

Važnost otkrivanja panel reaktivnih antitijela u pacijenata na listi čekanja za bubrež

Čikotić, Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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:176:124717>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

Repository / Repozitorij:

[Repository of the University Department for Health Studies, University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKA LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Marija Čikotić

**VAŽNOST OTKRIVANJA PANEL REAKTIVNIH
ANTITIJELA U PACIJENATA NA LISTI ČEKANJA ZA
BUBREG**

**SIGNIFICANCE OF PANEL REACTIVE ANTIBODIES IN
PATIENTS AWAITING KIDNEY TRANSPLANTATION**

Završni rad/ Bachelor's Thesis

Mentor:

Doc. dr. sc. Esma Čečuk- Jeličić

Split, 2018

SADRŽAJ

1.	Uvod.....	5
1.1.	Sustav HLA.....	6
1.1.1.	Obilježja sustava HLA.....	9
1.1.2.	Antigeni HLA.....	12
1.1.2.1.	Antigeni HLA razreda I.....	13
1.1.2.2.	Antigeni HLA razreda II.....	14
1.1.3.	Protutijela HLA.....	15
1.1.4.	Uloga sustava HLA u imunološkoj reakciji.....	16
1.1.4.1.	Povezanost sustava HLA i bolesti.....	17
1.2.	Transplantacija tkiva i organa.....	18
1.2.1.	Transplantacija bubrega.....	19
1.2.2.	Transplantacija bubrega u RH.....	22
2.	Cilj rada.....	25
3.	Materijali i metode.....	26
3.1.	Materijali.....	26
3.2.	Metode.....	26
3.2.1.	Test mikrolimfocitotoksičnosti.....	28
3.2.2.	Križna reakcija.....	31
3.2.3.	Luminex metoda.....	31
3.2.4.	PCR-SSO (engl. <i>Polymerase chain reaction-Sequence Specific Oligonucleotids</i>).....	32
3.2.4.1.	Izvođenje testa.....	33
4.	Rezultati.....	36
5.	Rasprava.....	37

6.	Zaključak.....	40
7.	Popis literature.....	41
8.	Popis tablica.....	43
9.	Popis ilustracija.....	44
10.	Sažetak.....	45
11.	Summary.....	46
12.	Životopis.....	47

POPIS KRATICA

AM	engl. <i>Acceptable Mismatch</i> ; prihvatljiva nepodudarnost
CM	engl. <i>Cross Match</i> ; test križne reakcije
CDC	engl. <i>Complement Dependent Cytotoxicity</i> ; metoda citotoksičnosti ovisne o komplementu
DNA	engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i> ; deoksiribonukleinska kiselina
DSA	engl. <i>Donor Specific Antibodies</i> ; donor specifična antitijela
ELISA	engl. <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> ; imunoenzimski test visoke osjetljivosti i selektivnosti
HLA	engl. <i>Human Leukocyte Antigen</i> ; humani leukocitni antigeni
MHC	engl. <i>Major Histocompatibility Complex</i> ; glavni sustav tkivne snošljivosti
MIC	engl. <i>MHC class I chain-related genes</i>
MLC	engl. <i>Mixed Lymphocyte Culture</i> ; kultura pomiješanih limfocita
PCR	engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> ; lančana reakcija polimeraze
PRA	engl. <i>Panel Reactive Antibodies</i> ; panel reaktivna protutijela
SAPE	engl. <i>Streptavidin–Phycoerytherin</i> ; R-fikoeritrin konjugirani streptavidin
SZO	engl. <i>World Health Organization, WHO</i> ; svjetska zdravstvena organizacija
TAP	engl. <i>Transporters Associated with Antigen Processing</i>
TNF	engl. <i>Tumor Necrosis Factor</i> ; čimbenik nekroze tumora

1. UVOD

Imunološki sustav organa osigurava specifičan odgovor organizma na strane antigene, ali isto tako i ne reakciju na vlastite antigene. Kontrolu ovog važnog zadatka provodi glavni sustav tkivne snošljivosti (engl. *Major Histocompatibility Complex*, MHC), genski sustav kojeg nalazimo u svih kralježnjaka. Sustav je definiran velikim brojem polimorfnih gena koji se nasljeđuju kodominantno po Mendelovim zakonima. Otkriven na bijelim krvnim stanicama, to jest leukocitima, u čovjeka je sustav MHC nazvan sustavom HLA (engl. *Human Leukocyte Antigen*) (1).

Unosom stranih antigena HLA, bilo to trudnoćom, transfuzijom ili transplantacijom, naš organizam stvara protutijela HLA. Protutijela HLA poznati su čimbenik rizika kako odbacivanja presatka tako i bolesti presatka protiv primatelja - GVHD (engl. *graft-versus-host disease*). Prisutnost tih protutijela u serumima pacijenata izražava se kao postotak panel reaktivnih protutijela (engl. *Panel Reactive Antibodies*, PRA) (2).

Prije same transplantacije organa izvodi se križna proba (engl. *cross-match*, CM) da bi otkrili postojanje protutijela HLA primatelja uperenih protiv antigena HLA darivatelja, takozvana donor 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 dotične populacije stanovništva. Test se izvodi četiri puta godišnje u svih bolesnika na listi čekanja za presađivanje bubrega. Što je veća PRA vrijednost, veća je vjerojatnost pozitivne križne probe i niža je vjerojatnost primanja presatka. Negativna CDC križna proba ukazuje na nepostojanje protutijela HLA u primatelja, no ponekad unatoč tome kod pacijenta može doći do odbacivanja presatka posredovano protutijelima HLA. Takav ishod ističe nedovoljnu osjetljivost CDC križne probe što je utjecalo na razvoj novih metoda koje mogu otkriti i protutijela nevidljiva metodom CDC, primjerice antiglobulin-CDC, ELISA (engl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*),

protočna citometrija i metoda Luminex xMAP tehnologija (engl. *Microsphere Assay Platform*, metoda mikrosfera obloženih specifičnim antigenima HLA). ELISA metodom utvrđuje se je li određeni protein prisutan u uzorku te ako je, u kojem postotku, dok se protočnom citometrijom mjere fizikalna svojstva stanice te se primjenjuje za mjerenje koncentracije različitih autoantitijela. Probir antitijela metodom Luminex trenutačno je najosjetljivija metoda određivanja HLA protutijela.

Podudarnost u genima HLA između primatelja i darivatelja organa, te prisutnost citotoksičnih protutijela HLA u serumu primatelja organa, glavni su čimbenici kod transplantacije organa s obzirom da imaju ključnu ulogu u toleranciji presatka. Dokaz o prisustvu DSA potvrđuje se pozitivnim testom križne probe, a to je ujedno i znak nemogućnosti transplantacije organa kao što su bubreg i srce.

Zbog svojih brojnih uloga, među kojima se ističe kontrola sinteze tkivnih antigena, regulacija i imunološko prepoznavanje stranih antigena, nadziranje, međudjelovanje i suradnja s drugim limfoidnim stanicama tijekom imunološke reakcije te sudjelovanje u proizvodnji specifičnih protutijela, HLA i imunogenetika postaju nezaobilazni dio u transplantacijskoj medicini (3-5).

1.1. Sustav HLA

Prvi otkriveni geni MHC bili su na miševima još 1930-ih godina. Ljudski ekvivalent mišjem H2 sustavu otkrio je francuski imunolog Jean Dausset 1954. godine kod politransfundiranih bolesnika i višerotkinja, za što je podijelio Nobelovu nagradu s Barujem Benacerrafom i Georgeom Snellom. Geni glavnog sustava tkivne snošljivosti kod čovjeka nalaze se na kraćem kraku kromosoma 6 u regiji 6p21.3 te čine 1/1000 ljudskog genoma, što iznosi približno 4 milijuna parova baza DNA (slika 1).

Godine 1963. nizozemski imunolog Jon van Rood otkrio je dvije skupine antigena za koje je utvrdio da pripadaju istom genskom sustavu, kasnije nazvan „Sustav 4“ (engl. *System Four*). Već iduće godine, Payne i suradnici otkrivaju sličan sustav leukocitnih antigena (engl. *Leukocyte Antigens*, LA), a kasnije je utvrđeno da je riječ o dva različita lokusa koja pripadaju istom genskom sustavu nazvanom HLA. Prvootkriveni lokusi dobili su nova imena: lokus HLA-A i lokus HLA-B, a antigeni pojedinog lokusa označavani su brojevima (npr. HLA-A1 ili HLA-B5). MLC testom (engl. *Mixed Lymphocyte Culture*, kultura pomiješanih limfocita), provedenim među osobama koje su identične za antigene lokusa HLA-A i HLA-B, u nekim je slučajevima bio uočen pojačan rast limfocita T. Ovakva spoznaja dovodi do otkrića novih antigena HLA, koji su nazvani HLA-D. Zbog povezanosti protutijela otkrivenih u serumu višerotkinja 1973. godine i antigena MLC te velike podudarnosti u stupnju proliferacije limfocita T, novootkriveni antigeni nose ime HLA-DR (D-related) (3, 11).

Zahvaljujući svim ovim spoznajama danas sustav HLA dijelimo u 3 genske regije:

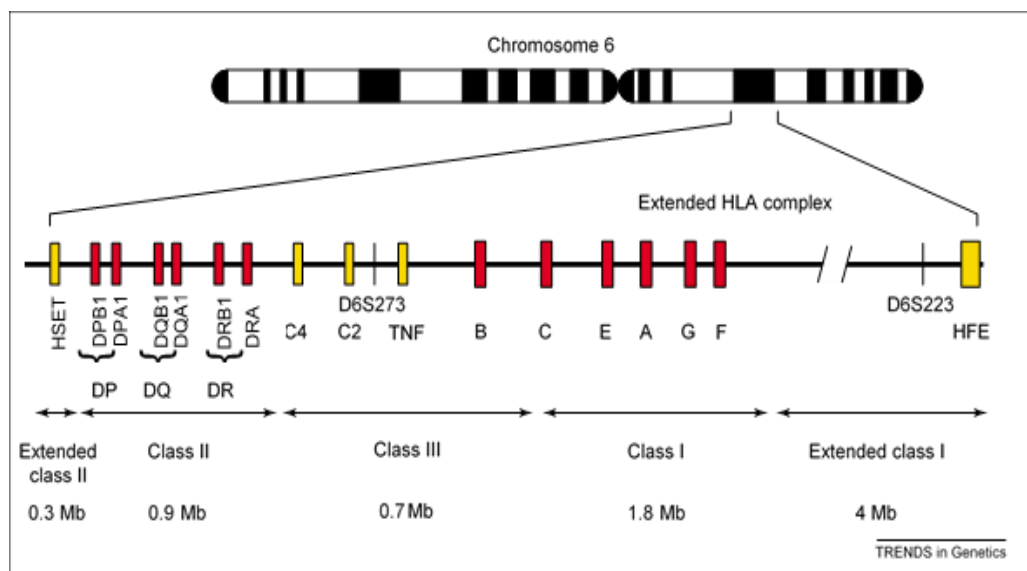
- geni HLA razreda I
- geni HLA razreda II
- geni HLA razreda III

Geni HLA razreda I nalaze se telomerično i čine dvije genske skupine: klasičnu i neklasičnu. Geni HLA-A, HLA-B i HLA-C pripadaju klasičnoj skupini, a njihovi produkti, to jest antigeni, izraženi su na gotovo svim stanicama u organizmu. Ovi geni odgovorni su za sintezu transplantacijskih antigena, izraženih na površini gotovo svih somatskih stanica. U skupinu neklasičnih gena spadaju geni HLA-E, HLA-F i HLA-G koji su slabijeg polimorfizma od klasičnih gena. Nadalje, regiji HLA razreda I pripada i 5 poznatih MIC gena (engl. *MHC class I chain-related genes*): MICA i MICB su funkcionalni geni, dok su MICC, MICD i MICE pseudogeni.

Geni HLA razreda II nalaze se centromerično te su podijeljeni u 6 genskih podregija: HLA-DM, -DN, -DO, -DP, -DQ i -DR. Najviše istraživane podregije

-DP, -DQ i -DR kodiraju molekule HLA razreda II koje se izražavaju na membrani stanica, za razliku od podregija -DM, -DN i -DO koje su posredno uključene u sam proces formiranja antigen-predočnih molekula HLA razreda II. Podregija HLA-DP sastoji se od 2 funkcionalna gena -DPA1 i -DPB1, te od 2 pseudogena -DPA2 i -DPB2. Također, podregija HLA-DQ sadrži 2 funkcionalna gena, -DQA1 i -DQB1, ali i pseudogene: -DQA2, -DQB2 i -DQB3. Najsloženija podregija HLA-DR sastoji se od aktivnog gena -DRA1 te većeg broja -DRB gena. Regiji HLA razreda II pripadaju i proteinske pumpe TAP1 i TAP2 (engl. *Transporters Associated with Antigen Processing*), važne u konačnom ustroju molekula HLA razreda I.

Između regije HLA razreda I i regije HLA razreda II smještena je regija HLA razreda III koju čini otprilike 75 gena. U toj, takozvanoj centralnoj regiji ne nalaze se geni HLA, već geni ključni u imunološkoj reakciji, među kojima su gen za enzim 21- hidroksilazu (21-OH), geni za nekrozu tumora (TNF- α i TNF- β) te geni za proteine šoka (engl. *Heat Shock Proteins*, HSP) (6).



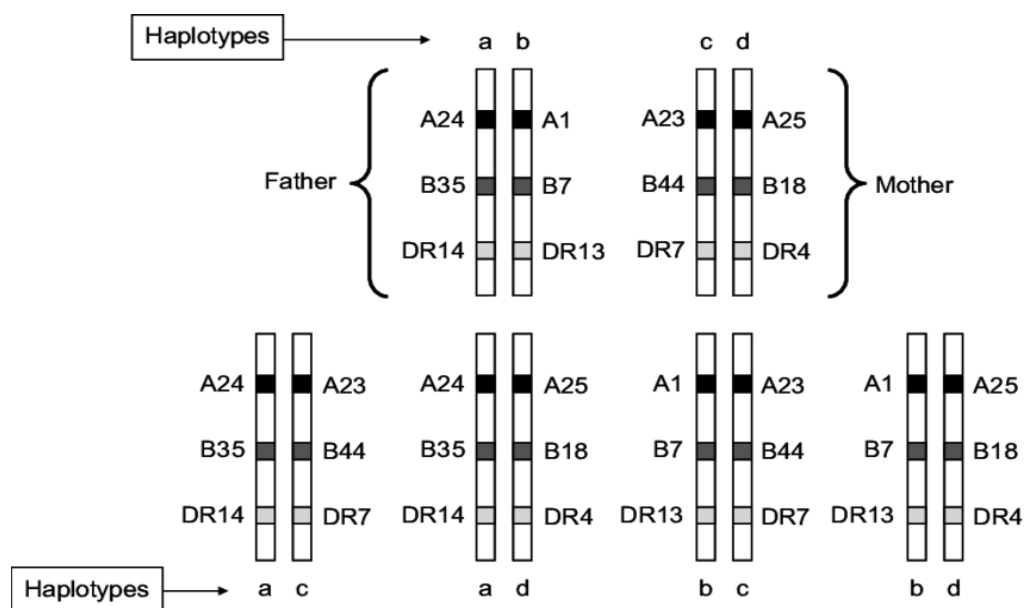
Slika 1. Smještaj lokusa HLA na kraćem kraku kromosoma 6

(izvor: [https://www.cell.com/trends/genetics/abstract/S0168-9525\(00\)02180-6?code=cell-site](https://www.cell.com/trends/genetics/abstract/S0168-9525(00)02180-6?code=cell-site))

1.1.1. Obilježja sustava HLA

Sustav HLA ima veliki broj uloga u organizmu pa ne čudi ljudsko zanimanje za njega, a svakodnevni napredak u istraživanju omogućio je značajne primjene u medicini, forenzici, antropologiji i drugim znanostima.

Kombinacija alela na pojedinim lokusima HLA na pojedinačnom kromosomu naziva se haplotip HLA. Spajanjem roditeljskih gameta dijete nasljeđuje po jedan haplotip od majke i jedan od oca, te se oba izražavaju kodominantno na staničnoj membrani. Dva haplotipa, po jedan od svakog roditelja, čine genotip HLA. Dva potomka imaju 25% vjerojatnosti biti genotipski HLA identična, 25% da ne dijele niti jedan haplotip, a 50% vjerojatnosti da će biti haploidentični, to jest da dijele jedan haplotip (slika 2) (6, 8).



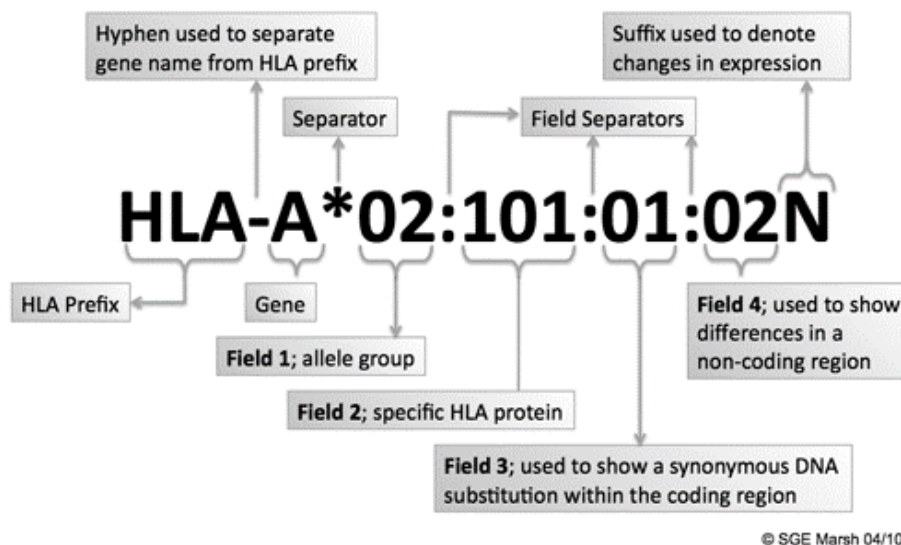
Slika 2. Nasljeđivanje haplotipova HLA (izvor: researchgate.net)

Nepravilnosti kod nasljeđivanja haplotipova HLA moguće su zbog izmjene dijelova kromatida tijekom gametogeneze u profazi prve mejotske diobe, odnosno zbog rekombinacija (engl. *crossing over*). Općenito, rekombinacija među HLA genima je vrlo mala te nema značajni doprinos u genetičkoj varijabilnosti HLA sustava.

Nadalje, pojedini haplotipovi HLA pronađeni su češće u određenim populacijama, nego što bi to bilo za očekivati. Takva aktivnost naziva se neravnotežom udruživanja (engl. *linkage disequilibrium*). Na primjer, HLA-A1, -B8, -DR17 najučestaliji su HLA haplotipovi kod bijele rase. Iako postoji par objašnjenja za ovakvo djelovanje, kao što su primjerice selekcijske sile, još uvijek nemamo potpuni odgovor na ovaj fenomen.

Uz navedeno, sustav HLA karakteriziraju još 2 važna obilježja koja onemogućuju patogenima izbjegavanje imunološkog odgovora. Prva značajka je polimorfizam što bi podrazumijevalo nekoliko varijanti svakog gena unutar populacije. Upravo je HLA sustav najpolimorfniji poznati genski sustav. Danas se smatra da je sam polimorfizam rezultat mutacija, rekombinacije pa čak postoje i pretpostavke da se ovaj sustav razvijao brže od ostalih. Drugo važno obilježje je poligenija, odnosno prisutnost nekoliko različitih srodnih gena sa sličnim funkcijama.

Zahvaljujući ovim obilježjima, točnije specifičnosti antigena HLA za svakog pojedinca, HLA metode postale su pojam pouzdanosti kod utvrđivanja očinstva, povezivanja s pojedinim bolestima te identifikacije osoba (9).



Slika 3. Nomenklatura HLA sustava

(izvor: <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>)

Zbog velike polimorfности HLA sustava, javila se potreba za sistematiziranom nomenklaturom koju provodi odbor SZO-a (*WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System*). Antigeni HLA dokazuju se serološkim metodama te se imenuju prvo oznakom lokusa (primjer HLA-A) nakon čega slijedi brojčana oznaka antigena (primjer HLA-A1). Kada govorimo o genima HLA koji se dokazuju molekularnim testiranjem, iza samog HLA prefiksa dolazi oznaka određenog lokusa (primjer HLA-A). Potom slijedi četveroznamenasti broj od kojeg prve dvije znamenke označavaju grupu alela (primjer HLA-A*02), a druge dvije redni broj alela kojim je redoslijedom otkriven (primjer HLA-A*02:01). Aleli koji se razlikuju jedino po sinonimima u kodirajućoj sekvenci imaju i treći set brojki, dok se četvrti set koristi za alele koji se razlikuju u polimorfizmima introna alela.

Uz svoj jedinstveni broj, alel može imati i sufiks N, L, S, C ili Q kao oznaku svoje ekspresije. Tako aleli bez ekspresije, odnosno *null* aleli, imaju oznaku N. Isto tako, aleli s niskom ekspresijom imaju oznaku L (*low*), S oznaka upućuje na prisutnost topljivog (*soluble*) produkta, C na ekspresiju unutar citoplazme te Q kao „*questionable*“ za upitne, nepotvrđene ekspresije (7).

Do ožujka 2018. godine otkriveno je 18 181 HLA alela (tablica 1), no novi aleli se i dalje otkrivaju te njihov broj raste iz dana u dan.

Tablica 1. Broj otkrivenih alela do ožujka 2018. godine

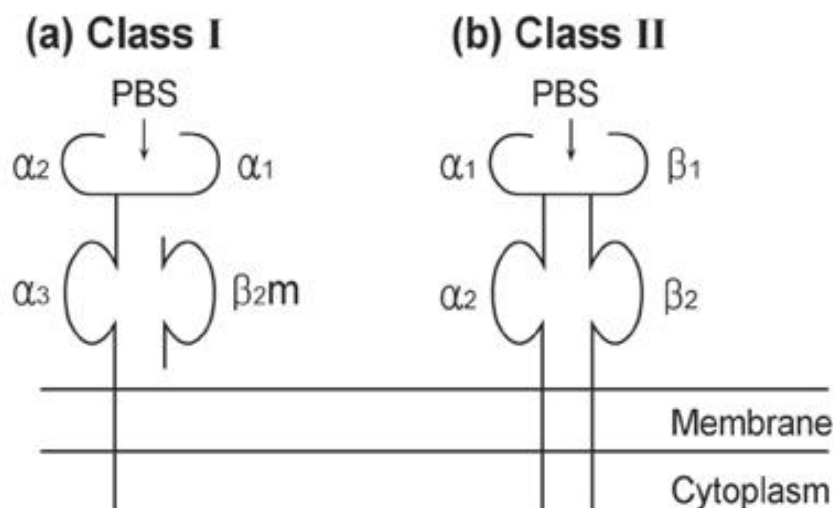
HLA razred I		HLA razred II			
Lokus	Broj alela	Lokus	Broj alela	Lokus	Broj alela
A	4200	DRA	7	DQA1	94
B	5091	DRB1	2165	DQB1	1196
C	3854	DRB2	1	DPA1	65
E	27	DRB3	157	DPA2	5
F	30	DRB4	74	DPB1	975
G	60	DRB5	55	DPB2	6
		DRB6	3	DMA	7
		DRB7	2	DMB	13
		DRB8	1	DOA	12
		DRB9	6	DOB	13
Ukupno: 13 324		Ukupno: 4857			
razred I + razred II = 18 181					

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

1.1.2. Antigeni HLA

Jedna od glavnih odgovornosti sustava HLA je sinteza specifičnih antigena (molekula) koji su po kemijskom sastavu transmembranski glikoproteini. Molekula se sastoji od dva dijela. Prvi dio određuje „privatnu“ specifičnost, a to je u načelu epitop specifičan samo za jedan antigen/molekulu HLA na koji se vežu

protutijela HLA, dok drugi dio određuje „opću“ specifičnost. Antigene HLA podijelili smo u dvije skupine koje su različite po strukturi, slijedu aminokiselina, ali i tipu antigena kojeg predočavaju, tipovima stanica kojima predočavaju antigene te po tkivnoj zastupljenosti (slika 4) (6).



Slika 4. Shematski prikaz molekula HLA razreda I (a) i razreda II (b)
(izvor: ref. 8)

1.1.2.1. Antigeni HLA razreda I

Molekula razreda I građena je od glikoproteinskog teškog α lanca kodiranog genima HLA razreda I te od nekovalentno vezanog izvanstaničnog β_2 -mikroglobulina (β_2m). Humani β_2 -mikroglobulin nije varijabilan, jednak je u svim antigenima HLA razreda I kod ljudi, a kodiran je genom na kromosomu 15. β lanac nema izravnu vezu sa stanicom, nalazi se slobodan u serumu te učvršćuje molekulu.

Teški lanac ima 3 izvanstanične domene (α_1 , α_2 i α_3), transmembransku i citoplazmatsku regiju. Izvanstanični dio sastoji se od regije vezanja peptida i regije slične imunoglobulinima. Svaka od α domena građena je od približno 90 aminokiselina. α_1 i α_2 domene čine pukotinu, najvažniji dio molekule sastavljen od 180 aminokiselina. Domena α_3 vezno je mjesto za koreceptorsku molekulu

CD8, citotoksičnog limfocita T, a zajedno s $\beta 2m$ tvori dio sličan imunoglobulinima (8).

Transmembranski dio sastoji se od približno 25 aminokiselina koje se nastavljaju na $\alpha 3$ domenu, pokazuje mali polimorfizam te je hidrofoban. Nasuprot tome, citoplazmatska domena je hidrofilna, sastavljena od 30 aminokiselina te predstavlja karboksilni kraj teškog lanca.

Osim endotela rožnice, egzokrinog dijela gušterače i neurona središnjeg živčanog sustava, molekule HLA razreda I nalaze se u svim drugim stanicama s jezgrom. Njima se ostvaruje unutarnji put predočavanja unutarstaničnih antigena koji se razgrađuju na peptide. Prijenosnim proteinima TAP1 i TAP2 dolazi do transporta peptida kroz endoplazmatski retikulum u kojem se sintetizira molekula HLA. Dalje se peptidi vežu na molekulu HLA te se, prolazeći kroz Golgijev aparat, pomoću vezikula egzocitozom predočavaju na površini stanice CD8+ citotoksičnim limfocitima T (10-12).

1.1.2.2. Antigeni HLA razreda II

Produkti gena HLA razreda II DP, DQ i DR su heterodimeri, dva nekovalentno vezana glikoproteinska polipeptidna lanca: α i β . α -lanac kodiraju A geni HLA razreda II, a β -lanac kodiraju B geni koji više pridonose polimorfizmu molekula HLA razreda II. Oba lanca prolaze kroz staničnu membranu te su slično građena.

Molekule HLA razreda II imaju dvije izvanstanične domene (α_1 i α_2 ili β_1 i β_2), transmembransku i citoplazmatsku regiju, a dvije trećine oba lanca nalaze se izvan stanice. Svaka izvanstanična domena sastoji se od oko 90 aminokiselina. Osim razlike u broju domena s molekulama razreda I, postoji i strukturna razlika u građi vezne pukotine koju čine dijelovi lanca $\alpha 1$ i $\beta 1$, s time da su krajevi pukotine otvoreni tako da se peptidi mogu nalaziti dijelom i izvan pukotine. $\alpha 2$ i $\beta 2$ su

nepromjenjive domene koje čine regiju nalik imunoglobulinu. Uz to je $\beta 2$ domena mjesto vezanja pomoćničkih limfocita T.

Molekulama HLA razreda II ostvaruje se egzogeni put predočavanja izvanstaničnih antigena koji započinje fagocitozom. Nalaze se na antigen-predodnim stanicama kao što su makrofagi, dendritičke stanice, limfociti B, neke endotelne i epitelne stanice, no njihova ekspresija može biti potaknuta i djelovanje agenasa poput γ -interferona što omogućava i prisutnost na fibroblastima te epitelnim stanicama timusa. Ulaskom stranog antigena dolazi do spajanja njega i lizosoma, a time i do razgradnje antigena na male peptide. U endoplazmatskom retikulumu počinje sinteza molekule HLA koja veže antigeni peptid te predočava antigene na površini stanice CD4⁺ pomoćničkim limfocitima T. Zatim kreće imunološki odgovor i sekrecija citokina (10, 11).

1.1.3. Protutijela HLA

Imunološki odgovor, bio on humoralni ili stanični, potiče unos bilo kojeg imunogena u organizam. Protutijela HLA nastaju kao rezultat humoralnog imunološkog odgovora na aloantigenu senzibilizaciju. Riječ je o stečenim protutijelima razreda IgG i IgM s mogućnošću specifičnog vezanja na antigen koji je i izazvao njihovo stvaranje.

Stvaranje protutijela HLA moguće je kroz trudnoću, transfuzijom krvi ili transplantacijom. Glavna uloga u senzibilizaciji na antigene HLA sustava pripada pomoćničkim limfocitima T. Posredstvom interleukina limfociti Th potiču diferencijaciju i proliferaciju limfocita B u plazma stanice osposobljene stvaranju protutijela HLA.

Trudnoća je prirodan način senzibilizacije majke na nepodudarne antigene HLA koje je dijete naslijedilo od oca. Kao rezultat nastaju anti T i B limfocitotoksična

protutijela ili, ako govorimo o antigenima razreda II, samo anti-B limfocitotoksična protutijela.

Sljedeći način aloimunizacije na antigene HLA je transfuzijom krvi. U slučaju kada osoba unatoč ispravne ABO krvne grupe primi nepodudarnu HLA transfuziju, pojavit će se posttransfuzijska reakcija očitovana drhtavicom i povišenom tjelesnom temperaturom. Kažemo da se osoba senzibilizirala na antigene iz darivateljeve krvi.

Transplantacija je još jedan mogući način senzibilizacije na antigene HLA u kojemu se stvaraju citotoksična protutijela HLA kao rezultat nepodudarnosti primatelja i darivatelja. Isto tako, važno je istaknuti da je stvaranje protutijela HLA moguće namjerno izazvati metodom unošenja leukocita u organizam što se primjenjuje u terapijske svrhe (8, 10, 16).

1.1.4. Uloga HLA u imunološkoj reakciji

Kao što je već spomenuto, primarna biološka uloga sustava HLA je regulacija imunološkog odgovora, odnosno razlikovanje vlastitih od stranih antigena. Brojni antigenski receptori smješteni na površini limfocita omogućili su mu tu funkciju. Limfociti su organizirani poput klonova koji nose na površini po jednu vrstu receptora za antigen. Pri prvom susretu s određenim antigenom, reagirat će manji broj limfocitnih klonova specifičnih za taj antigen, dok će kod drugog susreta s istim antigenom doći do bržeg sekundarnog imunološkog odgovora na isti antigen.

Imunološki sustav uključuje limfocite T, sazrele u timusu, te limfocite B u koštanoj srži. Osim mjesta sazrijevanja, odlikuju se i različitim biljezima na svojim površinama pa tako limfociti T imaju biljege CD3 i CD2, dok limfocite B karakteriziraju CD19 i CD20. Limfociti T na svojoj površini sadrže receptor TCR koji prepoznaje samo prerađene antigene u sklopu vlastitih molekula HLA razreda

I ili II na površini makrofaga, monocita itd., dok limfociti B sadrže IgM kao specifični receptor kod djevičanskih stanica te IgA, IgE ili IgG kod aktiviranih i memorijskih stanica. Osim toga, limfociti sadrže i koreceptorske molekule koje učvršćuju vezu s antigenom pa tako za limfocite T vežemo CD4 i CD8, a za limfocite B CD19, CD21 i CD81.

Limfocite karakterizira različita odgovornost tipu specifične imunosti. Limfociti B odgovaraju humoralnoj imunosti, a limfociti T staničnoj, kod kojih razlikujemo dvije populacije: pomoćnički limfociti T (Th CD4+) te citotoksični limfociti T (Tc CD8+).

Prema MHC molekulama u imunološkoj reakciji posebno je usmjerena transplantacijska reakcija koja se odlikuje imunološkom memorijom te antigenskom specifičnošću. Pokreće ju međusobno djelovanje receptora limfocita T s peptidnim antigenom predodređenim kao dio MHC molekule na membrani antigen predodređenih stanica. Limfociti T poslije aktivacije proizvode razne citokine za regulaciju imunološkog odgovora. Važnost limfocita B vidljiva je u hiperakutnom odbacivanju transplantacijske reakcije koje je posredovano citotoksičnim protutijelima IgG protiv HLA molekula razreda I. Za vrijeme aktivacije limfocita B, antigen-specifični B stanični receptori predodređavaju antigene presatka putem MHC molekula razreda II na svojoj površini (5, 16).

1.1.4.1. Povezanost sustava HLA i bolesti

Autoimunost podrazumijeva smanjenje tolerancije imunološkog sustava na vlastite antigene koje, u ovom slučaju, organizam doživljava kao sebi strane. Autoimune bolesti su kronične upalne bolesti karakterizirane poticanjem imunološkog humoralnog, posredovan limfocitima B, te staničnog odgovora, posredovan limfocitima T. Određeni HLA haplotipovi vežu se uz pojedine bolesti, osobito autoimune. Točan mehanizam ove veze nije još u potpunosti poznat te se smatra da ulogu imaju i drugi, kako genski tako i okolišni čimbenici.

Haplotipovi HLA-A1, HLA-B8 i HLA-DR17 redovito su povezani s autoimunim bolestima. Među najpoznatijim vezama HLA haplotipova i bolesti ističe se narkolepsija s HLA-DQB1*0602/HLA-DRB1*1501, ankilozantni spondilitis s HLA-B27 te celijakija s HLA-DQB1*02. Nadalje, reumatoidni artritis vežemo uz posebnu sekvencu aminokiseline u DR β 1 lancu, čest kod podtipova HLA-DR4 i HLA-DR1. Tip I *diabetes mellitus* povezan je s HLA-DR3 i HLA-DR4 heterozigotima, dok izostanak aminokiseline asparagin na 57 položaju DQ β 1 lanca može povećati sumnju na ovu autoimunu bolest (8).

1.2. Transplantacija tkiva i organa

Transplantacija, odnosno presađivanje tkiva ili organa medicinski je zahvat koji se primjenjuje u slučaju kada vlastiti vitalni organ izgubi svoju funkciju. Presadak osim što može spasiti ljudski život, kao u slučaju srca, jetre ili bubrega, također može i poboljšati njegovu kvalitetu. Glavni primjer za to je transplantacija tkiva poput rožnice koja stvara mogućnost popravka vida pacijenta.

Godine 1954. obavljena je prva uspješna transplantacija jednog organa u Bostonu. Riječ je bila o presađivanju bubrega između jednojajčanih blizanaca, a samu operaciju je izvršio doktor Joseph Murray za što je dobio i Nobelovu nagradu za medicinu. Takav uspjeh bio je poticaj za daljnjim napretkom u transplantacijskoj medicini na području presađivanja koštane srži, srca, jetre, gušterače i pluća (14).

Prekretnicu u transplantacijskoj medicini učinilo je osnivanje međunarodne, neprofitabilne organizacije europskih država, Eurotransplant. Osnovan 1969. godine, sa sjedištem u nizozemskom Leidenu, danas broji 8 članica: Nizozemska, Belgija, Luksemburg, Njemačka, Austrija, Slovenija, Mađarska te Hrvatska od 15. kolovoza 2007. godine. Članstvo u Eurotransplantu nedvojbeno je pomoglo transplantacijskoj medicini u Hrvatskoj s obzirom da je riječ o velikoj površini od 136 milijuna stanovnika, 1 601 bolnica za darivatelje organa te 72 transplantacijska centra. Osim toga, ovako velika višenacionalna organizacija

ujedno je povećala i zanimanje javnosti za transplantacijsku medicinu, bilo to kroz političke ovlasti ili udruge bolesnika. Važno je istaknuti kako je članstvo Eurotransplantu ponajviše pomoglo visoko imuniziranim pacijentima koji u državi od 4 milijuna stanovnika ne bi pronašli podudarnog darivatelja. Trenutno je na listi čekanja Eurotransplanta 16 000 pacijenata, a godišnje se presadi preko 7 000 organa (22, 26).

Prema genetičkom odnosu primatelja i darivatelja razlikujemo četiri vrste transplantacije. U autolognoj transplantaciji koristi se vlastito tkivo ili stanice. Singenična transplantacija predstavlja genetički identične jedinke poput jednojajčanih blizanaca, za razliku od alogenične gdje jedinke nisu genetički iste. Posljednji oblik je ksenogenična, transplantacija s jedinke jedne vrste na drugu vrstu.

Danas su uspješno provedene transplantacije sa živih darivatelja, od umrlih osoba, životinja te *in vitro* uzgojenih tkiva. Kao najlošiji izbor ističe se transplantacija sa životinje zbog prisutnosti prirodnih protutijela, ali joj popularnost raste zbog mogućih genetičkih manipulacija. Svakako, transplantacijska medicina razvija se iz dana u dan, a nove tehnike, testovi te imunosupresivni lijekovi omogućuju kvalitetniji životni vijek primatelja transplantanta (17).

1.2.1. Transplantacija bubrega

Transplantacija bubrega medicinski je zahvat prenošenja zdravog bubrega iz tijela darivatelja u donji dio trbušne šupljine primatelja. Bubrežna arterija i vena darivatelja spajaju se na veliku zdjeličnu arteriju i venu primatelja, a mokraćovod presađenog bubrega ugrađuje se u primateljev mjehur.

Začeci transplantacije bubrega javljaju se već početkom 20. stoljeća. Još 1933. godine sovjetski kirurg Yuriy Voronoy pokušao je izvesti prvu transplantaciju bubrega implantirajući organ s umrle osobe u natkoljenicu pacijentice otrovane

živom. Pacijentica je umrla dva dana kasnije zbog nepodudarnosti u ABO krvnoj grupi. Nakon toga rađeni su brojni eksperimenti, sve do već spomenutog Josepha Murraya koji je 1954. u Bostonu prvi uspješno transplantirao bubreg (13).

Danas je općepoznata činjenica da je transplantacija najbolja metoda liječenja kod kroničnog zatajenja bubrega, većinom kao posljedica šećerne bolesti ili hipertenzije. Za primatelja ima velike prednosti, uključujući neovisnost o dijalizi, slobodu kretanja, normalnu tjelesnu aktivnost, uravnoteženu prehranu i manju smrtnost u usporedbi s dijalizom. No, iako se smatra jednom od većih medicinskih inovacija 20. stoljeća, sa sobom povlači mnoge komplikacije. Najčešći uzroci gubitka presatka u prvoj godini nakon transplantacije su akutno odbacivanje, arterijska tromboza i smrt bolesnika, uzrokovana srčanožilnim bolestima, infekcijama i zloćudnim tumorima (18).

Darivatelji su najčešće umrli moždanom smrću (kadaveri) te živi članovi obitelji pacijenta. Transplantacija sa živog darivatelja, uz imunosupresivnu terapiju, daje značajno bolje rezultate. Osim što je sam postupak brži te se izbjegava dugo čekanje na listama, bubreg žive osobe pokazao se funkcionalnijim za pacijenta i dužeg vijeka. Živi darivatelji bubrega prije svega moraju zadovoljavati opće kriterije poput krvnog tlaka $< 140/90$ mmHg, indeksa tjelesne mase < 35 kg/m², normalne tolerancije na glukozu te izostanak krvi u mokraći. Danas, koristeći se *hand assisted donor nephrectomy* metodom, sam proces doniranja bubrega dosta je siguran za darivatelje koji tako imaju malo kirurških komplikacija te normalan životni vijek. No, to ne umanjuje činjenicu da su nefrološke kontrole potrebne zbog učestalije hipertenzije i proteinurije.

Primatelj bubrega prvo treba biti prijavljen na Listu čekanja kako bi se smatrao kandidatom za samu transplantaciju, nakon čega se razmatraju određeni kriteriji, poput podudarnosti u krvnoj grupi, tkivne podudarnosti, vremena na dijalizi i senzibilizaciji pacijenta. Ako nije riječ o jednojajčanom blizancu, organizam primatelja bubreg doživljava kao strano tijelo kojeg treba odbaciti. To je razlog zašto je u terapiji potrebno koristiti imunosupresivne lijekove i odlaziti na redovne

kontrole gdje se laboratorijski provjerava funkcija presađenog bubrega kroz nalaze ureje i kreatinina.

Prije same transplantacije potrebno je imunološki obraditi primatelja. Osoba se tipizira na alele lokusa HLA-A i HLA-B serološkom ili molekularnom metodom te na HLA-DR obavezno molekularnom metodom. Ako je primatelj senzibiliziran, to jest dokazana mu je prisutnost protutijela, molekularno se radi tipizacija lokusa HLA-DQA, HLA-DPA, HLA-DPB te tipizacija visokog razlučivanja za lokuse za koje je dokazana senzibilizacija. U razmaku od 24 sata uzimaju se dva uzorka krvi iz kojih se radi prva i potvrdna tipizacija, poželjno različitim metodama: CDC i molekularna PCR. Važno je istaknuti da tipizacijski laboratorij treba imati informacije o mogućim imunizirajućim događajima za svakog primatelja, bilo da je riječ o transfuziji, trudnoći ili prijašnjoj transplantaciji. Screening ili probir protutijela određuje radi li se o autoantitijelima ili aloantitijelima IgM ili IgG klase imunoglobulina. Koristi se kombinacija serološke metode CDC i metode čvrste faze ELISA ili Luminex. Za CDC metodu koristi se panel limfocita od najmanje 50 darivatelja sa specifičnosti HLA statistički zastupljenoj u općoj populaciji, koji su obavezno tipizirani na alele lokusa HLA-A, HLA-B i HLA-DR. Rezultat se izražava kao postotak PRA te označava postotak darivatelja koji na panelu limfocita reagiraju pozitivno sa serumom primatelja. Nadalje, kod primatelja organa obavezno je napraviti i test autokrižne reakcije da bi isključili mogućnost postojanja autoantitijela jer bi ona u križnom testu s darivateljem mogla dati lažno pozitivan rezultat. Kada se pacijent nalazi na listi čekanja za transplantaciju bubrega, potrebno je obavljati redoviti probir antitijela CDC metodom svako tri mjeseca te metodom čvrste faze svako dvanaest mjeseci.

Nažalost, treba napomenuti da ne mogu svi pacijenti s kroničnim zatajenjem bubrega biti kandidati za transplantaciju. Smatra se da HIV pozitivne osobe, osobe s proširenom malignom ili nekom infektivnom bolešću za koju se predviđa kratki životni vijek te HBV i HCV pozitivne osobe imaju kontraindikacije za stavljanje na listu čekanja. Isto tako, osobe starije životne dobi s teškim krvožilnim

bolestima sigurnije su s nastavkom dijalize, nego se prepustiti riziku transplantacije (23, 24).

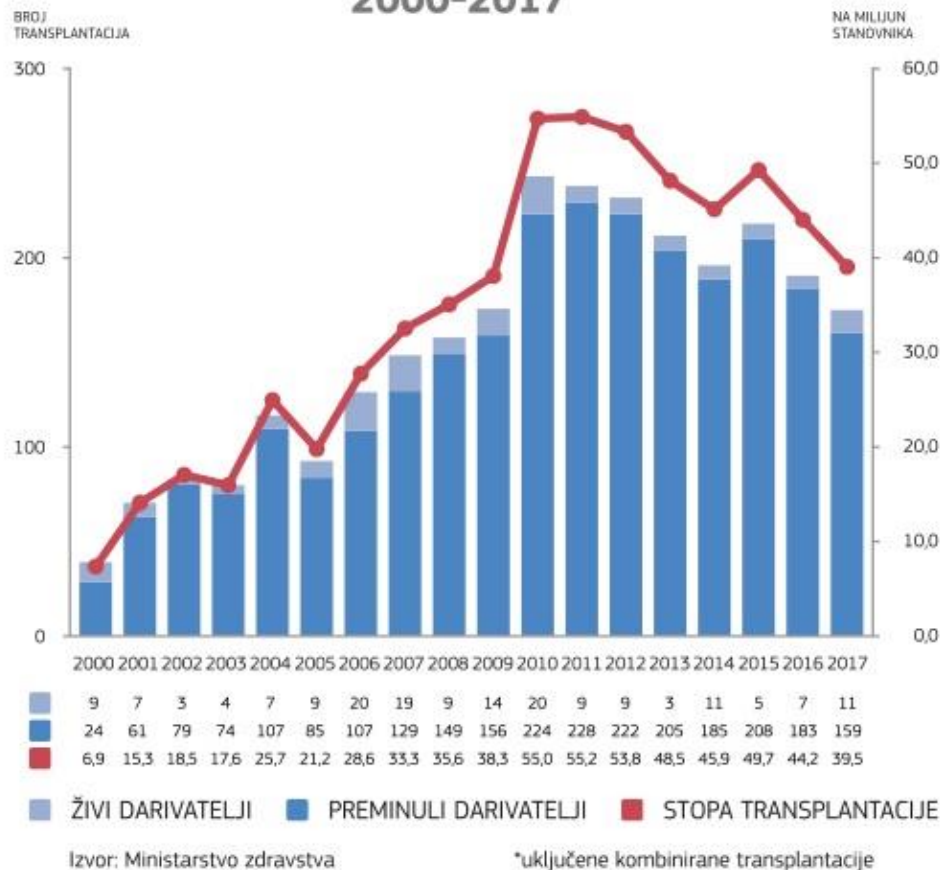
1.2.2. Transplantacija bubrega u RH

Same početke u liječenju kroničnog zatajivanja bubrega u Hrvatskoj pronalazimo u Klinici za kirurgiju KBC Rijeka kada je 1962. godine izvedena prva hemodijaliza u bolesnika s akutnim bubrežnim zatajenjem. Već 1966. godine, kao osnova transplantacije bubrega, započinje redovita hemodijaliza pod vodstvom prof. dr. Jerka Zeca. Uz to, započinje i savladavanje kirurških tehnika na eksperimentalnim životinjama, kao i posjete različitim inozemnim centrima za transplantaciju, a sve u interesu liječenja pacijenata s terminalnom insuficijencijom bubrega.

Završne pripreme poput proširenja centra za dijalizu i osnivanja laboratorija za tipizaciju tkiva, omogućile su da se 30. siječnja 1971. godine u Rijeci uspješno izvede prva transplantacija bubrega sa žive srodne osobe u Hrvatskoj. Operaciju je izvršio tim na čelu s prof. dr. sc. Vinkom Frančiškovićem, a 34-ogodišnji primatelj živio je 14,5 godina s funkcionirajućim bubregom. Samo godinu dana kasnije u Hrvatskoj je učinjena i transplantacija bubrega s nežive osobe umrle zastojem srca. Nedugo nakon toga, 1973. godine, tim na čelu s prof. dr. sc. Ljubomirom Čečukom u Kliničkom bolničkom centru Zagrebu, uz pomoć ekipe prof. dr. sc. Frančiškovića, također je bio uspješan u transplantaciji bubrega (14).

Osamdesetih godina prošlog stoljeća dolazi do noviteta u imunosupresivnom liječenju nakon transplantacije bubrega, korištenje novog lijeka ciklosporina. Kako je ciklosporin ukazao na poboljšanje rezultata preživjelih transplantiranih pacijenata, ubrzo je počela uporaba i drugih imunosupresiva s još manjom šansom odbacivanja presatka.

TRANSPLANTACIJE BUBREGA U HRVATSKOJ 2000-2017



Slika 5. Transplantacije bubrega u Hrvatskoj 2000. – 2017.

(izvor: Ministarstvo zdravstva)

Godine 2005. osnovana je hrvatska udruga Transplant za sve transplantirane pacijente, one na listi čekanja, članove obitelji te zdravstvene radnike transplantacijske medicine. Udruga je osnovana s ciljem povećanja broja transplantacija, ali i promicanja same transplantacijske medicine te osiguravanja bolje kvalitete života transplantiranih i oboljelih osoba (25).

Transplantacija bubrega u Hrvatskoj se obavlja u KBC-u Rijeka, KBC-u Zagreb i KB Merkur. Centar za dijalizu u kojem se nalazi pacijent obrađuje podatke osobe zbog mogućnosti stavljanja na listu čekanja za transplantaciju koristeći se propisanim nacionalnim smjernicama. Pri završetku svih određenih pretraga,

pacijent se upućuje u jedan od prethodno nabrojanih transplantacijskih centara te se prijavljuje na Nacionalnu listu čekanja za presađivanje bubrega, jedinstvenu za cijelu Hrvatsku.

Danas u Hrvatskoj, po procjeni, 150 000 ljudi boluje od kronične bubrežne bolesti te su u riziku za odlazak na dijalizu ili transplantaciju organa, dok nešto više od 1500 osoba živi s presađenim bubregom. Po podacima Eurotransplanta za 2017. godinu, u Hrvatskoj je transplantirano 156 bubrega s umrlih i 11 sa živućih darivatelja. 193 osobe su na listi čekanja za transplantaciju bubrega, ali svakako možemo reći da se taj broj iz dana u dan povećava (22, 23).

2. CILJ RADA

Cilj ovog rada bio je procijeniti PRA u pacijenata koji očekuju prvo presađivanje bubrega te uočiti utjecaj PRA na vrijeme nošenja presatka. Istraživanje sam provela u Laboratoriju za tipizaciju tkiva na Odjelu za transfuziju krvi u KBC-u Split – Križine.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

U Laboratorij za tipizaciju tkiva Centra za transfuzijsku medicinu KBC-a Split dostavljeni su uzorci seruma pacijenata na listi čekanja za transplantaciju bubrega iz dijalitičkog centra KBC Split.



Slika 6. Uzorak seruma bolesnika (izvor: researchgate.net)

3.2. Metode

Za utvrđivanje panel reaktivnih antitijela (%PRA) korišten je test mikrolimfocitotoksičnosti.

U svrhu istraživanja specifičnih antiseruma HLA kod ispitanika korišten je panel limfocita koji čini zbirku limfocita od 50 osoba koje su prethodno tipizirane, a to znači da su im određeni antigeni, to jest geni sustava HLA primjenom seroloških metoda ili metoda molekularne biologije (PCR-SSO; PCR-SSP).

Tablica 2. Panel limfocita

MATIČNI BROJ	ANTIGENI SUSTAVA HLA LOKUSA HLA-A,-B			
	HLA-A	HLA-A	HLA-B	HLA-B
01	1	25(10)	8	18
02	2	32(19)	8	35
03	2	11	35	57(17)
04	2	24(9)	35	49(21)
05	68(28)	31(19)	53	39(16)
06	31(19)	33(19)	13	27
07	2	11	13	35
08	1	32(19)	51(5)	57(17)
09	2	31(19)	27	41
10	2	68(28)	62(15)	35
11	3	68(28)	27	35
12	25(19)	26(10)	56(22)	-
13	2	3	7	8
14	2	68(28)	51(5)	65(14)
15	3	23(9)	7	35
16	2	26(10)	35	37
17	1	24(9)	8	37
18	23(9)	24(9)	58(17)	50(21)
19	2	32(19)	50(21)	8
20	2	32(19)	62(15)	61(40)
21	29	33(19)	35	18
22	1	25(10)	7	37
23	1	3	57(17)	47
24	2	3	35	39(16)
25	24(9)	68(28)	44(12)	35
26	24(9)	26(10)	35	61(40)
27	30(19)	32(19)	39(16)	70
28	2	66(10)	64(14)	62(15)

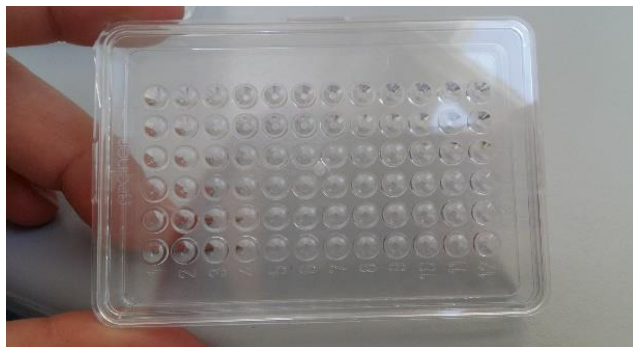
29	2	-	18	61(40)
30	24(9)	32(19)	18	35
31	1	11	57(17)	60(40)
32	1	2	37	44(12)
33	11	24(9)	35	57(17)
34	2	31(19)	18	35
35	1	28	57(17)	41
36	24(9)	2	38(16)	56(22)
37	2	24(9)	35	44(12)
38	1	2	8	35
39	2	3	41	47
40	1	2	13	45(12)
41	2	28	27	57(17)
42	24(9)	33(19)	14	62(15)
43	1	2	8	35
44	24(9)	26(10)	56(22)	57(17)
45	11	26(10)	18	58(17)
46	2	3	39(16)	60(40)
47	1	3	18	35
48	23(9)	26(10)	44(12)	60(40)
49	26(10)	32(19)	35	51(5)
50	3	24(9)	7	35

3.2.1. Test mikrolimfocitotoksičnosti

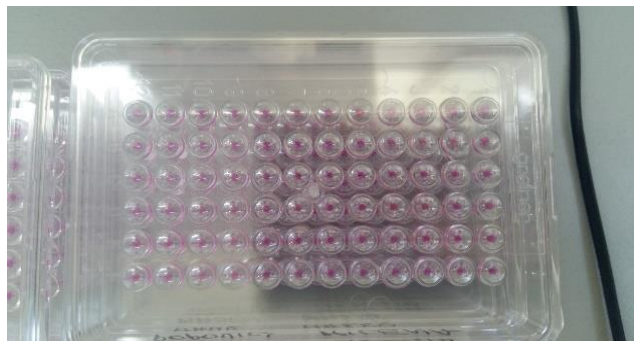
Test mikrolimfocitotoksičnosti ovisan o komplementu ili CDC najčešće je upotrebljavana metoda za određivanje protutijela HLA. U ovoj metodi, još zvanj probir, tj. screening seruma, koristimo se limfocitima prethodno tipiziranih darivatelja krvi, u većini slučajeva govorimo o njih 50 izabranih na način da

predstavljaju najčešće gene HLA u hrvatskoj populaciji. U testu se primjenjuje panel limfocita zbog čega se ovako određena protutijela HLA nazivaju panel reaktivnim protutijelima (PRA).

Uzorak je periferna krv s heparinom od koje se na gradijentu gustoće izdvoje limfociti. Test se temelji na reakciji poznatih antigena HLA na membranama limfocita s protutijelima HLA u serumu ispitanika koja se izvodi u Terasakijevim pločicama (slike 7.1 i 7.2). Nakon što smo rasporedili serume pacijenata u pločicu, u njih dodajemo suspenziju limfocita B i T prethodno tipiziranih nesrodnih osoba. Pločice se inkubiraju 30 minuta da bi se stvorio kompleks antigen-protutijelo poslije čega slijedi dodavanje kunićjeg seruma, dodatna inkubacija 90 minuta te završna dekantacija istresanjem.

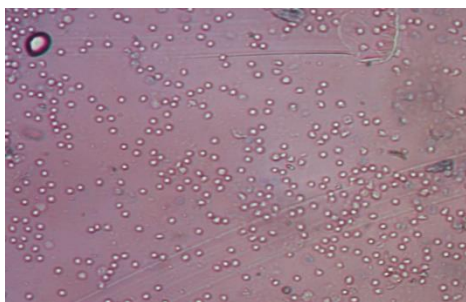


Slika 7.1. Prazne Terasakijeve pločice

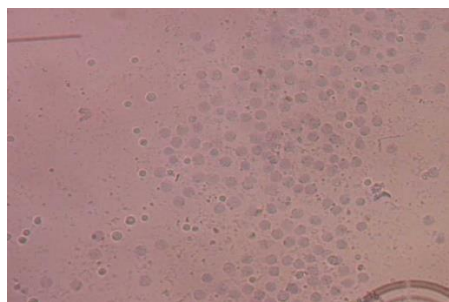


Slika 7.2. Pločice sa suspenzijom limfocita

Ako se u prethodnom koraku stvorio kompleks antigen-protutijelo, kunićji serum će aktivirati komponente komplementa te će doći do oštećenja membrane limfocita. Takve stanice su mrtve, a to možemo i vidjeti nakon bojanja tripanskim modrilom. Nežive stanice se oboje u plavo što očitavamo kao pozitivnu reakciju, to jest postotak panel reaktivnih protutijela (%PRA). Na taj način dobili smo uvid o senzibilizaciji pacijenta na antigene HLA sustava. U slučaju kada nije došlo do stvaranja kompleksa antigen-protutijelo, izostaje i liza stanica, što znači da su one žive te se neće obojiti tripanskim modrilom. To nam govori da u serumu pacijenta nema protutijela HLA protiv staničnih antigena (slike 8.1 i 8.2).



Slika 8.1. Negativna CDC reakcija
(izvor: ref.1)



Slika 8.2. Pozitivna CDC reakcija

Nadalje, dokazanim pozitivnim serumima možemo odrediti jesu li protutijela HLA klase imunoglobulina IgM ili IgG. U duplikatu ponovimo test s pozitivnim serumima tako da prije dodatka suspenzije limfocita B i T, samo na jednu pločicu dodamo i DTT (dithiothreitol). Zbog svoje moći razaranje pentamerske strukture IgM molekule, u slučaju njihovog prisustva, u toj pločici nećemo imati reakciju. Za razliku od toga, kod prisustva IgG protutijela, imamo reakciju u obje pločice (4, 5).

Rezultate CDC testa očitavala sam svjetlosnim mikroskopom dajući ocjene od 1 do 8. Najjača pozitivna reakcija, odnosno više od 80% obojenih stanica, ocjenjeno je s 8, dok je najslabija reakcija s manje od 10% ocjenjena s 1 (tablica 3).

Tablica 3. Vrednovanje rezultata CDC testa

OCJENA	MRTVE STANICE (%)	JAČINA REAKCIJE
1	≤ 10	negativna
2	10-20	pozitivna
4	20-40	pozitivna
6	40-80	pozitivna
8	80-100	pozitivna

(izvor: researchgate.net)

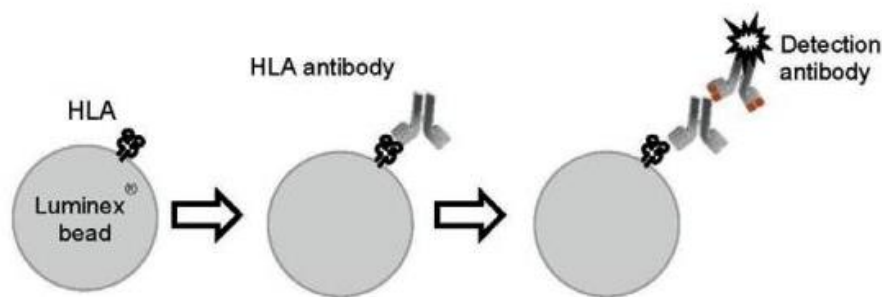
3.2.2. Križna reakcija

Prije same transplantacije radi se test križne reakcije (engl. *Cross Match*, CM) između primatelja i mogućeg darivatelja organa. Test također izvodimo serološkom CDC metodom da bi još jednom isključili postojanje IgG protutijela u serumu primatelja. Dakle, u ovom testu na primateljev serum nanosimo suspenziju limfocita darivatelja organa. Ako nema reakcije, to jest imamo manje od 10% mrtvih stanica, kod primatelja ne postoje protutijela HLA na antigene darivatelja te je transplantacija moguća. U suprotnom, sve više od 10% mrtvih stanica smatramo pozitivnim testom. On nam dokazuje postojanje protutijela na neki od antigen darivatelja čime je sama transplantacija onemogućena zbog očite nepodudarnosti organa (1).

3.2.3. Luminex metoda

Najosjetljivija metoda određivanja protutijela HLA upravo je Luminex metoda čvrste faze. Metoda se zasniva na polistirenskim mikrokuglicama koje su na površini obložene antigenima HLA, a u unutrašnjosti ispunjene bojama crvenim i infracrvenim fluorokromom različitog spektra. U slučaju da serum sadrži protutijela usmjerena protiv određenog antigena HLA, ona će se vezati na odgovarajuću kuglicu. Kompleks je detektiran fikoeritrin-konjugiranim

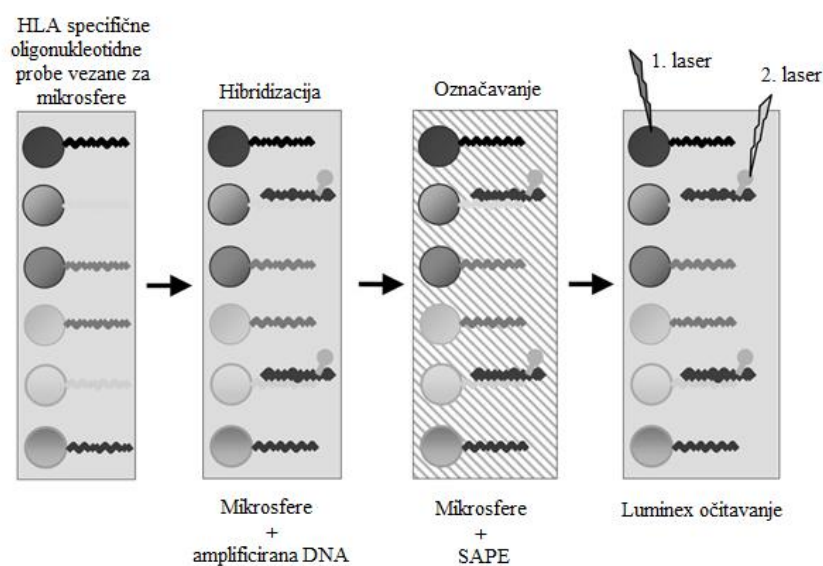
sekundarnim protutijelima koja su specifična za ljudske IgG. Koncentracija protutijela mjeri se u Luminex analizatoru na način da se izmjeri fluorescencijska emisija svake mikrokuglice prolaskom kroz dvije laserske zrake. Detekcija protutijela HLA postiže se korištenjem sekundarnih protutijela. Rezultat se, kao i kod CDC metode, izražava u %PRA (15).



Slika 9. Princip Luminex metode za detekciju protutijela HLA
(izvor: ref. 20)

3.2.4. 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 sintetski su dobivene čestice na čijoj se površini nalaze specifične oligonukleotidne probe, odnosno 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. Za očitavanje rezultata nastalih kompleksa koristi se uređaj Luminex (Luminex LX200 Analyser) koji koristi princip protočne citometrije kako bi doveo jednu po jednu mikrosferu do lasera. Zahvaljujući različitoj kombinaciji boja prisutnoj na svakoj mikrosferi, Luminex obasjava svaku mikrosferu s dva lasera. Jedan laser klasificira mikrosferu i određuje probu koja se vezala, a drugi kvantificira relativnu količinu vezane probe na svakoj pojedinoj mikrosferi na temelju čega se očitava rezultat (Slika 10) (21).

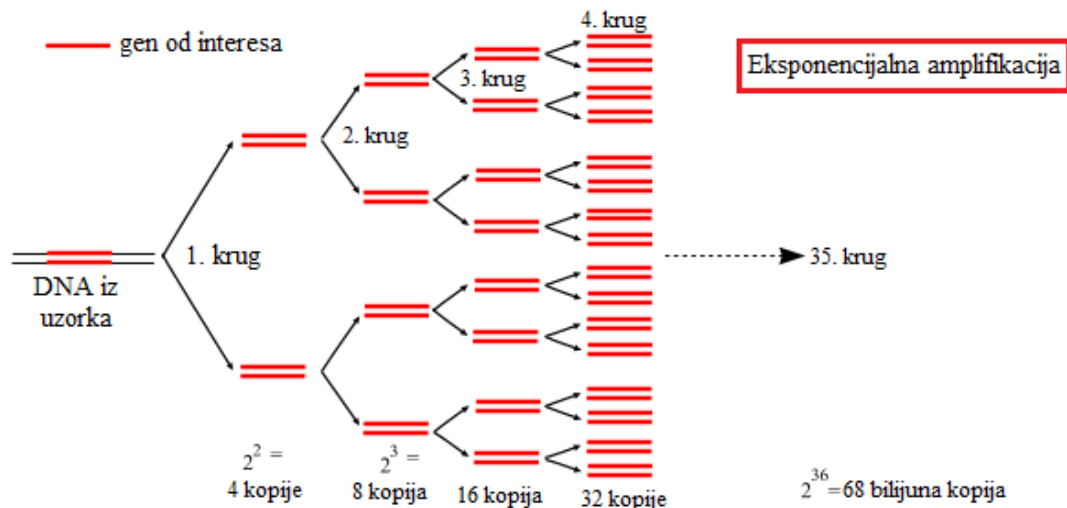


Slika 10. Princip PCR-SSO metode

(izvor: Heinemann, HLA Genotyping and Antibody Characterization Using the Luminex™ Multiplex Technology)

3.2.4.1. Izvođenje testa

Uzorak potreban za izvođenje testa je izolirana genomska DNA pacijenta koju je potrebno umnožiti, odnosno amplificirati u svrhu čega se koristi PCR (engl. *Polymerase chain reaction*). Da bi amplifikacija bila uspješna, potrebno je napraviti reakcijsku mješavinu za HLA lokus koji se tim testom želi ispitati. Reakcijska mješavina sadrži Taq polimerazu (0,2μl), reakcijski pufer, odnosno Master MIX (6μl) u kojem se nalaze oligonukleotidne početnice (engl. *Primer*) te destiliranu vodu (8,8μl). Reakcijskoj smjesi se doda 5μl DNA te smjesa zatim ide u „Thermocycler“ (LXAMPF RAPID) gdje se amplificira. Tijekom PCR reakcije Taq polimeraza prepoznaje komplementarne dijelove DNA na koje se zatim vežu oligonukleotidne početnice. Program se obično ponavlja 30 puta, a kao rezultat dobijemo 68 bilijuna kopija DNA (Slika 11).



Slika 11. PCR metoda

(izvor: modificirano prema Andy Vierstraete, 1999.)

Po završetku PCR reakcije slijedi proces hibridizacije. Reakcijski volumen potreban za proces hibridizacije je 20 μ l, tj. 5 μ l PCR produkta i 15 μ l suspenzije mikrosfera. Tijekom hibridizacije, koja traje 20 minuta, dolazi do vezanja PCR produkta na specifične oligonukleotidne probe na mikrosferama. Za vizualizaciju nastalog kompleksa dodaje se 170 μ l fluorescentne boje za obilježavanje koja se prethodno pripremi uz pomoć 170 μ l dilucijske otopine i 0,75 μ l streptavidina (R-fikoeritrin konjugirani streptavidin, engl. *Streptavidin-Phycoerytherin*, SAPE). Jedan dio boje veže se za biotin prisutan na početnicama, a drugi dio veže se 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 završene analize rezultati hibridizacije služe da se uz pomoć programa (Match IT DNA) odredi haplotip HLA ispitanika (Slika 12). Ovaj program sadrži bazu poznatih, već određenih haplotipova koje uspoređuje s rezultatom dobivenim PCR-SSO metodom.

4. REZULTATI

Tablica 4. Obrazac za screening seruma (HLA)

REDNI BROJ	ET BROJ	STATUS	REZULTAT SCREENINGA	SPECIFIČNOST
1	593248	I	POZITIVAN (95%)	-
2	361455	I	POZITIVAN (86%)	-
3	564654	I	POZITIVAN (16%)	B 57(17)
4	857458	T	POZITIVAN (3%)	
5	445878	NT	NEGATIVAN	
6	125478	NT	NEGATIVAN	
7	584777	NT	NEGATIVAN	
8	254678	T	NEGATIVAN	
9	589344	T	NEGATIVAN	-
10	452788	T	NEGATIVAN	
11	542478	T	NEGATIVAN	
12	896577	T	NEGATIVAN	
13	125874	T	NEGATIVAN	
14	856987	T	NEGATIVAN	
15	475841	T	NEGATIVAN	

I – imunizirani pacijent; NT – nije za transplantaciju; T – pacijent za transplantaciju

Nakon screeninga seruma pacijenata na listi čekanja za transplantaciju bubrega dijalitičkog centra KBC-a Split serološkom metodom CDC (citotoksičnost ovisna o komplementu) dobiveni rezultati pokazali su da su 4 od 15 pacijenata s liste čekanja senzibilizirani na HLA antigene. Od četiri senzibilizirana pacijenta dva pacijenta su visoko senzibilizirani (95% i 86%). Kod pacijenta pod rednim brojem 3, sa 16% senzibilizacije, analizom screeninga utvrđena je specifična senzibilizacija na antigen HLA-B57(17).

5. RASPRAVA

Transplantacija tkiva i organa nikad nije siguran postupak te sa sobom povlači mnogo imunoloških problema, prvenstveno odbacivanje presatka. Kao i kod drugih transplantacija, u transplantaciji bubrega osnovno pitanje pacijenta je izbor darivatelja organa. Osnovni čimbenici kod odabira darivatelja su podudarnost u genima HLA primatelja i darivatelja, te prisutnost protutijela HLA u serumu primatelja organa.

Važnost senzibilizacije na strane antigene HLA ističe se već u samim počecima transplantacije. Broj nepodudaranja antigena HLA određuje stupanj HLA nekompatibilnosti između primatelja i darivatelja organa. Anti-HLA protutijela značajno su povezana s pretransplantacijskom senzibilizacijom i posttransplantacijskom reakcijom odbacivanja presatka. Donor specifična antitijela svrstavaju se u dvije skupine: antitijela protiv HLA sustava, kojima pripadaju anti-HLA-A, -B i -C i anti-HLA-DP, -DQ, -DR, te antitijela koja nisu protiv HLA sustava.

Za utvrđivanje senzibilizacije osobe na listi čekanja za transplantaciju bubrega, ali i pouzdanu prognozu ishoda, odnosno odbacivanja presatka, određuje se %PRA testom mikrolimfocitotoksičnosti. Određivanje %PRA daje nam uvid u postotak darivatelja koji na panelu limfocita reagiraju pozitivno s primateljevim serumom. Dobar panel limfocita od najmanje 50 dobrovoljnih darivatelja tipiziranih za alele lokusa HLA-A, -B i -DR, a poželjno i za HLA-C i -DQ, treba sadržavati sve tkivne antigene populacije koja se ispituje. Prijašnja istraživanja dokazala su važnost HLA-A, -B i -DR antigena u transplantaciji solidnih organa, a u posljednje vrijeme se ističe i HLA-C zbog efekta u ishodu transplantacije krvotvornih matičnih stanica (19).

U ovom radu ispitivana skupina sastojala se od 15 pacijenata s liste čekanja za transplantaciju bubrega dijalitičkog centra KBC-a Split. Pacijentima je određivano prisustvo, odnosno odsustvo antitijela serološkom metodom

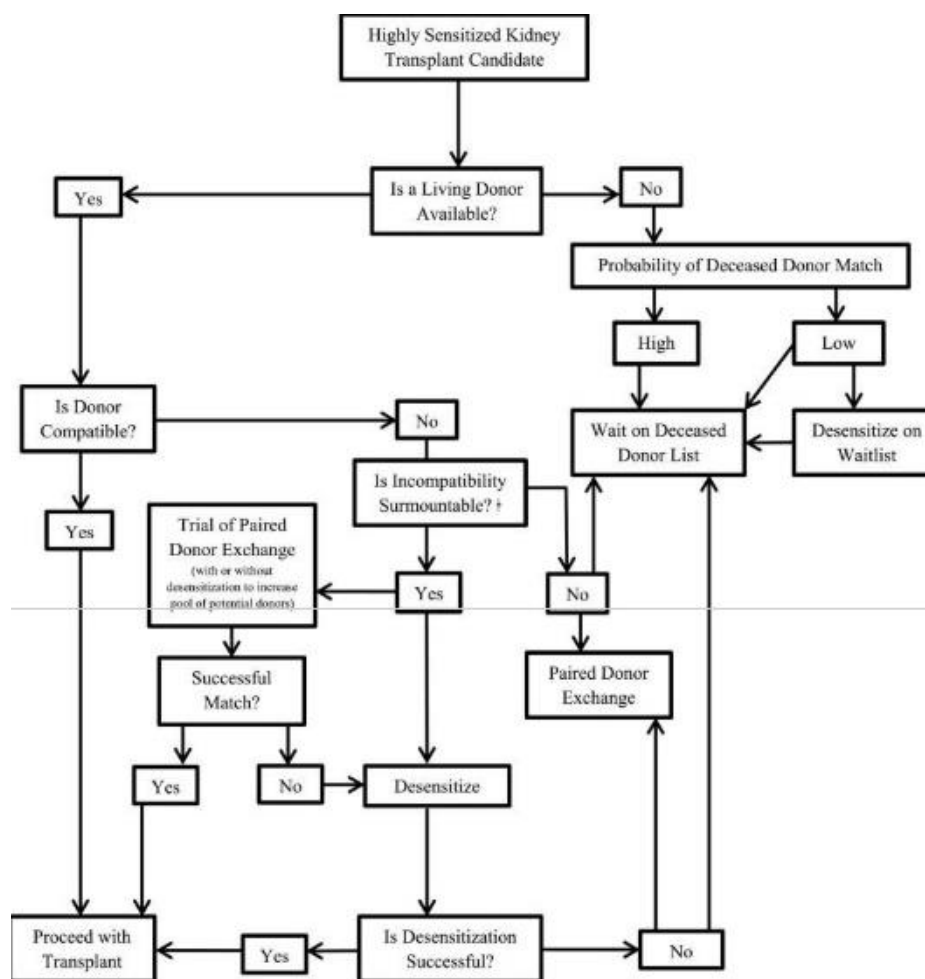
mikrolimfocitotoksičnosti. Nakon očitavanja reakcije pod svjetlosnim mikroskopom i ocjenjivanja intenziteta, uslijedila je analiza pacijenata za listu čekanja (tablica 4).

Kod pacijenta pod rednim brojem 3 kod kojega je utvrđena senzibilizacija, analizom seruma otkrivena je specifičnost za antigen B57(17). Upravo je otkrivanje specifičnosti od neizmjerne značajnosti jer predstavljaju potpuno neprihvatljive antigene za primatelja organa pa tako pacijent iz ispitivane skupine s pozitivnim screeningom od 16% senzibilizacije, ni u kojem slučaju ne smije primiti organ darivatelja kojemu je tipizacijom utvrđen antigen HLA-B57(17).

Između četiri senzibilizirana pacijenta, jedino je onaj pod rednim brojem 4 u mogućnosti biti transplantiran. Takvi kandidati za transplantaciju češće su i učinkovitije podvrgnuti postupku presađivanja bubrega zbog malog postotka senzibilizacije, kao što je primjerice u ovom istraživanju svega 3%.

Dva su pacijenta screeningom pokazala visoki stupanj senzibilizacije ($\geq 85\%$) od 86% i 95%. Visokosenzibilizirani pacijenti duže su vremena na listi čekanja te je mogućnost pronalaska srodnog darivatelja značajno manja zbog čega je važna točna i detaljna obrada potencijalnog darivatelja. No, da bi se riješio problem dugog čekanja transplantacije visokosenzibiliziranih osoba, danas u Eurotransplantu postoji program prihvatljive nepodudarnosti (engl. *Acceptable Mismatch*, AM) gdje se tim pacijentima određuju svi aleli HLA protiv kojih nisu stvorena protutijela HLA. U slučaju pronalaska darivatelja s upravo tim antigenima, prioritet dobivaju pacijenti iz AM programa, uzimajući u obzir da im je to rijetka prilika da dođu do organa.

Visokosenzibilizirani pacijenti imaju isto tako mogućnost transplantacije organa sa živog davatelja, s time da se to postiže preko programa razmjene organa između parova. Posljednja opcija jesu nepodudarani darivatelji što zahtjeva primjenu desenzibilizacije u primatelja kako bi se odstranila donor specifična protutijela (24).



Slika 13. Algoritam za pristup visokosenzibiliziranim pacijentima za transplantaciju bubrega (izvor: ref. 20)

Provedeno istraživanje također je pokazalo da su tri pacijenta, unatoč negativnom screeningu, u NT statusu, odnosno nisu u mogućnosti biti na listi čekanja za transplantaciju bubrega. Razlog tome tražimo su mogućim kliničkim preprekama. Unutar tri mjeseca od prethodnog screeninga pacijent pod rednim brojem 5 dobio je tuberkulozu, dok je pacijent pod rednim brojem 6 imao manji srčani zahvat. Pacijent pod rednim brojem 7 također je spriječen zato što nije na vrijeme dostavljena potpuna klinička dokumentacija od liječnika iz dijalitičkog centra u kojemu se pacijent dijalizirao. Ostali pacijenti u statusu su T, dakle u slučaju pronalaska podudarnog darivatelja, spremni su za transplantaciju.

6. ZAKLJUČAK

1. Kod pacijenta kod kojega je utvrđena senzibilizacija, analizom seruma otkrivena je specifičnost za antigen B57(17).
2. Dva su pacijenta screeningom pokazala visoki stupanj senzibilizacije od 86% i 95%. Visokosenzibilizirani pacijenti duže su vremena na listi čekanja te je mogućnost pronalaska srodnog darivatelja značajno manja.
3. Visokosenzibiliziranim pacijentima određuju se svi aleli HLA protiv kojih nisu stvorena protutijela HLA te u slučaju pronalaska darivatelja s upravo tim antigenima imaju prioritet, uzimajući u obzir da im je to rijetka prilika da dođu do organa.
4. Visoki PRA velika je prepreka kod transplantacije organa, dok specifična senzibilizacija ukazuje na potpunu neprihvatljivost organa.

7. POPIS LITERATURE

1. Žunec R, Grubić Z, Balen S. Važnost imunogenetike u transplantaciji organa. *Medix* 2011; (92/93): 208-213.
2. Mishra MN, Baliga KV. Significance of panel reactive antibodies in patients requiring kidney transplantation. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2013; 24(3): 495-499.
3. Fuggle SV, Taylor CJ. Histocompatibility and Immunogenetics. *Handb Ren Pancreat Transplant*. 2012. 55–75.
4. 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.
5. Trobonjača Z, Živčić-Ćosić S, Lisjak J. Imunobiologija presađivanja bubrega. *Medicina fluminensis* 2010; 46(4): 424-433.
6. Williams TM. Human leukocyte antigen gene polymorphism and the histocompatibility laboratory. *J Mol Diagn* 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. *Tissue Antigens* 2010; 75: 291-455.
8. Choo SY. The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications. *Yonsei Med J* 2007; 48(1): 11-23.
9. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Immunobiology. 5th ed. *The Immune System in Health and Disease*. New York: Garland Science, 2001.
10. Marsh SGE, Parham P, Barber LD. *The HLA: Facts Book*. Elsevier Science, 2000.
11. Thorsby E. A short history of HLA. *Tissue antigens* 2009; 74(2): 101-16.
12. Shankarkumar U. The Human Leukocyte Antigen (HLA) System. 2004. 4(2):91–103.
13. Pasini J. Transplantacija bubrega – očekivanja i još uvijek prisutne dvojbe. *Medix* 2011; (92/93): 188-192.

14. Orlić P. Povijest transplantacije bubrega u svijetu i u Hrvatskoj. *Med Vjesn* 2005; 37(1-4): 37-41.
15. Lachmann N, Todorova K, Schulze H, Schönemann C. Luminex and Its Applications for Solid Organ Transplantation, Hematopoietic Stem Cell Transplantation, and Transfusion. *Transfus Med Hemother* 2013 Jun; 40(3): 182–189.
16. 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.
17. Edinur HA, Manaf SM, Che Mat NF. Genetic barriers in transplantation medicine. *World J Transplant* 2016 Sep24; 6(3): 532–541.
18. Živčić-Ćosić S, Trobonjača Z, Sladoje-Martinović B, Orlić L. Komplikacije nakon presađivanja bubrega. *Medicina fluminensis* 2010; 46(4): 434-447.
19. Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, Fernandez-Vina M, Filipovich A, Horowitz M, et al. Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. *Blood*. 2004; 104: 1923-1930.
20. Keith DS, Vranic GM. Approach to the Highly Sensitized Kidney Transplant Candidate. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016 Apr 7; 11(4): 684–693.
21. Nowak J, Mika-Witowska R, Graczyk-Pol E. Genetic Methods of HLA Typing. In: M. Witt, T. Szczepanski, M. Dawidowska. *Molecular Aspects of Hematologic Malignancies*. Springer Science+Business Media; 2012. 325-339.
22. <http://www.hdm.hr/podaci-eurotransplant/> (9.6.2018.)
23. <http://www.svjetskidanbubrega.org/p7-presadjivanje-bubrega.htm> (7.6.2018.)
24. Nacionalne smjernice za obradu i procjenu primatelja i darivatelja bubrega. Izd. Ministarstvo zdravlja Republike Hrvatske (elektronski izvor, 9.6.2018.)
25. <http://www.svjetskidanbubrega.org/u-hut.htm> (7.6.2018.)
26. https://www.eurotransplant.org/cms/index.php?page=about_brief (9.6.2018.)

8. POPIS TABLICA

Tablica	Stranica
1. Broj otkrivenih alela do ožujka 2018. godine	12
2. Panel limfocita	27-28
3. Vrednovanje rezultat CDC testa	31
4. Obrazac za screening seruma (HLA)	36

9. POPIS ILUSTRACIJA

Slika	Stranica
1. Smještaj lokusa HLA na kraćem kraku kromosoma 6	8
2. Nasljeđivanje haplotipova HLA	9
3. Nomenklatura HLA sustava	11
4. Shematski prikaz molekula HLA razreda I (a) i razreda II (b)	13
5. Transplantacije bubrega u Hrvatskoj 2000. – 2007.	23
6. Uzorak seruma bolesnika	26
7.1. Prazne Terasakijeve pločice	29
7.2. Pločice sa suspenzijom limfocita	29
8.1. Negativna CDC reakcija	30
8.2. Pozitivna CDC reakcija	30
9. Princip Luminex metode za detekciju protutijela HLA	32
10. Princip PCR-SSO metode	33
11. PCR metoda	34
12. Rezultati dobiveni PCR-SSO metodom u MATCH IT DNA	35
13. Algoritam za pristup visokosenzibiliziranim pacijentima za transplantaciju bubrega	39

11. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Unosom stranih antigena HLA naš organizam stvara protutijela HLA, poznati čimbenik rizika odbacivanja presatka. Prisutnost tih protutijela u serumima pacijenata izražava se kao postotak panel reaktivnih protutijela (PRA). Cilj ovog istraživanja bio je procijeniti PRA u pacijenata koji očekuju prvo presađivanje bubrega te uočiti utjecaj PRA na vrijeme nošenja presatka.

Materijali i metode: Istraživanje je obavljeno u Laboratoriju za tipizaciju tkiva Centra za transfuzijsku medicinu KBC-a Split na uzorcima seruma pacijenata na listi čekanja bubrega iz dijalitičkog centra KBC Split. Za utvrđivanje panel reaktivnih antitijela (%PRA) koristili smo test mikrolimfocitotoksičnosti, dok smo za specifičnost antiseruma HLA ispitanika koristili panel limfocita od 50 prethodno tipiziranih osoba serološkim ili molekularnim metodama (PCR-SSO, PCR-SSP).

Rezultati: 4 od 15 pacijenata s liste čekanja senzibilizirani su na HLA antigene. Od četiri senzibilizirana pacijenta dva pacijenta su visoko senzibilizirana (95% i 63%). Kod pacijenta sa 16% senzibilizacije, analizom screeninga utvrđena je specifična senzibilizacija na antigen HLA-B57(17).

Zaključak: Potrebno je dovesti na minimum nekompatibilnost između primatelja i darivatelja organa redovitim praćenjem pacijenta na listi čekanja za transplantaciju. Visoki PRA velika je prepreka kod transplantacije organa, dok specifična senzibilizacija ukazuje na potpunu neprihvatljivost organa.

Ključne riječi: HLA, protutijela, senzibilizacija, transplantacija bubrega

12. SUMMARY

The aim of the study: By introducing foreign HLA antigens, our body produces HLA antibodies, a known risk factor for transplant rejection. The presence of these antibodies in the serum of patients is expressed as a percentage of panel reactive antibodies (PRA). The aim of this study was to evaluate PRA in patients awaiting first kidney transplantation and to detect the PRA's influence on transplant survival.

Materials and Methods: The research was carried out at Laboratory for Tissue Typing at University Hospital Centre Split on serum samples of patients on the kidney transplant waitlist from the University Hospital Centre Split dialysis centre. For the detection of the panel reactive antibodies (%PRA), we used Complement Dependent Cytotoxicity test, while, for an identification of specific HLA antibodies, we used panel of lymphocytes previously typed 50 individuals with serological or molecular methods (PCR-SSO, PCR-SSP).

Results: 4 out of 15 patients on waitlist are sensitized to HLA antigens. Two patients, out of four sensitized, were highly sensitized (95% and 63%). In a patient with 16% sensitization, screening analysis determined specific sensitization to the antigen HLA-B57(17).

Conclusion: It is necessary to minimize the incompatibility between the recipient and the organ donor by regular monitoring of the patient on the waitlist for transplantation. High PRA is a major obstacle to an organ transplantation, while specific sensitization indicates completely unacceptable organ.

Key words: HLA, antibodies, sensitization, kidney transplantation

ŽIVOTOPIS

Osobni podaci

Ime i prezime	Marija Čikotić
Adresa	Rikarda Katalinića Jeretova 1, 21 000 Split
Telefonski broj	(+385) 95 891 3023
E-mail	marija.cikotic14@gmail.com
Datum rođenja	14. lipnja 1996.
Spol	ženski
Državljanstvo	hrvatsko

Radno iskustvo

22. travnja 2017. - danas	Ispomoć u trgovini Zara Hrvatska d.o.o.
---------------------------	---

Obrazovanje i osposobljavanje

rujan 2003. - lipanj 2011.	Osnovna škola „Split 3“ Bruna Bušića 6, Split (Hrvatska)
rujan 2011. - lipanj 2015.	IV. gimnazija Marko Marulić Zagrebačka 2, Split (Hrvatska)
listopad 2015. - danas	Preddiplomski studij medicinska laboratorijska dijagnostika Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel zdravstvenih studija Ruđera Boškovića 35, Split (Hrvatska)

Osobne vještine

Materinski jezik	hrvatski
Strani jezici	Izvršno poznavanje engleskog te početničko poznavanje talijanskog jezika.
Komunikacijske vještine	Vrlo dobre komunikacijske vještine, kako usmene tako pismene, stečene tijekom školovanja uz veliki broj seminara i prezentacija. Sposobnost prilagođavanja različitim sredinama te vješt rad u timovima zahvaljujući iskustvu na radnom mjestu.
Poslovne vještine	Razumijevanje laboratorijskog ponašanja, korištenje analizatora te sposobnost izvođenja manualnih zadataka kroz velik broj kliničkih vježbi.
Računalne vještine	Osnove rada na računalu, poznavanje MS Office-a.