

Važnost praćenja panel-reaktivnih antitijela kod pacijenata na listi čekanja za transplantaciju bubrega

Čačija, Filip

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:471384>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**

Repository / Repozitorij:



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

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



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PRIJEDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Filip Čačija

**VAŽNOST PRAĆENJA PANEL-REAKTIVNIH ANTITIJELA
KOD PACIJENATA NA LISTI ČEKANJA ZA
TRANSPLANTACIJU BUBREGA**

Završni rad

Split, 2024

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA
PRIJEDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Filip Čačija

**VAŽNOST PRAĆENJA PANEL-REAKTIVNIH ANTITIJELA
KOD PACIJENATA NA LISTI ČEKANJA ZA
TRANSPLANTACIJU BUBREGA**

**IMPORTANCE OF CONTROLLING PANEL REACTIVE
ANTIBODIES IN PATIENTS ON WAITING LIST FOR
KIDNEY TRANSPLANTATION**

Završni rad/Bachelor's Thesis

Mentor:

Doc. dr. sc. Esma Čečuk – Jeličić

Split, 2024

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija

Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Znanstveno područje: Biomedicina i zdravstvo

Znanstveno polje: Kliničke medicinske znanosti

Mentor: Doc. dr. sc. Esma Čečuk – Jeličić, mag.biol.mol.

VAŽNOST PRAĆENJA PANEL-REAKTIVNIH ANTITIJELA KOD PACIJENATA NA LISTI ČEKANJA ZA TRANSPLANTACIJU BUBREGA

Filip Čačija

Sažetak:

U uvodnom dijelu ovoga rada govorimo o bubregu i njegovoj anatomske građi. Nažalost zbog bolesti bubrega i njegove insuficijencije često dolazi do potrebe za transplantacijom bubrega. Na samu transplantaciju utječu mnogi faktori među kojima glavnu ulogu ima podudarnost u HLA sustavu tkivne snošljivosti između darivatelja i primatelja organa.

Cilj ovoga rada bio je testirati serume tri pacijenta kako bi odredili prisutnost ili odsutnost antitijela u serumima. Zavod za transfuziju KBC-a Split bio je mjesto obavljanja istraživanja na uzorcima seruma pacijenata koji se nalaze na listi čekanja za transplantaciju bubrega.

Metode koje smo koristili u istraživanju je test mikrolimfocitotoksičnosti - citotoksičnost ovisna o komplementu (CDC).

Rezultati su pokazali da je pacijent br. 1 reagirao sa svim osobama na probiru te da se radi od visoko senzibiliziranom događaju. Kod pacijenta br. 2 kod kojeg je utvrđena senzibilizacija otkrivena je specifičnost za antigen HLA-A2 i HLA-A24 te pacijent br. 3 kod kojeg nije dokazana prisutnost antitijela.

Uz ispravne i aktualizirane podatke o mogućim senzibilizirajućim događajima, rezultati redovnih probira ključni su pri definiranju imunološkog statusa primatelja i omogućavaju optimalnu pretragu za potencijalnim donorom organa.

Ključne riječi: HLA, senzibilizacija, antitijela, transplantacija bubrega

Rad sadrži: 43 stranica, 16 slika, 2 tablice, 19 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split

University Department for Health Studies

University undergraduate study medical laboratory diagnostics

Scientific area: Biomedicine and health

Scientific field: Clinical medical sciences

Supervisor: Asst.Prof. Esma Čečuk – Jeličić, PhD

IMPORTANCE OF CONTROLLING PANEL REACTIVE ANTIBODIES IN PATIENTS ON WAITING LIST FOR KIDNEY TRANSPLANTATION

Filip Čačija

Summary:

Introductory part of this thesis provides short description of kidney anatomy and pathogenesis of kidney diseases. Unfortunately, kidney pathogenic states often lead to insufficiency, with kidney transplant as the most desirable way of treating the disease. One of the most important factors for successful kidney transplant and graft longevity is the best possible HLA system compatibility between organ donor and recipient.

The objective of this research was to test serums of 3 patients and determine presence or absence of HLA antibodies in given samples. Blood samples from patients were provided by Division of Transfusion Medicine (University hospital center Split), while all the tests were performed in Tissue Typing Laboratory.

Method used for HLA antibody detection in this research was mikrolimfocitotoxicity (CDC) test.

Research results showed that out of three tested patients, one was highly sensitized (against all samples provided for lymphocyte panel), second patient was sensitized specifically to HLA-A2 and HLA-A24(9) antigens, while in the last patient no HLA antibodies were detected.

Along with correct and updated data on possible sensitizing events, the results of regular screenings are crucial in defining the recipient's immune status and enable an optimal search for a potential organ donor.

Keywords: HLA, sensitization, antibodies, kidney transplantation

Thesis contains: 43 pages, 16 figures, 2 tables, 19 references

Original in: Croatian

POPIS KRATICA

- APS - antigen predočna stanica (engl. APC – antigen presenting cell)
- CDC - engl. Complement – Dependent Citotoxicity, citotoksičnost ovisna o komplementu
- CM - engl. cross match, test križne reaktivnosti
- DNA - engl. Deoxyribonucleic Acid, deoksiribonukleinska kiselina
- DSA - engl. donor specific antibody, donor specifična antitijela
- EDTA - engl. Ethylenediaminetetraacetic acid, etilendiamintetraoctena kiselina
- ELISA - engl. Enzyme-linked immunosorbent assay
- EFI - engl. European Federation for Immunogenetics, Europska fondacija za imunogenetiku
- HLA - engl. Human Leukocyte Antigen, sustav humanog leukocitnog antigena
- IHWS - engl. International Hystocompatibility Workshops, Internacionalna radionica histokompatibilnosti
- IPD-IMGT/HLA Database – svjetska baza podataka poznatih HLA alela
- MHC - engl. Major Histocompatibility Complex, glavni kompleks tkivne podudarnosti
- MLCT - engl. Microlymphocitotoxicity Test, test mikrolimfocitotoksičnosti
- MSCT - engl. Multislice spiral computed tomography, višeslojna CT angiografija
- MIC - engl. MHC class I chain-related gene A
- PCR - engl. Polymerase Chain Reaction, lančana reakcija polimeraze
- PCR-SSO- engl. Polymerase chain reaction – Sequence Specific Oligonucleotids, lančana reakcija polimerazom sa oligonukleotidama specifičnih sekvenci
- PCR-SSP- engl. Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primer, lančana reakcija polimerazom sa početnicama specifičnih sekvenci
- PRA - panel reaktivna antitijela
- SAPE - engl. Streptavidin – Phycoerytherin, R-fikoeritrin konjugiranog streptavidina
- TNF- α - engl. Tumor Necrosis Factor – α , faktor tumorske nekroze α
- UAM - engl. Unacceptable Antigen Mismatches, neprihvatljivi antigeni
- WHO - engl. World Health Organsation, Svjetska zdravstvena organizacija

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. ANATOMIJA BUBREGA	3
1.2. TRANSPLANTACIJA BUBREGA	5
1.2.1. Darivatelji i primatelji bubrega.....	6
1.2.2. Eksplantacija i prezervacija bubrega.....	6
1.2.3. Tehnika transplantacije	7
1.2.4. Imunosupresija nakon transplantacije	8
1.3. MEHANIZMI ODBACIVANJA TRANSPLANTIRANOG BUBREGA	10
1.3.1. Hiperakutno odbacivanje.....	10
1.3.2. Akutno odbacivanje	11
1.3.3. Kronično odbacivanje.....	12
1.4. HLA SUSTAV TKIVNE SNOŠLJIVOSTI.....	13
1.4.1. Nomenklatura gena i antigena HLA sustava	15
1.4.2. Transplantacijski antigeni.....	17
1.4.3. Senzibilizacija.....	18
1.4.4. Imunološka obrada primatelja	18
2. CILJ RADA.....	22
3. MATERIJALI I METODE.....	23
3.1. Materijali.....	23
3.2. Metode	23
3.2.1. Test mikrolimfocitotoksičnosti.....	25
4. REZULTATI	28

5. RASPRAVA.....	31
6. ZAKLJUČAK.....	33
7. LITERATURA.....	34
8. ŽIVOTOPIS	36

1. UVOD

Moderno vrijeme za ljudsko zdravlje predstavlja ozbiljan izazov. Porast pretilosti, kardiovaskularnih oboljenja, dijabetesa, ostavlja posljedice na brojne organske sustave tako i na urogenitalni, usko govoreći na bubrege. Bubrežne bolesti kroničnog tijeka često dovode do terminalnog oštećenja bubrega te je pacijentu potrebna dijaliza koja je kao način liječenja mentalno i fizički iscrpljujuća. Medicina kao znanost i struka ima zadatak olakšati i pomoći pacijentu, a u kontekstu teških bubrežnih oboljenja kao optimalna opcija pokazala se transplantacija bubrega.

Transplantacija organa jedan je od najvećih podviga 20-og stoljeća. Jedan od pionira uvođenja transplantacije u medicinu bio je Emerich Ullman koji je u Beču uspješno obavio transplantaciju bubrega na psu. Bubrež je bio presađen u predjelu vrata procesom autotransplantacije, a uspješno je funkcionirao pet dana. Alexis Carrel, francuski kirurg i biolog, u Lyonu izvršio je uspješnu autotransplantaciju bubrega, također na psu. Carrel je među prvima započeo promatranje postupka anastomoziranja krvnih žila, te je začetnik triangulacijske tehnike uz primjenu tzv. Carrelovog patcha, te je za svoj uspjeh dobio Nobelovu nagradu za fiziologiju i medicinu. Ovi načini transplantacije bili su preteča današnjoj modernoj transplantaciji.

Kada govorimo o transplantaciji bubrega, kao i drugih organa uvijek moramo skrenuti pozornost na odgovor ljudskog imunog sustava na unos stranih HLA antigena te proizvodnju antitijela HLA. Načini na koji strani humani leukocitni antigeni (HLA) u organizam mogu dospjeti su dobro poznati, a to su trudnoće, transfuzije kao i retransplantacije. Upravo postojanje (odnosno odsustvo) antitijela HLA uvjetuje uspješnost transplantacije, odnosno preživljavanje transplantiranog organa. Postotak panel reaktivnih antitijela (*engl. Panel Reactive Antibodies, %PRA*) ili stupanj HLA senzibilizacije kod bolesnika koji čekaju na transplantaciju bubrega pokazatelj je prisutnosti HLA. Prema Nacionalnim smjernicama za obradu i odabir primatelja i darivatelja bubrega i smjernicama Eurotransplanta, bolesnicima koji se upisuju na listu čekanja obavezno je odrediti HLA gene i antitijela HLA kako bi se transplantacija izvela uspješno. Prije same transplantacije izvodi se križna proba (*engl. cross-match, CM*) kako bi se utvrdilo postojanje antitijela HLA usmjerenih protiv antigena HLA

potencijalnog darivatelja, tzv. donor specifična antitijela (*engl. Donor Specific Antibodies*, DSA). Zlatni standard za izvođenje test križne probe i dalje je serološka metoda odnosno test mikrolimfocitotoksičnosti ovisne o komplementu (CDC), iako je medicina i tehnologija toliko napredovala da je došlo do razvoja novih metoda koje imaju sposobnost i osjetljivost otkriti i ona antitijela koja nije moguće CDC metodom. U takve metode spada ELISA, protočna citometrija i metoda Luminex xMAP tehnologija (*engl. Microsphere Assay Platform*). Prednost metode CDC se očituje u otkrivanju antitijela IgG i IgM, dok se testovima Luminex otkrivaju samo antitijela IgG.

Dva osnovna imunološka čimbenika koji su vrlo važni u transplantacijskoj medicini su podudarnost gena HLA i prisutnost citotoksičnih antitijela HLA u serumu organa.

1.1. ANATOMIJA BUBREGA

Bubreg je parni organ kod kralježnjaka koji filtrira otpadne tvari iz krvi i izlučuje ih skupa sa vodom kao mokraću. Područje medicine koja proučava bubrege i oboljenja bubrege naziva se nefrologija, od grčke riječi *nefro* (bubreg) i *logos* (znanost). Bubrezi su oblika zrna graha te smeđe-crvene boje prosječne duljine 10-12 cm, široki 6 cm, debljine 4 cm a imaju masu 160 g. Varijacije su vrlo česte od osobe do osobe s obzirom na veličinu, oblik i položaj. Lijevi je bubreg obično dulji, deblji i teži. Ako je jedan bubreg premalen ili ga pak nema, drugi je najčešće povećan, hipertrofiran. Govoreći o građi bubrege, presjekom frontalnim rezom, odnosno oslobodi li se bubrežni sinus već se golim okom može razlikovati srž i koru bubrege.

(1)

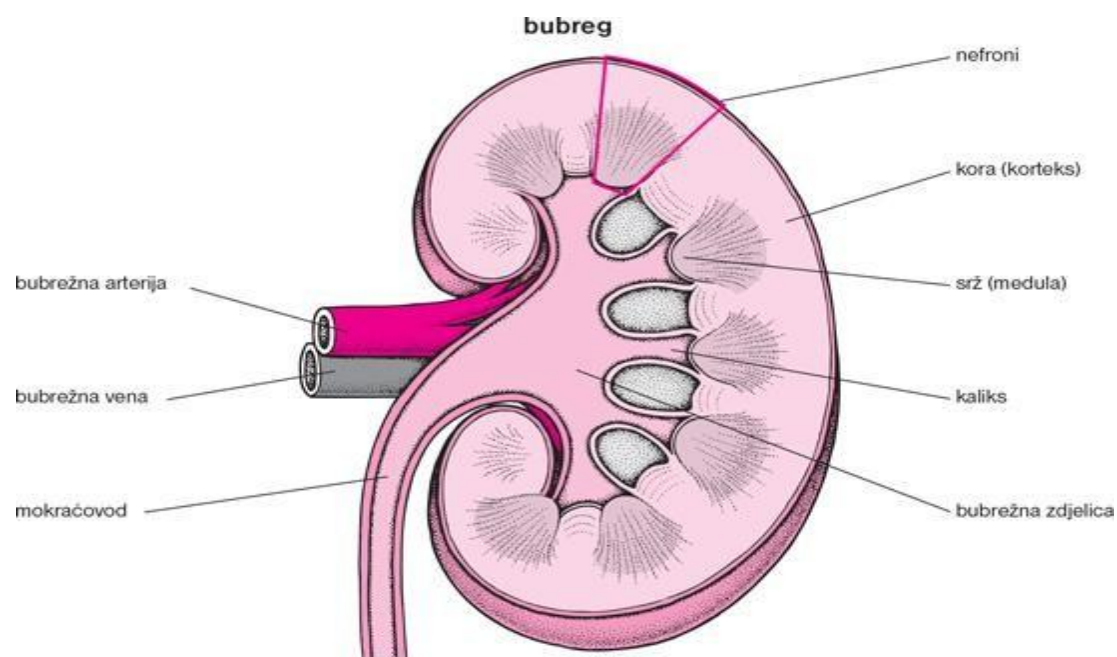


Slika 1- Bubreg
(izvor: <https://bs.wikipedia.org/wiki/Bubreg>)

Bubrežna kora, *cortex renalis* – nalazi se neposredno ispod bubrežne kapsule. Otprilike je debela oko 6-7 mm te posjeduje svoje produžetke *columnae renales* koje šalje između susjednih piramida. Ti stupovi vidljivi su u bubrežnoj zdjelici, kao niti koje se protežu do *hilusa*. Također možemo uočiti potpuno lateralno smješteni stup, koji je velik i naziva se *columna axialis*, a njegov položaj odvaja prednji i stražnji dio.

(slika 2) (1)

Bubrežna srž - *medulla renalis* - Sastoji se od 7 do 14 piramida, baza koje su usmjerene prema kori, i vrhova, *papillae renales*, prema srži, *sinus renalis*, te se na kraju izbočuju u bubrežne čaše, *calices renales*. Piramide su poredane u jedan prednji i jedan stražnji red a na gornjemu i na donjemu polu leži po jedna velika piramida, pri čemu je najveća piramida na gornjem polu. Zbog ravnih dijelova bubrežnih kanalića, srž na presjeku pravilnog je izgleda. Kortikalni stupovi se nalaze oko svake piramide. *Lobus renalis, renculus* ili bubrežni režanj čini sama piramida sa zajedničkim dijelom kore. U novorođenčeta su *lobi renales* još uvijek odvojeni dubokim brazdama. Kasnije, međutim, granice režnjeva potpuno nestaju, iako ih u nekih sisavaca možemo naći doživotno, a ponekad i u bubrežima odraslih ljudi. *Papillae renales*, nalaze se na slobodnim vrhovima piramide koje su nepravilnog izgleda te se na njima nalazi sitasta površina *area cribrosa* sa sitnim otvorima sabirnih cijevi, *ductus papillares*. Papile su uložene u bubrežne vrčeve. (1)



Slika 2- Presjek bubrega na kojem se vide srž i kora
(izvor: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/bolesti-bubrega-i-mokracnih-putova/biologija-bubrega-i-mokracnih-putova/simptomi-bolesti-bubrega-i-mokracnih-putova>)

1.2. TRANSPLANTACIJA BUBREGA

Transplantacija bubrega je socijalno, ekonomski, medicinski i psihološki opravdan način terapije bolesnika s terminalnim zatajenjem bubrega. Broj bolesnika na dijalizi raste gotovo u svim zemljama kao što raste i broj bolesnika na listama čekanja za transplantaciju bubrega. Osnovni razlog povećanja broja pacijenata na listi čekanja je manjak kadaveričnih davatelja koji su glavni izvor organa za transplantaciju. Najčešći uzrok zatajenja funkcije bubrega je diabetes mellitus (zatajenje se javlja u oko 16% bolesnika s tom bolesti), a mogući uzroci su neliječena ili slabo kontrolirana hipertenzija, glomerulonefritis, policistična bolest bubrega i intersticijski nefritis. Zahvaljujući napretku medicine (kvalitetna dijaliza, preciznije imunološko testiranje, usavršene kirurške tehnike, jači i selektivni imunosupresivni lijekovi, dobro praćenje bolesnika u poslije operacijskom razdoblju), transplantacijom bubrega ne samo da se poboljšava kvaliteta već i produžava život bolesnika.

U svijetu na transplantaciju bubrega čeka oko 180.000 bolesnika, a u Republici Hrvatskoj preko 190 pacijenata. Za 50 godina od kako se ova operacija radi u svijetu urađeno je 620.000 transplantacija. Republika Hrvatska je u programu Eurotransplanta (od 2007. god.) i zahvaljujući ulasku Hrvatske u ovu krovnu organizaciju povećao se kako broj transplantacija solidnih organa, tako i broj darivatelja organa.

Govoreći o povijesti transplantaciji solidnih organa u Hrvatskoj svakako moramo biti ponosni jer smo u samom vrhu europske transplantacije. Važno je istaknuti da ovih dana slavimo pedeset godina od prve transplantacije bubrega koju je na KBC Zagreb, Rebro izveo akademik Ljubomir Čečuk sa svojim suradnicima. (2,3)

1.2.1. Darivatelji i primatelji bubrega

Osnovna zapreka u napredovanju transplantacijskog programa jest manjak ponude organa kompatibilnih između primatelja i davatelja. Bubrege se može uzeti od srodnoga darivatelja (živa, srodna donacija), nesrodnog darivatelja (živa, nesrodna donacija), ili umrle osobe s dijagnozom smrti mozga. Darivanje organa je legalno, etički i religijski opravdano i predstavlja altruistički čin kojim se spašava tuđi život. Bubrege mogu donirati i živi i umrli donori. Žive donore najčešće čine najuži članovi obitelji (otac, majka, braća i sestre). S obzirom na stroge zakonitosti genetike i Mendelovog nasljeđivanja kod transplantacije živog donora veća je vjerojatnost podudaranja alela sustava HLA što maksimalno smanjuje rizik od odbacivanja organa. Kriteriji za isključivanje živih donora su sljedeći: smanjenje glomerulske filtracije, proteinurija, mikrohematurija, policistični bubrezi.(2,3).

Prije stavljanja bolesnika na listu čekanja potrebno je učiniti niz pretraga, a ponekad i zahvata kako bi bolesnik bio podoban za transplantacijski proces u kojem se osim samog kirurškog zahvata, primjenjuje i niz drugih postupaka koji mogu bolesnika ugroziti (imunosupresivna terapija, sklonost infekcijama i razvijanje tumora komplikacije steroidne terapije itd.) (3)

1.2.2. Eksplantacija i prezervacija bubrega

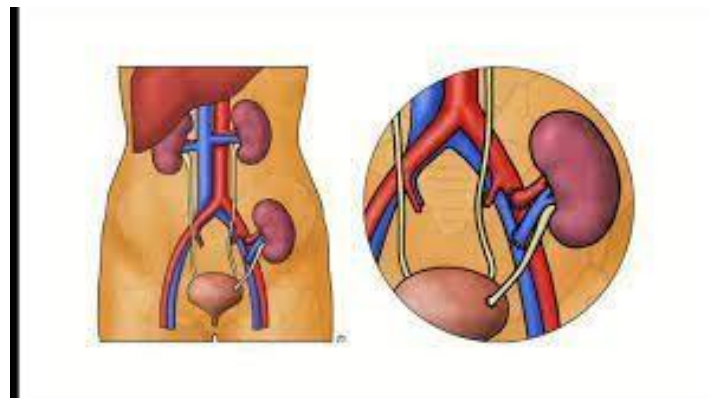
Osnovno pravilo kod eksplantacije organa s kadaveričnog davatelja je da se vrijeme tople ishemije (vrijeme kada je organ perfundiran krvlju i topao) svede na najmanju moguću mjeru. Stoga se eksplantacija izvodi na takav način da se izoliraju velike krvne žile ne dirajući organ, a potom ispiru hladnim otopinama za perfuziju (Euro-Collinsova otopina, Retschneiderova otopina, IJW University of Wisconsin - Belzerova otopina), dok se preparacija organa, razdvajanje i spremanje za prijenos obavlja na stoliću nakon što se organi izvade (*en block*). Nakon opsežne i temeljite obrade kod eksplantacije sa žive osobe koja uključuje i renalnu angiografiju i višeslojnu CT (MSCT) angiografiju, te procjenu funkcionalnosti organa za transplantaciju, uzima se bubrege sa boljom funkcijom. Ako je funkcija oba bubrega podjednaka poželjno je, zbog duljine bubrežne vene, uzeti lijevi bubrege. Kirurški zahvat se obavlja otvorno ili laparoskopski uz ili bez pomoći ruke (*hand assisted*).

Prije klemanja krvnih žila, kako bi funkcija transplantata bila bolja, davatelju se daje obilno tekućine i furosemid. (3)

Poslije vađenja organa bubrezi se pripremaju za prezervaciju. Razdvajaju se na stolicu, pazeći pritom da se ne oštete krvne žile. Oko mokraćovoda potrebno je ostaviti dosta masnoga tkiva i krvnih žila kako bi osigurali da će mokraćovod biti dobro opskrbljen krvlju. Razdvojeni bubrezi potom se stavljaju u vrećice ili u posebne posude, u koje se stavi određena količina prezervacijske tekućine. Oko toga se postavlja suhi led koji se topi i sve se zajedno pohranjuje u spremnik, na čiji se vrh pričvršćuje sva potrebna dokumentacija. Poslije perfuzije hladnim otopinama započinje vrijeme hladne ishemije koje mora trajati što kraće. Maksimalno vrijeme hladne ishemije ne bi smjelo trajati dulje od 24 sata, iako se, ovisno o brojnim drugim čimbenicima prihvaćaju organi i do 43 sata nakon eksplantacije bubrega (3)

1.2.3. Tehnika transplantacije

Bubreg se transplantira u ilijačnu fosu, desni najčešće na lijevu, a lijevi na desnu stranu, kako bi kanalni sustav bio okrenut prema *peritoneumu* (slika 3). Zahvat se izvodi ekstrapertonealno, s time da se ispreparira *v. iliaca externa* i arterija *iliaca interna*. Ako se ustanovi kako arterija *iliaca interna* nije pogodna za anastomoze (aterosklerotički plakovi) arterijska se anastomoza radi na vanjsku ili zajedničku ilijačnu arteriju. (3)



Slika 3- Mjesto transplantacije bubrega

(izvor: <https://www.visual-limes.com/en/visual-limes-expands-the-nefrosoft-transplant-module-with-new-features-2>)

Pri preparaciji je važno podvezati limfne putove kako bi se spriječio nastanak limforeje odnosno kasnije i limfokele. Pri arterijskim anastomozama koristi se dio aorte oko dolazišta bubrežne arterije (*Carrel patch*). Poslije otpuštanja pritiska bubreg najčešće postaje prvo plavkast, a potom šaren, a nakon otprilike 20 minuta poprima uobičajenu boju i nešto je tvrđe konzistencije. Nakon kontrole hemostaze učini se reimplantacija mokraćovoda (ureterocistoneostomija).. U mjehur se stavi kateter i potom se, nakon što je postavljen dren, rana šije po slojevima. Zahvat traje najčešće oko 2,5 do 3 sata. (3)

1.2.4. Imunosupresija nakon transplantacije

Hiperakutno odbacivanje koje nastaje u bolesnika koji imaju citotoksična antitijela je rijetko ako je križna reakcija negativna. Akutno stanično odbacivanje moguća je opasnost u ranom poslije operacijskom razdoblju, a sprječavamo ga imunosupresivnim lijekovima. Osnova imunosupresije je ciklosporin, zajedno s mikofenolat mofetilom (*Cell-Sept*). U većini se centara i dalje daje pronizon kao imunosupresiv. Kod visokorizičnih primatelja koriste se poliklonska ili monoklonska antitijela u indukciji imunosupresivnoga postupka. Takrolimus, inhibitor kalcineurina, kao i ciklosporin, iako djelotvoran lijek, zbog svoje nefrotoksičnosti i drugih popratnih pojava, te svoje cijene, još nije u potpunosti zamijenio ciklosporin. Sirolimus, antiproliferativni lijek koji nije nefrotoksičan, pokazao se dobrim u prevenciji akutnoga odbacivanja u kombinaciji s ciklosporinom, no dugoročni rezultati njegove primjene još nisu poznati. (3)



Slika 4 - Odbačen bubreg

(izvor: <https://www.sciencephoto.com/media/764874/view/failed-kidney-transplant>)

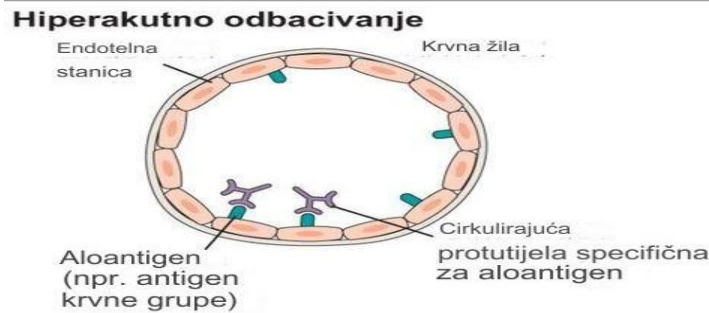
Iako postoje smjernice o doziranju pojedinih lijekova, uz teorijsko poznavanje protokola, potrebno je i kliničko iskustvo kako imunosupresija ne bi bila prejak (infekcije, pojava tumora, limfoproliferativnih bolesti, popratne pojave), ali isto tako ni preslaba (odbacivanje). Ako dođe do akutnog odbacivanja, što se dokazuje nizom kliničkih parametara i radioizotopnim pretragama te ultrazvučnim pregledom, a potvrđuje histološkom dijagnozom presatka, ono se liječi visokim dozama steroida. Ako se takvim liječenjem ne postigne uspjeh primjenjuju se poliklonska ili monoklonska antitijela (antilimfocitni globulin, OKT-3 i sl.). Za kronično odbacivanje (stanično ili nepoznata uzroka) nema primjerene terapije (slika 4). (3)

1.3.MEHANIZMI ODBACIVANJA TRANSPLANTIRANOG BUBREGA

Najveći problem kod transplantacije solidnih organa kamo spada i transplantacija bubrega je odbacivanje organa (7). Odbacivanje organa se najčešće javlja kao posljedica koja je izazvana upalnim odgovorom koje je uzrokovano presađenim tkivom. Veliki dio saznanja o imunologiji transplantacije potiče iz istraživanja visoko srodnih vrsta glodavaca, prvenstveno miševa. Presađivanja koja su izvođena između životinja istog ili različitih visoko srodnih sojeva te je utvrđeno da se transplantat prihvaća unutar visoko srodnog soja, a da se odbacuje između različitih sojeva. Ova istraživanja su jasno pokazala da odbacivanje transplantata mora biti na neki način povezano sa kompatibilnosti pojedinih gena u transplantiranih životinja. (7). S obzirom na patološke te kliničke značajke odbacivanje organa može biti hiperakutno, akutno i kronično. Također, postalo je jasno da je za svaku vrstu odbacivanja karakterističan određeni tip imunog odgovora. (7)

1.3.1. Hiperakutno odbacivanje

Hiperakutno odbacivanje događa se neposredno poslije presađivanja i popraćeno je trombozom te ishemijskom nekrozom transplantata. Ovakvu vrstu odbacivanja izazivaju cirkulirajuća antitijela koja su visoko specifična za antigene koji se nalaze na stanicama endotela te se kod primatelja nalaze i prije transplantacije (Slika 5). Ta prethodno formirana antitijela mogu biti prirodna IgM antitijela, specifična za antigene krvnih grupa ili mogu biti antitijela specifična za alogene HLA molekule, koja nastaju zbog izlaganja alogenim stanicama uslijed transfuzija krvi, trudnoće ili prethodnog presađivanja organa. Ubrzo nakon presađivanja, antitijela počinju proces vezivanja za antigene krvnožilnog endotela organa, započinju aktivaciju sistema komplementa i koagulaciju, te tako nastaje oštećenje endotela i stvaranje trombina. Hiperakutno odbacivanje se događa rijetko jer postoji mnogi niz provjera koje se odrađuju prije same transplantacije u svrhu pronalaska optimalnog mogućeg primatelja za ponuđeni organ (*cross-match* i podudarnost alela sustava HLA primatelj –darivatelj). (7)

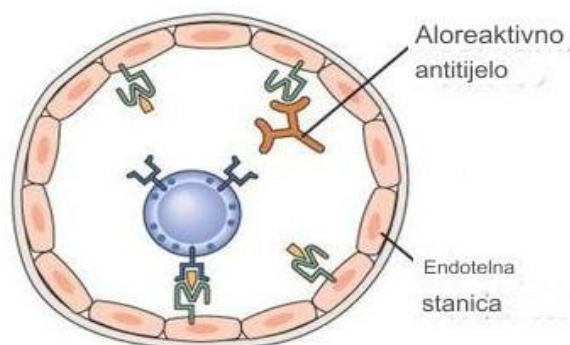


Slika 5 – Hiperakutno odbacivanje
(izvor: <https://slideplayer.gr/slide/15142602/>)

1.3.2. Akutno odbacivanje

Za razliku od hiperakutnog, akutno se odbacivanje javlja nakon nekoliko dana ili tjedana i glavni je razlog za preuranjeno odbacivanje transplantata. Akutno odbacivanje posredovano je T-limfocitima i protutijelima specifičnim za aloantigene transplantata (Slika 6).

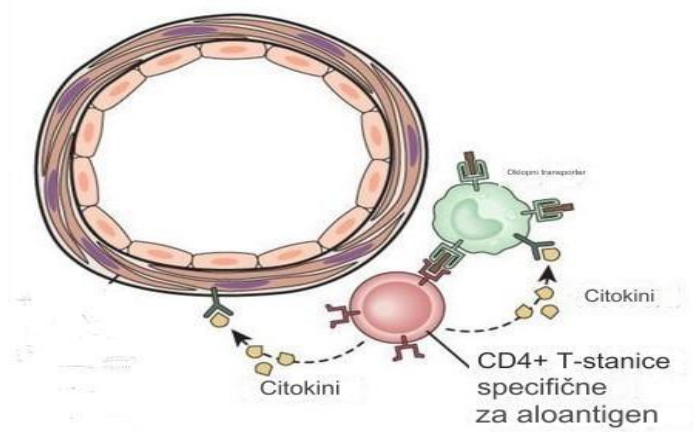
T-limfociti mogu biti CD8⁺ stanice koji direktno uništavaju stanice organa, ili CD4⁺ stanice koje luče citokine i induciraju upalu koja uništava transplantat. Antitijela posebno doprinose vaskularnoj komponenti akutnog odbacivanja, reagiraju sa krvnim žilama te dolazi do aktivacije komplementa klasičnim putem, a samim time i do oštećenja krvnih žila. Suvremena imunosupresivna terapija uglavnom je osmišljena za sprečavanje i smanjivanje akutnog odbacivanja blokiranjem aktivacije aloreaktivnih T-stanica.(7)



Slika 6- Akutno odbacivanje
(izvor: <https://slideplayer.gr/slide/15142602/>)

1.3.3. Kronično odbacivanje

Kronično odbacivanje predstavlja dugotrajan proces oštećenja transplantata koji se događa mjesecima ili godinama poslije transplantacije te dovodi do progresivnog oštećenja organa. Glavne karakteristike kroničnog odbacivanja su fibroza i sužavanje krvnih žila odnosno proces koji se zove ateroskleroza transplantata. Smatra se da glavnu ulogu u ovome patološkom procesu čine T limfociti koji reagiraju protiv antigena transplantata koji potiču sazrijevanje i diferencijaciju fibroblasta (Slika 7). Aloantitijela također doprinose kroničnom odbacivanju. Iako terapija za sprečavanje ili smanjenje akutnog odbacivanja stalno napreduje, što dovodi do boljeg preživljavanja transplantata, kronično odbacivanje ne reagira uvijek na provođenje terapija i to postaje glavni razlog odbacivanja transplantata. (7)

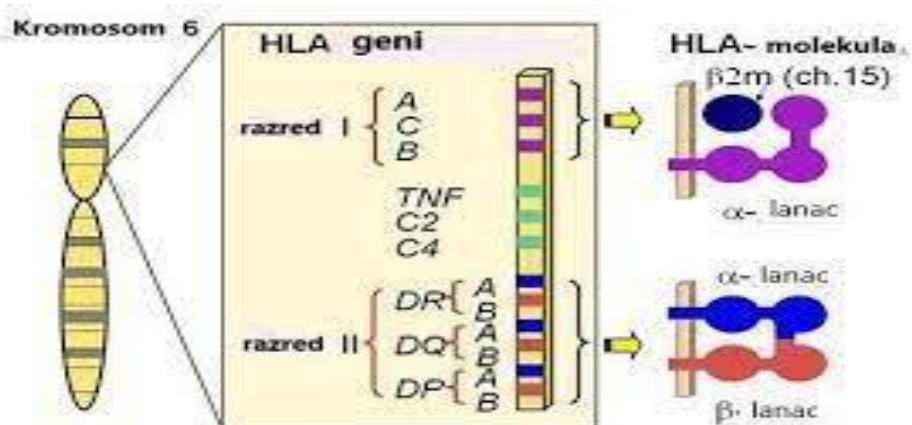


Slika 7 – Kronično odbacivanje
(izvor: <https://slideplayer.gr/slide/15142602/>)

1.4. HLA SUSTAV TKIVNE SNOŠLJIVOSTI

Molekule koje se nalaze na samoj površini stanica koje su kodirane velikom zajednicom gena čiji je zadatak kontroliranje glavnog dijela imunološkog sustava svih kralježaka predstavljaju glavni kompleks tkivne podudarnosti (MHC-*major histocompatibility complex*). Zajedno sa leukocitima i drugim stanicama koje igraju bitnu ulogu u obrani organizma ove molekule su temelj imunskog odgovora organizma.

MHC sustav u čovjeka u literaturi se označava kao HLA sustav (*engl. human leukocyte antigen*). HLA molekule možemo definirati kao proteine koji se nalaze na membrani antigen prezentirajućih stanica koji sudjeluju u predočavanju peptidnih antigena T- limfocitima. Upravo prepoznavanje vlastitih i stranih peptida, koje se odvija u sklopu samih molekula HLA, predstavlja najvažniji faktor u ishodu transplantacije organa i tkiva. (8)



Slika 8 – Prikaz kromosoma 6

(izvor: <https://repozitorij.mefos.hr/islandora/object/mefos%3A860/datastream/PDF/view>)

Molekule sustava HLA koje su kodirane genima nalaze se na kratkom kraku kromosoma 6, točnije na području regije 6p21 (slika 8). Regija HLA koja se nalazi na 6 kromosomu podijeljena je na 3 regije (regije HLA razreda I, razreda II i razreda III).

Telomerično smještena regija HLA razred I sastoji se od dvije skupine gena – „klasičnih“ i „ne-klasičnih“. Geni lokusa HLA-A,-B,-C pripadaju grupi klasičnih gena razreda I, a molekule kodirane ovom skupinom gena nalaze se izražene na

gotovo svim stanicama sa jezgrom, sa malim iznimkama. Zbog svoje ograničene tkivne rasprostranjenosti, puno manjeg polimorfizma, te svoje specifične funkcije geni lokusa HLA-E, -F i -G pripadaju skupini neklasičnih gena razreda I sustava HLA. Geni lokusa HLA-E izražavaju najmanji polimorfizam unutar skupine neklasičnih gena. Za razliku od njih geni lokusa HLA-F imaju nešto veći broj do sada otkrivenih alela, ali je ekspresija njihovih molekula usko ograničena na tkiva kao što su koža, jetra, slezena i mjehur. Najveći polimorfizam među neklasičnim genima pokazuju geni lokusa HLA-G koji također imaju najspecifičniju tkivnu ekspresiju molekula koja je najčešće ograničena na trofoblaste. U regiji razreda I sustava HLA nalazi se i skupina gena MIC (*MHC class I chain-related gene A*) te neki pseudogeni. (8)

Svaka molekula razreda I sustava HLA sadrži α -lanac (sastoji se od tri ekstracelularne domene i kratkih transmembranskih i citoplazmatskih domena) koji je nekovalentnom vezom povezan sa β -mikroglobulinom, odnosno proteinom koji ne pripada MHC lokusu. (8)

Regija razreda II nalazi se u području bliže centromeri kromosoma i sadrži 6 genskih skupina: HLA-DM, -DN, -DO, -DP, -DQ, -DR. U skupinu klasičnih gena HLA razreda II spadaju geni HLA-DP, -DQ i -DR čija je osnovna uloga kodiranje molekula razreda II koje su lokalizirane na membrani APS (antigen predočnih stanica).

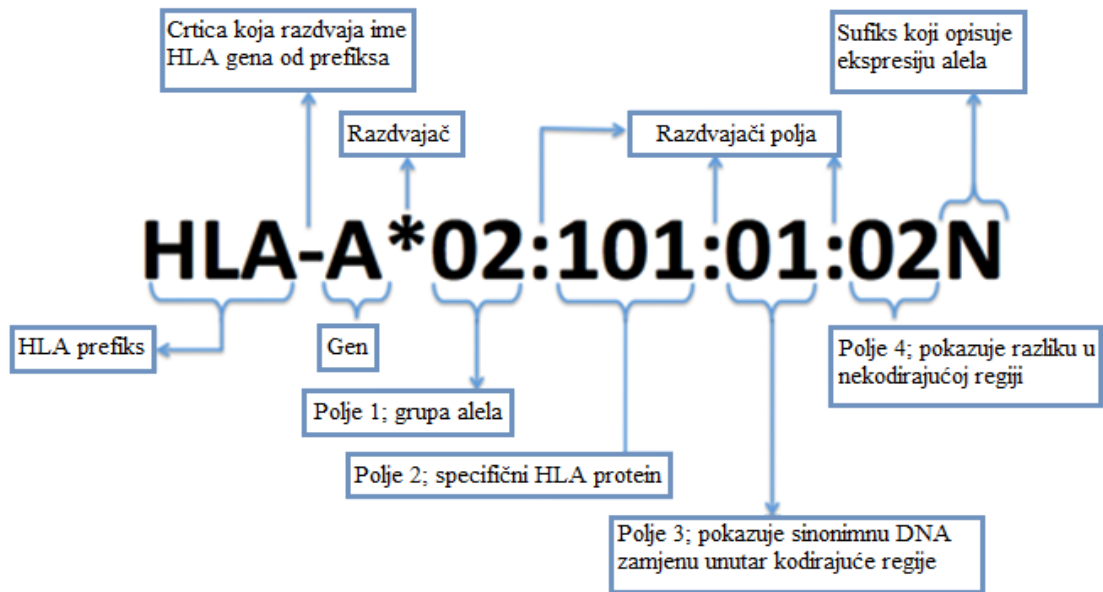
Ne-klasične skupine gena u koju spadaju lokusi HLA-DM, -DN, -DO imaju glavnu zadaću u vidu kodiranja molekula koje se najčešće nalaze u citoplazmi ali ne i na njihovoj površini te služe za funkcionalno vezanje peptidnih ulomaka sa drugim molekulama HLA razreda II. (8)

Svaka molekula II razreda sustava HLA sastoji se od dva transmembranska lanca, koji se nazivaju α i β . Svaki lanac se sastoji od dvije ekstracelularne domene, transmembranske i citoplazmatske regije. (8)

1.4.1. Nomenklatura gena i antigena HLA sustava

Odbor koji je sastavljen u svrhu nazivlja HLA sustava te se nalazi pod ingerencijom Svjetske zdravstvene organizacije (*engl. The WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System*) osnovan je 1968.godine. Njegovu osnovnu funkciju predstavlja dodjeljivanje odgovarajuće službene nomenklature za svaki novootkriveni gen ili antigen sustava HLA. Svaka novootkrivena sekvenca mora proći strogi postupak analize i kontrole koji obuhvaća različite metode kojima se dokazuju genetske komponente u visokoj i niskoj razlučivosti. Nove do sada ne otkrivene sekvence se skupa sa svojim imenom objavljuju u svjetskoj bazi podataka poznati HLA alela - IPD-IMGT/HLA Database.

Svaki gen koji se nalazi u HLA sustavu posjeduje svoj jedinstveni broj koji je sastavljen od četiri seta znamenki koji su odvojeni dvotočkom. Svaki je alel posebno označen sa četiri broja. Sustav u kojem se nalazi pojedini gen je označen prefiksom HLA. Naziv gena HLA se zatim odvaja crtom od prefiksa. Dalje slijede slova/slovo koja predstavljaju ime gena (npr. A, B, DR), te razdvajač u obliku zvjezdice čija je uloga razdvajanje gena od polja koji u obliku broja opisuju alele. Polja su podijeljena u četiri dijela. Prvo polje označava skupinu koja se dobije metodom niske rezolucije i u visokom postotku odgovara specifičnom serološkom antigenu. Nakon razdvajača prvog i drugog polja u obliku dvotočke nalazi se drugo polje u kojem se nalaze brojevi koji opisuju podtip alela, odnosno specifični HLA protein koji se dobije metodom visoke rezolucije. Razlike između pojedinih alela koje su prikazane u trećoj i četvrtoj skupini gena koji se mogu nalaziti u kodirajućoj ili nekodirajućoj regiji uzrokovane se mutacijama (slika 9). Kako bi se određivali sljedovi DNA podtipovi su se dobivali redom. Određeni aleli koji pokazuju ekspresiju tog alela imaju sufiks. (13)



Slika 9 - Nomenklatura sustava HLA
 (izvor: <https://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html> (13))

1.4.2. Transplantacijski antigeni

Skupine gena koje se sastoje od antigena i alela razreda I i razreda II sustava HLA te koje kao glavne karakteristike imaju poligeniju i polimorfizam spadaju u najistaknutije transplantacijske antigene.

Kada slični geni kodiraju proteinske proizvode koji imaju istu funkciju to možemo definirati kao poligeniju. Genski lokusi HLA-A, -B, -C pripadaju razredu I sustava HLA čija je glavna zadaća kodiranje izoformi molekula koje možemo pronaći na svim stanicama sa jezgrom i trombocitima. Posebno veliku ekspresiju nalazimo na antigen-predodnim stanicama, uključujući dendritične stanice, limfocite B i makrofage te na krvnožilnim endotelnim stanicama. U razred II sustava HLA ubrajaju se genski lokusi: HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ koji su zaduženi za kodiranje izoformi HLA II molekula. Molekule razreda II izražene su pretežito u antigen predodnim stanicama, odnosno na limfocitima B, makrofagima, dendritičnim stanicama i na timusnim epitelnim stanicama. Nakon izlaganja te djelovanja protuupalnih citokina kao što su interferoni gama ($\text{IFN-}\gamma$) i $\text{TNF-}\alpha$ (*tumor necrosis factor α*), epitelne i vaskularno endotelne stanice mogu izražavati HLA II molekule (7).

Svojstvo da se na svakom od spomenutih genskih lokusa može pojaviti jedan od većeg broja različitih alela koje možemo pronaći u ljudskoj populaciji naziva se polimorfizam. Do danas je identificirano više od 36 000 HLA-alela, a od toga preko 8 000 samo na HLA-A lokusu. Stoga postoji mala vjerojatnost da dvije nesrodne osobe imaju isti set HLA-molekula. (7)

Razvijanjem, odnosno evolucijom HLA molekule postale su izrazito polimorfne (velika promjenjivost u aminokiselinskoj sekvenci peptida) što dovodi do njihove mogućnosti vezanja velikog broja peptida mikroorganizama i samim tim pružanje imunog odgovora protiv većine infekcija. Upravo je ova osobnost uzrok jake transplantacijske aloreaktivnosti jer HLA molekule pored uloge u prezentiranju antigena imaju i zadaću pokretanja imunog odgovora kod primateljevog presatka. (7)

Iako su molekule sustava HLA glavni antigeni koji stimuliraju odbacivanja transplantata, drugi polimorfni proteini također mogu sudjelovati u odbacivanju. Antigeni koji induciraju odbacivanje transplantata, a ne pripadaju MHC sistemu (non-MHC antigeni), nazivaju se minorni antigeni tkivne podudarnosti (*engl. minor histocompatibility antigens*) i većina njih su alelne forme normalnih proteina stanica

koje se razlikuju između darivatelja i primatelja. Reakcija odbacivanja koju izazivaju minorni antigeni tkivne podudarnosti obično nije tako jaka kao reakcija protiv stranih MHC molekula. Dvije kliničke situacije u kojima su minorni antigeni značajna meta pri odbacivanju su transfuzija krvi i transplantacija krvotvornih matičnih stanica. (11)

1.4.3. Senzibilizacija

Antigeni sustava HLA koji su stanicama davatelja organa nepodudarni sa HLA antigenima prisutnima u primatelju presatka uzrokuju stvaranje donor specifičnih antitijela (*engl. DSA - Donor Specific Alloantibody*) čija imunološka aktivnost dovodi do poremećaja funkcije presatka i kraćeg vremena preživljavanja organa. Osim prethodne transplantacije, uzrok senzibilizacije mogu biti i prethodne trudnoće i transfuzije krvnih pripravaka. Budući da zbog prisutnosti antitijela u serumu, imunizirani pacijenti dosta duže čekaju na transplantaciju budući im je izbor mogućih darivatelja puno manji. (7)

Pri transplantaciji organa, aloantigeni transplantata se uz pomoć dendritičkih stanica transportiraju u drenirajuće limfne čvorove primatelja organa gdje ih prepoznaju aloreaktivni T-limfociti. Uz predočavanje stranog antigena T-limfocitima, dendritičke stanice također omogućavaju i stimulacijski signal za aktivaciju pomoćničkih T-limfocita, kao i aloreaktivnih citotoksičnih T limfocita (CTL). Na ovaj način aktivirane efektorske T-stanice cirkuliraju nazad ka transplantatu i posreduju reakciji odbacivanja. (7)

Iako se pri odbacivanju organa naglašava uloga T-stanica, odbacivanju također pridonose i antitijela usmjerena na strane antigene. Naime, B-stanice primatelja prepoznaju aloantigene davatelja, obrađuju ih i prikazuju u peptidnom obliku pomoćničkim T-limfocitima (prethodno aktivirani dendritičkim stanicama primatelja koji također predočavaju strane antigene davatelja organa), čime započinje proces produkcije visokoafinitetnih antitijela specifičnih za peptidne antigene presatka. (8)

1.4.4. Imunološka obrada primatelja

Pri imunološkoj obradi primatelja kod pacijenata koji se nalaze na listi čekanja za transplantaciju bubrega uvijek se rade tri osnovna testa: HLA tipizacija, probir (*screening*) antitijela HLA u serumu pacijenta i test autokrižne reakcije. Kako se

Hrvatska od 2007. nalazi u sustavu Eurotransplanta (organizacije za dodjelu i razmjenu organa) koji joj uvelike pomaže pri povećanju broja transplantacija solidnih organa, naravno bubrega, svi pacijenti na listi čekanja obrađuju su prema smjernicama Europske federacije za imunogenetiku (*EFI, European Federation of Immunogenetics*) kao i Nacionalnim smjernicama za obradu i odabir primatelja, Ministarstva zdravlja RH.

1.4.4.1. HLA tipizacija

Po prijavi pacijenta na listu čekanja za transplantaciju bubrega potrebno je pacijentu odrediti alele lokusa HLA-A, HLA-B i HLA-DR te po potrebi HLA-C i HLA-DQ. Antigene i alele lokusa razreda I (HLA-A, -B i -C) moguće je odrediti serološkim i molekularnim metodama, dok je za određivanje lokusa razreda II sustava HLA obavezna molekularna tipizacija. Za HLA tipizaciju pri prijavi na listu čekanja, primatelju se uzimaju dva uzorka krvi u razmaku od deset dana („prva“ i „potvrдна“ tipizacija), te se iz oba uzorka određuju lokusi sustava HLA, obavezno pomoću različitih metoda, u svrhu smanjivanja mogućnosti tehničke pogreške i potvrde točnosti određenih antigena i alela sustava HLA. (10)

Serološka metoda određivanja antigena sustava HLA uključuje test mikrolimfocitotoksičnosti, tj. CDC metodu (*engl. Complement dependent cytotoxicity*). Molekularne metode u rutinskoj upotrebi za određivanje alela sustava HLA su PCR-SSO (*Polymerase chain reaction sequence-specific oligonucleotide*) ili PCR-SSP (*the single specific primer*). Ukoliko je u laboratoriju za tipizaciju tkiva koristi samo jedna molekularna metoda u tom se slučaju za potvrdnu tipizaciju koriste testovi različitih proizvođača. Ukoliko je u pacijenta na nekom od lokusa određen samo jedan alel, radi dokazivanja homozigotnosti potrebno je tipizirati najbliže srodnike pacijenta (roditelje). (10)

1.4.4.2. HLA senzibilizacija - određivanje broja i specifičnosti panel reaktivnih antitijela (% PRA)

Prilikom prijave na listu čekanja, podatke o prethodnim trudnoćama, transfuzijama i transplantacijama pacijenta potrebno je dostaviti u laboratorij za

tipizaciju tkiva. Stupanj imunizacije pacijenta određuje se serološkom metodom i metodama čvrste faze (ELISA(*engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*); Luminex metoda). (16)

Panel limfocita koji se sastoji od pedeset stanica darivatelja krvi koje su opisane poznatim osobinama antigena i alela sustava HLA predstavlja CDC metodu. Broj i učestalost ukazuje na raspodjelu antigena HLA u ispitivanoj populaciji, odnosno postojanost antitijela određene specifičnosti HLA u serumu ukazivati će na pozitivnu reakciju. Broj davatelja organa koji su podložni transplantaciji u općoj populaciji s kojima bi primatelj imao pozitivnu križnu reakciju označava se kao postotak panel reaktivnih antitijela (%PRA). Ukoliko se pronađu senzibilizirani pacijenti određuje se analizom reakcija seruma antigena HLA i pacijenta te se na ovaj način određuje specifičnost antitijela i apsolutno (potpuno) neprihvatljivi antigeni (*engl. Unacceptable Antigen Mismatches; UAM*), čime se znatno ubrzava pretraga potencijalnih darivatelja organa. (10, 16)

Zlatni standard metoda čvrste faze za određivanje HLA antitijela je tzv. Luminex® metoda, koja je značajno osjetljivija od serološkog određivanja prisutnosti HLA antitijela. Probir antitijela Luminex metodom, omogućuje određivanje prisutnosti antitijela razreda I i razreda II, a u većini slučajeva i specifičnost prisutnih antitijela. Rezultat probira izražava se kao % PRA, a u slučaju pozitivnog ishoda navodi se i specifičnost antitijela razreda I (HLA-A, -B, -C) i razreda II (HLA-DR, -DQ, -DP). (16)

Pored CDC metode pomoću koje dobijemo osobnosti HLA antitijela koje su kontraindikacija za uspješnu transplantaciju imamo i metodu čvrste faze kojom dokazujemo osobnosti postojanih antitijela koje najčešće predstavljaju faktore povišenog imunskog rizika ali ne potpuno neprihvatljive antigene. Krajnji broj i upis antigena koji nisu prihvatljivi uvijek se odredi u dogovoru imunologa i odgovarajućeg liječnika uzimajući u obzir sve parametre. (10, 16)

Redovni probir anti-HLA antitijela pacijenata na listi čekanja vrši se 4x godišnje (svaka tri mjeseca) u EFI akreditiranim laboratorijima kombinacijom serološke metode i metode čvrste faze dostupnih u laboratoriju. Uz ispravne i aktualizirane podatke o mogućim senzibilizirajućim događajima, rezultati redovnih probira ključni su pri

definiranju imunološkog statusa primatelja i omogućavaju optimalnu pretragu za potencijalnim donorom organa. Obzirom na moguće senzibilizirajuće događaje, uz rezultate redovnog probira (prisutnost specifičnih HLA antitijela), kao neprihvatljivi antigeni u status primatelja mogu se navesti nepodudarni aleli darivatelja organa (u slučaju prethodno transplantiranog pacijenta), nepodudarni aleli djeteta i/ili oca djeteta (trudnoća) te nepodudarni aleli darivatelja krvnog pripravka (u slučaju prethodnih transfuzija). (10, 16)

Bolesnicima koji su visoko senzibilizirani dodjeljuje se lista neprihvatljivih antigena koja je veća nego u nesenzibiliziranih pacijenata, te su takvi bolesnici vrlo često zbog nemogućnosti pronalaska kompatibilnog darivatelja organa dugo na listama čekanja i na dijalizi. (10, 16)

1.4.4.3. Test autokrižne reakcije

Osim tipizacije HLA i probira HLA antitijela, dodatani test prije prijave na listu čekanja za transplantaciju je i test autokrižne reakcije (*engl. auto cross-match*). Test se izvodi serološkom CDC metodom (citotoksičnost ovisna o komplementu) seruma pacijenta s vlastitim limfocitima. Pozitivan ishod je znak prisutnosti anti-HLA antitijela na vlastite HLA antigene i nužno ga je uzeti u obzir kao rizik od mogućeg lažno pozitivnog rezultata u testu križne reakcije sa donorom organa. (10)

1.4.4.4. Test križne reakcije (Cross-match)

Terasakijeva studija te mnoge druge studije proučile su i dokazale usku vezu između donor-specifičnih limfocitotoksičnih IgG antitijela (DSA) u serumu primatelja kod kojeg je došlo do hiperakutnog odbacivanja organa. Posljednji test provjere prisutnosti DSA-a prije transplantacije bubrega je test križne reakcije metodom CDC. Dokazana prisutnost antitijela HLA koja su usmjerena na antigene HLA darivatelja predstavlja apsolutnu kontraindikaciju za uspješno transplantiran bubreg. (14, 17)

2. CILJ RADA

Kada govorimo o ishodu i uspješnosti transplantacije bubrega, podudarnost antigena i alela sustava HLA između darivatelja i primatelja HLA predstavlja važan čimbenik. Govoreći o uspješnosti nošenja transplantata bubrega, svakako moramo istaknuti važnost senzibilizacije, odnosno otkrivanja prisutnosti antitijela HLA. Osnovni dio imunogenetske obrade primatelja prije transplantacije čini određivanje prisutnosti antitijela HLA. Pored serološke CDC metode - standardne metode koja se godinama koristi za probir HLA antitijela u serumu pacijenta, došlo je do razvoja novih tehnika poput Luminex metode kojom je postignuta još veća osjetljivost otkrivanja antitijela HLA.

U našem radu testirali smo serume troje pacijenta koja se nalaze na listi čekanja za bubreg kako bismo provjerili prisutnost ili odsustvo antitijela u serumima serološkom CDC metodom.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

U Laboratorij za tipizaciju tkiva Zavoda za transfuzijsku medicinu KBC Split dostavljeni su uzorci seruma pacijenata na listi čekanja za transplantaciju bubrega iz dijalitičkog centra KBC Split. U sklopu redovnog tromjesečnog *screeninga* seruma pacijenata na listi čekanja, pripadajući dijalitički centri svim pacijentima uzimaju uzorak pune krvi u biokemijskim spremnicima (crveni ili žuti čep, slika 10), iz kojih se centrifugiranjem na 2300 o/min 5-10 minuta odvaja serum pacijenta od krvnih stanica.



Slika 10 - Uzorak seruma bolesnika (izvor: researchgate.net)

3.2. Metode

Za utvrđivanje panel reaktivnih antitijela (% PRA) koristili smo test mikrolimfocitotoksičnosti. (19)

Specifična anti-HLA antitijela kod pacijenata koje smo ispitivali dobili smo koristeći panel limfocita koji se sastoji od 50 osoba koje smo prethodno tipizirali, odnosno prethodno odredili HLA antigene. (19)

Izdvajanje limfocita za panel limfocita izvodi se separacijom na gradijentu gustoće iz uzoraka heparinizirane pune krvi te niza koraka ispiranja stanica fiziološkom otopinom, nakon čega se talog limfocita, resuspendiran u krvnoj plazmi uzorka, uz dodatak krioprezervansa (DMSO – dimetil sufoksid) zamrzava na -80°C ili u tekućem dušiku. Na

ovaj način zamrznuti limfociti, po potrebi se odmrzavaju, te nakon niza ispiranja i provjere vijabilnosti i koncentracije stanica pomoću tripanskog modrila na Burker-Turkovom komoricama koriste se kao panel limfocita za probir HLA antitijela testom mikrolimfocitotoksičnosti.

Tablica 1 - Panel limfocita

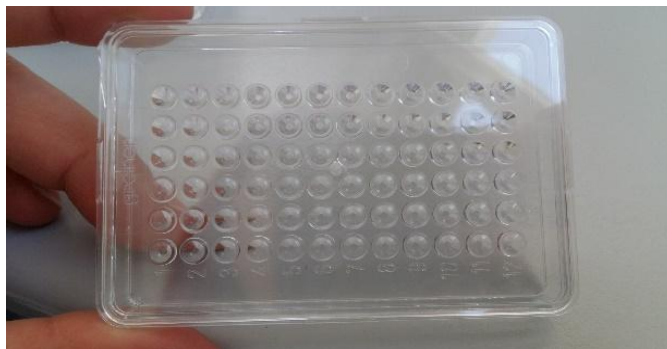
MATIČNI BROJ	ANTIGENI SUSTAVA HLA LOKUSA HLA-A,-B			
	HLA-A	HLA-A	HLA-B	HLA-B
01	1	26(10)	8	38(16)
02	2	29 (19)	8	51(5)
03	3	11	44(12)	57(17)
04	2	24(9)	35	49(21)
05	68(28)	31(19)	53	39(16)
06	32(19)	33(19)	13	14
07	2	11	13	35
08	1	32(19)	52(5)	58(17)
09	2	31(19)	27	41
10	2	68(28)	63(15)	35
11	3	68(28)	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)	49 (21)
19	3	32(19)	50(21)	63(15)
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	11	35	39(16)
25	24(9)	69 (28)	45 (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	52(5)
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	11	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	11	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

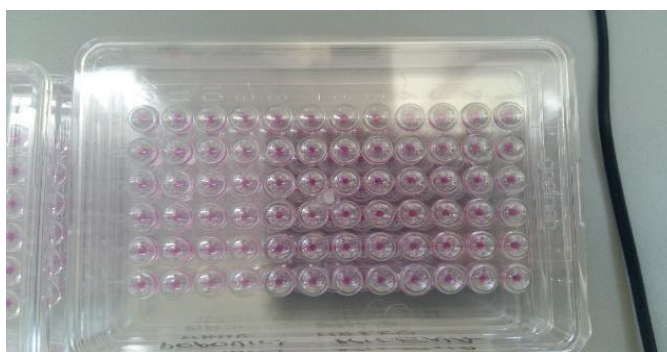
3.2.1. Test mikrolimfocitotoksičnosti

Test mikrolimfocitotoksičnosti, odnosno citotoksičnost ovisna o komplementu (CDC) najčešće je upotrebljavana metoda za određivanje antitijela HLA. U ovoj metodi, još zvanoj 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 i svaki je zastupljen bar dva puta. U testu se primjenjuje panel limfocita zbog čega se ovako određena antitijela HLA nazivaju panel reaktivnim protutijelima (PRA). (17)

Test se temelji na citotoksičnoj reakciji poznatih antigena HLA na membranama limfocita s protutijelima HLA u serumu ispitanika koja se izvodi u Terasakijevim pločicama (slike 12 i 13). Nakon što smo rasporedili serume naših 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 kuničjeg seruma, dodatna inkubacija 90 minuta te istresanje pločice. (17)

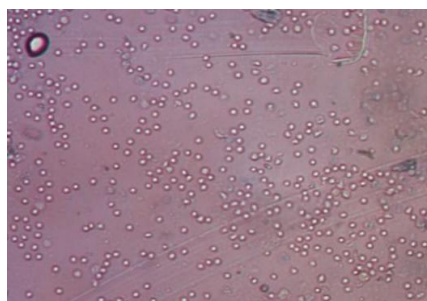


Slika 12 - Prazne Terasakijeve pločice
(snimljeno u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split)

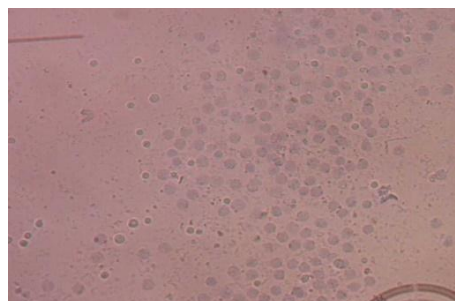


Slika 13 - Pločice sa suspenzijom limfocita
(snimljeno u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split)

Kod citotoksične reakcije antigen-antitijelo, kunićji serum će aktivirati komponente komplekta te će doći do oštećenja membrane limfocita. Gdje je došlo do citotoksične reakcije, dolazi do pucanja membrane, tripansko modriilo prodire u stanice koje se boje u plavo. Zbroj pozitivne reakcija u odnosu na ukupan broj uzoraka u panelu predstavljaju postotak panel reaktivnih antitijela (%PRA). Ukoliko ne dolazi do stvaranja kompleksa antigen-protutijelo, izostaje i liza stanica, govorimo o negativnoj reakciji, odnosno u serumu pacijenta nema antitijela HLA protiv staničnih antigena (slike 14.1 i 14.2).



Slika 14.1- Negativna CDC reakcija



Slika 14.2 - Pozitivna CDC reakcija

U pozitivnim serumima možemo odrediti da li se radi o protutijelima HLA razreda 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 razaranja pentamerske strukture IgM molekule, u slučaju njihove prisutnosti, u toj pločici nećemo imati reakciju. Za razliku od toga, kod prisutnosti IgG antitijela, imamo reakciju u obje pločice.

Pod svjetlosnim mikroskopom očitavamo rezultate skrininga seruma 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 2) (4,5).

Tablica 2 - 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)

4. REZULTATI

U našem radu smo ispitivali serume pacijenata koji se nalaze na listi čekanja za bubreg (MPB-mogući primatelj bubrega) kako bismo mogli utvrditi eventualnu prisutnost panel reaktivnih antitijela (PRA), čija je odsutnost neophodna za uspjeh nošenja presatka. (19)

Jedan od ispitanika bio je pacijent koji je transplantiran, ali nakon godinu dana nošenja presatka došlo je do odbacivanja transplantiranog kadaveričnog bubrega. Pacijent je ponovo počeo s hemodijalizom i vraćen je na listu čekanja.

Druga dva ispitivana seruma su serumi dvoje pacijenta koji se nalaze na listi čekanja za bubreg koji su došli na redoviti skrining koji se radi svaka tri mjeseca kako bismo mogli pratiti % panel reaktivnih antitijela u serumima naših pacijenata.

Za utvrđivanje panel reaktivnih antitijela (% PRA) koristili smo test mikrolimfocitotoksičnosti, odnosno metodu citotoksičnost ovisna o komplementu (CDC) koja se temelji na citotoksičnoj reakciji antigen-antitijelo. Za specifičnost antiseruma HLA ispitanika koristili smo panel limfocita od 50 prethodno tipiziranih osoba serološkim ili molekularnim metodama (PCR-SSO, PCR-SSP). (19)

Datum pripreme tipizacijske pločice: 17.03.2023.		Izvodilo: <i>95</i>							
Metoda: Complement-dependent cytotoxicity (CDC)									
Pacijent (barkod): 21230536									
UKUPNA PRA: <i>24/24</i>									
TIPIZACIJSKI LISTIĆ BR. #1									
DATUM	MBR	RED	PK	AB+	MEM	SERUM (1 µL)	SERUM (1 µL)	SERUM (1/2 µL)	SPECIFIC NOSTI
2123 0500	1	8				8	8	8	A 1, 2 B 18,39
2123 0501	2	8				8	8	8	A 1, 2 B 18,57
2123 0502	3	8				8	8	8	A 2,32 B 7,35
2123 0504	4	8				8	8	8	A 1,24 B 8,18
2123 0505	5	8				8	8	8	A 2,3 B 35,-
2123 0506	6	8				8	8	8	A 3,26 B 18,39
2123 0509	7	8				8	8	8	A 1,28 B 8,53
2123 0510	8	8				8	8	8	A 1,26 B 8,51
2123 0511	9	8				8	8	8	A 1,32 B 8,61
2123 0512	10	8				8	8	8	A 3,31 B 18,39
2123 0515	11	8				8	8	8	A 2,- B 35,39
2123 0516	12	8				8	8	8	A 26,- B 38,44
PRA				<i>12/12</i>					

Reagensi									
Rabbit Complement	LOT: HKL1022								
MEM Alpha Medium	LOT: UM01AY								
0,3% Trypan Blau	LOT:								
TIPIZACIJSKI LISTIĆ BR. #2									
DATUM	MBR	RED	PK	AB+	MEM	SERUM (1 µL)	SERUM (1 µL)	SERUM (1/2 µL)	SPECIFIC NOSTI
2123 0486	1	8				8	8	8	A 24,32 B 13,44
2123 0487	2	8				8	8	8	A 2,25 B 27,56
2123 0489	3	8				8	8	8	A 26,33 B 28,63
2123 0488	4	8				8	8	8	A 2,24 B 18,61
2123 0490	5	8				8	8	8	A 1,- B 8,35
2123 0491	6	8				8	8	8	A 1,2 B 7,8
2123 0492	7	8				8	8	8	A 2,- B 27,51
2123 0477	8	8				8	8	8	A 2,3 B 35,57
2123 0478	9	8				8	8	8	A 1,2 B 35,-
2123 0479	10	8				8	8	8	A 3,24 B 27,35
2123 0480	11	8				8	8	8	A 1,24 B 8,13
2123 0480	12	8				8	8	8	A 1,2 B 8,57
PRA				<i>12/12</i>					

Slika 15 – Rezultat skrininga pacijenta broj 1 koji je primao transfuzije (test izveden u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split)

U serumu pacijenta broj 1 (slika 15) došlo je do pozitivne reakcije sa svim limfocitima iz panela (100% PRA). Uvidom u podatke pacijenta (pacijentice) broj 1 saznali smo da se radi o pacijentici koja je prije početka dijalize imala tri trudnoće, a od stavljanja na listu čekanja za bubreg, zbog anemije, ukazala se potreba za transfuzijama. (15)

Pacijent broj 2 (slika 16) je prije četiri godine dobio kadaverični bubreg, kojeg je u međuvremenu odbacio te je ponovo vraćen na dijalizu i stavljen na listu čekanja za bubreg. Podudarnost primatelja i darivatelja bila je 6/10. Iz dobivenih rezultat skrininga možemo vidjeti da se pacijent specifično senzibilizirao na antigene A2 i A24(9). Dobiveni rezultati govore u prilog nepodudarnosti primatelja i kadaveričnog darivatelja za antigene lokusa HLA-A.

Datum pripreme tipizacijske pločice: 29.09.2023.		Izvodio: 70							
Metoda: Complement-dependent cytotoxicity (CDC)									
Pacijent (barkod): 21231834									
UKUPNA PRA: 18/24									
TIPIZACIJSKI LISTIĆ BR. #1									
DATUM	MBR	RED	PK	AB+	MEM	SERUM (1 µL)	SERUM (1 µL)	SERUM (1/2 µL)	SPECIFIČNOSTI
2123	1827	1	8			8	8	8	A 2,26 B 27,60
2123	1828	2	8			8	8	6	A 1,2 B 8,18
2123	1829	3	8						A 1,3 B 7,8
2123	1833	4	8			8	8	8	A 28,30 B 13,60
2123	1836	5	8			8	8	8	A 2,24 B 44,7
2123	1837	6	8						A 1,- B 8,35
2123	1839	7	8			8	8	8	A 2,- B 51,57
2123	1842	8	8						A 1,3 B 35,50
2123	1844	9	8			8	8	8	A 2,11 B 27,56
2123	1845	10	8			8	8	8	A 3,24 B 8,13
2123	1846	11	8						A 32,- B 51,-
2123	1847	12	8			8	8	8	A 2,32 B 35,-
PRA				8/12					

Datum pripreme tipizacijske pločice: 29.09.2023.		Izvodio: 70							
Metoda: Complement-dependent cytotoxicity (CDC)									
Pacijent (barkod): 21231834									
UKUPNA PRA: 18/24									
TIPIZACIJSKI LISTIĆ BR. #2									
DATUM	MBR	RED	PK	AB+	MEM	SERUM (1 µL)	SERUM (1 µL)	SERUM (1/2 µL)	SPECIFIČNOSTI
2123	1848	1	8			8	8	8	A 2,26 B 61,-
2123	1849	2	8			8	8	6	A 1,32 B 57,61
2123	0066	3	8			8	8	8	A 1,2 B 35,-
2123	1851	4	8			6	8	2	A 31,33 B 58,63
2123	1853	5	8						A 3,- B 7,-
2123	1854	6	8			8	8	8	A 2,11 B 35,-
2123	1855	7	8			8	8	8	A 2,31 B 27,51
2123	14,182	8	8			8	8	8	A 2,3 B 14,18
2123	1859	9	8						A 3,11 B 18,52
2123	1860	10	8			8	8	8	A 2,33 B 14,18
2123	1806	11	8			8	8	8	A 11,24 B 8,60
2123	1821	12	8			8	8	8	A 2,33 B 14,44
PRA				10/12					

Slika 16 – Rezultat skrininga pacijenta broj 2 koji je primao transfuzije (test izveden u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split)

Pacijent broj 3 (slika 17) je imao 0 %PRA. Pacijent je dobro podnosio dijalizu, nije imao potrebe za transfuzijama te nije došlo do senzibilizirajućih događaja.

Datum pripreme tipizacijske pločice: 22.09.2023.		Izvodio: 70							
Metoda: Complement-dependent cytotoxicity (CDC)									
Pacijent (barkod): 22230064									
UKUPNA PRA: 0/12									
TIPIZACIJSKI LISTIĆ BR. #1									
DATUM	MBR	RED	PK	AB+	MEM	SERUM (1 µL)	SERUM (1 µL)	SERUM (1/2 µL)	SPECIFIČNOSTI
2123	1741	1	8						A 2,29 B 44,57
2123	1742	2	8						A 2,- B 35,61
2223	0063	3	8						A 3,11 B 27,62
2123	1743	4	8						A 2,25 B 18,44
2123	1745	5	8						A 1,- B 18,50
2123	1748	6	8						A 11,28 B 44,51
2123	1718	7	8						A 33,- B 14,-
2123	1719	8	8						A 3,11 B 35,60
2123	1720	9	8						A 1,2 B 8,51
2123	1721	10	8						A 2,24 B 18,-
2123	1722	11	8						A 11,32 B 27,62
2123	1723	12	8						A 2,26 B 8,27
PRA				0/12					

Datum pripreme tipizacijske pločice: 22.09.2023.		Izvodio: 70							
Metoda: Complement-dependent cytotoxicity (CDC)									
Pacijent (barkod): 22230064									
UKUPNA PRA: 0/12									
TIPIZACIJSKI LISTIĆ BR. #2									
DATUM	MBR	RED	PK	AB+	MEM	SERUM (1 µL)	SERUM (1 µL)	SERUM (1/2 µL)	SPECIFIČNOSTI
2123	1769	1	8						A 2,25 B 27,-
2123	1770	2	8						A 1,3 B 8,51
2123	1772	3	8						A 11,24 B 8,35
2123	1773	4	8						A 1,24 B 8,-
2123	1777	5	8						A 1,2 B 8,56
2123	1778	6	8						A 2,- B 8,45
2123	1779	7	8						A 11,29 B 7,44
2123	1780	8	8						A 2,28 B 50,51
2123	1781	9	8						A 2,24 B 44,50
2123	1783	10	8						A 3,32 B 39,60
2123	1786	11	8						A 1,2 B 8,51
2123	1787	12	8						A 2,25 B 18,27
PRA				0/12					

Slika 17 – Rezultat skrininga pacijenta koji nije imao potrebe za primanjem transfuzija (test izveden u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split)

5. RASPRAVA

Prilikom pripreme i ispitivanja pacijenata koji čekaju na transplantaciju bubrega uvijek se rade i imunološka ispitivanja podobnosti transplantacije. Kada govorimo o imunološkim ispitivanjima podrazumijevamo HLA tipizaciju primatelja i donora, bez koje je nemoguća transplantacija bubrega kao i ispitivanje reakcije kod primatelja i davatelja MM (*missmatch*) i CM (*crossmatch*) kao i ispitivanje moguće prisutnosti antitijela na HLA antigene donora tj. prisutnost donor specifičnih antitijela (DSA). Podjela pacijenata u odnosu na imunološki rizik je na: nizak imunološki rizik, povećan imunološki rizik i visok imunološki rizik. Kad govorimo o imunološkom riziku mislimo na pacijente sa niskim imunološkim rizikom od odbacivanja bubrega nakon transplantacije i tu spadaju oni kod kojih je nivo panel reaktivnih antitijela (PRA) manji od 5%, koji nisu imali prethodne transplantacije, kao i pacijente koji nisu primali transfuzije krvnim derivatima u posljednjih šest mjeseci pred transplantaciju. U grupu povećanog imunološkog rizika spadaju pacijenti kod kojih je PRA 6-20%. U tu skupinu spadaju pacijenti koji su prethodno imali jednu ili više transplantacija bubrega, ili su primali i transfuzije krvnih derivata u periodu šest mjeseci prije transplantacije (dovoljna je prisutnost jednog od pobrojanih kriterija). U pacijente sa visokim imunološkim rizikom spadaju oni koji: imaju PRA preko 20%, ili gubitak prethodno transplantiranog bubrega zbog epizode odbacivanja posredovanog antitijelima, ili ukoliko se radi o transplantaciji bubrega kod nepodudarnih krvnih grupa donora i primatelja.

U ovom radu ispitivali smo serume tri pacijenta s liste čekanja za transplantaciju bubrega dijalitičkog centra KBC-a Split. Pacijentima je određivana prisutnost, odnosno odsustvo antitijela serološkom metodom mikrolimfocitotoksičnosti. Nakon očitavanja reakcije pod svjetlosnim mikroskopom i ocjenjivanja intenziteta, uslijedila je analiza pacijenata za listu čekanja.

Naši rezultati su pokazali da je **pacijent broj 1** reagirao sa svim osobama na skriningu (100%PRA). Dakle radi se o visoko senzibiliziranom pacijentu. Visoko senzibilizirani 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. Uvidom u podatke pacijenta (pacijentice) broj 1 saznali smo da se radi o pacijentici koja je prije početka dijalize imala tri trudnoće, a od stavljanja na listu čekanja za bubreg, zbog anemije, ukazala se potreba za transfuzijama.

Kod **pacijenta pod rednim brojem 2** kod kojega je utvrđena senzibilizacija, analizom seruma otkrivena je specifičnost za antigen HLA-A2 i HLA-A24 (9).

Upravo je otkrivanje specifičnosti od neizmjerne važnosti jer predstavljaju potpuno neprihvatljive antigene za primatelja organa pa tako pacijent iz ispitivane skupine s pozitivnim skriningom od 16% senzibilizacije, ni u kojem slučaju ne smije primiti organ darivatelja kojemu su tipizacijom određeni antigeni HLA-A2 i HLA-A24 (9).

Kod **pacijenta broj 3** nakon provedene analize skrininga nismo otkrili prisutnost panel reaktivnih antitijela (PRA 0%). Pacijent je dobro podnosio dijalizu, nije imao potrebe za transfuzijama te nije došlo do senzibilizirajućih događaja. S obzirom na negativan nalaz skrininga i pomno provedene nefrološke obrade pacijenta, mogući primatelj bubrega (MPB) je na listu čekanja za bubreg stavljen u T status (nema imunoloških i nefroloških kontraindikacija za transplantaciju).

6. ZAKLJUČAK

1. Transplantacija bubrega je socijalno, ekonomski, medicinski i psihološki opravdan način terapije bolesnika s terminalnim zatajenjem bubrega
2. HLA aloimunizacija primatelja predstavlja jedan od najznačajnijih imunih čimbenika koji utječu na ishod transplantacije bubrega
3. Pri prijavi na listu čekanja tipizacijskom laboratoriju neophodni su podatci o potencijalno imunizirajućim događajima - prethodnim trudnoćama, transplantacijama i transfuzijama pacijenta.
4. Stupanj imunizacije pacijenta određuje se serološkom metodom i metodama čvrste faze (ELISA; Luminex metoda)
5. Probir (screening) seruma pacijenata na listi čekanja za bubreg radi se četiri puta godišnje -svaka tri mjeseca se ispituje da li su se pacijenti u međuvremenu senzibilizirali na antigene sustava HLA.
6. Određivanje %PRA daje nam uvid u postotak darivatelja koji na panelu limfocita reagiraju pozitivno s primateljevim serumom.
7. Uz ispravne i aktualizirane podatke o mogućim senzibilizirajućim događajima, rezultati redovnih probira ključni su pri definiranju imunološkog statusa primatelja i omogućavaju optimalnu pretragu za potencijalnim donorom organa.

7. LITERATURA

1. Waldeyer A.J. Waldeyerova anatomija čovjeka. Golden marketing tehnička knjiga. Zagreb, 2009
2. Sutlić Ž., Mijatović D., Augustin G., Dobrić I. i suradnici. Kirurgija. Sveučilišni udžbenik. Školska knjiga, 2022
3. Šoša T. Kirurgija. Naklada Ljevak, 2007
4. <https://zdravlje.gov.hr/vijesti/nacionalni-transplantacijski-program-u-pandemijskoj-2021/5571>.
5. <https://www.hdndt.org/novosti/15-50-godina-prve-transplantacije-bubrega>
6. <https://budidonor.hr/o-transplantaciji/>
7. Abbas A.K., Lichtman A.H. . Stanična i molekularna imunologija. Medicinska Naklada. Zagreb, 2018
8. Čečuk-Jeličić E., Jaman S.. Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti. Skripta za studente Odsjeka medicinsko laboratorijske dijagnostike
9. <https://www.proimmune.com/mixed-lymphocyte-reaction-mlr-assays/>
10. <https://zdravlje.gov.hr/UserDocsImages//dokumenti/Tekstovi%20razni//Nacionalne%20smjernice%20za%20obradu%20i%20odabir%20primatelja%20i%20darivatelja%20bubrega.pdf>
11. 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. 68 (2014) 421-423
12. Katalinić N., Crnić Marčetić T., Balen S., Praćenje antitijela HLA prije transplantacije bubrega Luminex tehnikom. Medicina fluminensis. 2020, Vol. 56, No. 4, p. 490-497
13. Marsh SGE, Parham P, Barber LD. The HLA: Facts Book. Elsevier Science, 2000
14. <https://zir.nsk.hr/islandora/object/ozs%3A1354/datastream/PDF/view>

15. Brunetta Gavranić B, Bašić Jukić N, Ratković Gusić I, Martinez N, Ivančan V, Kes P. Priprema visoko HLA senzibilizirane trudnice za transplantaciju srca : Prvi slučaj u Republici Hrvatskoj. *Acta Med Croatica*, 2011; vol. 65, br.4 :294-388
16. Čečuk Jeličić E, Grgičević D, Grubić Z, Kaštelan A, Kerhin Brkljačić V, Skodlar J. Senzibilizacija na antigene sustava HLA u: Odabrana poglavlja iz transfuzijske medicine. Zagreb, (1992); str. 39-50
17. Murphey CL, Forsthuber TG. Trends in HLA antibody screening and identification and their role in transplantation. *Expert Rev Clin Immunol*. 2008 May;4(3): 391-399
18. Žunec R, Grubić Z, Balen S. Važnost imunogenetike u transplantaciji organa. 2011, *MEDIX*, 92/93: 208-215
19. Bostock I.C., Alberú J., Arvizu A., Hernández-Mendez E.A., De-Santiago A., González-Tableros N., López M., Castelán N., Contreras A.G., Morales-Buenrostro L.E., Gabilondo B., Vilatobá M.. Probability of deceased donor kidney transplantation based on % PRA. *Transpl Immunol*. 2013 Jun; 28 (4):154-8.

8. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Filip Čačija

Datum, godina i mjesto rođenja: 02.10.1999., Livno

OBRAZOVANJE:

Visokoškolsko obrazovanje: 2020 – 2023

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija, Split

Preddiplomski sveučilišni studij

Smjer: Medicinsko Laboratorijska Dijagnostika

Srednjoškolsko obrazovanje: 2014-2018 Medicinska škola Livno

Smjer: Medicinski tehničar

Osnovnoškolsko obrazovanje: 2006-2014 Osnovna škola fra. Lovro Karaula

RADNO ISKUSTVO:

Školska praksa tijekom 4 godine srednje škole u Županijskoj bolnici fra Mihovil Sučić Livno

ZNANJA I VJEŠTINE:

Engleski jezik: Aktivno znanje

Rad na računalu: Microsoft Office (Word, Power Point, Excel)

HOBI:

Aktivno igranje nogometa