# Važnost križne reakcije (cross-match) u transplantaciji solidnih organa

**Čičak, Ana**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split / Sveučilište u Splitu**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:176:022334

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the University Department for Health Studies, University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Ana Čičak**

# VAŽNOST KRIŽNE REAKCIJE(CROSS-MATCH) U TRANSPLANTACIJI SOLIDNIH ORGANA

**Završni rad**

Split, 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Ana Čičak**

# VAŽNOST KRIŽNE REAKCIJE(CROSS-MATCH) U TRANSPLANTACIJI SOLIDNIH ORGANA

# THE IMPORTANCE OF CROSS-MATCH IN TRANSPLANTATION OF SOLID ORGANS

**Završni rad/Bachelor's Thesis**

Mentor:

**Doc.dr.sc.Esma Čečuk-Jeličić**

Split, 2019.

# SADRŽAJ


1. UVOD....1
1.1. Sustav HLA....1
1.1.2. Antigeni HLA....4
1.1.2.1. Antigeni HLA razreda I....4
1.1.2.2. Antigeni HLA razreda II....5
1.1.3. Protutijela HLA....7
1.1.4. Osobitosti sustava HLA....8
1.1.5. Nazivlje sustava HLA....10
1.1.6. Imunološki odgovor i povezanost bolesti sa HLA....12
1.2. Transplantacija....13
1.2.1. Transplantacija u Hrvatskoj....18
2. CILJ RADA....22
3. MATERIJALI I METODE....23
3.1. Materijali....23
3.2. Metode....23
3.2.1. Izvođenje križne probe metodom mikrolimfocitotoksičnosti....23
3.2.2. Luminex metoda....27
3.2.3. PCR-SSO (engl. Polymerase chain reaction- Sequence Specific Oligonucleotids) 27
3.2.2.1. Izvođenje testa....28
4. REZULTATI....30
5. RASPRAVA....32
6. ZAKLJUČAK....33
7. POPIS LITERATURE....34
8. SAŽETAK....36
9. SUMMARY....37
10. ŽIVOTOPIS....38

# POPIS KRATICA

CM engl. Cross Match; test križne reakcije

CDC engl. Complement Dependent Cytotoxicity; metoda citotoksičnosti ovisne o komplementu

DNA engl. Deoxyribonucleic acid, deoksiribonukleinska kiselina

DSA engl. Donor Specific Antibodies, donor specifična protutijela

ELISA engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay; imunoenzimski test visoke osjetljivosti i selektivnosti

Fab engl. Fragment antigen-binding; odsječak za vezanje antigena

Fc engl. Fragmet crystallizable; odsječak za kristalizaciju

HLA engl. Human Leukocyte Antigen; humani leukocitni antigeni

MHC engl. Major Histocompatibility Complex; glavni sustav tkivne snošljivosti

MIC engl. MHC class I chain-related genes

MLCT engl. Microcytolymphotoxicity test; test mikrolimfocitotoksičnosti

PCR engl. Polymerase Chain Reaction; lančana reakcija polimeraze

PRA engl. Panel Reactive Antibodies; panel reaktivna protutijela

SZO engl. World Health Organization, WHO; svjetska zdravstvena organizacija

TAP engl. Transporters Associated with Antigen Processing

TNF engl. Tumor Necrosis Factor; čimbenik nekroze tumora

# 1. UVOD

## 1.1. Sustav HLA

Temeljna uloga imunosnog sustava je osigurati visokospecifični odgovor na strane antigene, uz istodobnu nereaktivnost na vlastite antigene. Glavni sustav tkivne snošljivosti (engl. Major Histocompatiblity Complex- MHC) je skupina gena pronađena kod svih kralježnjaka. Sustav je definiran velikim brojem polimorfnih gena koji se nasljeđuju kodominantno prema Mendelovim zakonima. U čovjeka je nazvan sustavom HLA (engl. Human Leucoycte Antigen) jer je otkriven na bijelim krvnim stanicama, to jest leukocitima. Kod unosa stranih HLA antigena dolazi do proizvodnje HLA protutijela.

Strani antigeni HLA u organizam mogu doći tijekom trudnoće, nakon transfuzije ili transplantacije. U transplantacijskoj medicini protutijela HLA su predmet velikog zanimanja, zbog njihove središnje uloge kod odbacivanja transplantiranog organa, ali i bolesti presatka protiv primatelja- GVHD (engl. graft-versus-host-disease). Stupanj senzibilizacije HLA ili postotak panel reaktivnih protutijela (engl. Panel Reactive Antibodies, %PRA) ukazuju na prisutnost protutijela HLA i određuju se u serumima pacijenata na listi čekanja za transplantaciju organa. (1)

Kod predtransplantacijske obrade bolesnika, obavezno je određivanje gena i protutijela sustava HLA. Prije same transplantacije izvodi se križna proba (engl. cross-match, CM), da bi se otkrilo postoje li protutijela HLA usmjerena protiv davateljevih HLA antigena, takozvana davatelj specifična protutijela (engl. Donor Specific Antibodies, DSA). Test križne probe izvodi se najčešće metodom citotoksičnosti ovisne o komplementu (engl. Complement Dependent Cytotoxicity, CDC), na panelu limfocita darivatelja krvi. Što je veća PRA vrijednost, veća je vjerojatnost pozitivne križne probe, te je niža vjerojatnosr primanja presatka. Osjetljivost ove metode nije dovoljna, što je utjecalo na razvoj novih metoda s višom osjetljivošću, koje mogu detektirati i protutijela nevidljiva metodom CDC. Primjer takvih metoda je ELISA (engl. Enzyme-Linked ImunnoSorbent Assay), protočna citometrija i metoda Luminex xMAP tehnologija (engl. Microsphere Assay Platform, metoda mikrosfera obloženih specifičnim antigenima HLA). Metodom ELISA se utvrđuje

je li određeni protein prisutan u uzorku i ako je, u kojem postotku, a protočna citometrija je metoda kojom se mjere fizikalna svojstva stanice i primjenjuje se za mjerenje koncentracije različitih autoantitijela. Luminex metoda je trenutno najosjetljiva metoda određivanja specifičnosti protutijela HLA. (2)

Sustav HLA otkrio je francuski imunolog Jean Dausset 1954. godine, kada su u serumima politransfundiranih bolesnika otkrivena protutijela protiv leukocitnih antigena, a postojanje istih protutijela otkriveno je i u serumima višeorotkinja. 1963.godine nizozemski imunolog Jon Van Rood otkrio je dvije skupine antigena, za koje je potvrdio da pripadaju istom genskom sustavu i nazvao ih „Sustav 4“ (engl. System Four). Godinu dana poslije, Payne i suradnici otkrivaju sličan sustav leukocitnih antigena i nazivaju ga LA (engl. Leukocyte Antigenes). Obiteljskim i populacijskim istraživanjima koja su uslijedila utvrđeno je da je riječ o dva različita lokusa koja pripadaju istom genetskom sustavu HLA-A, koji je poslije dobio naziv HLA. Dva prvootkrivena lokusa, preimenovana su u lokuse HLA-A i HLA-B, a antigeni pojedinog lokusa označavani su brojevima, kao oznaka određene specifičnosti (npr. HLA-A2 ili HLA-B27). MLC testom (engl.Mixed Lymphocyte Culture, kultura pomiješanih limfocita), provedenim među osobama koje su identične za antigene lokusa HLA-A i HLA-B, u pojedinim slučajevima je uočen rast limfocita T. Takva spoznaja dovodi do otkrića novih antigena HLA, koji su nazvani HLA-D. Tijekom 1973.godine u serumima višerotkinja, otkrivena je nova skupina protutijela, a usporedba te skupine antigena i antigena MLC,pokazala je visok stupanj podudarnosti u stupnju proliferacije limfocita T, te tako novootkriveni antigeni nose ime HLA-DR( D-related). (3, 4)

Geni glavnog sustava tkivne snošljivosti kod čovjeka, nalaze se na kraćem kraku kromosoma 6, na odsječku 6p21.3, gdje zauzimaju područje od približno 4 milijuna parova baza DNA, što čini 1/1000 ljudskog genoma (slika 1.)

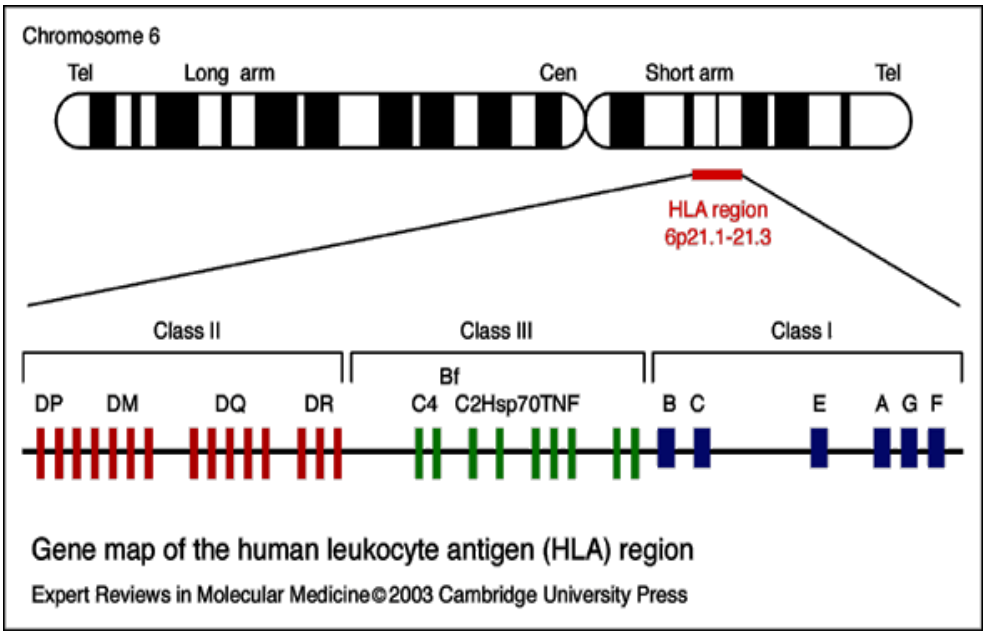
Sustav HLA dijelimo u tri genske regije:

- geni HLA razreda I
- geni HLA razreda II
- geni HLA razreda III

Regija gena razreda I, smještena je na telomeričnom kraju sustava i sadržava gene koji kodiraju klasične transplantacijske antigene HLA-A, HLA-B i HLA-C, te neklasične gene HLA-E, HLA-F, HLA-G koji su slabijeg polimorfizma od klasičnih gena. MIC geni (engl. MHC class 1 chain-related genes) se nalaze u istoj regiji kao i geni HLA razreda I, te imaju slične sekvence kao i geni HLA razreda I. Poznato je 5 gena MIC regije: MICA i MICB su funkcionalni geni, dok su MICC, MICD I MICE pseudogeni.

Regija gena razreda II smještena je centromerično i građena je od šest genskih podregija: HLA-DM, -DN, -DO, -DP, -DQ i –DR. Podregije HLA-DP, -DQ i -DR kodiraju molekule HLA razreda II koje se izražavaju na membrani stanica, dok preostale tri podregije (HLA-DM, -DN i -DO) kodiraju molekule koje nisu prisutne na staničnoj membrani i posredno su uključene u proces funkcionalnog formiranja antigen-predočnih molekula HLA razreda II. Unutar regije HLA razreda II nalaze se i proteinske pumpe TAP1 i TAP2 (engl. Transporters Associated with antigen Processing) koje su ključne za konačni ustroj molekula HLA razreda I. (5)

Regija razreda III smještena je između razreda I i II i u njoj se ne nalaze geni HLA, već geni ključni u imunološkoj reakciji, kao što su gen za enzim 21-hidroksilazu (21-OH), geni za nekrozu tumora (TNF –α i TNF-β) i geni za proteine šoka (engl. Heat Shock Proteins, HSP). (6)




**Slika 1.** Smještaj regije HLA na kraćem kraku kromosoma 6 (izvor:https://www.cell.com/trends/genetics/fulltext/S0168-9525(00)02180-6)

### 1.1.2. Antigeni HLA

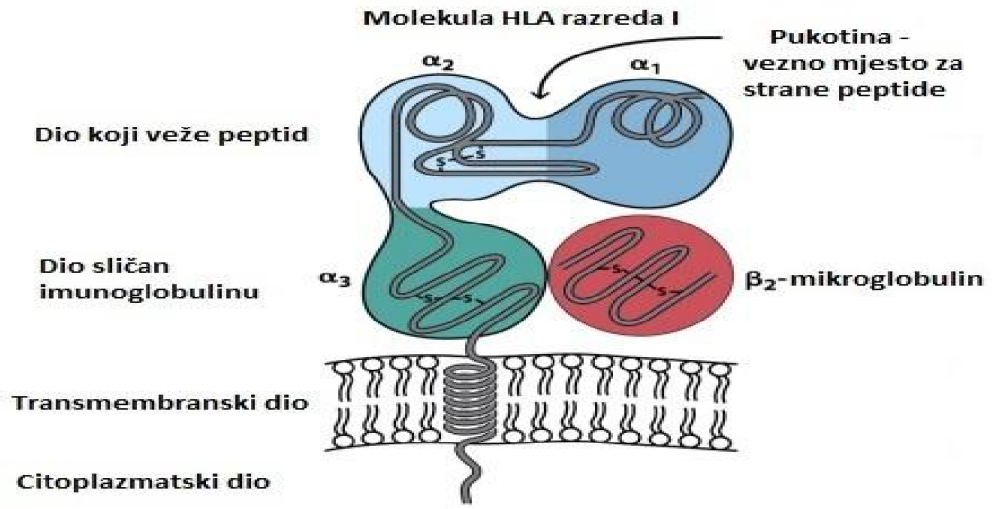
Dva su razreda molekula HLA, čija je glavna funkcija predočavanje vlastitih i stranih peptidnih dijelova izvršnim molekulama imunološkog sustava i pokretanje imunološke reakcije s ciljem eliminacije stranog antigena. Molekula se sastoji od dva dijela. Prvi dio određuje „privatnu“ specifičnost, a to je epitop specifičan samo za jedan antigen/molekulu HLA na koji će se vezati protutijela HLA, a drugi dio određuje „opću“ specifičnost. Osnovne razlike između molekula HLA razreda I i II su njihova struktura, slijed aminokiselina, tip antigena kojeg predočuju, tipovi stanica kojima predočuju antigen i njihova tkivna zastupljenost. (5,6)

#### 1.1.2.1. Antigeni HLA razreda I

Molekule HLA razreda I građene su od glikoproteinskog teškog α-lanca, koji je kodiran genima HLA razreda I (HLA -A, -B i -C), te od nekovalentno vezanog β2- mikroglobulina. β2- mikroglobulin je protein kodiran izvan lokusa HLA, na kromosomu 15. β lanac nalazi se izvan stanice, slobodan u serumu, te ima funkciju učvršćivanja molekule.

Cijela se molekula HLA razreda I može podijeliti u četiri dijela: vanjski dio koji veže peptidne ulomke, dio sličan imunoglobulinu, te transmembranski i citoplazmatski dio. Potpuni oblik molekule HLA razreda I, koji je potreban za njezinu stabilnu strukturu na staničnoj membrani, je heterodimer sastavljen od α-lanca, β2- mikroglobulina i vezanog peptidnog ulomka. Najvažniji je dio molekule onaj koji veže peptid, jer je glavna funkcija molekula HLA da vežu dijelove prerađenih tuđih antigena. Molekule HLA razreda I u pukotinu mogu vezati peptide veličine 8-11 aminokiselina. Pukotina je najvažniji dio molekule, izgrađena je od 180 aminokiselina, koje su stereokemijski podijeljene u dva dijela: α1 i α2. Dio oko vezne pukotine, zajedno sa stranim antigenom, prepoznaje receptor T-limfocita. α3 zajedno sa β2-mikroglubulinom tvori dio sličan imunoglobulinima, te sadržava vezno mjesto za molekulu CD8+ na citotoksičnim limfocitima T. (5)

Transmembranski dio sastoji se od približno 25 hidrofobnih aminokiselina koje se nastavljaju na α3 domenu i pokazuje mali polimorfizam. Citoplazmatski dio je sastavljen od 30 bazičnih aminokiselina i predstavlja karboksilni kraj teškog lanca. (5)




**Slika 2.** Shematski prikaz molekule HLA razreda I

(izvor: ref. 8)

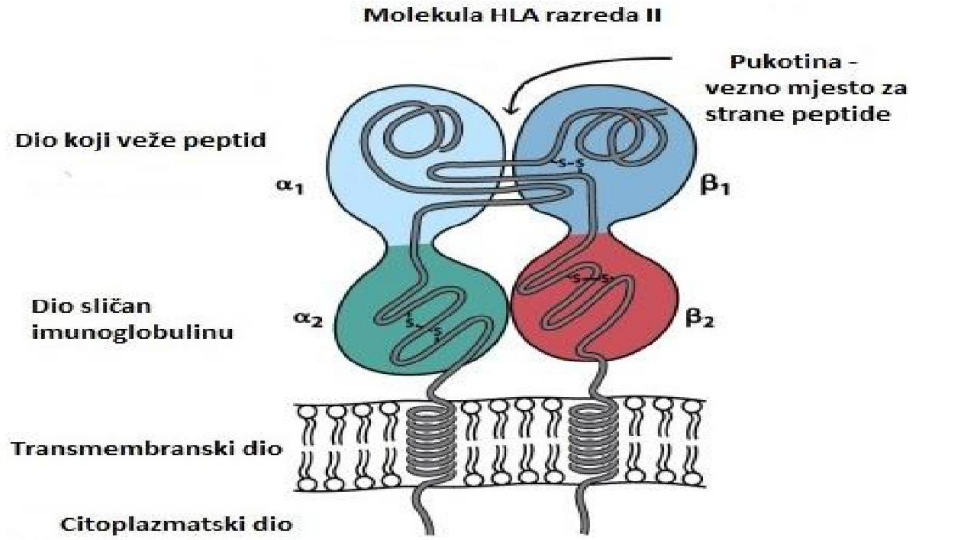
Molekule HLA razreda I nalaze se na svim stanicama s jezgrom, osim endotela rožnice, egzokrinog dijela gušterače i neurona središnjeg živčanog sustava. Preko antigena HLA razreda I ostvaruje se unutarnji put predočenja stranog antigena, koji se razgrađuju na peptide. Peptidi se pomoću specifičnih prijenosnih proteina TAP1 i TAP2, transportiraju kroz endoplazmatsku mrežicu u kojoj se sintetizira molekula HLA. Dalje se vežu na molekulu HLA, prolaze kroz Golgijev aparat, te se pomoću vezikula egzocitozom predočavaju na površini stanice CD8+ citotoksičnim limfocitima T. (9)

### 1.1.2.2. Antigeni HLA razreda II

Molekule HLA razreda II građene su od dva glikoproteinska polipeptidna, nekovalentno vezana lanca α i β, od kojih su oba kodirana genima HLA. Teški α-lanac kodiraju A geni HLA razreda II, a laki β-lanac kodiraju B geni. Geni koji kodiraju β-lanac više doprinose polimorfizmu molekula HLA razreda II, zbog većeg broja alela, a to je prvenstveno najpolimorfniji gen HLA razreda II - HLA-DRB1.

Molekule ovog razreda također se sastoje od četiri osnovna dijela: vanjski dio koji veže peptidne ulomke, dio sličan imunoglobulinu, transmembranski i citoplazmatski dio. Oba lanca molekula HLA razreda II imaju po dvije izvanstanične domene: α1 i α2 na jednom lancu,te domene β1 i β2 na drugom lancu. Veznu pukotinu čine dijelovi lanaca α1 i β1. Za

razliku od molekula razreda HLA I, krajevi pukotine su otvoreni, pa se vezani peptidni dijelovi mogu nalaziti i dijelom izvan pukotine. To dovodi do vezanja većih peptida građenih od 10-30 aminokiselina. α2 i β2 su nepromjenjive domene i čine regiju sličnu imunoglobulinu. β2 domena je mjesto vezanja pomoćničkih limfocita T. Transmembranska regija sadrži hidrofobne aminokiseline, dok citoplazmatska regija sadrži mjesto za fosforilaciju, te veže molekulu za elemente citoskeleta. (5, 9)




**Slika 3.** Shematski prikaz molekule HLA razreda II

(izvor: ref 8)

Egzogeni put predočavanja antigena ostvaruje se molekulama HLA razreda II, koji započinje fagocitozom. Molekule HLA razreda II se nalaze na antigen-predočnim stanicama poput makrofaga, dendritičkih stanica, B-limfocita, te nekih endotelnih i epitelnih stanica. Ekspresija molekula HLA-razreda II, može biti potaknuta uz pomoć agenasa poput γ-interferona, te tako biti prisutna i na površini fibroblasta i epitelnih stanica timusa. (10)

Ulaskom stranog antigena dolazi do razgradnje na male peptide veličine do 30 aminokiselina. Istovremeno u endoplazmatskom retikulumu počinje sinteza molekule HLA, koja će vezati antigeni peptid. Tako se antigen predočava na površini stanice CD4+ pomoćničkim limfocitima T, koji prepoznaju kompleks antigen-vlastiti antigen HLA, te započinje imunološki odgovor i sekrecija interleukina i citokina. (4, 11)

### 1.1.3. Protutijela HLA

Imunološki odgovor, koji može biti stanični ili humoralni, je posljedica aktiviranja imunoloških reakcija nakon ulaska imunogena u organizam. Humoralna imunost je imunost koja je posredovana protutijelima. Protutijela su po kemijskom sastavu glikoproteini, produkt su aktiviranih limfocita B, te ih nazivamo imunoglobulinima. Osnovna četveročlana molekula je monomer i građena je od dva teška (engl. heavy chain, H) i dva laka (engl. light chain, L) lanca. Imunoglobulini se dijele u pet osnovnih razreda: IgG, IgA, IgM, IgD i IgE. Imunoglobulini imaju simetričnu strukturu u obliku slova Y, koja je posljedica brojnih disulfidnih i nekovalentnih veza između različitih polipeptidnih lanaca. Molekula imunoglobulina građena je od dva funkcijski i strukturno različita dijela, a to su Fab odsječak (engl. Fragment antigen-binding), a to je dio molekule koji specifično prepoznaje antigen i Fc odsječak (engl. Fragment crystallizable), dio molekule koji ima sposobnost kristalizacije.

Protutijela HLA su po svojoj funkciji citotoksična protutijela i nastaju kao rezultat humoralnog imunološkog odgovora na aloantigenu stimulaciju. Pripadaju razredu IgG i IgM, te je glavna uloga protutijela HLA vezanje specifičnih antigena HLA, koji su i izazvali njihovo stvaranje. Dakle, protutijela HLA su stečena i mogu nastati u trudnoći, nakon transfuzije ili nakon transplantacije tkiva i organa. Glavnu ulogu u procesu senzibilizacije na antigene HLA imaju pomoćnički limfociti T. Oni pomoću interleukina potiču limfocite B na diferencijaciju i proliferaciju u plazma stanice, koje imaju sposobnost proizvodnje protutijela HLA.

Protutijela HLA koja nastaju u trudnoći, imunološki su odgovor majke na strane antigene djeteta, koje dijete naslijedi od biološkog oca. Kod senzibilizacije na antigene koji su produkti gena HLA-A –B i Cw, kao rezultat nastaju T+B limfocitotoksična protutijela HLA. Ako se radi o senzibilizaciji na antigene HLA razreda II, nastaju anti B limfocitotoksična protutijela HLA. Također, nekad dolazi do slučaja senzibilacije majke na cijeli HLA haplotip djeteta koji je naslijeđen od oca.

Isto tako, protutijela HLA mogu izazvati teške poslijetransfuzijske reakcije na transfuziju pune krvi, leukocita ili trombocita. U slučaju transfuzije, kada primatelj dobije ABO podudarnu, ali HLA nepodudarnu krv, doći će do posttransfuzijske reakcije, to jest do senzibilizacije na antigene iz krvi davatelja. Simptomi posttransfuzijske reakcije će biti povišena temperatura i drhtavica. To se često događa na hemodijalizi, gdje su pacijenti izloženi transfuzijama krvi.

Pacijentima se daje filtrirana krv sa smanjenim brojem leukocita ili pripravak deficitarnih stanica koje na svojim membranama nemaju antigene HLA.

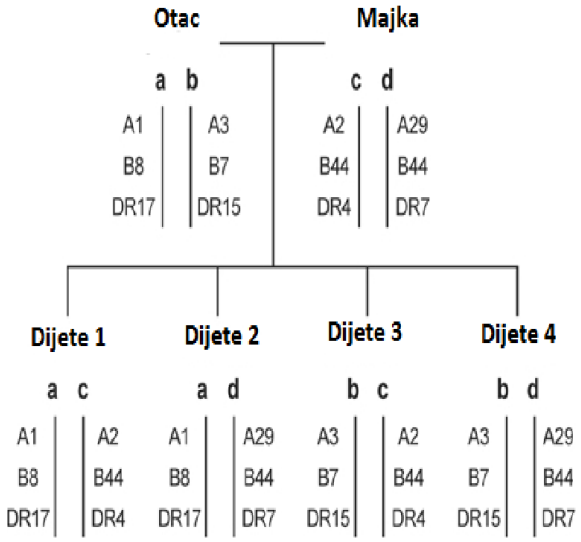
Pacijenti koji su imali transplantacije organa ili tkiva, također često imunološki reagiraju stvaranjem protutijela HLA. Dolazi do senzibilizacije na antigene HLA, kada davatelj i primatelj nisu podudarni i proizvodit će se citotoksična protutijela HLA. (1, 5)

### 1.1.4. Osobitosti sustava HLA

Sustav HLA ima praktičnu važnost u transplantaciji tkiva i organa, transfuzijskom liječenju, povezanosti s nastankom određenih bolesti, antropološkim istraživanjima, kod identifikacije osoba, te kod isključivanja očinstva, stoga ne čudi ljudsko zanimanje za njega.

Kada je riječ o nasljeđivanju gena HLA, valja naglasiti kako ono prati Mendelove zakone nasljeđivanja. Geni lokusa HLA koji se nalaze na jednom kromosomu tvore haplotip HLA. Dijete nasljeđuje po jedan haplotip od majke i jedan od oca, pri čemu se oba izražavaju kodominantno na staničnoj membrani. Kombinacija tih dvaju haplotipova čini genotip HLA. (slika 4)

Do odstupanja od pravilnosti nasljeđivanja haplotipova HLA dolazi vrlo rijetko, a razlog odstupanju je najčešće proces rekombinacije (engl. crossing over), odnosno izmjene dijelova kromatida tijekom gametogeneze u profazi prve mejotske diobe. U načelu, rekombinacija između HLA gena je vrlo mala i nema značajni doprinos u genetičkoj varijabilnosti HLA sustava.




**Slika 4.** Nasljeđivanje haplotipova HLA

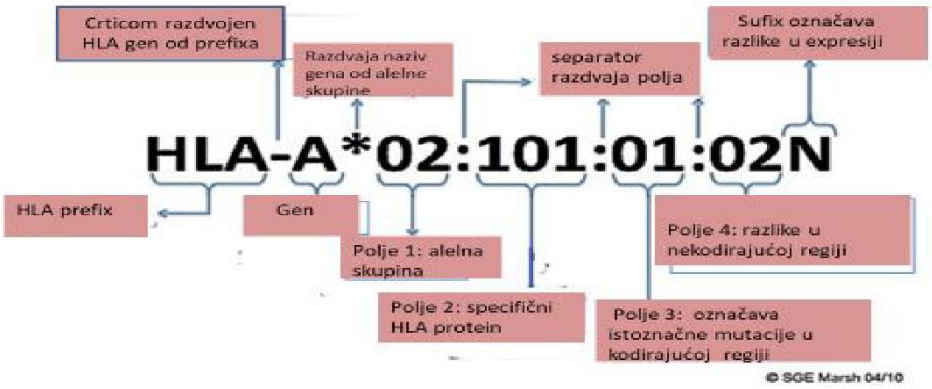
Genska neravnoteža udruživanja (engl. Linkage Disequilibrium, LD) je obilježje sustava HLA zbog kojeg se različiti aleli dva ili više bliska lokusa HLA javljaju češće u istom haplotipu, nego što bi trebali s obzirom na njihovu pojedinačnu gensku učestalost. Tako imamo primjer da su HLA-A1 i –B8 najučestaliji HLA haplotipovi kod bijele rase. Nekoliko je mogućih objašnjenja ovog fenomena poput djelovanja selekcijskih sila ili genetički uvjetovanih mehanizama koji potiču specifična udruživanja alela HLA u zajednički haplotip,a koji su rezultat male udaljenosti među pojedinim lokusima HLA, ali još uvijek nemamo potpuni odgovor na ovaj fenomen.

Sustav HLA karakteriziraju još dva obilježja, a to su polimorfizam i poligenija. Regija gena HLA je najpolimorfnija genska regija u ljudi, što podrazumijeva nekoliko varijanti svakog gena unutar populacije. Pretpostavlja se da se ovaj sustav razvijao brže od ostalih, te se danas smatra da je polimorfizam rezultat mutacije (koje uzrokuju promjenu pojedinih nukleotida), rekombinacije gena (između različitih alela istog lokusa) i konverzija gena (zamjena pojedinih dijelova gena ulomcima drugog gena). Drugo važno obilježje je poligenija, odnosno prisutnost nekoliko različitih srodnih gena sa sličnom funkcijom. Poligenija se uz polimorfizam smatra evolucijskom prilagodbom koja osigurava uspješniju borbu protiv mikroorganizama s velikim brojem različitih antigena. (5)

### 1.1.5. Nazivlje sustava HLA

Zbog izrazitog polimorfizma, javila se potreba da se uskladi nomenklatura među laboratorijima i studijama. 2010.godine stručnjaci za HLA, pri SZO (WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System) sistematizirali su najnoviju nomenklaturu za HLA sustav. Serološkom metodom dokazuju se antigeni HLA, te se imenuju prvo oznakom lokusa,nakon kojeg slijedi identifikacijska brojčana oznaka antigena( primjer HLA-B7). Geni HLA dokazuju se molekularnom metodom određivanja, te iza samog HLA prefiksa, dolazi oznaka određenog lokusa (primjer HLA-A). Nakon toga, slijedi četveroznamenkasti broj, gdje prva dva broja označavaju grupu alela (primjer HLA-A*02), a druga dva broja označavaju redni broj alela toga gena, kako je koji otkriven (primjer HLA-A*02:01). U nazivlju gena za HLA razred II, uz oznaku lokusa dodaje se oznaka gena za polimorfni lanac, gdje je A oznaka za α-lanac, a B oznaka za β-lanac, na primjer DQA1*01:01 i DQB1*05:01.

Dodatno, određeni broj sufiksa se koristi da bi se identificirale regije koje se ne eskprimiraju. Tako aleli bez ekspresije, to jest nullaleli, imaju oznaku N. Aleli s niskom ekspresijom imaju oznaku L, low. S oznaka označava prisutnost topljivog (soluble) produkta. C oznaka se odnosi na ekspresiju unutar citoplazme, Q označava „questionable“ za upitne i nepotvrđene ekspresije, a A upućuje na one koje imaju nepravilnu ekspresiju. (7)




**Slika 5.** Nomenklatura HLA sustava (izvor: http/hla.alleles.org/nomenclature/naming.html)

Do ožujka 2019. otkriveno je 22 548 alela HLA (tablica 1), no svakim danom se otkrivaju novi aleli, te tako njihov broj nije konačan.

.

**Tablica 1.** Broj otkrivenih alela do ožujka 2019.godine

| **HLA razred I** | | **HLA razred II** | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Lokus** | **Broj alela** | **Lokus** | **Broj alela** | **Lokus** | **Broj alela** |
| A | 5108 | DRA | 7 | DQA1 | 149 |
| B | 6096 | DRB1 | 2479 | DQB1 | 1561 |
| C | 4852 | DRB2 | 1 | DPA1 | 106 |
| E | 30 | DRB3 | 225 | DPA2 | 5 |
| F | 44 | DRB4 | 121 | DPB1 | 1360 |
| G | 68 | DRB5 | 85 | DPB2 | 6 |
| | | DRB6 | 3 | DMA | 7 |
| | | DRB7 | 2 | DMB | 13 |
| | | DRB8 | 1 | DOA | 12 |
| | | DRB9 | 6 | DOB | 13 |
| Ukupno: 16386 | | Ukupno:6162 | | | |
| **razred I+ razred II=22 548** | | | | | |

(izvor: http/hla.alleles.org/nomenclature/stats-html)

### 1.1.6. Imunološki odgovor i povezanost bolesti sa HLA

Glavna uloga antigena HLA je imunološko prepoznavanje stranih antigena i njihovo odbacivanje, te razlikovanje vlastitih stanica od tuđih. Kao što je već navedeno, citotoksični limfociti T prepoznaju tuđe antigene u sklopu molekula HLA razreda I, a pomagački limfociti T prepoznaju tuđe antigene u sklopu molekula HLA razreda II. Receptor koji prepoznaje komplekse molekula HLA/peptid-antigen naziva se T-stanični receptor (engl. T cell receptor, TCR) i razlikuje se između različitih klonova limfocita T.

Molekule HLA razreda I imaju ulogu biljega stanice koja je zaražena unutarstaničnim antigenom (na primjer tumori, virusi). TCR citotoksičnog limfocita T prepoznaje tuđe antigene koje su vezane na vlastitu stanicu i zadaća mu je ubiti vlastitu stanicu zaraženu unutarstaničnim antigenom.

Molekule HLA razreda II imaju ulogu biljega stanice limfnoga tkiva koja izlaže prerađeni strani izvanstanični antigen (na primjer bakterije, toksini). Tuđe antigene prepoznaje TCR pomagačkog limfocita T, koji aktivira i usmjerava imunološku reakciju prema B limfocitima. (1, 5)

Autoimunost je naziv za proces u kojem imunološki sustav organizma postaje osjetljiv na vlastite antigene i doživljava ih kao sebi strane. Ovisno o tome koliki je dio organa zahvaćen autoimunom bolešću dijelimo ih na organ specifične, a to su na primjer dijabetes tipa 1, glutenska enteropatija, multipla skleroza i tireoditis, te na sistemne kao što su reumatoidni artritis i eritemski lupus. Autoimune bolesti su kompleksne i ovisne su o genetskim i okolišnim čimbenicima. Geni sustava HLA najvažniji su genetski čimbenici uključeni u njihov razvoj, pa se tako određeni HLA haplotipovi vežu uz pojedine autoimune bolesti.

Jedna od najpoznatijih veza između HLA haplotipova i bolesti je HLA-B27 i ankilozantni spondilitis, gdje je vrijednost relativnog rizika oko 80, što znači da osobe pozitivne na HLA-B27 imaju 80 puta veću vjerojatnost obolijevanja od te bolesti, nego osobe koje nemaju taj haplotip. Ističe se i povezanost narkolepsije s HLA-DQB1*0602/HLA-DRB1*1501, te celijakija s HLA-DQB1*02. Za razvoj šećerne bolesti tipa 1 (engl. diabetes melitus type 1) najrizičnija je prisutnost alela HLA-DQA1*05:01 i HLA-DQB1*03:02. Reumatoidni artritis vežemo uz sekvencu aminokiseline u DR β1 lancu, koji je čest kod podtipova HLA-DR1 i HLA- DR4. Istraživanja su pokazala da je za nastanak psorijaze primarni rizični alel HLA-C*06:02. (12)

## 1.2. Transplantacija

Transplantacija je presađivanje organa ili tkiva s jednog živog bića (čovjek ili životinja) na drugo u svrhu liječenja. Transplantat je tkivo ili organ koji se presađuje. Prema vrsti transplantata razlikujemo transplantaciju nelimfatičnog tkiva, a to su bubreg, srce, gušterača, jetra, rožnica i pluća, te transplantaciju nelimfatičnog tkiva, odnosno koštana srž i krvotvorne matične stanice.

Organi se mogu presađivati sa živog ili mrtvog davatelja (kadaver), gdje se bolesni organ zamijeni sa zdravim organom davatelja. U medicinskoj praksi transplantacije razlikujemo četiri osnovne vrste između primatelja ili darivatelja. Dijelimo ih na autolognu transplantaciju, gdje je primatelj ujedno i donor, to jest koristi se vlastito tkivo ili stanice, singeničnu transplantaciju predstavlja transplantat čiji su donor i primatelj genetički identične jedinke (na primjer jednojajčani blizanci). Zatim slijedi alogenična transplantacija, u kojoj se transplantat prenosi s jednog bića na drugo koja nisu genetički jednaka, te posljednji oblik je ksenogenična transplantacija u kojoj donor i primatelj pripadaju različitim vrstama. Povijesno gledajući, nakon što je bilo više neuspješnih transplantacija bubrega od živog ili mrtvog donora, domaćih životinja i čovjekolikih majmuna, prva uspješna transplantacija bila je u Bostonu 1954.godine, kada je kirurg Joseph Murray presadio bubreg između jednojajčanih blizananaca. Prva uspješna transplantacija bubrega od umrle osobe izvršena je 1962.godine, također u Bostonu. Zatim je uslijedilo presađivanje koštane srži, jetre, gušterače, srca i pluća. (13)

Veliki značaj u transplantacijskoj medicini je osnivanje Eurotransplanta, međunarodne organizacije europskih država za dodjelu i razmjenu organa. Osnovan je 1969.godine, a sjedište mu je u Leidenu u Nizozemskoj. Obuhvaća osam europskih država, među kojima su Njemačka, Belgija, Nizozemska, Austrija, Slovenija, Mađarska, te Hrvatska koja je postala punopravna članica 26.svibnja 2007. Ova međunarodna suradnja uključuje sve transplantacijske bolnice, laboratorije za tipizaciju tkiva i bolnice u kojima se odvijaju donacije organa i tako omogućuje pravovremeno pronalaženje, bolju podudarnost, veću iskoristivost i dostupnost darivanih organa primateljima na listi čekanja. Na središnjoj listi čekanja Eurotransplanta prijavljeno je oko 16 000 pacijenata, a podaci za 2017. godinu pokazuju da se presadilo 8040 organa. (15, 16)




**Slika 6** . Članice Eurotransplanta

Podudaranje za gene HLA  smatra se glavnim genetičkim uvjetom kojim se postiže bolje preživljenje organa. U transplantacijskoj imunosnoj reakciji dolazi do prepoznavanja antigena HLA davatelja ili izravno na davateljevim antigen-predočnim stanicama nakon njihove migracije iz transplantiranog organa u regionalne limfne čvorove ili posredno nakon njihove „prerade“ u antigen predočnim stanicama primatelja. U oba slučaja nastaju aktivirani limfociti koji migriraju u transplantirani organ i uzrokuju njegovo oštećenje. U odbacivanju transplantiranog organa, ulogu imaju i limfociti B koji, nakon aktivacije i proliferacije, sazrijevaju u plazma-stanice koje proizvode protutijela protiv endotelnih stanica transplantata. (14)

U transplantaciji bubrega, prethodi određivanje HLA podudarnosti između primatelja i donora, dok se kod transplantacije jetre, srca i pluća ne uzima u obzir HLA podudarnost, a imunološka reakcija protiv presađenog organa nastala zbog genetske nepodudarnosti primatelja i davatelja sprječava se primjenom imunosupresivnih lijekova. (12)

Transplantacija je najbolja metoda liječenja kod kroničnog bubrežnog zatajenja, kao posljedica dijabetesa, povišenog arterijskog tlaka i ateroskleroze. U usporedbi sa dijalizom ima velike prednosti, kao što su  primateljeva sloboda kretanja, neovisnost o dijalizi, uravnotežena prehrana i manja smrtnost. No, česte su i komplikacije, pa tako u prvoj godini nakon transplantacije dolazi do akutnog odbacivanja, arterijske tromboze, te smrti bolesnika. Najčešći uzroci smrti su kardiovaskularne bolesti, zloćudni tumori i infekcije. Brojne su prednosti transplantacije sa živog darivatelja u odnosu prema transplantaciji s umrle osobe, bolja je kvaliteta organa, postupak je brži, izbjegava se dugo čekanje na listama, te je tako bolji ishod transplantacije. Na temelju krvne grupe, HLA podudarnosti između darivatelja i primatelja, vremenu provedenom na listi čekanja, senzibilizaciji pacijenta, životnoj

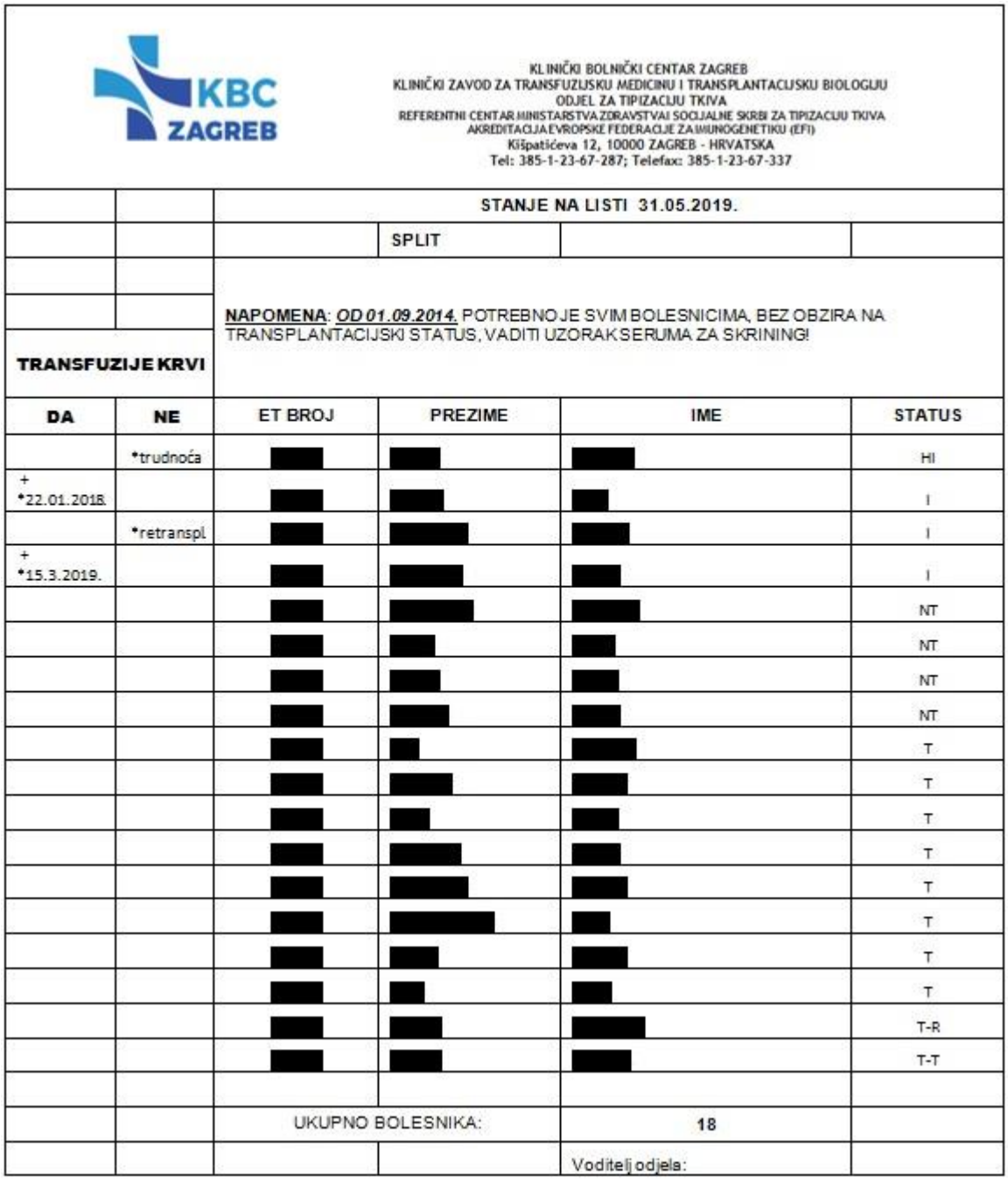
ugroženosti, dobi pacijenta, nacionalnoj uravnoteženosti prmatelja i darivatelja, svaki pacijent dobiva određeni broj bodova, nakon čega se formira lista, te HLA podudarnost donosi najveći broj bodova. (17,18)

Svakog pacijenta treba imunološki obraditi za prijavu na listu čekanja. Svi testovi koji se koriste prilikom imunološke obrade primatelja i darivatelja bubrega se moraju provoditi u skladu s važećim propisima Europske federacije za imunogenetiku (engl. European Federation for Immunogenetics- EFI Standards for Histocompatibility Testing and Immunogenetics Testing) i Eurotransplanta. Provode se u laboratoriju koji ima valjanu akreditaciju Europske federacije za imunogenetiku za kategorije „Transplantacija organa - bubreg: tipizacija primatelja, probir antitijela, identifikacija antitijela“. Iznimka su laboratoriji bez valjane akreditacije, mogu provoditi imunološka testiranja pacijenata za listu čekanja, isključivo ako su zadovoljili kriterije certificiranih programa vanjske kontrole kvalitete. Također, akreditirani laboratorij mora provoditi HLA tipizaciju darivatelja organa, rezultat je nužan prijaviti laboratoriju Eurotransplanta (engl. ETRL- Eurotransplant Reference Laboratory), te test križne reakcije mora provoditi i prijavljivati Eurotransplant-ovu laboratoriju koji ima valjanu akreditaciju Europske federacije za imunogenetiku za područje „Transplantacija organa - bubreg: cross-match“.

**Slika 7.** European Federation for Immunogenetics

Pacijent se tipizira za alele lokusa HLA-A, HLA-B serološkom ili molekularnom metodom, a za HLA-DR je obavezna molekularna metoda. Ako je dokazana prisutnost HLA protutijela, to jest kada je primatelj senzibiliziran, preporučuje se napraviti molekularna tipizacija tkiva HLA-DQA, HLA-DPA, HLA-DPB i tipizacija visokog razlučivanja za lokuse za koje je dokazana alel-specifična senzibilizacija. U razmaku od najmanje 24 sata uzimaju se dva uzorka krvi za prvu i potvrdnu tipizaciju, te je poželjno da se primijene dvije različite metode: serološka CDC i molekularna PCR. U slučaju da se za tipizaciju obaju uzoraka koristi ista metoda, tada je poželjno rabiti testove različitih proizvođača. Nadležni liječnik dužan je

svakom tipizacijskom laboratoriju dostaviti podatke o mogućim imunizirajućim događajima koje je pacijent mogao imati, kao što su trudnoća, transfuzija ili prethodna transplantacija. Probir protutijela ili screening odredi je li riječ o autoantitijelima ili aloantitijelima IgM ili igG klase imunoglobulina, rabeći kombinaciju serološke metode- citotoksičnosti ovisne o komplementu CDC i metode čvrste faze ELISA  i Luminex. Za probir protutijela metodom CDC, koristi se panel limfocita od najmanje 50 dobrovoljnih darivatelja koji su tipizirani za alele lokusa HLA-A, HLA-B i HLA-DR. Rezultat se izražava kao postotak PRA i predstavlja postotak donora koji na panelu limfocita reagiraju pozitivno s primateljevim serumom. Panel se odabire tako da je svaka specifičnost HLA zastupljena s učestalošću koja statistički značajno ne odstupa od zastupljenosti u općoj populaciji. Za svakog primatelja, također je obavezno prije prijave na listu čekanja odraditi test autokrižne reakcije, da se isključi postojanje autoantitijela, koja u testu križne reakcije s donorom mogu dati lažno pozitivni rezultat. Tipizacijski laboratorij treba svim centrima za dijalizu na početku godine dostaviti obavijest o datumima prikupljanja uzoraka seruma za redoviti godišnji probir protutijela za pacijente za koje se provodi imunogenetička obrada. Redoviti probir protutijela provodi se četiri puta godišnje CDC metodom sa razmakom od tri mjeseca, dok se probir prututijela metodom čvrste faze provodi jednom u dvanaest mjeseci.



KBC ZAGREB

KLINIČKI BOLNIČKI CENTAR ZAGREB
KLINIČKI ZAVOD ZA TRANSFUZIJSKU MEDICINU I TRANSPLANTACIJSKU BIOLOGIJU
ODJEL ZA TIPIZACIJU TKIVA
REFERENTNI CENTAR MINISTARSTVA ZDRAVSTVA I SOCIJALNE SKRBI ZA TIPIZACIJU TKIVA
AKREDITACIJA EVROPSKE FEDERACIJE ZA IMUNOGENETIKU (EFI)
Kišpatićeva 12, 10000 ZAGREB - HRVATSKA
Tel: 385-1-23-67-287; Telefax: 385-1-23-67-337

STANJE NA LISTI 31.05.2019.

SPLIT

**NAPOMENA**: ***OD 01.09.2014.*** POTREBNO JE SVIM BOLESNICIMA, BEZ OBZIRA NA TRANSPLANTACIJSKI STATUS, VADITI UZORAK SERUMA ZA SKRINING!

| TRANSFUZIJE KRVI | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **DA** | **NE** | **ET BROJ** | **PREZIME** | **IME** | **STATUS** |
| | *trudnoća | [redacted] | [redacted] | [redacted] | HI |
| + *22.01.2018. | | [redacted] | [redacted] | [redacted] | I |
| | *retranspl. | [redacted] | [redacted] | [redacted] | I |
| + *15.3.2019. | | [redacted] | [redacted] | [redacted] | I |
| | | [redacted] | [redacted] | [redacted] | NT |
| | | [redacted] | [redacted] | [redacted] | NT |
| | | [redacted] | [redacted] | [redacted] | NT |
| | | [redacted] | [redacted] | [redacted] | NT |
| | | [redacted] | [redacted] | [redacted] | T |
| | | [redacted] | [redacted] | [redacted] | T |
| | | [redacted] | [redacted] | [redacted] | T |
| | | [redacted] | [redacted] | [redacted] | T |
| | | [redacted] | [redacted] | [redacted] | T |
| | | [redacted] | [redacted] | [redacted] | T |
| | | [redacted] | [redacted] | [redacted] | T |
| | | [redacted] | [redacted] | [redacted] | T |
| | | [redacted] | [redacted] | [redacted] | T-R |
| | | [redacted] | [redacted] | [redacted] | T-T |
| | | | | | |
| | | UKUPNO BOLESNIKA: | | 18 | |
| | | | | Voditelj odjela: | |

**Slika 8.** Primjer liste čekanja mogućih primatelja bubrega

Završni test pred samu transplantaciju je in vitro test križne reakcije (engl.cross match- CM) između primatelja i darivatelja. Zlatni standard križne reakcije je također serološka metoda CDC, te tako negativan rezultat CM-a isključuje postojanje HLA donor specifičnih protutijela. Pozitivan rezultat CM-a sa „svježim“ uzorkom seruma, koji nije stariji od tri mjeseca, nam kazuje da primatelj ima HLA protutijela, što pri transplantaciji dovodi do reakcije odbacivanja organa, to jest apsolutna je kontraindikacija za transplantaciju bubrega. Testovi određivanja

PRA i križne reakcije međuzavisni su, te se tako test križne reakcije, u slučaju potpuno točnog određivanja specifičnosti protutijela HLA u serumu bolesnika, može predvidjeti s velikom sigurnošću. (14, 19)

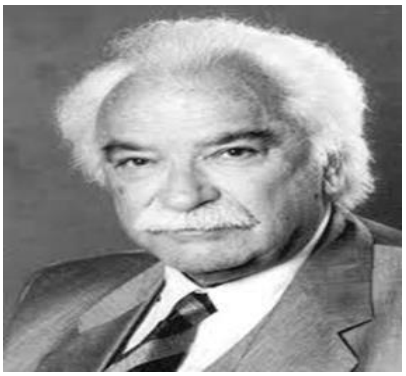
### 1.2.1. Transplantacija u Hrvatskoj

1962. godine na Odjelu za urologiju, Klinike za kirurgiju u KBC Rijeka izvedena je prvi put hemodijaliza u bolesnika s kroničnim bubrežnim zatajenjem, te je nakon četiri godine započela redovita hemodijaliza, koju je vodio prof. dr. Jerko Zec, što je bila osnova za program transplantacije bubrega. Ostale pripreme izučavanja kliničkih i imunoloških problema su bile pod vodstvom prof. dr. Vinka Frančiškovića, koje su rezultirale prvom transplantacijom bubrega 30. siječnja 1971. godine. 34-godišnjaku je presađen majčin bubreg i on je umro nakon 14,5 godina s funkcionirajućim bubregom.



**Slika 9.** Prof.dr. sc. Vinko Frančišković

Nakon prvih uspješnih transplantacija sa živog darivatelja, 15. svibnja 1972.godine učinjena je prva transplantacija sa umrle osobe u Rijeci. U KBC Zagreb je tim na čelu sa akademikom Ljubomirom Čečukom također bio uspješan u transplantaciji bubrega. Transplantacija bubrega ubrzo postaje rutinska metoda nadomještanja bubrežne funkcije, kojom su spašene tisuće života.



**Slika 10.** Akademik Ljubomir Čečuk

1988.godine učinjena je prva transplantacija srca u KBC Zagreb, na čelu s prof. dr. Josipom Sokolićem, a 1990. godine prva transplantacija jetre, koju je predvodio doc.dr.sc. Vuk Borčić. Transplantacija solidnih organa u KB-u Merkur počela je programom transplantacije jetre 1998. godine, te su nekoliko godina poslije izvedene kombinirane transplantacije jetre i bubrega i dva bubrega jednom primatelju. Prva transplantacija bubrega u KBC Osijek obavljena je 20. listopada 2017. godine. (13, 20)

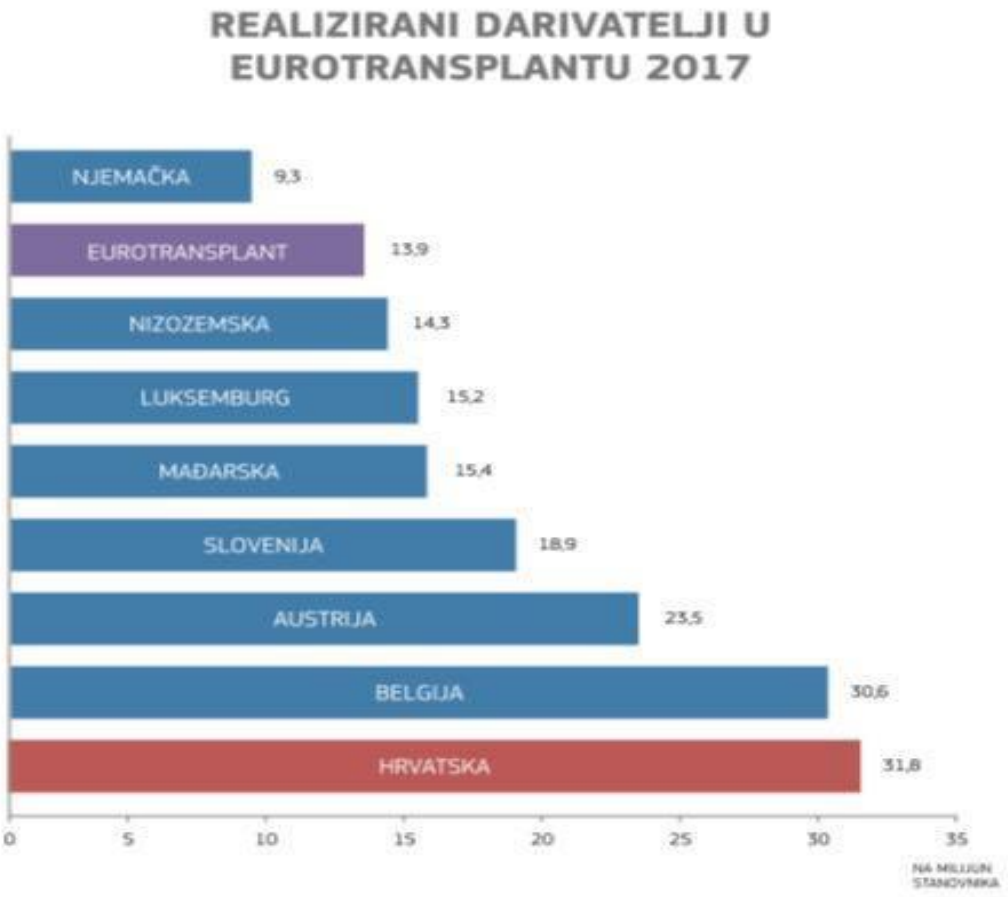
Hrvatska udruga Transplant, koja je osnovana 2005.godine, okuplja transplantirane pacijente, one koji su na listi čekanja, članove obitelji i prijatelje i zdravstvene radnike koji su u području transplantacijske medicine. Cilj udruge je povećanje broja transplantacija, bolja kvaliteta života oboljelih, kao i poboljšanje uvjeta rada zdravstvenog osoblja i bolja zdravstvena zaštita. U Hrvatskoj živi skoro 4000 osoba s presađenim organima, najviše njih sa presađenim bubregom, to jest 1500, te sa jetrom njih 400. Podaci Eurotransplanta iz 2017. godine pokazuju da je transplantirano ukupno 311 organa, od toga 155 bubrega od umrlih, te 11 sa živih darivatelja. (16, 21)




**Slika 11**. Realizirani darivatelji organa u Hrvatskoj 2006-2017.

(izvor: Ministarstvo zdravstva, Zavod za transplantaciju i biomedicinu)

Kao što je već navedeno, Hrvatska je u svibnju 2007. postala punopravna članica Eurotransplanta, a prva transplantacija u sklopu te organizacije bila je 15. kolovoza u Klinici za Urologiju KBC-a Zagreb. Članstvo u Eurotransplantu doprinosi visoko imuniziranim pacijentima koji u maloj državi ne bi pronašli podudarnog darivatelja. 2011.godine je Hrvatska po stopi realiziranih darivatelja organa i transplantacija bubrega i jetre bila prva zemlja u svijetu. Uspješnost je u iznadprosječnim rezultatima preživljenja presatka i primatelja, a to nas svrstava u sam vrh transplantacijske medicine u svijetu. Zavod za tipizaciju tkiva KBC-a Zagreb i Laboratorij za tipizaciju tkiva KBC-a Rijeka posjeduju akreditaciju Europske federacije za imunogenetiku, te tako ispunjavaju uvjete Eurotransplanta u području imunogenetičke obrade u kadaveričnoj transplantaciji solidnih organa. Akreditacija obuhvaća tipizaciju gena HLA, određivanje panel reaktivnih protutijela HLA, te test križne reakcije između primatelja i davatelja organa (14, 20)




**Slika 12**. Realizirani darivatelji u Eurotransplantu 2017.

(izvor: Ministarstvo zdravstva, Zavod za transplantaciju i biomedicinu)

# 2. CILJ RADA

Cilj ovog rada bio je ukazati na važnost transplantacije solidnih organa (bubreg, srce, jetra, gušterača, pluća, rožnica) u liječenju pacijenata na listama čekanja, posebice na važnost izvodenja testa križne probe (cross-matcha) kao glavnog preduvjeta za samu transplantaciju.

Cross-match (križna proba) se izvodi metodom CDC (citotoksičnost ovisna o komplementu). Pozitivan cross-match je kontraindikacija za transplantaciju, dok je negativan cross-match uz ostale imunogenetičke i kliničke parametre indikacija za transplantaciju.

Istraživanje sam provela u Laboratoriju za tipizaciju tkiva u Zavodu za transfuzijsku medicinu u KBC-u Split-Križine.

# 3. MATERIJALI I METODE

## 3.1. Materijali

Budući da za sada transplantacijski program u KBC Split još nije zaživio, eksperimentalni dio rada u Laboratoriju za tipizaciju tkiva napravila sam na primjeru dviju trudnica. Screening seruma trudnica napravljen je metodom CDC na panelu limfocita 30 dobrovoljnih darivatelja krvi. Cross–match trudnice s pozitivnim nalazom senzibilizacije napravljen je sa limfocitima iz periferne krvi supruga pacijentice. Antigeni i aleli sustava HLA senzibilizirane trudnice i supruga određeni su serološkom metodom CDC i potvrđeni molekularnom metodom PCR-SSO.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Izvođenje križne probe metodom mikrolimfocitotoksičnosti

Svrha imunogenetskih testova je spriječiti, te smanjiti i odgoditi reakciju odbacivanja transplantiranog organa. Test mikrolimfocitotoksičnosti (engl. microlymphocytotoxic test, MLCT), koji se naziva i metoda CDC (engl. complement dependent cytotoxicity, CDC), citotoksičnost ovisna o komplementu, koristi se za određivanje protutijela HLA, ali i antigena HLA. Kada se određuju specifična protutijela HLA, u testu se koriste stanice s poznatim antigenima HLA, a kada se određuju antigeni HLA, koriste se serumi s poznatim HLA protutijelima. (14)

Standardna križna proba (engl.cross- match, CM) izvodi se testom mikrolimfocitotoksičnosti. Završni je test pred transplantaciju i njime se još jednom isključuje postojanje citotoksičnih IgG protutijela u serumu primatelja, stvorenih protiv antigena HLA koje ima davatelj, a koja bi izazvala hiperakutno ili akutno odbacivanje organa. Lista s popisom bolesnika, za koje je potrebno izvesti testove križne probe, takozvana cross- match lista, formira se kompjuterski u Leidenu u Nizozemskoj, centru Eurotransplanta, te se dostavlja tipizacijskom centru.

Eurotransplant 03 march 2011
Rep 222: Kidney cross match report for donor 137450 Eurotransplant fax nr: 0031 715 790 515 p

ET donor number: 137450 Donor center: CHROR Date donor report: 03.03.2011
Donor data:
Age: 47 HBsAg: Neg Sepsis: HLA Match level Broad HLA full typing: A2 A10 A26 B16 B39 B27 BW4
Sex: F HBcAb: Neg Meningitis: TT Lab: CZATT DR3 DR52 DQ1 DQ5 DQ2 Cw12
ABO: O HCVAb: Neg Malig. Tumor: No Typing mat.: Peripheral blood
Rh: Pos CMV: Pos Drug Abuse: No HLA match typing: A2 A10 B16 B27 DR1

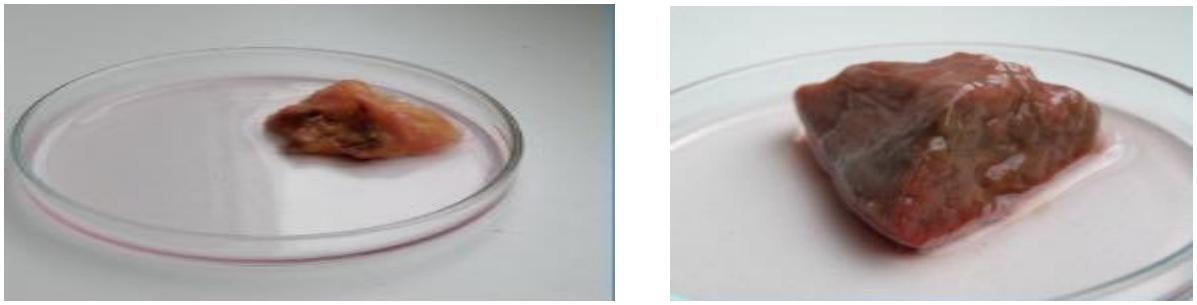
| Rank | Etnr | Name | Ctr | X match result Conv. | DTT | Ser.date | Cur | Auto | PRA % High | Age | Cri | ABO | Tot. sc. | Full match phenotype | Unacceptable antigens | Com |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 286753 | | CZATP | _____ | ____ | __/__/__ | 0 | DNT | 0 | 37 | 111 | 0 | 1008 | A1 A10 A26 B8 B16 B38 DR3 DR4 | | |
| 2 | 270675 | | CZATP | _____ | ____ | __/__/__ | 0 | DNeg | 0 | 36 | 111 | 0 | 996 | A2 A9 A23 B5 B51 B27 Cw2 Cw16 DR1 DR7 DQ1 DQ5 DQ2 | | |
| 3 | 263520 | | CZMTP | _____ | ____ | __/__/__ | 0 | DNeg | 3 | 48 | 112 | 0 | 963 | A2 A9 A24 B5 B51 B16 B39 Cw12 Cw16 DR5 DR5 DR11 DR12 | | |
| 4 | 293272 | | CZATP | _____ | ____ | __/__/__ | 0 | DNeg | 0 | 32 | 002 | 0 | 959 | A2 A10 A26 B16 B38 B27 DR5 DR11 DR7 | | |
| 5 | 260808 | | CZMTP | _____ | ____ | __/__/__ | 0 | DNT | 0 | 59 | 211 | 0 | 949 | A11 A19 A31 B27 B35 DR1 DR5 DR11 | | |
| 6 | 272629 | | CZATP | _____ | ____ | __/__/__ | 0 | DNT | 0 | 57 | 121 | 0 | 948 | A9 A24 A10 A26 B8 B22 B55 DR3 DR10 | | |
| 7 | 271818 | | CZMTP | _____ | ____ | __/__/__ | 0 | DNT | 0 | 49 | 211 | 0 | 946 | A1 B8 B16 B39 DR3 DR5 DR11 DQ2 DQ3 | | |
| 8 | 260090 | | CZMTP | _____ | ____ | __/__/__ | 0 | DNT | 0 | 63 | 121 | 0 | 925 | A2 B7 B40 DR2 DR15 DR3 | | |
| 11 | 105817 | | GJETP | _____ | ____ | __/__/__ | 33 | DNT | 33 | 52 | 121 | 0 | 404 | A1 A2 B8 B13 BW4 BW6 Cw6 Cw7 DR3 DR17 DR7 DR52 DR53 DQ2 | A3 B5 B35 Cw4 Cw14 DR13 DQ6 | |
| 12 | 279067 | | CZATP | _____ | ____ | __/__/__ | 0 | DNeg | 0 | 51 | 211 | 0 | 889 | A9 A24 A19 A32 B17 B57 | | |

**Slika 13.** Eurotransplantova cross-match lista (izvor: ref 25)

Uzorci potrebni za izvođenje testa križne probe su serum primatelja i limfociti izolirani iz limfnog čvora ili slezene potencijalnog davatelja.

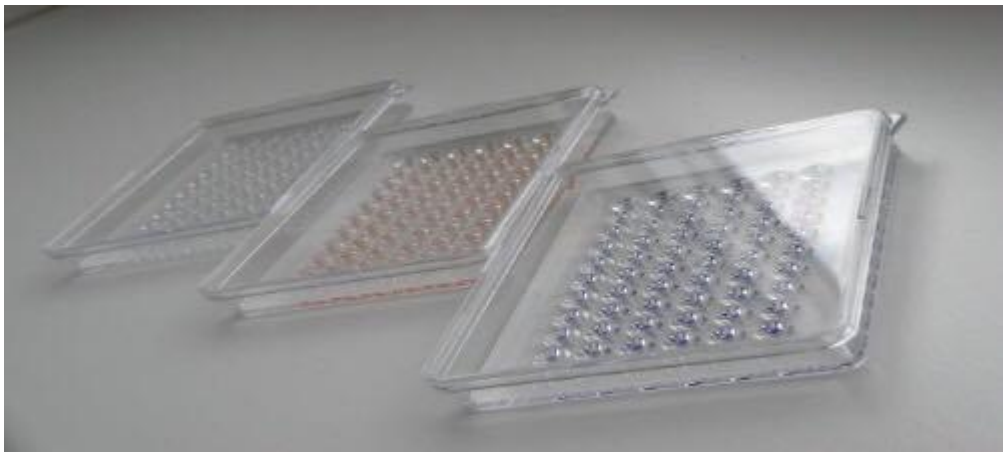


**Slika 14**. Serum primatelja (izvor: ref 25) .



**Slika 15**. Limfni čvor i slezena (izvor: ref 25)

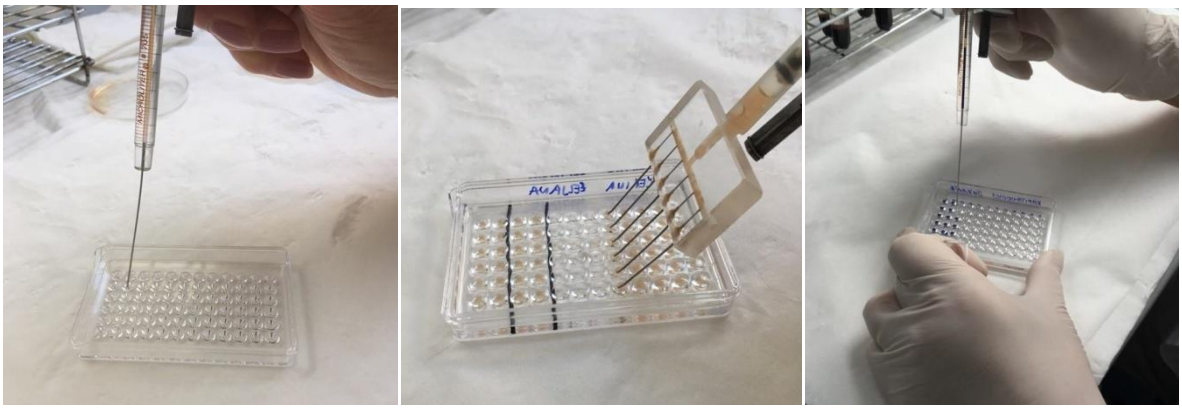
Kao što je već spomenuto, test citototoksičnosti ovisan o komplementu (CDC) je standardni test u predtransplantacijskoj obradi. Serum primatelja organa i limfociti potencijalnog davatelja organa stavljaju se u kontakt u Terasakijevoj pločici, uz dodatak komplementa kunića. U nauljenu Terasakijevu pločicu, za svaki test, se stavlja AB serum, medij, pozitivna kontrola, te serum ispitivane osobe, a u našem radu je ispitivana osoba primatelj transplantata. Serum ispitivane osobe stavljamo u razrjeđenja s AB serumom. Količina seruma je 1 mikrolitar po rupici u Terasakijevoj pločici, te na pripremljenu i razlivenu Terasakijevu pločicu dodajemo podešenu suspenziju limfocita davatelja organa i to inkubiramo 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, dodaje se serum kunića, odnosno komplement i potom inkubira 90 minuta. Pločice se boje tripanskim modrilom nakon dekantiranja istresanjem.



**Slika 16.** Terasakijeve pločice (prazne, uz dodatak komplementa i tripanskog modrila)

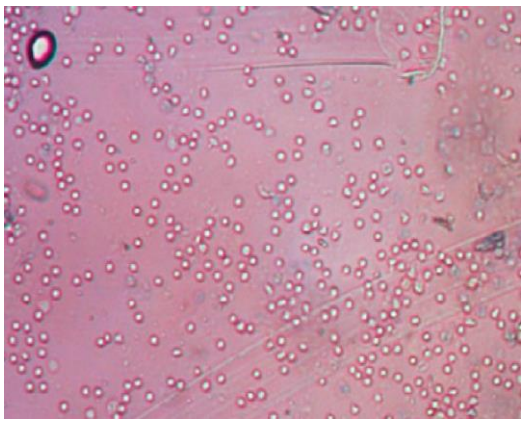
(izvor: ref 25)

Ako se stvorio kompleks antigen-protutijelo, kunićji serum će aktivirati komponente komplementa i doći će do oštećenja membrane limfocita. Takve stanice su mrtve i možemo ih vidjeti nakon bojanja tripanskim modrilom. U slučaju kada nije došlo do stvaranja kompleksa antigen- protutijelo, neće doći do lize stanica, što znači da su one žive i neće se obojati tripanskim modrilom.

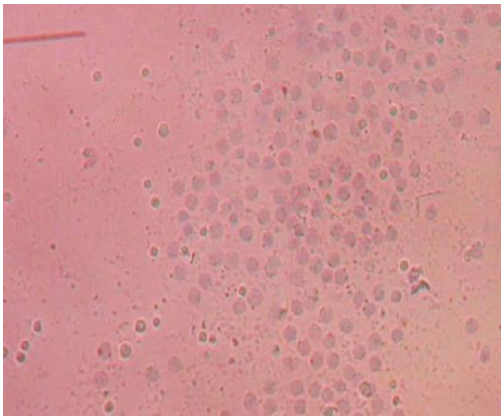


**Slika 17.** Izvođenje testa screeninga seruma u Laboratoriju za tipizaciju tkiva KBC Split

Rezultati se očitavaju pregledom svijetlosnim mikroskopom. Kod očitavanja testa križne probe postotak stanica u jažicama s negativnom kontrolom ne smije prijeći 10%, a postotak mrtvih stanica u rupicama s pozitivnom kontrolom treba biti veći od 80% ( jačina reakcije 8). Križna proba smatra se pozitivnom, ako su reakcije nerazrijeđenog i/ili razrijeđenog seruma jače od reakcija na negativnim kontrolama za barem 20%.



**Slika 18.1.** Negativan test križne reakcije

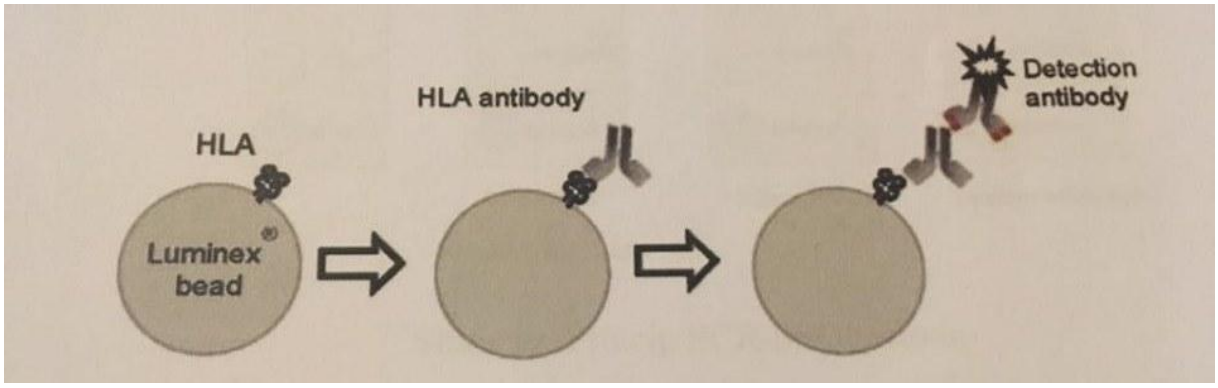


**Slika 18.2.** Pozitivan test križne reakcije

(izvor: 14)

### 3.2.2. Luminex metoda

Luminex metoda čvrste faze je najosjetljivija metoda određivanja protutijela HLA. Temelji se na korištenju 5.6 mikron polistirenskih mikrosfera (kuglice) koje su na površini obložene antigenima HLA, a unutrašnjost im je ispunjena jedinstvenom kombinacijom crvene i infracrvene boje. U slučaju da serum sadrži protutijela koja su usmjerena protiv određenog antigena HLA, ona će se vezati na odgovarajuću kuglicu. Kompleks je detektiran fikoeritrin-konjugiranim sekundarnim protutijelima koja su specifična za ljudske IgG. Koncentracija protutijela mjeri se u Luminex analizatoru na način da se izmjeri fluorescencijska emisija svake mikrokuglice prolaskom kroz dvije laserske zrake. Detekcija protutijela HLA postiže se korištenjem sekundarnih protutijela. (22)



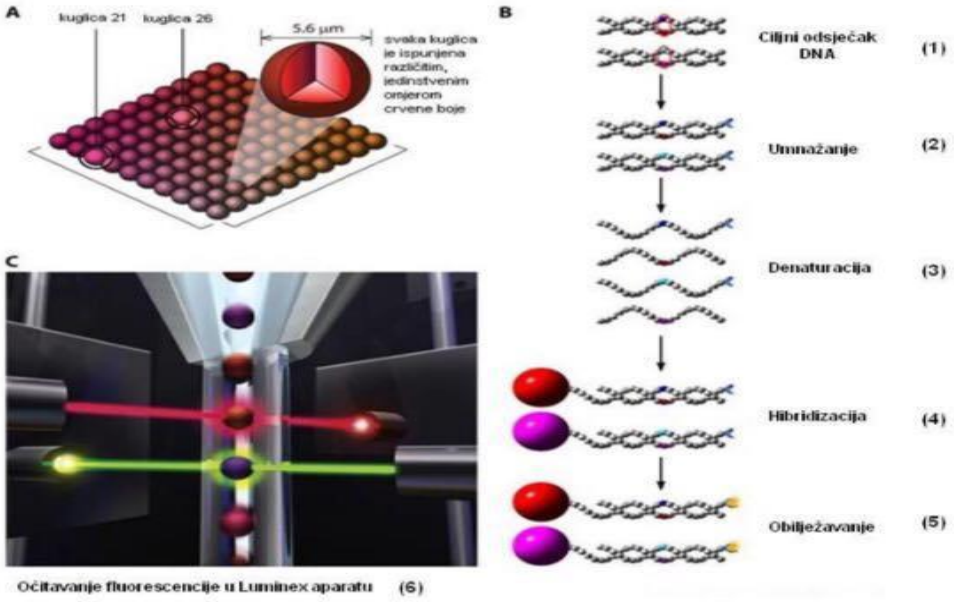

**Slika 19.** Princip Luminex metode za detekciju protutijela HLA

(izvor: ref 23)

### 3.2.3. PCR-SSO (engl. Polymerase chain reaction- Sequence Specific Oligonucleotids)

Ova metoda temelji se na principu specifičnog vezanja amplificiranog DNA produkta iz uzorka za mikrosfere. Mikrosfere su sintetski dobivene čestice na čijoj se površini nalaze specifične oligonukleotidne probe, to jest specifični sljedovi DNA uz pomoć kojih je moguće ispitivati prisutnost ili odsutnost određenog HLA lokusa u uzorku, a obojane su kombinacijom crvene i infracrvene boje. Uređaj koji se koristi za očitavanje rezultata nastalih kompleksa je Luminex (Luminex LX200 Analyser) i on koristi princip protočne citometrije kako bi doveo jednu po jednu mikrosferu do lasera. Luminex obasjava svaku mikrosferu s dva lasera,

zahvaljujući različitoj kombinaciji boja prisutnoj na svakoj mikrosferi. Jedan laser klasificira mikrosferu i određuje probu koja se vezala, dok drugi kvantificira relativnu količinu vezane probe na svakoj pojedinoj mikrosferi na temelju čega se očitava rezultat.

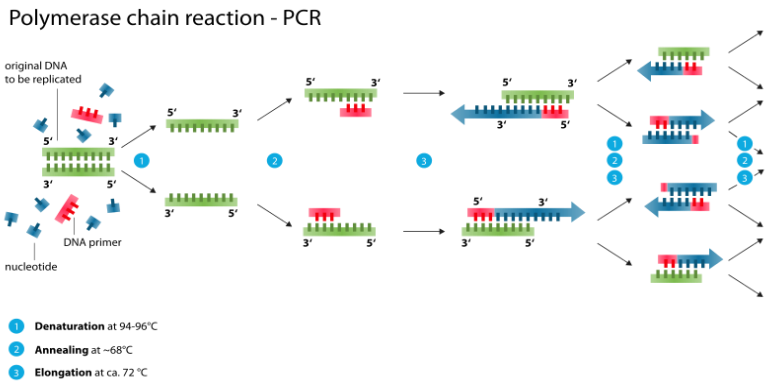



**Slika 20.** Shematski prikaz principa rada Luminex aparata

(izvor: ref 24)

### 3.2.2.1. Izvođenje testa

Izolirana genomska DNA pacijenta je uzorak potreban za izvođenje testa, te ju je potrebno umnožiti, odnosno amplificirati u svrhu čega se koristi PCR (engl. Polymerase chain reaction). PCR reakcija se odvija u aparatu za automatsko umnažanje (engl. Thermocycler) Potrebno je napraviti reakcijsku mješavinu za HLA lokus koji se tim testom želi ispitati. Reakcijska mješavina sadrži Taq polimerazu, reakcijski pufer, to jest Master MIX u kojem se nalaze oligonukleotidne početnice (engl. Primer), te destiliranu vodu. Reakcijskoj smjesi se doda DNA ispitanika i stavlja se u „Thermocycler“, gdje se amplificira. Tijekom PCR reakcije Taq polimeraza prepoznaje komplementarne dijelove DNA, na koje se zatim vežu oligonukleotidne početnice. Sama reakcija se sastoji od 30-35 ciklusa umnažanja, a u svakom ciklusu dolazi do 3 izmjene temperature. Kao rezultat dobijemo 68 bilijuna kopija DNA.




**Slika 21**. Shematski prikaz PCR reakcije

Po završetku PCR reakcije slijedi proces hibridizacije. Tijekom hibridizacije, koja traje 20 minuta, dolazi do vezanja PCR produkta na specifične oligonukleotidne probe na mikrosferama. Za vizualizaciju nastalog kompleksa dodaje se fluorescentna boja za obilježavanje. Jedan dio boje veže se za biotin prisutan na početnicama, dok se drugi dio veže za nastali kompleks ukoliko je došlo do nastanka istog. Nakon hibridizacije, coster pločica na kojoj se izvodi test, stavlja se u Luminex aparat gdje se vrši očitavanje. Nakon što je završena analiza, rezultati hibridizacije služe da se uz pomoć programa koji se naziva Match IT DNA, odredi haplotip HLA ispitanika. Match IT DNA sadrži bazu poznatih, već određenih haplotipova koje uspoređuje s rezultatom dobivenim PCR-SSO metodom.



**Slika 22.** Rezultati dobiveni PCR-SSO metodom u Match IT DNA

# 4. REZULTATI

Transplantacija ili presađivanje organa danas je u svijetu kao i kod nas prihvaćena metoda liječenja u slučaju zakazivanja funkcije različitih vitalnih organa. U svijetu se godišnje presađuje na desetine tisuća različitih organa (bubreg, jetra, srce, te multiorganske transplantacije bubrega i gušterače, bubrega i jetre). Da bismo mogli uspješno izvršiti transplantaciju organa (u našem radu govorimo o transplantaciji bubrega) potrebno je ispuniti određene imunogenetske testove. Svrha imunogenetskih testova je spriječiti te smanjiti ili odgoditi reakciju odbacivaja transplantiranog organa. Kod same transplantacije bubrega potrebno je odrediti alele sustava HLA primatelja kao i tipizaciju alela HLA davatelja kadaveričnog organa. Prije same transplantacije obavezno se mora napraviti test križne reakcije primatelj-darivatelj (cross-match). Budući da za sada transplantacijski program u KBC Split još nije zaživio, eksperimentalni dio rada u Laboratoriju za tipizaciju tkiva napravila sam na primjeru dviju trudnica od kojih je jedna bila senzibilizirana.

Kod senzibilizirane pacijentice napravila sam screening seruma metodom CDC na panelu od 30 dobrovoljnih darivatelja limfocita (panel) i odredila pozitivost testa. Pozitivne reakcije koje sam dobila analizom navedenog screeninga ukazale su na specifičnost senzibilizacije na tkivni antigen HLA-B7. Nakon utvrđene senzibilizacije, pozvan je suprug trudnice. Tipizirala sam i supruga i pacijenticu, te napravila cross-match između trudnice (serum) i supruga (limfociti izdvojeni iz periferne krvi). Analizom pozitivnog cross-match testa, prethodnog screeninga seruma trudnice i tipizacija supružnika, utvrđena je pozitivnost cross-matcha i specifična senzibilizacija na antigen HLA-B7. Kad bismo ovaj rezultat „preveli“ u transplantacijski program za bubreg, ovakav nalaz pozitivnog cross-matcha bio bi kontraindikacija za transplantaciju bubrega.

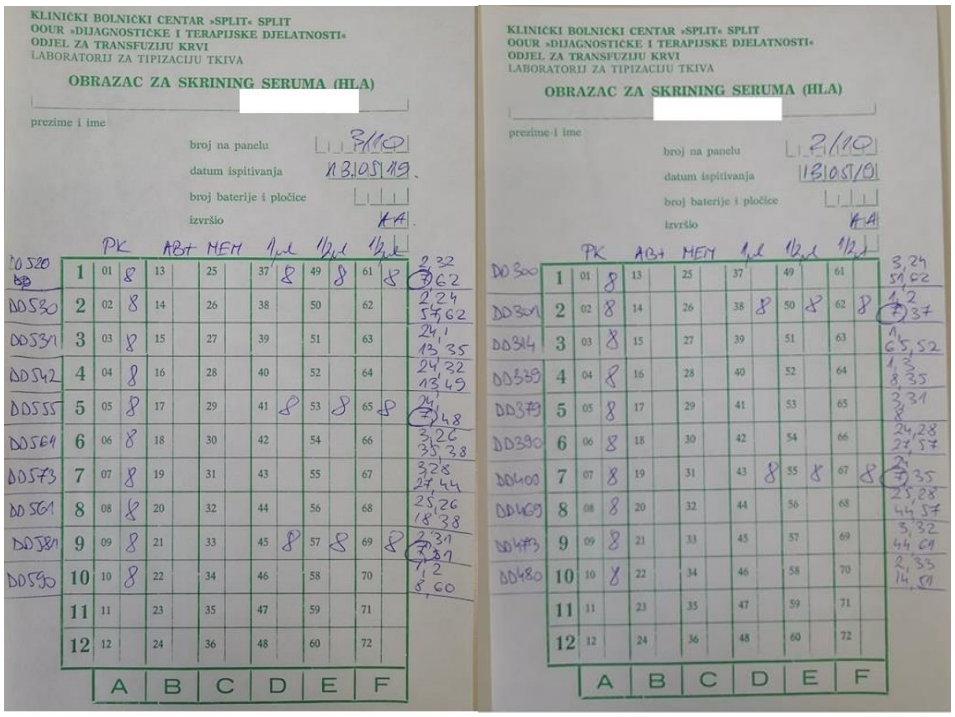
Tipizacije antigena HLA ispitanika:

MM (senzibilizirana trudnica)

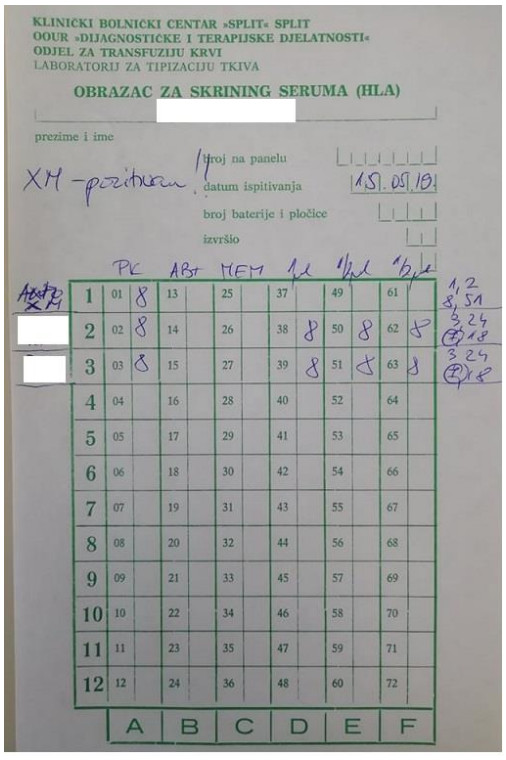
HLA-A1, -A2, HLA-B8, -B51(5)

MP (suprug)

HLA-A3, -A24(9) , HLA-B7, -B18




**Slika 23.** a), b) screening seruma na panelu limfocita 30 dobrovoljnih darivatelja krvi




**Slika 23.** c) pozitivan cross- match ispitanika

# 5. RASPRAVA

Najčešće post-transplantacijske komplikacije su odbacivanje organa, infekcija, poremećaj bubrežne funkcije, ateroskleroza i tumori. Odbacivanje organa može biti hiperakutno i kronično. Da ne bi dolazilo do gore navedenih komplikacija, transplantiranim bolesnicima se daje imunosupresija, a uspješnost same transplantacije ovisi i o dobrom pred-transplantacijskom postupku koji obuhvaća određivanje gena HLA, utvrđivanje prisutnosti i specifičnosti protutijela HLA prije, ali i poslije transplantacije. Posebnu pažnju moramo obratiti na test križne probe (cross-match) između primatelja i darivatelja organa, test križne probe se izvodi serološkom metodom – test mikrolimfocitotoksičnosti (citotoksičnost ovisna o komplementu). Za izvođenje testa cross-matcha koristi se serum pacijenta na listi čekanja za tranplantaciju bubrega ili drugih solidnih organa, te limfociti darivatelja iz limfnog čvora ili slezene. Pozitivan CM je način kojim se dokazuje postojanje protutijela HLA protiv nekog od antigena HLA davatelja, te je apsolutna kontraindikacija za transplantaciju bubrega i pokazuje da organ nije imunološki podoban za odabranog primatelja. S druge strane, negativan rezultat CM-a pokazuje da ne postoji imunološka prepreka transplantaciji organa, jer bolesnik nema razvijena protutijela HLA ili ima protutijela HLA koja nisu uperena protiv antigena HLA davatelja. Osnovno pravilo imunogoenetike, uz važnost CM, je podudarnost tkivnih antigena između primatelja i darivatelja - što je podudarnost u antigenima lokusa sustava HLA veća, očekivana duljina nošenja transplantata je veća.

Kao što je naglašeno u rezultatima, budući da u KBC Split u ovom trenutku još nije krenuo transplantacijski program, u mom radu sam htjela prikazati princip izvođenja screeninga seruma i testa križne probe na primjeru određivanja pozitivnosti senzibilizacije u trudnica. Poznato je da pacijenti na listi čekanja mogu biti senzibilizirani zbog neadekvatnih transfuzija krvi, prethodnih trudnoća (ako se radi o ženskom primatelju bubrega), te u slučaju retransplantacije primatelja (senzibiliziracija na nepodudarne HLA tkivne antigene prethodnog davatelja).

# 6. ZAKLJUČAK

1. Dosadašnja saznanja o glavnom sustavu tkivne snošljivosti kod čovjeka nam kazuju o njegovoj izuzetnoj važnosti u transplantacijskoj medicini, populacijskoj genetici i povezanosti sa bolestima.

2. Kod pacijentice kod koje je utvrđena senzibilizacija, analizom seruma je otkrivena specifičnost za antigen HLA-B7.

3. Analizom pozitivnog cross-match testa, prethodnog screeninga seruma trudnice i tipizacija supružnika, utvrđena je pozitivnost cross-matcha i specifična senzibilizacija na antigen HLA-B7.

4. Pozitivan cross-match je kontraindikacija za transplantaciju, dok je negativan cross-match uz ostale imunogenetičke i kliničke parametre indikacija za transplantaciju.

# 7. POPIS LITERATURE


1. Kerhin-Brkljačić V, Grubić Z. Glavni sustav tkivne snošljivosti u ljudi; U:Grgičević D. i sur. Transfuzijska medicina u kliničkoj praksi, Zagreb, Medicinska naklada, 2006, str.254-258.

2. Ančić M, Maravić B, Radman M, Kovačić V. Metode otkrivanja antitijela na HLA antigene kod bolesnika koji čekaju bubrežnu transplantaciju te kombiniranu transplantaciju gušterača-bubreg. Acta Med Croatica 2014; 68: 421-423.

3. Labar B. i sur. (2007.), Hematologija, Zagreb,Školska knjiga, str 54.

4. Thorsby E. A short history of HLA. Tissue antigens 2009; 74(2):101-16.

5. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D., Lukinović-Škudar V, Marušić M., Taradi M.,Višnjić D. (2010): Imunologija. Medicinska naklada, Zagreb.

6. Williams TM. Human leukocyte antigen gene polymorphysm and the histocompatibility laboratory. J.MolDiagn 2001 Aug; 3(3): 98-104.

7. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, et.al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. TissueAntigens 2010;75: 291-455

8. Goldsby R. A, Kindt T. J, Osborne B. A, Kuby J. (2003): Immunology. Freeman, New York

9. Crnić Martinović M. Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti u čovjeka (predavanje), 2005, Rijeka

10. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ, Immunobiology, 5th ed. The Immune System in Health and Disease. New York: Garland Science, 2001

11. Marsh SGE, Parham P, Barber LD. The HLA: Facts Book. Elsevier Science, 2000

12. Sertić J, i sur. Klinička kemija i molekularna dijagnostika. Zagreb: Medicinska naklada; 2008. str.292-300.

13. Orlić P. Povijest transplantacije bubrega u svijetu i u Hrvatskoj. Med Vijes 2005; 37(1- 4): 37-41.

14. Žunec R, Grubić Z, Balen S. Važnost imunogenetike u transplantaciji organa, Medix 2011; (92/93): 208-213.

15. https://www.eurotransplant.org/cms/index.php?page=about_brief

16. http://www.hdm.hr/podaci-eurotransplant/

17. Živčić-Ćosić S, Trobonjača Z, Sladoje-Martinović B, Orlić L. Komplikacije nakon presađivanja bubrega. Medicina fluminensis 2010; 46(4):434-447

18. https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/29148/Vrste-transplantacije-bubrega.html

19. Nacionalne smjernice za obradu i procjenu primatelja i darivatelja bubrega.

20. Jukić Bašić N, Kaštelan Ž. i sur. (2016): Transplantacija bubrega. Medicinska naklada, Zagreb.

21. http://www.svjetskidanbubrega.org/u-hut.htm

22. Katalinić N, Franić A, Duhović M, Šimac Sušanj I, Milojević, T, Šever Šušnjar S, Starčević A, Balen S: Značaj Luminex tehnologije u praćenju protutijela HLA prije transplantacije organa, 2018. str. 58.

23. Keith DS, Vranic GM. Approach to the Highly Senzitized Kidney Transplant Candidate. Clin J Am Soc Nephrol. 2016 Apr 7; 11(4): 684-693.

24. http://www.viracrobt.com/Learning-Lab/Luminex

25. Galenić D. Test križne probe u transplantaciji solidnih organa, Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju Kliničke jedinice za tipizaciju tkiva, KBC Zagreb

# 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Unosom stranih antigena HLA, ljudski organizam stvara protutijela HLA, koji je poznati čimbenik rizika odbacivanja presatka. Cilj ovog istraživanja bio je ukazati na važnost transplantacije solidnih organa (bubreg, srce, jetra, gušterača, pluća, rožnica) u liječenju pacijenata na listama čekanja, posebice na važnost izvodenja testa križne probe (cross-matcha) kao glavnog preduvjeta za samu transplantaciju.

**Materijali i metode:** Budući da za sada transplantacijski program u KBC Split još nije zaživio, eksperimentalni dio rada u Laboratoriju za tipizaciju tkiva Centra za transfuzijsku medicinu KBC-a Split napravila sam na primjeru dviju trudnica. Cross–match trudnice s pozitivnim nalazom senzibilizacije napravljen je sa limfocitima iz periferne krvi supruga pacijentice. Antigeni i aleli sustava HLA senzibilizirane trudnice i supruga određeni su serološkom metodom CDC i potvrđeni molekularnom metodom PCR-SSO.

**Rezultati:** Pozitivne reakcije koje smo dobili analizom navedenog screeninga ukazale su na specifičnost senzibilizacije na tkivni antigen HLA-B7, te je utvrđena pozitivnost križne reakcije.

**Zaključak:** Pozitivan CM je način kojim se dokazuje postojanje protutijela HLA protiv nekog od antigena HLA davatelja, te je apsolutna kontraindikacija za transplantaciju bubrega i pokazuje da organ nije imunološki podoban za odabranog primatelja.S druge strane, negativan rezultat CM-a pokazuje da ne postoji imunološka prepreka transplantaciji organa, jer bolesnik nema razvijena protutijela HLA ili ima protutijela HLA koja nisu uperena protiv antigena HLA davatelja.

**Ključne riječi:** HLA, križna reakcija, protutijela, senzibilizacija, transplantacija bubrega

# 9. SUMMARY

**The aim of the study:** By introducing foreign antigens HLA, the human body creates antibodies to HLA, which is a known risk factor for rejection. The aim of this study was to point out the importance of transplantation of solid organs (kidney, heart, liver, pancreas, lung, cornea) in treating patients on waiting lists, especially on the importance of cross-match testing as the main precondition for transplantation.

**Materials and Methods**: Since the transplantation program at KBC Split is not yet available, experimental part of the work at the Laboratory for Typesetting of the Center for Transfusion Medicine of KBC Split I made on for example of two pregnant women. Multiple pregnant women with positive sensitization findings were made for lymphocytes from the patient's peripheral blood. The antigens and allele sensitized pregnant and male HLA systems were determined by the serological CDC method and confirmed by the PCR-SSO molecular method.

**RESULTS:** Positive responses obtained by analysis of said screening indicate the specificity of sensitization to tissue antigen HLA-B7, and cross-reaction positivity was determined.

**Conclusion:** Positive CM is a way of proving the existence of HLA antibodies against one of the HLA antigens, which is an absolute contraindication for kidney transplantation and indicates that the body is not immunologically similar to the selected recipients. immuno-obstructive organ transplantation because there is no developed HLA antibody or anti-HLA antibody against HLA antigen.

**Key words:** HLA, cross reaction, antibody, sensitization, kidney transplantation

# 10. ŽIVOTOPIS

**OSNOVNI PODACI**


Adresa VELEBITSKA 58, Split 21000

Država Hrvatska

Telefon 095 / 525 3040

E-mail anaa.cicak@gmail.com


Mjesto i datum rođenja 21.03.1989. Kupres, BiH

**OBRAZOVANJE**

| | |
|---|---|
| 2004. – 2008. | „Opća gimnazija“ |
| | Našice |
| 2008. – | „Građevinski fakultet“ |
| | Osijek |
| 2016. – danas | „Odjel zdravstvenih studija“ |
| | Split |
| | Medicinsko laboratorijska dijagnostika |

**RADNO ISKUSTVO**

| | |
|---|---|
| 2012.-2014. | Suradnik u Koting d.o.o. |
| 2014. – 2015. | Sezonski poslovi rada u restoranu i prodaja |
| 2016. – danas | Inditex- Oysho |