of Medicine, No. 6, 2005, February 10;
27. Yasuo I. et al, Injury and progressive loss of peritubular capillaries in the development of chronic allograft nephropathy, Kidney International, Vo.67(2005);
28. Jirasiritham S. et al, The role of anti-IL-2 receptor in high risk kidney transplant patients, Transplant Proc, 2004, Sep;36(7):2110-2;
29. Karpinski Martin et al, Leukocyte Reduction of Red Blood Cell Transfusions Does not Decrease Allosensitisation Rates in Potential Kidney Transplant Candidates, Journal of the American Society of Nephrology, 15, 3 March, 2004;
30. Kazlauskienė N, Srautinė citometrija, ploidiškumas ir prognozė vėžio tyrimuose, 2002 m, Internistas;
31. Kuby J, Immunology, III ed. 1997;
32. Mizutani Kazuo et al, Serial Ten-Year Follow-Up of HLA and MICA Antibody Production Prior to Kidney Graft Failure, American Journal of Transplantation, Volume 5 Issue 9;
33. Muro Manuel et al, Acute vascular rejection mediated by HLA antibodies in a cadaveric kidney recipient: discrepancies between flow PRA, ELISA and CDC vs luminex screening, Nephrology Dialysis Transplantation, Vo.20, Nr.1;

34. Nephrology, Dialysis, Transplantation, Vol. 15. Supplement 17;
35. Ogura K, Sensitization, Clin Transpl, 1992; 357-69;
36. Pascual M. et al, Strategies to Improve Long-Term Outcomes After Renal Transplantation, The New England Journal of Medicine, Vo.346:580-590, February 21, 2002, No.8;
37. Ponticelli Claudio, Renal transplantation 2004: where do we stand today? Nephrology Dialysis Transplantation 2004 19(12):2937-2947;
38. Racusen Lorraine C. et al, Antibody-Mediated Rejection Criteria – an Addition to the Banff '97 Classification of Renal Allograft Rejection, American Journal of Transplantation, Volume 3 Issue 6, June 2003;
39. Rainienė T, Lapšytė V, Stanaitienė Ž, HLA presensitizacija ir imuninis atsakas į inksto alotransplantatą po pakartotinių persodinimų, Alergija, astma, imunologija XXI a;
40. Rainienė T, Lapšytė V, Stanaitienė Ž, Pirminis instų persodinimas iš gyvų donorų: HLA I klasės antikūnų gamyba potransplantaciniu laikotarpiu ir transplantato išgyvenimas, Medicina (2001) 37 t. Nr. 5;
41. Rainienė T, Monokloninių antikūnų basiliksimumo ir daklizumabo vartojimas persodinant gyvų donorų inkstus, Laboratorinė medicina, 2002, Nr.4(16);
42. Reynauld-Gaubert Martine L. et al, Development of Lymphocytotoxic Antibodies among Lung Transplant Recipients: Preliminary Results, The Journal of Heart and Lung Transplantation, October 1998;
43. Rosini Aldo A, Greiner Dale L, Mordes John P, Induction of Immunologic Tolerance for Transplantation, Physiological Reviews, Vo. 79, No. 1, January 1999;
44. Sayegh Mohamed H, Carpenter Charles B, Transplantation 50 Years Later – Progress, Challenges, and Promises, Vo. 351:2761-2766, December 23, 2004, No. 26;
45. Sayegh Mohamed H, Turka Laurence A, The Role of T-cell Costimulatory Activation Pathways in Transplant Rejection, The New England Journal of Medicine, Vo. 338:1813-1821, June 18, 1998, No. 25;
46. Singh D, Kiberd BA, West KA, Kamal K, Balbotin F, Belitsky P, Lawen J, Importance of peak PRA in predicting the kidney transplant survival in highly sensitised patients, Transplant Proc, 2003, Nov; 35(7):2395-7;
47. Solange Moll, Pascual Manuel, Humoral Rejection of Organ Allografts, American Journal of Transplantation, Volume 5 Issue 11, November 2005;
48. Soosay A, O'Neill D, Counihan A, Hickey D, Keogan M, Causes of sensitisation in patients awaiting renal transplantation in Ireland, Ir Med J. 2003, May; 96 (5):156;

49. Sumitran-Holgersson Suchitra, HLA-specific alloantibodies and renal graft outcome, *Nephrology Dialysis Transplantation*, (2001) 16:897-904;
50. Tahir MT. et al, Effect of panel reactive antibody on live related donor kidney transplantation: Indian experience, *Transpl. Immunol.* 1994, Sep;2(3):238-42;
51. Takemoto S, Terasaki PI, Cecka JM, Cho YW, Gjertson DW, Survival of nationally shared, HLA-matched kidney transplants from cadaveric donors. The UNOS Scientific Renal Transplant Registry, *The New England Journal of Medicine*, Vo.327:834-839, Sep. 17, 1992, No.12;
52. Terasaki Paul I, Humoral Theory of Transplantation, *American Journal of Transplantation*, Vo.3, issue 6, June 2003;
53. Thadhani R, Pascual M, Bonventre J.V, Acute Renal Failure, *The New England Journal of Medicine*, Vo.334:1448-1460, May 30, 1996, No.22;
54. Tilney Nicholas, Transplantation and its biology: from fantasy to routine, *Journal of Applied Physiology*, Vo.89:1681-1689, November 2000;
55. *Transplantacija, Sveikata*, 2004 m. Nr. 4;
56. Vaičiūnienė R, Gudžinskienė S, HLA tipavimas Kauno medicinos universiteto Imunologijos laboratorijoje (vienerių metų patirtis), *Medicina* (2001) 37t, Nr.5;
57. Weinstein D. et al, Ultra-Late Antibody- Mediated Rejection 30 Years After a Living-Related Renal Allograft, *American Journal of Transplantation*, Volume 5 Issue 10, October 2005.