

Kadaverična transplantacija bubrega

Cvitković, Klara

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:176:541249>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U SPLITU
Podružnica
SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Klara Cvitković

KADAVERIČNA TRANSPLANTACIJA BUBREGA

Završni rad

Split, 2024.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Klara Cvitković

KADAVERIČNA TRANSPLANTACIJA BUBREGA

CADAVERIC 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 prijediplomski studij medicinsko laboratorijska dijagnostika

Znanstveno područje: biomedicina i zdravstvo
Znanstveno polje: kliničke medicinske znanosti

Mentor: Doc. dr. sc. Esma Čečuk - Jeličić

KADAVERIČNA TRANSPLANTACIJA BUBREGA

Klara Cvitković, 0346012547

SAŽETAK: Glavni sustav tkivne podudarnosti kod čovjeka, poznat kao HLA sustav, jedan je od najpolimorfnijih genskih sustava čiji su produkti predodređeni za sudjelovanje u imunološkim reakcijama. Geni sustava HLA smješteni su na kraćem kraku kromosoma 6 i podijeljeni su u 3 genske regije. Jedna od značajnijih osobitosti HLA sustava je njegova povezanost s autoimunim, nefrološkim, neurološkim i dermatološkim bolestima. Najvažniji je značaj ovog sustava povezanost sa transplantacijom tkiva i organa. HLA sustav neizostavni je dio u svakom transplantacijskom programu. Cilj rada je ukazati na važnost provedbe testa križne probe kod odabira primatelja mogućih kadaveričnih donora bubrega. Poseban naglasak stavlja se na pozitivne rezultate testa križne probe jer ukazuju na apsolutnu kontraindikaciju za kadaveričnu transplantaciju bubrega. Prije izvođenja testa križne probe, potrebno je provesti tipizaciju HLA svih lokusa potencijalnog darivatelja i prijaviti je u ENIS sustav Eurotransplanta. Tipizacija HLA lokusa potencijalnog darivatelja bubrega izvršava se serološkom metodom, a rezultati se potvrđuju pomoću molekularnih metoda koje uključuju PCR-SSO (Luminex metoda) te PCR-SSP metodu. Na temelju HLA tipizacije potencijalnog darivatelja bubrega, iz Eurotransplanta poslana je lista mogućih primatelja bubrega. Lista je utemeljena s obzirom na podudarnost krvne grupe, HLA tipizaciju i postotak panel reaktivnih antitijela. Rezultati su pokazali da je kod jednog od 4 moguća primatelja bubrega cross-match bio pozitivan. Pacijent je bio visoko senzibiliziran, a tipizacija mogućeg primatelja u odnosu na darivatelja pokazala je visoku nepodudarnost.

Ključne riječi: HLA geni; kadaver; križna reaktivnost; PCR-SSO; PCR-SSP; transplantacija

Rad sadrži: 52 stranice; 22 slike; 2 tablice

Jezik izvornika: hrvatski

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
University Department for Health Studies
University undergraduate study of medical laboratory diagnostics

Scientific area: biomedicine and health care
Scientific field: clinical medical sciences

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

CADAVERIC KIDNEY TRANSPLANTATION

Klara Cvitković, 0346012547

SUMMARY: The main histocompatibility system in humans, known as the HLA system, is one of the most polymorphic gene systems whose products are destined to participate in immune reactions. The genes of the HLA system are located on the shorter arm of chromosome 6 and are divided into 3 gene regions. One of the most significant features of the HLA system is its association with autoimmune, nephrological, neurological and dermatological diseases. The most important significance is the connection of this system with tissue and organ transplantation. The HLA system is an essential part of any transplant program. The aim of the paper is to point out the importance of checking the cross-probe test when selecting recipients of possible cadaveric kidney donors. Special emphasis is placed on the positive results of the cross-probe test, as they indicate an absolute contraindication for cadaveric kidney transplantation. Before performing the cross-probe test, it is necessary to perform HLA typing of all loci of the potential donor and register in the ENIS system of Eurotransplant. Typing of the HLA locus of a potential kidney donor is performed using a serological method, and the results are confirmed using molecular methods including PCR-SSO (Luminex method) and PCR-SSP method. Based on the HLA typing of the potential kidney donor, a list of possible kidney recipients was sent from Eurotransplant. The list is based on matching of blood group, HLA typing and percentage of panel reactive antibodies. The results showed that one of the 4 possible kidney recipients had a positive cross-match. The patient was highly sensitized, and the typing of the possible recipient in relation to the donor showed a high discrepancy.

Keywords: cadaver; cross-match; HLA genes; PCR-SSP; PCR-SSO; transplantation

Thesis contains: 52 pages; 22 figures; 2 tables

Original in: Croatian

Zahvale

Želim izraziti svoju iskrenu zahvalnost mentorici doc. dr. sc. Esmi Čečuk-Jeličić koja mi je pristupila s mnogo empatije te svojom stručnošću i strpljivošću pomogla da napišem ovaj rad. Hvala Vam na svim vrijednim savjetima, prenesenom znanju kao i na pomoći i podršci koju ste mi pružali tijekom cijelog procesa. Vaša pomoć i vodstvo omogućili su da ovaj rad kao i cijelo moje studiranje budu nezaboravno i dragocjeno iskustvo.

Velike zahvale dugujem i svim ostalim djelatnicama Laboratorija za tipizaciju tkiva, KBC Split za sve korisne savjete koje su podijelile samnom. Posebnu zahvalu upućujem mag. biol. mol. Sonji Jaman na susretljivosti i nesebičnoj pomoći.

Hvala svim mojim prijateljima koji su mi bili velika podrška, mudri savjetnici i prije svega ugodno društvo.

Ovaj rad posvećujem meni najdragocjenijima, mojoj obitelji.

SADRŽAJ

SADRŽAJ	VI
1. UVOD	1
1.1 SUSTAV HLA	1
1.1.1. HLA razred I.....	3
1.1.2. HLA razred II.....	4
1.1.3. Osobitosti sustava HLA	5
1.1.4. Nazivlje sustava HLA.....	7
1.1.5. Nasljeđivanje HLA gena	8
1.1.6. Povezanost bolesti i HLA sustava	9
1.2 TRANSPLANTACIJA BUBREGA	11
1.2.1 Transplantacija bubrega kroz povijest	11
1.2.1.1 Transplantacija bubrega u Hrvatskoj	12
1.2.2 Starenje bubrega	13
1.2.3 Odabir primatelja organa.....	14
1.2.4 Odabir darivatelja bubrega.....	16
1.2.4.1 Kadaverični darivatelj bubrega.....	18
1.3 IMUNOLOŠKA OBRADA POTENCIJALNOG DARIVATELJA I PRIMATELJA BUBREGA	21
1.4 EUROTRANSPLANT.....	24
2. CILJ RADA	28
3. ISPITANICI I METODE	29
3.1 ISPITANICI	29

3.2. METODE	29
3.2.1 HLA tipizacija primatelja i darivatelja	29
3.2.2 Serološka metoda određivanja antigena sustava HLA	29
3.2.3 Molekularne metode određivanja alela sustava HLA	32
3.2.3.1 Izolacija DNA.....	33
3.2.3.2. PCR-SSO (Luminex metoda)	33
3.2.3.3 PCR-SSP.....	35
3.3 TEST KRIŽNE PROBE (CROSS MATCH) IZMEĐU PRIMATELJA I DARIVATELJA	38
4. REZULTATI	43
5. RASPRAVA	46
6. ZAKLJUČAK	48
7. LITERATURA	49
8. ŽIVOTOPIS	52

1. UVOD

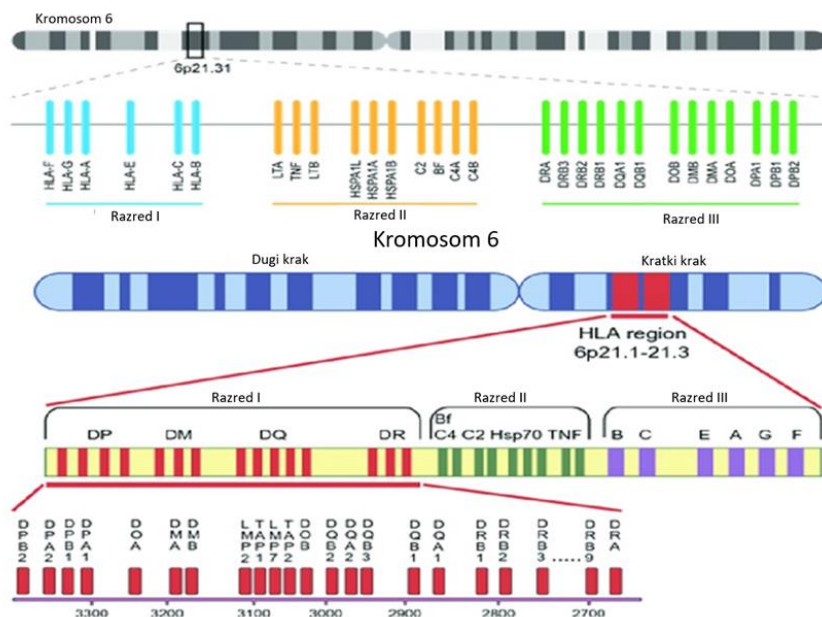
1.1 SUSTAV HLA

Svaka tjelesna stanica sadrži brojne bjelančevine koje mogu izazvati imunološku reakciju u tuđem organizmu, djelujući pritom kao antigeni. Te molekule nazvane su tkivnim antigenima ili antigenima glavnog sustava tkivne podudarnosti (engl. *Major Histocompatibility Complex*), u čovjeka nazvanim sustavom HLA (engl. *Human Leukocyte Antigen*). Ovaj najpolimorfiji genski sustav sadrži veliki broj gena čiji su produkti predodređeni za sudjelovanje u imunološkoj reakciji. Funkcije sustava HLA su mnogostruke, a temelje se na pomoći imunološkom sustavu u održavanju individualnosti jedinke te pokretanju adekvatnog odgovora s ciljem obrane od stranog antigena. HLA molekule također imaju i važnu funkciju u kontroliranju složenih procesa kojima se sintetiziraju tkivni antigeni te reguliraju proces proizvodnje karakterističnih antitijela. Zadužene su i za nadzor međusobnih interakcija između limfoidnih stanica tijekom procesa u kojemu se aktivira imunološki sustav usmjeren protiv stranog antigena te usmjeravanje proizvodnje medijatora imunološke reakcije (1).

Molekule HLA pomažu u sazrijevanju T limfocita u timusu gdje T limfociti prolaze procese pozitivne i negativne selekcije. Slučajnim procesom somatske rekombinacije stvara se repertoar limfocitnih klonova koji prvo prolaze proces pozitivnog probira u kojem preživljavaju samo oni limfociti čiji receptori imaju slabi afinitet za vlastite antigene HLA. Zatim slijedi negativna selekcija koja se temelji na uklanjanju klonova koji imaju velik afinitet za vlastite HLA antigene jer bi u protivnom reagirali s vlastitim HLA antigenima što bi dovelo do usmjeravanja imunološke reakcije protiv vlastitog organizma.

Strani antigeni prezentirani su T limfocitima pomoću molekula HLA jer one sadrže receptor za antigen pomoću kojeg se može prepoznati kompleks dvaju antigena, onog koji je organizmu stran te antigena tkivne podudarnosti koji pripada vlastitom organizmu. Na jednoj HLA molekuli postoji samo jedno, specifično vezno mjesto za peptid koji je karakterističan za određeni antigen i koji u određenom trenutku na sebe može vezati jedan antigeni peptid, a ne više njih. Razina ekspresije HLA molekula na površini stanice uvelike ovisi o jačini

ekspresije gena koji kodiraju sintezu HLA molekula. Glavnu ulogu u regulaciji ovih procesa imaju citokini koji induciraju pojačano gensko prepisivanje i izražaj molekula HLA. Glavni stimulatori koji omogućuju izražavanje HLA molekula jesu tri različite vrste interferona (IFN- α , IFN- β i IFN- γ) te tumorski faktor nekroze (engl. *Tumor Necrosis Factor*, TNF). Djeluju tako da aktiviraju čimbenike transkripcije kojima je onda omogućeno vezanje na promotorska mjesta pojedinih HLA gena i poticanje njihove povećane genske ekspresije. IL-1, IL-4 te IFN- γ omogućuju povećan izražaj HLA molekula razreda II, dok interferoni α i β imaju suprotan učinak, odnosno smanjuju njihov izražaj. Geni sustava HLA smješteni su na kraćem kraku kromosoma 6 (odsječak 6p21.1-21.3.). Područje na kromosomu 6 na kojem se nalaze HLA geni podijeljeno je u 3 genske regije: geni razreda I, geni razreda II te geni razreda III. Najbliže telomeri smješteni su geni HLA sustava razreda I, dok su bliži centromeri geni razreda II. U središnjem dijelu, između gena HLA sustava razreda I i II smješteni su geni razreda III (Slika 1.) (2).

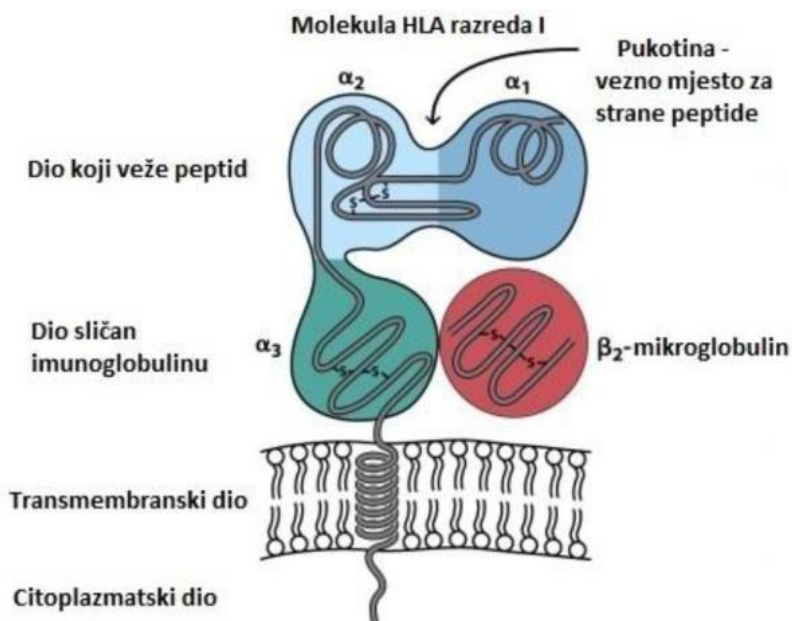


Slika 1. Smještaj sustava HLA

Preuzeto i prilagođeno iz: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-of-chromosome-6-where-HLA-genes-are-located-in-the-short-arm-of-this_fig5_356617150

1.1.1. HLA razred I

Sve stanice s jezgrom na sebi nose molekule HLA razreda I. Po građi su to membranski glikoproteini koji se sastoje od dvaju kovalentno vezanih polipeptidnih lanaca - α lanca (teški) i β lanca (laki). Molekule HLA -A, -B, -C kodiraju teški lanac α , dok geni na kromosomu 15, koji nisu dio HLA genskog sustava, kodiraju laki lanac β , poznat još i kao $\beta 2$ mikroglobulin. α lanac sastoji se od 3 osnovna segmenta: citoplazmatskog, transmembranskog i ekstracelularnog. Ekstracelularni dio se dalje dijeli na tri domene - $\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$. Karakteristika domena $\alpha 1$ i $\alpha 2$ jest što oblikuju specifično vezno mjesto gdje se osim raznih peptida mogu vezati i strani antigeni te predstavlja najpolimorfiji dio molekule. $\alpha 3$ domena molekule sposobna je reagirati sa receptorom za T limfocite koji se nalazi na stanici i djeluje kao mjesto za vezanje. Osim citoplazmatskog, transmembranskog i ekstracelularnog dijela, molekula ima i četvrti dio koji tvori laki lanac β . Ovaj lanac služi isključivo za stabilizaciju molekule, ali ne sudjeluje u imunološkim reakcijama niti u prezentaciji stranih antigena. Molekule HLA razreda I imaju sposobnost prepoznavanja endogenih antigena tako što unutar stanice strani antigeni prolaze proces razgradnje na manje fragmente, takozvane peptide. Ti peptidi se zatim vezuju za HLA molekulu i prezentiraju na površini stanice kako bi bili prepoznati od strane imunološkog sustava. Manji dio antigena koji se prethodno razgradio veže se na udubljenje koje su oblikovale $\alpha 1$ i $\alpha 2$ domene HLA molekule te se prezentira CD8⁺ citotoksičnim T limfocitima. Nakon prezentacije peptida na površini stanice putem HLA molekule, isti limfociti vežu se na tijelu nepoznat antigen i površinu HLA molekule koristeći mehanizam nazvan spregnuto prepoznavanje (3).



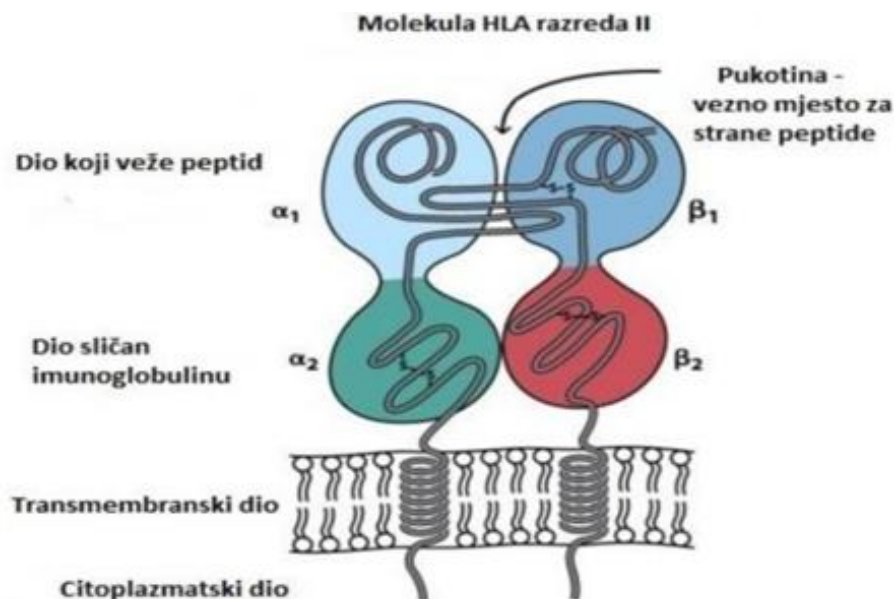
Slika 2. Shematski prikaz molekule HLA razreda I

Preuzeto i prilagođeno iz: <https://triyambak.org/index.php/free-resources/csir-net-life-sciences/pointer/1737>

1.1.2. HLA razred II

Brojna istraživanja pokazala su da se molekule HLA razreda II nalaze na različitim stanicama imunološkog sustava, uključujući B limfocite, makrofage, dendritičke stanice te CD34⁺ pomoćničke T-limfocite. CD34⁺ pomoćnički T-limfociti posebno su važni jer su odgovorni za poticanje proizvodnje antitijela koja su usmjerena protiv odgovarajućih antigena. Molekule HLA razreda II građene su od dvaju α i β lanaca koji su polimorfni i nalikuju jedan drugome. α i β lanci međusobno nisu povezani kovalentnim vezama. Teški α-lanac molekule HLA razreda II kodiraju geni A koji se sastoje od 5 egzona, dok laki β-lanac kodiraju geni B sastavljeni od 6 egzona. Citoplazmatski, transmembranski i ekstracelularni dio također su karakteristika molekula HLA razreda II. Ekstracelularni dio molekule sastoji se od 4 domene α1, α2, β1, β2. Domene α1 i β1 oblikuju pukotinu na koju se veže strani antigen te je to ujedno i najpolimorfniji dio molekule. Na krajevima pukotine mogu se vezati peptidi s duljinom od 10 do 30 aminokiselina. Na domenu β2 vežu se pomoćnički T-limfociti kojima HLA molekule predočuju strani antigen. Nakon što organizmu nepoznat antigen dođe

u organizam, ragrađi se na manje peptide. HLA molekule koje vežu nepoznati antigen na pukotinu koja je formirana pomoću domena α_1 i β_1 se u vrijeme ragrađnje nepoznatog antigena sintetiziraju. Iste te HLA molekule strani antigen prezentiraju CD4⁺ pomoćničkim T-limfocitima (2).



Slika 3. Shematski prikaz molekule HLA razreda II

Preuzeto i prilagođeno iz: Kindt TJ, Osborne BA, Goldsby RA. Kuby Immunology. New York: Freeman, W. H.& Company; 2006

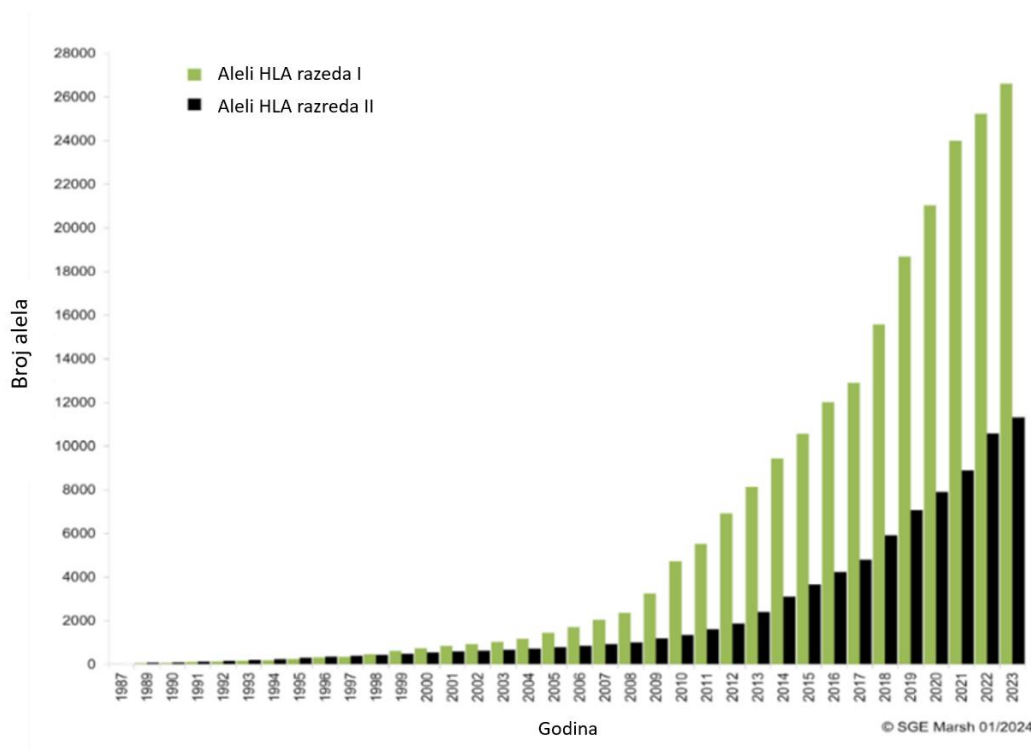
1.1.3. Osobitosti sustava HLA

Glavna obilježja sustava HLA su nepravilna distribucija u raznim tkivima, veliki genski polimorfizam, crossing over, pravilna genska segregacija, genska neravnoteža udruživanja, križna reaktivnost te rasna i populacijska specifičnost.

Kada se govori o nepravilnoj distribuciji u tkivima, važno je naglasiti kako su geni HLA-a češće prisutni na staničnim membranama tkiva i organa koji su aktivno uključeni u

imunološki odgovor. Zastupljenost im je značajno manja na masnom i mišićnom tkivu te središnjem živčanom sustavu (2).

Polimorfizam gena definiran je kao zastupljenost dva ili više alela na pojedinim lokusima sustava HLA. Smatra se kako je polimorfizam ili rezultat brzog evolucijskog razvoja HLA sustava u odnosu na druge sustave ili su pomoću prirodne selekcije nastali određeni haplotipovi HLA koji su bili sposobniji prepoznati uzročnik bolesti i na njega djelovati (2).



Slika 4. Broj HLA alela otkrivenih do 01./2024.

Preuzeto i prilagođeno iz: <https://hla.alleles.org/alleles/>

Važnu ulogu kod nasljeđivanja gena HLA imaju Mendelovi zakoni koji govore o nasljeđivanju gena. Sagregacija je također pravilna i slijedi Mendelov zakon o sagregaciji

alela. Crossing over rijetko uzrokuje promjenu haplotipa zbog male udaljenosti između HLA lokusa, dok se češće događa kada su lokusi udaljeniji (4).

Neravnoteža udruživanja gena (engl. *linkage disequilibrium*) označava pojavu koja se odnosi na alele dvaju ili više HLA lokusa koji mogu biti usko povezani, a učestaliji su u istom haplotipu više nego što bi se javljali temeljem pojedinačne učestalosti alela (5).

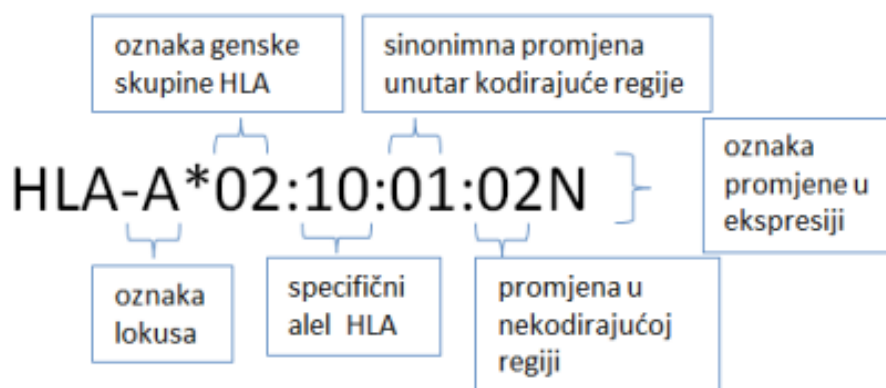
Još jedno važno obilježje gena sustava HLA očituje se u križnoj reaktivnosti gena. Križna reaktivnost temelji se na činjenici da molekula HLA ima svoju privatnu, ali i opću specifičnost. Kada se osoba imunizira, imunološka je reakcija usmjerena i protiv drugih antigena koji na sebi imaju epitope sa sličnom ili istom općom specifičnošću kao i antigen HLA koji je potaknuo imunizaciju. Pojava križne reaktivnosti odnosi se uglavnom na antigene HLA istog lokusa (5).

Populacijska istraživanja sustava HLA pokazala su da je unutar pojedine populacije moguće pronaći samo određeni dio haplotipova i alela što predstavlja rasnu i populacijsku specifičnost ovog sustava (6).

1.1.4. Nazivlje sustava HLA

S obzirom da je polimorfizam jedno od glavnih obilježja sustava HLA, potrebno je bilo uskladiti nomenklaturu sustava HLA između različitih laboratorija. Iz te potrebe 1968. godine osnovan je odbor koji se bavi imenovanjem gena i antigena sustava HLA, a predvodi ga odbor Svjetske zdravstvene organizacije (WHO). Pomoću serološke metode dokazuju se antigeni sustava HLA čija se oznaka nalazi prije prve dvotočke i dobivaju se metodom niske rezolucije. Metodom visoke rezolucije opisuje se skupina brojeva koja se nalazi iza prve dvotočke i koja opisuje podtipove nekog gena HLA. Mutacije koje se mogu pronaći u kodirajućoj i nekodirajućoj regiji nalaze se u trećem i četvrtom polju. Iz potrebe za označavanjem mutacija koje nisu izražene, a potrebno ih je identificirati, dodaju se razni sufiksi. Sufiks L (engl. *low*) označava alele koji se manje izražavaju na površini stanice u odnosu na normalne razine. Sufiks S (engl. *soluble*) koristi se za alele koji kodiraju proteine izražene kao topljive, izlučene molekule koje nisu prisutne na površini stanice. Sufiks C

(engl. *cytoplasm*) dodjeljuje se alelima čiji se proteini nalaze u citoplazmi umjesto na površini stanice. Sufiks A (engl. *abberant*) upotrebljava se za označavanje ekspresije koja odstupa od uobičajene, odnosno kada postoji sumnja u stvarnu ekspresiju proteina. Sufiks Q (engl. *questionable*), označava alele s upitnom ekspresijom, što znači da mutacija prisutna u alelu utječe na normalnu ekspresiju, ali se to ne događa kod drugih alela (7).

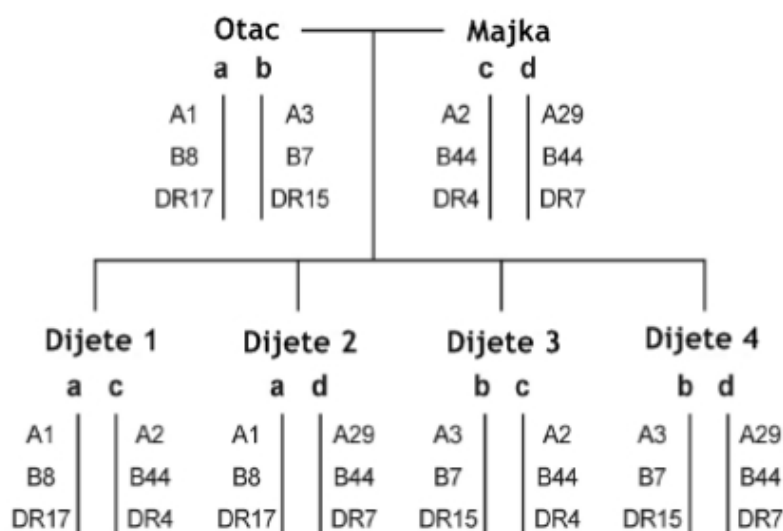


Slika 5. Nazivlje sustava HLA

Preuzeto i prilagođeno iz: <https://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>

1.1.5. Nasljeđivanje HLA gena

Glavnu ulogu u nasljeđivanju HLA gena imaju Mendelovi zakoni o nasljeđivanju. Geni HLA-a nasljeđuju se kodominantno. Svaki roditelj prenosi po jedan haplotip HLA-a na svoje dijete, a oba haplotipa se ravnopravno izražavaju na staničnoj membrani. Tri su moguća ishoda kod nasljeđivanja HLA gena. Dvoje srodnika biti će haplotipski HLA identični ukoliko nasljede iste haplotipove od oba roditelja. Ako dvoje srodnika naslijedi samo jedan isti haplotip, tada su poluidentični po HLA sustavu. Kada dvoje srodnika nasljedi različite gene, tada oni nemaju isti HLA materijal (8).



Slika 6. Prikaz haplotipova HLA unutar obitelji

Preuzeto i prilagođeno iz: https://www.researchgate.net/figure/Mendelian-inheritance-of-HLA-haplotypes-demonstrated-in-a-family-study-HLA-haplotypes_fig2_6480734

1.1.6. Povezanost bolesti i HLA sustava

Geni HLA u literaturi se uglavnom povezuju sa autoimunim bolestima. Statistička povezanost između određenih bolesti kao što su reumatoidni artritis, ankilozantni spondilitis, celijakije i drugih bolesti i gena HLA sustava ne smije se tumačiti na način da HLA geni uzrokuju te iste bolesti – povezanost sustava HLA s bolestima uglavnom je rezultat neravnoteže udruživanja gena koji zapravo sudjeluju u patogenezi pojedine bolesti gena sustava HLA. Nadalje, postoje razne teorije kod kojih se smatra da molekula HLA slabo predočuje virusni ili bakterijski antigen, dok neki smatraju kako upravo molekula HLA služi kao vezno mjesto za virusne ili bakterijske uzročnike bolesti. Stajališta nekih znanstvenika se slažu s idejom kako HLA molekula ima veliku podudarnost s patogenom te da to onemogućuje prepoznavanje stranog patogena, dok neka istraživanja potvrđuju kako HLA molekula omogućuje transport virusa u stanicu. Nakon opsežnih istraživanja, zaključeno je

kako svaki prethodno opisan mehanizam na poseban način sudjeluje u nastanku određenih bolesti, ali u različitim razmjerima (9).

Tablica 1 Povezanost antigena/alela sustava HLA i bolesti

Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459459/>

Bolest	HLA antigen/alel
Ankilozantni spondilitis	HLA-B27/B*27
Reiterov sindrom	HLA-B27/B*27
Akutni prednji uveitis	HLA-B27/B*27
Bechet bolest	HLA-B51
Sistematski lupus eritematosus	HLA-B8, -DR3/B*08, -DRB1*03
Reumatoidni artritis	HLA-DR1, -DR4/DRB1*01, -DRB1*04
Psorijatični artritis	HLA-B13, -B27, -B57, -37; HLA-Cw6; HLA-DR7
Sjorgen-ov sindrom	HLA-B8, -DR3
Psorijaza	HLA-B13, -B17; C w 6; DR7
Celijakija	HLA-DQ2,-DQ8/DQB1*02,- DQB1*08
Narkolepsija	HLA-DR15/HLA-DRB1*0602; HLA- DQA1*0102
Inzulin ovisni dijabetes melitus	HLA-DR3,-DR4
Hemokromatoza	HLA-A3

1.2 TRANSPLANTACIJA BUBREGA

Transplantacija ili presađivanje bubrega predstavlja jednu od najučinkovitijih metoda liječenja kroničnog zatajenja bubrega. Ovaj postupak predstavlja ključni korak u produženju života i poboljšanju kvalitete života pacijenata koji se bore s ovim teškim stanjem. Bit transplantacije bubrega leži u zamjeni neispravnog bubrega pacijenta s funkcionalnim bubregom donora. Tijekom ovog postupka važno je pažljivo povezati bubrežnu arteriju i venu presađenog bubrega s primateljevim velikim krvnim žilama u zdjelici. Mokraćovod presađenog bubrega potrebno je kirurški povezati na mokraćni mjehur primatelja.

Transplantacija bubrega može biti posljednja mogućnost liječenja za pacijente koji se nalaze u završnom stadiju bolesti bubrega, kada druge opcije, poput dijalize, više nisu izvedive ili nisu učinkovite. Uspješna transplantacija bubrega omogućava pacijentima poboljšanje kvalitete života kao i mogućnost povratku normalnim životnim i radnim aktivnostima. Osim toga, transplantacija omogućava maksimalnu medicinsku, osobnu i socijalnu rehabilitaciju pacijenata, što ih osnažuje za nadolazeće izazove (10).

1.2.1 Transplantacija bubrega kroz povijest

Prva uspješna transplantacija bubrega izvršena je 1954. u Sjedinjenim Američkim Državama. Iako je operacija bila uspješna na početku, bubreg je nažalost odbačen nakon 10 mjeseci. Razlog tome bila je nedostatna terapija koja bi spriječila reakciju tijela primatelja prema novom organu. Prvi uspješan transplantacijski zahvat između dviju osoba dogodio se 1954. godine, no u ovom slučaju donor i primatelj bili su jednojajčani blizanci, što je omogućilo uspješnu integraciju presađenog bubrega.

Revolucionarni napredak u području transplantacijske medicine dogodio se otkrićem imunosupresivnih lijekova. Ovi lijekovi omogućili su kontroliranje imunološkog odgovora primatelja i smanjenje rizika od odbacivanja presađenog organa. Primjena imunosupresivne terapije znatno je poboljšala ishode transplantacije bubrega i omogućila širu primjenu ovog postupka u kliničkoj praksi (10).

1.2.1.1 Transplantacija bubrega u Hrvatskoj

Hrvatska ima dugu povijest u području transplantacije bubrega. Prva uspješna transplantacija bubrega od živog darivatelja izvedena je u Rijeci 1971. godine pod vodstvom profesora Vinka Frančiškovića. Već godinu dana kasnije, isti tim proveo je prvu transplantaciju bubrega s umrle osobe. Klinički bolnički centar Zagreb pridružio se transplantacijskom programu 1972. godine. Prvu transplantaciju bubrega u KBC Zagreb, Rebro prije pedeset godina izveo je akademik Ljubomir Čečuk sa suradnicima.

Danas postoje četiri transplantacijska centra u Hrvatskoj, a to su: KBC Zagreb, KBC Rijeka, KB Merkur i KBC Osijek. Zahvaljujući dobroj organizaciji transplantacijskih centara kao i povećanju broja mogućih donora organa, Hrvatska je postala važan partner ostalim europskim državama u području transplantacije te se priključila Eurotransplantu 2007. godine kao punopravna članica. Nakon pridruženja Eurotransplantu, uočen je porast broja donora organa koji raste i danas (10).

Broj transplantacija (kadaverični donor) u zemljama Eurotransplanta na milijun stanovnika po zemlji										
Transplants pmp	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Austria	82.2	80.0	77.4	79.4	78.6	83.5	80.3	79.3	78.5	78.8
Belgium	75.2	72.0	82.7	83.4	76.9	73.3	80.8	79.8	83.0	81.7
Croatia	54.5	84.1	90.4	90.5	82.4	80.5	90.9	80.9	72.7	84.0
Germany	47.3	50.3	47.9	43.8	38.5	37.5	36.6	35.6	32.3	37.9
Hungary				2.4	21.5	47.9	44.6	45.7	40.9	46.2
Luxembourg	4.1									
Netherlands	38.3	38.6	39.9	44.4	41.9	46.6	44.6	40.5	41.6	47.4
Slovenia	38.9	49.8	39.0	56.9	53.9	57.3	53.8	48.9	45.0	50.3
All ET	50.8	53.6	53.1	47.9	44.9	46.8	46.5	44.9	42.6	47.4

statistics.eurotransplant.org : 2271P_all organs : 12.11.2019 : based on population at start of year

Slika 7. Broj transplantacija u zemljama Eurotransplanta na milijun stanovnika po zemlji

Preuzeto i prilagođeno iz: <https://www.eurotransplant.org/statistics/statistics-library/>

1.2.2 Starenje bubrega

Starije osobe češće imaju problem sa poremećenom funkcijom bubrega koja je uvelike povezana s procesom starenja. Funkcionalne i anatomske promjene koje se događaju tijekom starenja dovode do narušenog funkcionalnog kapaciteta bubrega što za posljedicu ima smanjenu sposobnost bubrega da održi homeostazu organizma. Važno je napomenuti da poremećaj funkcije bubrega nužno ne implicira na prisutnost bolesnih bubrega, nego se odnosi na sposobnost bubrega da se prilagodi promjenama, osobito pod opterećenjem. Također, kod starijih osoba posebno treba voditi računa o prilagođavanju terapije tekućinama i lijekovima zbog povećanog rizika od komplikacija. Nefrotoksični su lijekovi važni jer mogu dodatno opteretiti već oslabljenu funkciju bubrega. Ključno je pratiti funkciju bubrega kod starijih osoba i prilagoditi terapiju kako bi se smanjio rizik od nuspojava i komplikacija.

Tijekom procesa starenja, bubreg prolazi kroz značajne promjene kako u strukturi tako i u funkciji. Na anatomskej razini, bubreg postaje manji i ima glađu površinu, odnosno gubi svoju uobičajenu neravnu površinu. Najveći gubitak mase bubrega obično se događa kada osoba dosegne sedmo ili osmo desetljeće života (11).

Uzroci ovih promjena mogu biti povezani s općim promjenama u krvnim žilama. Vidljiv je gubitak vanjskog sloja bubrega, poznatog kao kortikalni parenhim (12). Na histološkoj razini, promjene obuhvaćaju oštećenje glomerula, smanjenje tubula, nakupljanje vezivnog tkiva između tubula te nakupljanje vezivnog tkiva u zidovima arterija. Prosječna stopa gubitka glomerulske filtracije (GF) nakon tridesete godine života je oko 1 mL godišnje. Ova stopa označava postupno smanjenje sposobnosti bubrega da filtrira krv kroz glomerule tijekom starenja (13). Također, bubreg kao endokrini organ omogućuje proizvodnju eritropoetina, hormona zaslužnog za poticanje stvaranja crvenih krvnih stanica u tijelu. U starijoj dobi, bubreg može imati smanjenu sposobnost proizvodnje eritropoetina, što može rezultirati češćom pojavom anemije (14).

1.2.3 Odabir primatelja organa

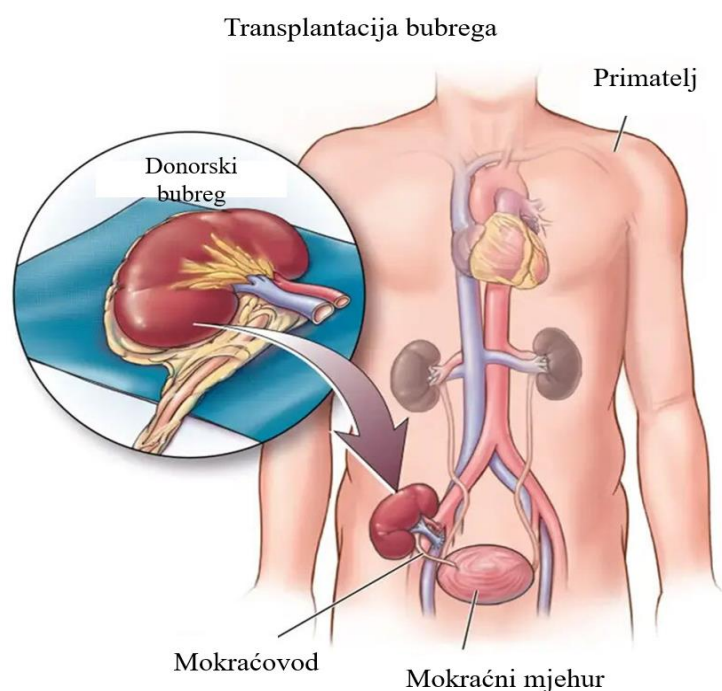
Primarna terapija za pacijente koji se nalaze u terminalnom stadiju kroničnog zatajenja bubrega jest presađivanje bubrega od potencijalnog donora. Osim razumijevanja medicinskih aspekata procesa transplantacije bubrega, važno je razumijeti samu odluku pacijenta o prihvatanju ili odbijanju presađivanja bubrega. Kako bi pacijenti uopće postali potencijalni kandidati za presađivanje bubrega, moraju se podvrgnuti detaljnom pregledu i procjeni koja uključuje povijest prijašnjih zdravstvenih stanja, trenutno zdravstveno stanje te moguće kontraindikacije koje će spriječiti podvrgavanje procesu transplantacije (15).

Čimbenici koji predstavljaju prepreku u postupku presađivanja su: maligni tumori, pozitivitet na HIV infekciju, infekcija virusom hepatitisa B i C, hemolitičko-uremijski sindrom, aktivna konzumacija alkohola i droga, pretilost te bolesti kardiovaskularnog sustava. Ako bolesnikova medicinska povijest ukazuje na to da je imao ili trenutno ima tumor, potrebno je razmotriti postoji li apsolutna prepreka za stavljanje na listu čekanja transplantacije ili je potrebno odgoditi prijavu na listu čekanja. Primarna metoda koja omogućuje otkrivanje tumora bubrega jest ultrazvuk, uz moguću nadopunu drugim dijagnostičkim metodama. Bolesnici koji imaju povećan rizik od razvoja karcinoma mokraćnog mjehura trebaju poći na cistoskopski pregled. Kod bolesnika s neinvazivnim papilarnim tumorom mokraćnog mjehura ne postoji potreba za odgađanjem postupka presađivanja bubrega. Za određivanje vremenskog razdoblja koje treba odgoditi prijavu na listu za presađivanje bubrega, potrebno je razmotriti dijagnozu i stanje svakog pojedinog bolesnika koji je imao ili ima malignu bolest u suradnji s onkologom. Važno je uzeti u obzir rizik od ponovnog javljanja ili progresije malignog tumora, dob bolesnika i druge zdravstvene faktore. Prema smjernicama Europske radne skupine za bubrežne bolesti (ERBP), vrijeme čekanja prije stavljanja na listu za presađivanje varira ovisno o vrsti i stadiju malignog tumora. Bolesnici s lokaliziranim malignim tumorima koji imaju dobru prognozu mogu biti stavljeni na listu nakon određenog vremenskog razdoblja, dok bolesnici s diseminiranim oblikom tumora obično nisu kandidati za presađivanje bubrega. Kod bolesnika s neinvazivnim papilarnim tumorom mokraćnog mjehura, ne postoji potreba za odgađanjem postupka presađivanja bubrega. Nadalje, HIV infekcija sama po sebi nije

prepreka za dobivanje novog bubrega presađivanjem, ali HIV pozitivni pacijenti moraju ispuniti određene uvjete kako bi bili prikladni kandidati za transplantaciju bubrega. Prvo, moraju redovito uzimati terapiju, posebno HAART (engl. *Highly Active Antiretroviral Treatment*), koja je visoko učinkovita u suzbijanju HIV-a. Također, važno je da imaju odgovarajući broj CD4+ T stanica, što je pokazatelj jačine imunološkog sustava. Razina virusa HIV RNA u krvi treba biti neotkrivena tijekom posljednja tri mjeseca, a također ne bi smjeli imati oportunističke infekcije tijekom posljednjih šest mjeseci. Prije samog postupka transplantacije, treba pažljivo razmotriti koje će se kombinacije lijekova koristiti, a to se obično radi u suradnji s infektolozima. Cilj je izbjeći moguće interakcije između lijekova koji potiskuju imunološki sustav i onih koji su dio antiretrovirusne terapije kako bi se osiguralo uspješno i sigurno presađivanje bubrega. Kod kronične infekcije hepatitisom B i C, važan je redoviti probir na hepatocelularni karcinom. Također, kod infekcije hepatitisom C, preporučuje se temeljita dijagnostika, uključujući otkrivanje genotipa virusa, procjenu fibroze jetre te primjena antivirusne terapije prije i nakon presađivanja, dok se pacijentima inficiranim virusom hepatitisa B preporučuje liječenje analogima nukleozida kao i interferonima prije procesa transplantacije kako bi se smanjio rizik od pogoršanja jetrene bolesti. Kod pacijenata sa određenim oblicima hemolitičko-uremijskog sindroma, moguća je transplantacija bubrega. Za tipični HUS uzrokovan bakterijom *E. coli*, presađivanje bubrega nije kontraindicirano, ali kod atipičnog oblika HUS-a povezanog s genetskim mutacijama ili određenim protutijelima, potrebno je razmotriti mogućnost transplantacije ako nema prisutnih protutijela u vrijeme presađivanja. Ističe se kako transplantacija bubrega nije preporučena za pacijente sa atipičnim oblikom HUS-a, osim u slučaju da se kod darivatelja ne isključi moguća mutacija određenog gena. Zloupotreba alkohola i droga povećava rizik nakon transplantacije bubrega. Preporučuje se smanjenje ili prestanak konzumacije alkohola, a transplantacija se ne preporučuje za ovisnike o alkoholu ili drogama. Nadalje, pretilost povećava rizik i komplikacije transplantacije kod bolesnika s bubrežnom bolešću te je važno razmotriti mogućnost transplantacije kod pretilih pacijenata i poticati ih na smanjenje tjelesne mase. Kada su kardiovaskularne bolesti u pitanju, nove smjernice iz 2013. godine predlažu kako bi kardiološka obrada pacijenata sa niskim rizikom od razvijanja kardiovaskularnih bolesti trebala biti smanjena te bi trebala uključivati anamnezu, fizikalni pregled, EKG i

redgenski snimak prsnih organa. Međutim, iako su te pretrage smanjene, kardiovaskularne bolesti ostaju vodeći uzrok smrti kod bolesnika s kroničnom bubrežnom bolesti (15).

Informirani pristanak pacijenta ključan je korak u procesu transplantacije bubrega, a pacijenti izražavaju svoju odluku potpisivanjem obrasca o informiranom pristanku. Nakon donošenja odluke za transplantaciju bubrega, pacijenti prolaze kroz daljnju procjenu i pripremu u suradnji s njihovim liječnicima i transplantacijskim centrom (15).



Slika 8. Shematski prikaz transplantiranog bubrega

Preuzeto i prilagođeno iz: <https://my.clevelandclinic.org/health/treatments/22537-kidney-transplant>

1.2.4 Odabir darivatelja bubrega

Darivatelji bubrega obično se dijele u dvije osnovne skupine, a to su: živi darivatelji, najčešće članovi obitelji iako mogu biti i nesrodni pojedinci poput prijatelja i partnera te

kadaveri, odnosno ljudi koji su preminuli uslijed moždane smrti ili traume glave. Prednost transplantacije bubrega od živog donora u odnosu na kadavera ogleda se u činjenici što se izbjegava čekanje na mogućeg donora što može rezultirati dugotrajnošću samog procesa. Također, dokazano je kako bubrezi donirani od živog darivatelja pokazuju bolje i dugotrajnije rezultate transplantacije u odnosu na bubrege dobivene od umrlog darivatelja. Važno je napomenuti kako darivanje bubrega obično predstavlja nizak rizik za samog darivatelja obzirom da se pažljivo i precizno provjerava njihovo zdravstveno stanje prije samog postupka kako bi se osigurala mogućnost da donirani bubreg primatelju pruži optimalnu učinkovitost i funkciju. Darivatelji bubrega, bilo da su živi ili preminuli, imaju ključnu ulogu u procesu transplantacije bubrega i pružaju nadu i priliku za poboljšanje zdravlja pacijentima koji su suočeni s terminalnim stadijem bolesti bubrega (10).

Razumijevanje kriterija za procjenu živog darivatelja bubrega ključno je za osiguranje sigurnosti i dobrobiti svih uključenih u proces transplantacije. Postoje osnovni kriteriji prema kojima se očituje mogućnost potencijalnog darivatelja bubrega da bude uključen u proces transplantacije. Specifični kriteriji za procjenu potencijalnih darivatelja uključuju:

- 1. hipertenzija:** krvni tlak treba biti stabilan, ako je prisutna arterijska hipertenzija (arterijski tlak $>140/90$ mm Hg), treba se provesti detaljno mjerenje tlaka kako bi se utvrdila njegova kontrola
- 2. pretilost:** BMI veći od 35 kg/m^2 smatra se kontraindikacijom za darivanje bubrega
- 3. oštećena tolerancija glukoze:** dijabetes predstavlja kontraindikaciju za darivanje bubrega, ali oštećena tolerancija glukoze nužno ne predstavlja kontraindikaciju
- 4. proteinurija:** visoka razina proteina u mokraći može biti kontraindikacija za darivanje bubrega. Ako se u 24-satnom urinu ili u slučajnom uzorku urina otkrije prisutnost bjelančevina >300 mg, ili ako je omjer albumina/kreatinina > 300 mg/g, to se smatra kontraindikacijom za darivanje bubrega
- 5. hematurija:** prisutnost krvi u mokraći može biti znak bolesti bubrega, što bi moglo isključiti mogućnost osobe da daruje bubreg
- 6. veličina glomerularne filtracije:** eGFR $>37,5$ ml/min/m² smatra se prihvatljivom vrijednošću za presađivanje za zdravog starijeg pojedinca (15).

1.2.4.1 Kadaverični darivatelj bubrega

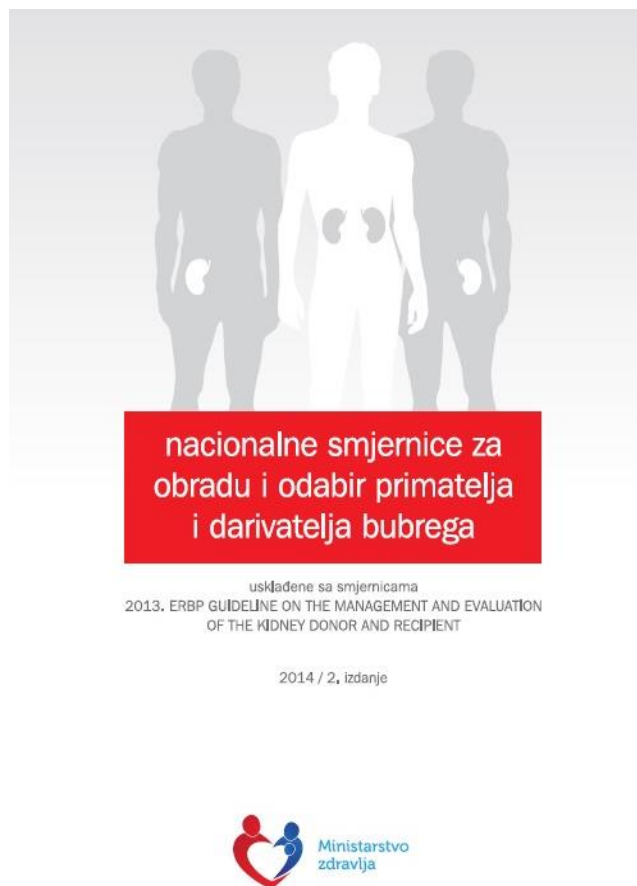
Veliki dio transplantacija bubrega u Republici Hrvatskoj provodi se s bubrezima preminulih darivatelja. Pojam preminulih darivatelja, odnosno kadavera podrazumijeva osobe koje su preminule moždanom smrću. Proces dobivanja organa od preminulih darivatelja podrazumijeva poštivanje medicinskih normi, kao i zakonskih propisa koji su ključni u regulaciji utvrđivanja smrti osobe kao i u procesu darivanja organa. Također, važna je transparentnost i etički pristup u komunikaciji sa obitelji preminule osobe. U Republici Hrvatskoj postoji zakonski okvir koji omogućuje da se osobe preminule moždanom smrću automatski smatraju potencijalnim darivateljima organa, osim ako su za života izrazile suprotno stajalište (16).

Takva pravila su uspostavljena kako bi se osigurala široka dostupnost organa za transplantaciju, ali i da se istovremeno poštuje volja mogućeg darivatelja organa. Kada osoba za života izrazi želju da nakon smrti njen organ/organi budu donirani, uvijek se nakon smrti traži pristanak obitelji preminulog darivatelja, a ukoliko se oni protive, od transplantacije se odustaje (17).

Kako bi preminula osoba postala kadaverični darivatelj organa, moraju biti ispunjeni određeni kriteriji koji uključuju da je kadaverični darivatelj preminuo u kontroliranim uvjetima unutar zdravstvene ustanove, da nije bolovao od nikakvih akutnih kao ni kroničnih infekcija te da u svojoj anamnezi nije imao zloćudnih bolesti. Također, kontraindikacija pri obradi kadaveričnog darivatelja jesu zarazne bolesti kao što su hepatitis A, B i C, AIDS/HIV, bjesnoća, sifilis, kongenitalna rubeola, virusni encefalitis, tuberkuloza, Reyesov sindrom, progresivna multifokalna encefalopatija, malarija te humani T-limfotropni virus tip 1 i 2. Smjernice Europskog društva za urologiju nalažu kako neke od malignih bolesti nisu kontraindikacija za transplantaciju bubrega jer imaju nizak rizik od prenošenja bolesti na primatelja. Takve maligne bolesti uključuju in situ karcinom cerviksa i glasnica, bazocelularni karcinom kože, nemetastatski spinocelularni karcinom kože i neoplazme središnjeg živčanog sustava koje imaju nizak malignitet (18).

U procesu pripreme bubrega od umrlog darivatelja za transplantaciju, bitna je detaljna analiza morfologije i funkcije bubrega. Priprema podrazumijeva upotrebu ultrazvuka ili CT

skeniranja kako bi liječniku lakše bilo uočiti i procjeniti veličinu, oblik ili patološke promjene na bubrezima. Također, važna je procjena bubrežne funkcije koja je moguća pomoću mjerenja razine kreatinina u krvi ili izračunom klirensa kreatinina. Osim optimalnih, postoje i takozvani suboptimalni darivatelji bubrega. Takvu skupinu kadaveričnih darivatelja bubrega predstavljaju darivatelji koji optimalno ne zadovoljavaju standardizirane kriterije, odnosno mogu imati određene zdravstvene probleme kao što su anatomske varijacije bubrega ili su starije životne dobi. U medicinskom kontekstu, osoba koja ima više od 60 godina starosti obično se smatra starijim darivateljem ili je starija od 50 godina te zadovoljava dva od tri kriterija u koje spadaju visoka razina kreatinina u krvi, prisutnost hipertenzije u anamnezi ili smrt uzrokovana moždanim udarom. Iako je rizik od odbacivanja transplantiranog bubrega povećan za 70% u usporedbi sa idealnim darivateljima, primatelji bubrega darivatelja po proširenim kriterijima uvelike pokazuju bolje preživljavanje u odnosu na bolesnike na dijalizi (17, 19).



Slika 9. Pravilnik nacionalnih smjernica za obradu i odabir darivatelja i primatelja bubrega

Izvor: <https://zdravlje.gov.hr/programi-i-projekti/nacionalni-programi-projekti-i-strategije/nacionalni-transplantacijski-program/1528>

1.3 IMUNOLOŠKA OBRADA POTENCIJALNOG DARIVATELJA I PRIMATELJA BUBREGA

Kako bi transplantacija bila što uspješnija i kako bi dobrobit transplantacije predvladala rizike, potrebno je prije složenog transplantacijskog procesa obaviti niz pretraga. Postoje standardizirane pretrage koje se obavljaju u sklopu transplantacije pojedinih organa. Važno je da predtransplantacijska obrada primatelja, ali i darivatelja bude kvalitetna, pravovremena i učinkovita kako bi operacija bila što uspješnija bez loših posljedica, kako za primatelja, tako i za darivatelja. Kod kadaverične transplantacije organa, bolesnici koji čekaju organ od kadavera, odnosno umrlog darivatelja, uvrštavaju se na posebno kreirane liste čekanja kod kojih prednost imaju određene skupine bolesnika kao što su teško oboljeli pacijenti, oni koji moraju primiti više od jednog organa ili djeca. Prije nego što se pacijenta stavi na listu čekanja za transplantaciju bubrega u Eurotransplantu, važno je provesti tipizaciju tkiva kako bi se utvrdila kompatibilnost između primatelja i davatelja (20).

Ključni testovi koji se provode jesu: testiranje seruma primatelja na panelu limfocita, test križne reakcije te kategorizacija primatelja prema postotku PRA (engl. *Panel Reactive Antibodies* – PRA). Za pripremu panela limfocita ključno je odabrati 50 darivatelja čiji su limfociti prethodno tipizirani za HLA antigene. HLA geni odabranih darivatelja predstavljaju reprezentativne gene populacije (20).

Za sve primatelje kao i darivatelje bubrega ključno je testirati gene – svih 11 lokusa sustava HLA. Nakon testiranja analizira se broj različitih gena na tim lokusima kako bi se utvrdio stupanj nepodudarnosti između primatelja i davatelja (engl. *mismatch*). Što je manji broj razlika u HLA genima, to je veća vjerojatnost uspješnog prihvatanja transplantiranog organa i boljeg preživljenja pacijenta. Osim što se testira panel limfocita darivatelja, također se testira serum primatelja. Testiranje seruma mogućeg primatelja bubrega provodi se svaka tri mjeseca kako bi se otkrila prisutnost protutijela anti-HLA i time spriječili mogući neželjeni imunizacijski događaji. Naziv panel-reaktivna protutijela (PRA) koristi se za protutijela anti-HLA koja su identificirana pomoću panela limfocita darivatelja krvi. Ta protutijela izražavaju se kao postotak i pokazuju koliko su limfociti darivatelja u panelu reagirali s protutijelima primatelja. Ova oznaka pomaže u razumijevanju imunološkog odgovora

primatelja na različite HLA antigene te omogućuje procjenu prikladnosti donora za transplantaciju. Ukoliko se utvrde pozitivni probiri seruma, postotak panel-reaktivnih protutijela mora se prijaviti te se trebaju isključiti svi HLA antigeni koji su nepodudarni sa primateljevima. Što je viši postotak PRA, to je veća vjerojatnost da će primatelj imati poteškoća u pronalazanju kompatibilnog donora te će imati povećan rizik od odbacivanja transplantiranog organa. Postotak PRA određuje imunološku pripravnost primateljevog organizma, a klasificira se kao:

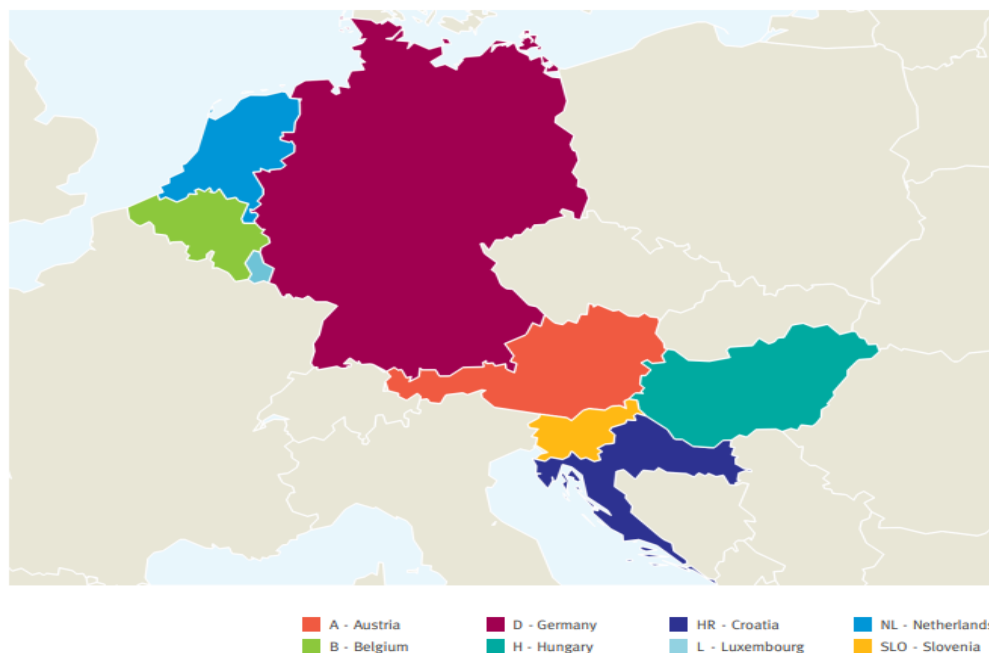
1. **0–5% PRA:** postotak panel-reaktivnih protutijela je nizak te primatelji koji imaju panel-reaktivna protutijela u ovom rasponu smatraju se neimuniziranima. Pronalazak kompatibilnog donora je lakši, a rizik da organ bude odbačen je nizak.
2. **5–85% PRA:** postotak panel-reaktivnih protutijela je umjeren te primatelji koji imaju panel-reaktivna protutijela u ovom rasponu smatraju se imuniziranima. Potreban je pažljiv odabir mogućeg darivatelja organa uz razmatranje mogućnosti primjene imunosupresivne terapije kako bi se smanjio rizik od odbacivanja organa.
3. **>85% PRA:** postotak panel-reaktivnih protutijela je visok te primatelji koji imaju panel-reaktivna protutijela u ovom rasponu smatraju se visokoimuniziranima. U takvim slučajevima rizik od odbacivanja organa je visok te je potreban pažljiv odabir donora kao i intenzivna imunosupresivna terapija (20).

Neželjene posljedice koje se mogu pojaviti nakon transplantacije organa u primateljev organizam uglavnom se vežu uz imunološku aktivnost organizma. Nastupa imunološka reakcija odbacivanja (imunost ili preosjetljivost-alergija) ili imunološka nereaktivnost (imunodeficijencije, specifična imunološka tolerancija). Zbog mogućih neželjenih imunoloških reakcija koje mogu biti štetne i po život opasne za primatelja, uvodi se imunosupresivna terapija s ciljem poboljšanja kvalitete života primatelja organa kao i poboljšanje u preživljavanju transplantata. Značajni imunosupresivni lijekovi su: tacrolimus, mycophenolate mofetil, sirolimus, cyclosporin A i ostali.

Postoje 3 kriterija prema kojima se očituje transplantacijska reakcija, a to su: prema kliničkom tijeku, prema genskom odnosu primatelja i davatelja te prema izboru davatelja. Klinički tijek eksprimira se u obliku hiperakutnog, akutnog ranog, akutnog kasnog ili kroničnog odbacivanja transplantiranog tkiva ili organa. U genetičkom odnosu darivatelja i primatelja transplantacija se dijeli na: autolognu, sinergičnu, ksenogeničnu i alogeničnu. Prema načinu na koji se bira mogući darivatelj tkiva ili organa može biti od zdravog davatelja, od umrle osobe (kadavera) ili životinje, ali tada su rezultati najlošiji jer su prisutna prirodna protutijela (21).

1.4 EUROTRANSPLANT

Eurotransplant je neprofitna organizacija utemeljena 1967. godine od strane profesora Jon van Rooda kojemu je glavni cilj bio u potpunosti iskoristiti mogućnosti presađivanja organa. Od tada pa sve do danas, Eurotransplant djeluje kao posrednik između transplantacijskih centara i donorskih bolnica. Cilj je omogućiti dostupnost raspoloživih organa pacijentima kojima je potrebna transplantacija istih. Organizacija se sastoji od 8 zemalja članica: Austrije, Belgije, Hrvatske, Njemačke, Mađarske, Luksemburga, Nizozemske i Slovenije. Na toj listi Hrvatska se nalazi od 2007. godine, kada je postala punopravna članica.



Slika 10. Članice Eurotransplanta

Izvor: <https://www.eurotransplant.org/>

Tijekom više od 60 godina rada organizacije, omogućena je međusobna razmjena organa od umrlih davatelja između različitih zemalja, odnosno pluća, srca, gušterače, crijeva,

jetre i bubrega. U tom procesu sudjeluju transplantacijski centri, bolnice za razmjenu organa, laboratoriji za tipizaciju tkiva kao i same bolnice u kojima se odvija donacija organa. Svima je zajednički cilj osigurati što bolje podudaranje između darivatelja i primatelja organa. Međusobna suradnja transplantacijskih centara, bolnica i laboratorija koji su važan čimbenik u procesu transplantacije omogućuje bržu razmjenu informacija i veću šansu za uspješnu transplantaciju što konačno omogućuje pacijentima nadu za bolji život.

Unutar informatičkog sustava Eurotransplanta umrežene su sve liste čekanja pacijenata (bilo za solidne organe ili krvotvorne matične stanice) koji čekaju transplantaciju. Na tim listama definirane su karakteristike primatelja organa ključne za pronalazak optimalnog darivatelja – HLA tipizacija kandidata na listi čekanja, rezultati probira na anti-HLA protutijela u serumu te auto-križne reakcije. Također je definirano kliničko stanje pacijenta na temelju čega se formiraju liste prioriteta koje također imaju utjecaj na algoritam probira najpovoljnijeg primatelja u slučaju pojave darivatelja organa. Pacijenti visoke hitnosti imaju prioritet zbog njihove trenutačne situacije kod koje je važno hitno pronaći odgovarajući organ da bi im život bio spašen. Nadalje, imunizirani pacijenti također predstavljaju rizičnu skupinu pacijenata zbog rizika od odbacivanja organa. Kako bi taj rizik bio sveden na minimum, napravljen je program koji omogućuje dodjelu organa koji možda u potpunosti nije podudaran, ali ima prihvatljive karakteristike koje omogućuju uspješnu transplantaciju. Posebnu skupinu predstavljaju i djeca, čija je specifična potreba za organima koji odgovaraju njihovoj veličini i fazi razvoja posebno uzeta u obzir u procesu dodjele organa te su smješteni na prioritetnu listu čekanja (22).

Središnja računalna baza podataka omogućuje transplantacijskim centrima da unose informacije o svojim pacijentima i traženim profilima donora. Kada se pacijent upiše na listu čekanja za transplantaciju organa, vrijeme čekanja počinje teći. Za pacijente koji čekaju na transplantaciju bubrega, to se vrijeme počinje računati od datuma kada su prvi put počeli primati dijalizu. Kada se pojavi donorski organ, laboratoriji provjeravaju karakteristike tkiva i krvnu grupu darivatelja. Te informacije zatim se šalju u središnju bazu podataka Eurotransplanta. Ovaj proces omogućava identifikaciju najboljeg podudaranja između darivatelja i primatelja, što je ključno za uspješnu transplantaciju organa. Na temelju tih podataka, Eurotransplant generira popis podudaranja za svaki dostupni donorski organ. Cilj

je osigurati da proces dodjele organa bude jednak neovisno o tome tko obavlja dodjelu, da bude ponovljiv te da bude transparentan i valjan. Kada je organ prihvaćen, Eurotransplant uspostavlja kontakt između donorske i transplantacijske bolnice te se organizira prijevoz organa u skladu s ograničenim vremenom koje organi mogu provesti izvan tijela. Učinkovita organizacija i brza reakcija ključni su kako bi se osiguralo da transplantacija organa bude uspješna i da se maksimalno iskoriste dostupni resursi. Eurotransplant kao organizacija teži pravednoj i prije svega transparentnoj distribuciji organa tako što usklađuje svoj rad sa međunarodnim sporazumima i nacionalnim propisima kako bi pacijentima bio omogućen pristup organima bez obzira na njihovu nacionalnost ili lokaciju (23).

Članstvo Hrvatske u Eurotransplantu ima značajan utjecaj na visoko imunizirane pacijente jer takvim je pacijentima iznimno teško pronaći podudarnog darivatelja organa. Suradnja Hrvatske i Eurotransplanta omogućuje pristup širokom spektru dostupnih organa što u konačnici povećava šanse za uspješnu transplantaciju pacijentima koji imaju kompleksan imunološki profil. Podaci iz 2011. godine ukazuju na izvanredne rezultate Hrvatske postignute u području transplantacijske medicine. Visoka stopa realiziranih transplantacija bubrega i jetre svrstala je Hrvatsku na prvo mjesto u svijetu. Postignuti rezultati odraz su velikog broja transplantacija kao i visokog postotka preživljenja transplantiranog organa i samog primatelja (20).

Tablica 2 Kadaverični darivatelji organa prema podacima iz Eurotransplanta za 2022. godinu

Preuzeto i prilagođeno iz: <https://www.eurotransplant.org/wp-content/uploads/2023/09/Annual-Report-ET-2022.pdf>

	Austrija	Belgija	Njemačka	Mađarska	Hrvatska	Luksemburg	Nizozemska	Slovenija	Ukupno
Bubreg	157	227	734	102	64	8	255	38	1586
Srce	71	70	311	50	34	4	59	24	644
Pluća	71	91	242	24	18	2	118	20	598
Jetra	152	269	656	79	87	7	196	34	1483
Gušterača	17	24	41	4	6	2	38	1	133
Crijeva		1	2		1	1	1		6
Ostali organi	198	309	844	119	91	8	285	49	1938

2. CILJ RADA

Cilj ovog rada bio je ukazati na važnost provedbe testa križne probe (engl. *cross match*) kod odabira primatelja bubrega od mogućih kadaveričnih donora.

Poseban naglasak stavlja se na pozitivne rezultate testa križne probe jer ukazuju na apsolutnu kontraindikaciju za kadaveričnu transplantaciju bubrega. Negativni rezultati testa križne probe uz ostale klinički ispitane parametre predstavljaju indicaciju za izvođenje transplantacije bubrega s kadaveričnog donora.

Ispitivanje je provedeno u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, Zavoda za transfuzijsku medicinu, KBC Split i u Zavodu za tipizaciju tkiva, Zavoda za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, KBC Zagreb, Rebro.

3. ISPITANICI I METODE

3.1 ISPITANICI

Ekperimentalni dio istraživanja provela sam u Laboratoriju za tipizaciju tkiva na primjeru mogućeg kadaveričnog darivatelja bubrega i 4 kandidata za transplantaciju bubrega. Ispuhivanjem limfnog čvora dobili smo suspenziju T i B limfocita koje smo, zajedno s medijem, stavili na separaciju pomoću gradijenta gustoće (Lymphoprep) koji služi za izolaciju mononuklearnih stanica iskorištavanjem razlika u gustoći stanica. U istraživanju su korišteni serumi 4 potencijalna kandidata za transplantaciju bubrega.

3.2. METODE

3.2.1 HLA tipizacija primatelja i darivatelja

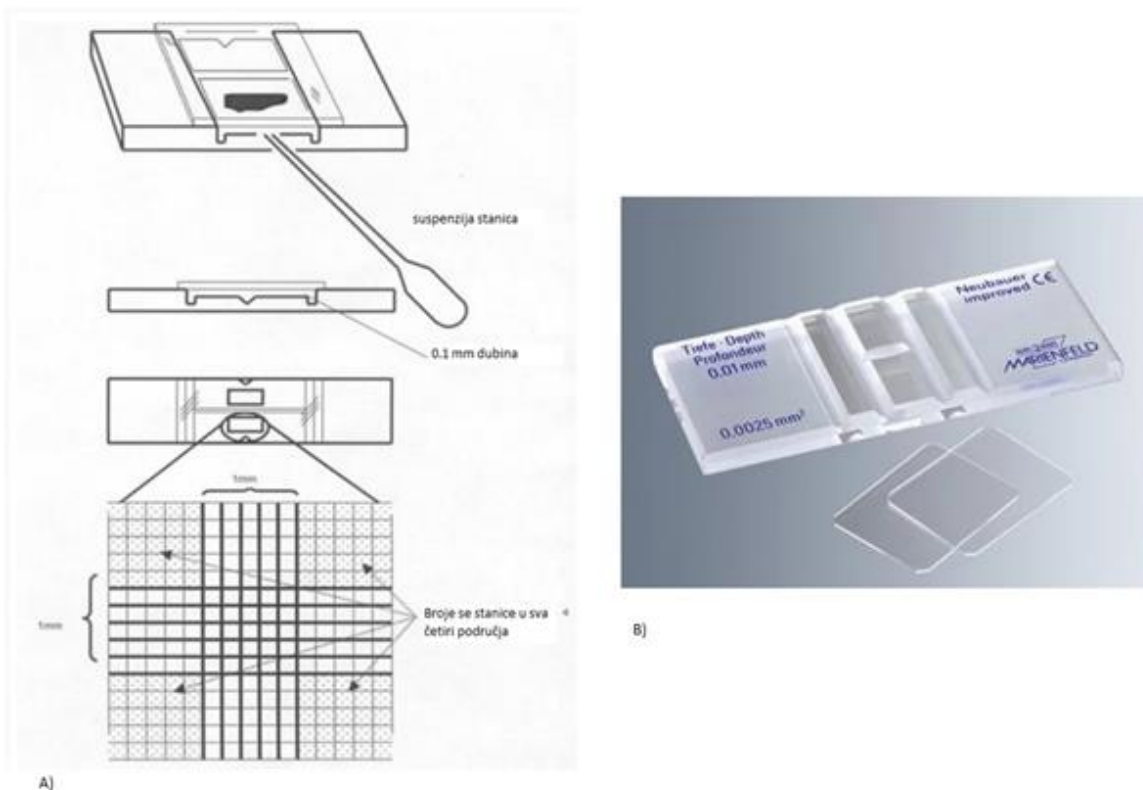
Prije samog procesa transplantacije nužno je ispitati podudarnost u HLA genima i antigenima primatelja i mogućeg darivatelja organa pomoću HLA tipizacije. Za taj proces koriste se serološke metode čiji se rezultati potvrđuju pomoću molekularnih metoda koje uključuju PCR-SSO (Luminex metoda) te PCR-SSP metodu. Nakon što se ispituju HLA geni i antigeni koje sadrže primatelj i darivatelj organa, izvodi se test križne probe (engl. *cross-match*) između njih. Rezultati križne probe omogućuju uvid u podudarnost gena HLA primatelja i mogućeg darivatelja organa.

3.2.2 Serološka metoda određivanja antigena sustava HLA

Serološka metoda koja služi za određivanje antigena HLA razreda I i II naziva se još i testom mikrolimfocitotoksičnosti (engl. *microlymphocitotoxicity test*). Test je utemeljen na reakciji između poznatih protutijela koja se dobiju iz seruma žena višerotkinja, a prethodno su određena pomoću poznatih antigena (24, 25).

Monoklonska protutijela koja reagiraju sa poliklonskim dobivena su pomoću imuniziranih miševa. Poznatim protutijelima dodaje se serum pacijenta te dolazi do reakcije između protutijela i antigena u serumu. Važno je znati prepoznati koji i koliko se antigena vezalo za protutijela ukoliko su međusobno komplementarni pa se stvorio kompleks antigen-antitijelo. Prepoznavanje vezanih antitijela postiže se pomoću njihovog označavanja dodavanjem antihumanog komplementa koji se zatim veže za protutijelo iz nastalog kompleksa. Antihumani komplement koji je jedna vrsta protutijela veže se za membranu stanice te je direktno oštećuje, zatim se dogodi liza stanice i boja prodre u nju. U slučaju da je došlo do nastanka kompleksa antigen-protutijelo, doći će do obojenja stanice te će obojenje biti vidljivo pod mikroskopom i označiti će pozitivan rezultat (26).

Tipizaciju antigena HLA potrebno je provesti pomoću serološke metode testom mikrolimfocitotoksičnosti. Za izvođenje tog testa potrebno je uzeti uzorak periferne krvi s heparinom kao antikoagulumom. Od mogućeg darivatelja uzimaju se limfociti iz slezene ili jetre. Koncentracija limfocita određuje se pomoću hemocitometra koji se još naziva i Burker Turk-ova komorica, a napravljena je od debelog stakla u čijem se središtu nalazi izrezbarena mreža kvadratića. Kako bi se koncentracija limfocita pravilno odredila, potrebno je pomiješati 5 μ l limfocitne suspenzije te 5 μ l boje (Tripan blue). Pomiješanu suspenziju potrebno je postaviti na Burker-Turk-ovu komoricu. Boja prodire u mrtve stanice te se takve stanice pod mikroskopom vizualiziraju kao plavo obojenje. Stanice u koje boja ne prodire ostaju žive. Kako bi bilo moguće tipizirati HLA antigene, potrebno je pod svjetlosnim mikroskopom uočiti 4 do 6 obojenih stanica po malom kvadratiću. Ukoliko je pod svjetlosnim mikroskopom uočen veći broj obojenih stanica, njihova se koncentracija može podesiti razrjeđivanjem ili ponovnim centrifugiranjem suspenzije limfocita.



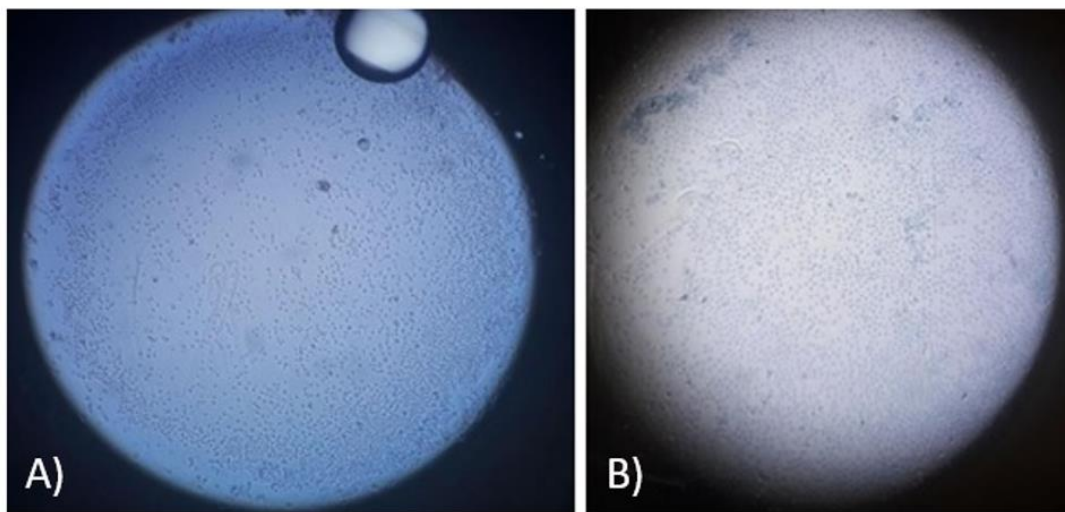
Slika 11. a) Određivanje koncentracije stanica pomoću hemocitometra

b) Burker-Turkova komorica

Preuzeto i prilagođeno iz: Chacon-Cortes D, Griffiths LR. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. BSAM. 2014 May 28;2:1–9.

Nakon podešavanja koncentracije stanica iz limfocita u Burker-Turk-ovoj komorici, uzorak se pomoću Hamilton mikrolitarske šprice postavlja na Terasakijeve pločice koje sadrže jažice u kojima se nalaze već poznata protutijela za antigene HLA razreda koje je potrebno odrediti, a dobivena su iz seruma žena višerotkinja. Uzorak se inkubira pola sata, nakon čega slijedi dodavanje komplementa kunića. Nakon što se doda komplement kunića, inkubacija traje do jednog sata te se nakon inkubacije odstranjuje višak komplementa koji se nije vezao istresanjem Terasakijeve pločice. Ostatak uzorka u jažicama boji se triptanskim

modrilom te se one jažice u kojima se nalazio dovoljan broj mrtvih, odnosno stanica u koje je prodrijetela boja, upisuju tipizacijske listiće. Taj postupak omogućuje određivanje tkivnih antigena koje pacijent ima, a utemeljeni su na pozitivnim reakcijama u jažicama koje sadrže već poznata protutijela (27).



Slika 12. Rezultati testa MLCT pod svjetlosnim mikroskopom

A) negativna reakcija B) pozitivna reakcija

3.2.3 Molekularne metode određivanja alela sustava HLA

Nakon provođenja seroloških metoda kojima se ispituje koje razrede HLA gena pacijent posjeduje, rezultati se provjeravaju pomoću molekularnih metoda koje su preciznije i daju pouzdanije rezultate. Najčešće korištene metode jesu PCR-SSP (engl. *Polymerase chain reaction-Sequence Specific Primer*) te PCR-SSO (engl. *Polymerase chain reaction-Sequence Specific Oligonucleotids*), odnosno Luminex metoda. U procesima ispitivanja HLA gena na molekularnoj razini nužno je izolirati DNA iz uzoraka. DNA se može izolirati

iz uzoraka periferne krvi koja se prethodno izvadi pacijentu pomoću epruvete koja sadrži EDTA antikoagulans (28).

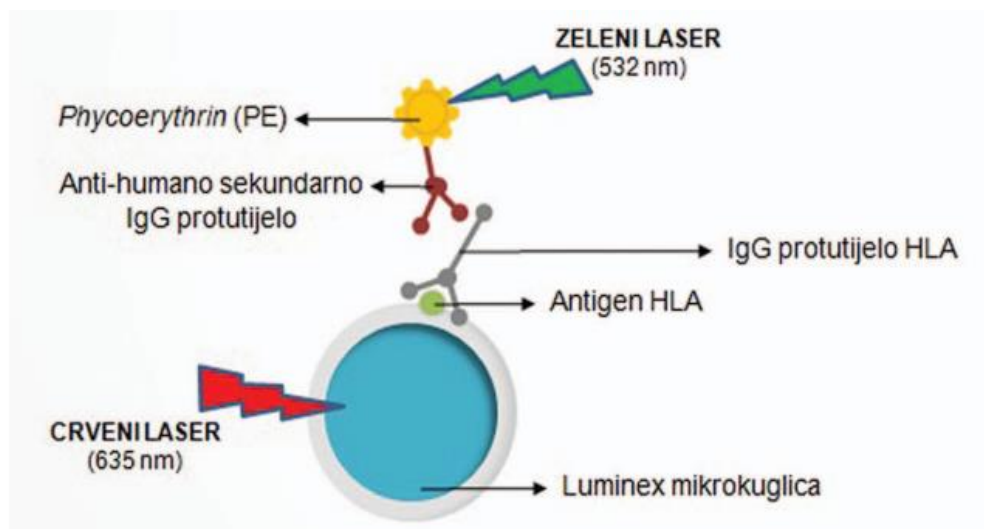
3.2.3.1 Izolacija DNA

Prije procesa ispitivanja gena HLA pomoću molekularnih metoda, nužno je izolirati DNA iz periferne krvi pacijenta. U radu se koriste razni komercijalno dostupni setovi. Najčešće korištena metoda jest upotreba kolumne koja sadrži silikatnu membranu na koju se vežu DNA molekule. Proces započinje liziranjem stanica kako bi se molekula DNA oslobodila iz stanica. Za liziranje se koristi proteinaza K i pufer za liziranje. Kada se lizatu doda etanol, omogućeno je vezanje prethodno oslobođene DNA iz stanice na kolumnu čija silikatna membrana veže molekulu DNA. Nakon vezanja DNA molekule za silikatnu membranu, potrebno je ispiranjem pomoću pufera ukloniti ostatne nečistoće. Pri samom kraju procesa izolacije DNA potrebno je eluirati čistu DNA elucijskim puferom (29).

3.2.3.2. PCR-SSO (*Luminex metoda*)

PCR-SSO (engl. *Polymerase chain reaction- sequence-specific oligonucleotide*) jest metoda koja se temelji na vezanju DNA produkta koji je prethodno amplificiran iz uzorka, a veže se na polistirenske mikrokuglice (mikrosfere) na kojima se nalaze konjugirani antigeni HLA razreda I i II. Mikrosfere su označene zelenom i infracrvenom bojom. Označavanje mikrosfera omogućuje potvrdu koji se HLA lokus nalazi u uzorku. Za obradu i interpretaciju rezultata dobivenih PCR-SSO metodom se primjenjuje uređaj Luminex. Osnovni princip Luminex uređaja utemeljen je na protočnoj citometriji. Svaki test sadrži do 100 setova mikrokuglica s fluorokromima u različitim omjerima, što omogućuje jedinstveni spektralni signal za svaki set. Prvi korak jest inkubacija seruma pacijenta i mikrokuglica kako bi se ukoliko su prisutna, vezala IgG protutijela HLA na antigene HLA razreda I i/ili II koji se nalaze konjugirani na mikrokuglicama. Protutijela koja se nisu vezala za antigene HLA na

mikrokuglicama se ispiru. Antihumana IgG protutijela označena phycoeritriinom (PE) koji predstavlja fluorescentnu boju dodaju se kako bi se mogla označiti protutijela koja su ostala vezana. Reakcije se analiziraju u Luminex fluorocitometru pomoću dva lasera. U postupku analize, crvenim se laserom aktiviraju fluorokromi u mikrokuglicama, omogućujući identifikaciju jedinstvenog signala pojedinog seta mikrokuglica na kojima su vezani antigeni HLA specifični za određene vrste. Pomoću zelenog lasera, potiče se fluorescencija phycoeritrina. Nakon mjerenja signala pomoću lasera, rezultati se obrađuju u računalnom programu. Računalni program registrira signale te se pomoću njih određuje specifičnost protutijela u testiranom serumu pacijenta.



Slika 13. Shematski prikaz principa Luminex tehnike

Izvor: Katalinić N, Crnić Marčetić T, Balen S. Praćenje protutijela HLA prije transplantacije bubrega Luminex tehnikom. *Medicina Fluminensis : Medicina Fluminensis*. 2020 Dec 1;56(4):490–7.

Prisutnost HLA protutijela koja se mogu pronaći u pacijentovom serumu mogu se ispitati na tri razine:

- 1. kvalitativno testiranje:** izražavanje rezultata kao pozitivnog (HLA protutijela su prisutna) ili izražavanje rezultata kao negativnog (nije zabilježena prisutnost HLA protutijela)
- 2. postotak panel reaktivnih protutijela**
- 3. određivanje specifičnosti HLA protutijela:** uključene su mikrokuglice koje imaju HLA molekule iste specifičnosti.

Prednost Luminex metode u odnosu na ostale jest što je visoko osjetljiva i specifična što je nužno kod prepoznavanja protutijela HLA. Visoka osjetljivost može predstavljati i nedostatak metode obzirom da se mogu otkriti protutijela upitne kliničke značajnosti za transplantaciju bubrega. Jedna od prednosti jest što je moguće je otkriti protutijela koja se nalaze u niskom titru. Također, mogu se dokazati protutijela na antigene HLA razreda I i II, kao i protutijela na neke od rijetkih alela zbog širokog spektra antigena HLA na mikrokuglicama.

Nedostatci metode ogledaju se u činjenici da nije moguće razlikovanje komplement aktivirajućih IgG protutijela od onih koja ne aktiviraju komplement. Prozonski učinak može negativno utjecati na rezultate testiranja seruma visokoimuniziranih pacijenata jer može uzrokovati lažno negativne ili slabo pozitivne rezultate, a nakon razrijeđenja seruma rezultat može biti visoko reaktivan (30).

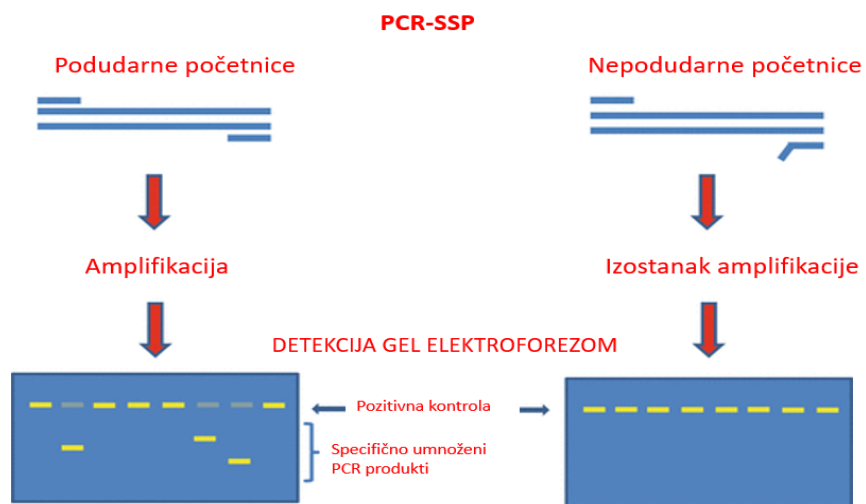
3.2.3.3 PCR-SSP

PCR-SSP (engl. *Polymerase Chain Reaction with Sequence-Specific Primers*) metoda temelji se na korištenju oligonukleotidnih primera koji su komplementarni sa specifičnim alelima ili grupama alela. Ova metoda omogućava identifikaciju prisutnosti određenih genetičkih varijanti u uzorku DNA. Kod PCR-SSP metode važno je imati odgovarajuće početnice kako bi amplifikacija DNA bila omogućena i kako bi rezultat bio pozitivan. Rezultat PCR-SSP metode prikazuje se pomoću gel elektroforeze gdje se prethodno

amplificirana DNA postavlja na gel te se na temelju razlike u duljini fragmenata zbog putovanja DNA produkta kroz gel može prikazati i očitati rezultat (31, 32).

PCR-SSP metoda zahtijeva pažljivu pripremu i specifične reagense za uspješno provođenje. Potrebno je pažljivo pripremiti reakcijsku mješavinu koja se još naziva i Master MIX, a sastoji se od Taq polimeraze, destilirane vode i uzorka u kojemu se nalazi izolirana DNA. U posebne jažice u kojima se nalazi komercijalno dostupna pripremljena otopina dehidriranih primera pipetira se prethodno pripremljena reakcijska mješavina Master MIX-a. Pločica s jažicama (Olerup SSP®) zatim se postavlja u Thermocycler gdje je omogućena amplifikacija DNA iz uzorka koji prethodno bio pomiješan u reakcijsku mješavinu Master MIX-a.

Nakon što se završi PCR amplifikacija u PCR-SSP metodi, amplificirani DNA produkt stavlja se na gel elektroforezu. Produkt se pomiješa s bojom kao što je etidij bromid (Et-Br) ili Simply Safe, koja omogućava vizualizaciju DNA pod UV svjetlom. Nakon što se uzorci pipetiraju u jažice gela, gel se podvrgava elektroforezi u trajanju od 15 minuta. Nakon elektroforeze, gel se izlaže UV svjetlu kako bi se vizualizirali rezultati. Program Proxima AQ-4 koristi se za digitalizaciju i analizu slike gela. U svaki eksperiment potrebno je uključiti i negativnu kontrolu, koja služi za provjeru izvedbe testa i osiguranje da nije došlo do kontaminacije. Interpretacija rezultata temelji se na prisutnosti ili odsutnosti DNA produkta na gelu. Prisustvo trake ukazuje na pozitivan rezultat, odnosno prisutnost ciljanog alela u uzorku. Odsutnost trake ukazuje na negativan rezultat, odnosno odsutnost ciljanog alela. Za analizu i interpretaciju rezultata koristi se program Helmborg SCORE (33).



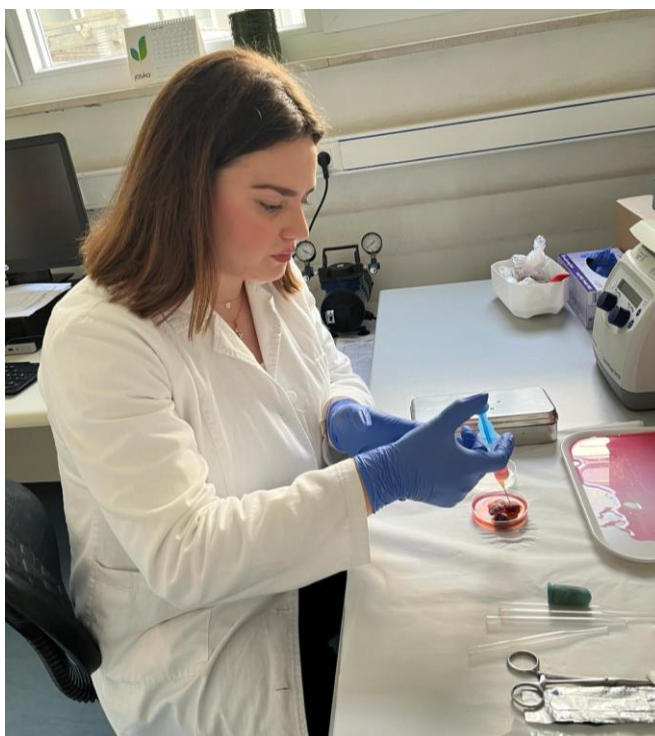
Slika 14. Shematski prikaz određivanja alela sustava HLA PCR-SSP metodom

Preuzeto i prilagođeno iz: <http://www.medogar.co.il/index.php/en/lab-reagents/hla-typing>

3.3 TEST KRIŽNE PROBE (CROSS-MATCH) IZMEĐU PRIMATELJA I DARIVATELJA

Prije procesa transplantacije bubrega, kao i svih solidnih organa, zadnji najvažniji test koji je potrebno provesti jest određivanje moguće prisutnosti donor-specifičnih antitijela (DSA - *Donor Specific Antibodies*). Provjera se izvodi pomoću serološke metode - testa mikrolimfocitotoksičnosti. Prethodno dobiveni serum primatelja organa izlaže se pripremljenoj suspenziji T i B limfocita potencijalnog donora organa dobivenoj iz limfnog čvora ili slezene. Ako je rezultat testa mikrolimfocitotoksičnosti pozitivan, to znači da su prisutna antitijela usmjerena protiv HLA antigena darivatelja i takav rezultat predstavlja apsolutnu kontraindikaciju za transplantaciju, budući da prisutnost donor specifičnih protutijela može uzrokovati akutno odbacivanje presatka.

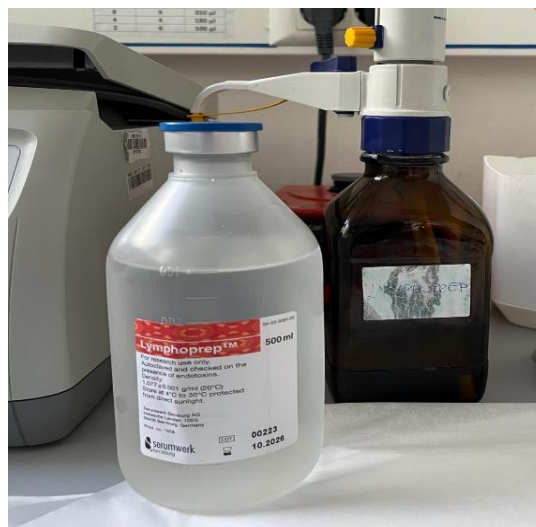
Za izvođenje samog postupka potrebno je iz prethodno izoliranog limfnog čvora ili slezene donora izolirati limfocite. Limfni čvor ili slezena se iz hranjivog MEM medija u kojem se nalaze prebace u Petrijevu zdjelicu te se tehnikom ispuhivanja izolira suspenzija T ili B limfocita donora. Izolirana se suspenzija zajedno sa Lymphoprep gradijentom gustoće centrifugira na 2500 okretaja/min 20 minuta.



Slika 15. Ispuhivanje limfocita iz limfnog čvora kadaveričnog donora
Postupak proveden u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split



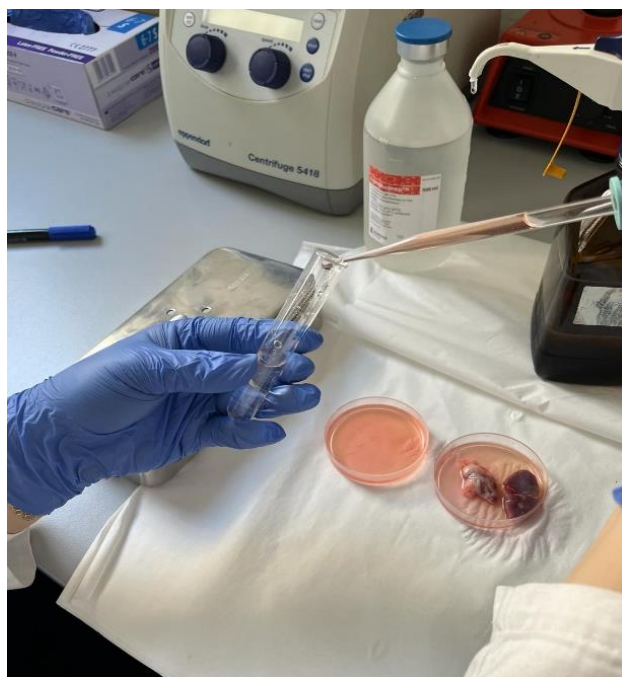
Slika 16. Limfni čvor kadaveričnog donora



Slika 17. Lymphoprep gradijent gustoće

Nakon što se izvrši prvo centrifugiranje, prsten limfocita pažljivo se premješta u novu, čistu staklenu epruvetu. Epruveta se potom napuni fiziološkom otopinom i ponovno

centrifugira 10 minuta pri 1700 okretaja u minuti. Nakon ovog koraka, supernatant se odbacuje. Limfociti se zatim još jednom isperu ponavljanjem centrifugiranja 10 minuta pri 1500 okretaja u minuti.



Slika 18. Priprema suspenzije limfocita

Postupak proveden u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split

Nakon drugog centrifugiranja, limfociti se talože na dnu epruvete. Nakon taloženja na dnu epruvete se napravi resuspendija u malom volumenu MEM medija ili fiziološke otopine. Kako bi se pravilno odredila koncentracija i vijabilnost limfocita, njihova suspenzija postavlja se na Burker-Turk-ovu komoricu (hemocitometar). Nakon što se podesi njihova koncentracija pomoću dilucije ili ponovnog centrifugiranja suspenzije ukoliko je potrebno, limfociti su spremni za izvođenje testa križne reakcije.

Terasakijeva pločica na kojoj se test izvodi podijeljena je u 6 stupaca. Jažice Terasakijeve pločice prethodno se naulje parafinskim uljem. Pomoću Hamilton mikrolitarske šprice u stupac A dodaje se 1 μ l pozitivne kontrole. U stupac B dodaje se 1 μ l AB+ seruma

koji je inaktiviran i predstavlja prvu negativnu kontrolu. U stupac C dodaje se 1 μ l MEM medija koji predstavlja drugu negativnu kontrolu. U stupce D i E dodaje se 1 μ l nerazrijeđenog seruma primatelja organa. U stupac F dodaje se razrijeđeni serum primatelja organa razrijeđen u omjeru 1:1 s AB+ serumom koji je inaktiviran.



Slika 19. Prikaz postavljanja seruma 4 kandidata za transplantaciju bubrega na Terasakijeve pločice

Postupak proveden u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split

Nakon pripreme jažica Terasakijeve pločice za tipizaciju, nanosi se 1 μ l prethodno pripremljene suspenzije limfocita dobivene iz limfnog čvora potencijalnog donora. Slijedi inkubacija od 30 minuta nakon koje se dodaje komplement kunića. Nakon dodavanja kunićjeg komplementa, inkubacija traje 60 minuta. Nakon drugog inkubacijskog koraka, Terasakijeve se pločice ispiru kako bi se uklonio preostali višak komplementa koji se nije uspio vezati. Ostatak vezanog komplementa označava se pomoću boje Triptan blue (triptansko modriilo) te se obojene stanice promatraju pod svjetlosnim mikroskopom. Važnost

ovog testa jest prepoznavanje pozitiviteta testa mikrolimfocitotoksičnosti jer ukazuje kako postoji prisutnost HLA protutijela u serumu potencijalnog primatelja organa koja su direktno usmjerena protiv HLA antigena donora što je apsolutna kontraindikacija u procesu transplantacije kako bubrega, tako i svih solidnih organa (26).

4. REZULTATI

U radu su obrađena 4 moguća primatelja bubrega koji su dugi niz godina bili na listi čekanja za transplantaciju bubrega. Nakon dojave o potencijalnom donoru iz dijalitičkog centra KBC Split, u Laboratoriju za tipizaciju tkiva dostavljeni su uzorci krvi s heparinom, uzorci krvi s EDTA i limfni čvor potencijalnih donora. Iz dobivenog materijala metodom PCR-SSO i SSP određena je tipizacija HLA svih lokusa potencijalnog darivatelja (slika 20.) i prijavljena je u ENIS sustav Eurotrasplanta.

KLINIČKI BOLNIČKI CENTAR SPLIT
ZAVOD ZA TRANSFUZIJSKU MEDICINU
LABORATORIJ ZA TIPIZACIJU TKIVA
Tel: 021 557-430

NALAZ HLA TIPIZACIJE

ET broj: [REDACTED]
God.rođenja: [REDACTED]
Broj : [REDACTED]

Tipizacija HLA (serološka metoda)

HLA-A 24(9),	HLA-A 32(19),
HLA- B 7,	HLA- B 51(5),
HLA-Cw7	HLA-Cw -
HLA-Bw4,	HLA-Bw6

Test izveden na : INNO-TRAIN HLA-READY PLATE ABC 72 (lot H720323)

Tipizacija HLA (DNA metoda)

HLA-A*24,	HLA-A*32
HLA- B*07,	HLA- B*51
HLA-C*07,	HLA-C -
HLA-DRB1*11,	HLA-DRB1*15
HLA-DQA1*01	HLA-DQA1*05
HLA-DQB1*03	HLA-DQB1*06

Test izveden na :
LIFECODES HLA-A (lot 3013131)
LIFECODES HLA-B (lot 3013567)
LIFECODES HLA-C (lot 3012846)
LIFECODES HLA-DRB1 (lot 3013296)
LIFECODES HLA-DQA1/DQB1 (lot 3012778)

Test izvršio: [REDACTED]

Pročelnica Zavoda: [REDACTED]

Voditeljica laboratorija: [REDACTED]

Split, 07.04.2024.

Slika 20. Tipizacija darivatelja

Na temelju HLA tipizacije potencijalnog darivatelja bubrega, iz Eurotransplanta poslana je lista mogućih primatelja bubrega (slika 21.). Lista je utemeljena s obzirom na podudarnost krvne grupe, HLA tipizaciju i postotak PRA. Na Eurotransplantovoj cross-match listi nalazila su se i 4 potencijalna primatelja iz našeg centra. Odmah po primitku liste, kontaktirani su nefrolozi iz dijalitičkih centara kojima pripadaju navedeni pacijenti, kako bi se utvrdilo kliničko stanje pacijenta i provjerilo je li je došlo do eventualnih senzibilizirajućih događaja (primanje krvi ili manji kirurški zahvati unutar 3 mjeseca od zadnjeg screeninga seruma). U slučaju potvrde da su pacijenti sa liste u dobrom stanju i spremni za transplantaciju, iz uzoraka seruma pohranjenih prilikom posljednjeg screeninga napravljen je cross-match CDC metodom (citotoksičnost ovisna o komplementu).

Eurotransplant
Rep 220: Peri allocation lab report

07 aprill 2024 07:31:48
production

ET donor number: ██████████ Donor center: CHROR Date donor report: 06.04.2024

Donor data:

Age: 61 HBsAg: Neg Sepsis: HLA Match Level: DR Split HLA full typing: A9 A24 A19 A32 B5 B51 B7 Bw4 Bw6 Cw7 DR2 DR15 DR5 DR11
 cfx: F HBeAb: Neg Meningitis: TT Lab: CZATT DR51 DR52 Q01 Q06 Q03 Q07 Cw15 DQA-01 DQA-05 DP-0201
 ASO: A HCVAb: Neg Malign. Tumor: No ev. 5P-0401 DPA-01
 Rh: Pos CMV IgG/IgM: Pos/Neg IV Drug Abuse: No Typing mat.: Peripheral blood
 HLA match typing: A9 A19 B5 B7 DR15 DR11

Rank	Organ	Etar	Name	Ctr	Age	Sex	Urg	Cri	ABO	Cur	Ab	Waiting since
2 KI				CZM	67	F	I	212	A4B3	6	Neg	30.06.2017
3 KI				CZA	49	M	T	270	A	0	DNeg	15.02.2019
4 KI				CZA	40	M	T	011	A	0	DNeg	01.09.2022
5 KI				CZM	55	M	T	111	A7B3	0	DNeg	16.02.2021
6 KI				CZM	23	F	I	212	A2B3	50	DNeg	26.12.2022
7 KI				CZM	62	F	T	111	A4B3	0	Neg	12.04.2022
8 KI				CZA	25	M	I	121	A	40	DNeg	11.03.2020
9 KI				CZA	47	M	T	121	A	0	DNeg	25.05.2020
10 KI				CZM	55	F	T	111	A6B3	0	DNeg	25.07.2022
11 KI				CZA	56	M	T	211	A	0	DNeg	20.12.2022
12 KI				CZM	63	F	I	112	A4B3	4	DNeg	07.07.2022
13 KI				CZA	58	M	T	111	A	0	DNeg	25.07.2023
14 KI				CZA	33	M	T	210	A	0	DNeg	
15 KI				CZM	51	F	T	121	A7B3	0	DNeg	25.04.2023
16 KI				CZM	63	M	T	211	A4B3	0	DNeg	13.03.2022

Center(s) in donor typing lab cluster:
CZA CZM CZD CRI CHR CZP COS CZK


Center(s) in recipient typing lab cluster:

0 = field empty; patient is not on dialysis yet

Page 1 of 1

Slika 21. Eurotransplant Cross-match lista

Rezultati su pokazali da je kod jednog od 4 moguća primatelja bubrega cross-match bio pozitivan (slika 22.). Pacijent je bio visoko senzibiliziran, a tipizacija mogućeg primatelja u odnosu na darivatelja pokazala je visoku nepodudarnost (4/10).

 KBC SPLIT <small>Antikörperlabor - Zentrallabor</small>	OBRAZAC			
	KRIŽNA PROBA DTT-/DTT+ U KADAVERIČNOJ TX			
	U primjeni od: 01.01.2024.	Izdanje: 2	Stranica: 1	Oznaka: OB-HLA-05

DAVATELJ	
ET BROJ	██████████
INICIJALI, GOD.ROĐENJA	
DATUM UZORKA	06.04.2024
DATUM ISPITIVANJA	07.04.2024
Izvor stanica (T+B limfociti) :	periferna krv / limfni čvor / slezena
LOT complement:	HK7013
LOT IgG (PK):	HG918
Izvršio: <i>sf</i>	Potvrdio: <i>bc</i>

PRIMATELJ		A	B	C	D	E	F	REZULTAT CM
		-CON ABS	-CON MEDIJ	+CON IgG	Serum 1 µL	Serum 1 µL	Serum 1 µL	
ET ████████ Datum uzorkovanja seruma: 13.3.24.	1			8	8	8	8	+
	2			8	8	8	8	
	3			8	8	6	8	
ET ████████ Datum uzorkovanja seruma: 7.3.24.	4			8				-
	5			8				
	6			8				
ET ████████ Datum uzorkovanja seruma: 2.3.24.	7			8				-
	8			8				
	9			8				
ET ████████ Datum uzorkovanja seruma: 11.3.24.	10			8				-
	11			8				
	12			8				

	Ime i prezime	Datum ovjere:	Potpis
Izradio/la	Matea Tarabene, mag.biol.mol.	01.01.2024.	
Pregledao/la	Doc.dr.sc. Esma Čečuk-Jeličić, mag.biol.mol		
Odobrio/la	Doc.dr.sc. Esma Čečuk-Jeličić, mag.biol.mol		

Slika 22. Rezultati cross-matcha sa 4 moguća primatelja

5. RASPRAVA

Svaka tjelesna stanica sadrži brojne bjelančevine koje mogu izazvati imunološku reakciju u tuđem organizmu, a te molekule nazvane su antigenima glavnog sustava tkivne podudarnosti (eng. *Major Histocompatibility complex*), dok su kod čovjeka poznate pod nazivom sustav HLA. Jedna od osobitosti ovog sustava je izrazita polimorfnost antigena i gena što ga čini najpolimorfnijim genskim sustavom kod čovjeka. Funkcije sustava HLA su mnogostruke, a temelje se na pomoći imunološkom susatvu u održavanju osobitosti jedinke te pokretanju imunološkog odgovora s ciljem obrane od stranog antigena. Glavna osobitost sustava HLA je povezanost HLA sustava s bolestima, odnosno genetska predispozicija za čitav niz autoimunih bolesti (reumatoidni artritis, psorijatični artritis, dijabetes melitus kao i celijakija), razne nefrološke, neurološke i dermatološke bolesti. Također, važna osobitost ovog sustava je populacijska genetika, odnosno otkrivanje i ispitivanje učestalosti pojedinih alela i haplotipova u raznim svjetskim populacijama. Snažne populacijske spoznaje prate i antropološka ispitivanja, a reklo bi se da je najvažniji značaj ovog sustava povezanost sustava HLA sa transplantacijom tkiva i organa. Kao što je poznato sustav HLA je neizostavni dio u svakom transplantacijskom programu, bilo da se radi o kadaveričnoj ili živoj transplantaciji bubrega kao i transplantaciji krvotvornih matičnih stanica.

Zahvaljujući transplantacijskom programu bubrega između KBC Zagreb i KBC Split omogućeno je da se iz uzoraka i limfnog čvora potencijalnog darivatelja iz Splitsko-dalmatinske županije napravi tipizacija HLA, odnosno odrede aleli potencijalnog donora. Zahvaljujući suradnji sa Zavodom za tipizaciju tkiva KBC Rebro nakon HLA tipizacije sam nalaz je poslan u Eurotransplant kao krovnu jedinicu koju čini 7 zemalja među kojima je i Hrvatska. Po standardima Eurotransplanta na listi cross matcha našla su se i 4 moguća primatelja bubrega iz hrvatskih centara. Po primitku liste iz eurotransplanta kontaktirani su potencijalni primatelji. Važno je istaknuti da je jedan od mogućih primatelja bubrega koji su dolazili u obzir za transplantaciju bio visoko senzibiliziran, dok ostala 3 primatelja nikada nisu imali zabilježen postotak panel reaktivnih antitijela za vrijeme čekanja na listi za transplantaciju bubrega. Nakon što je napravljena križna reakcija između primatelja i darivatelja, dobiveni su rezultati gdje je kod visoko senzibiliziranog pacijenta, ali i lošije

tkivne podudarnosti primatelj-darivatelj cross match bio pozitivan i taj pacijent nije dolazio u obzir za transplantaciju bubrega. Ostala 3 pacijenta imali su negativan cross match, ali s različitom podudarnošću, odnosno nepodudarnošću s potencijalnim darivateljem. Nakon konzilijarnog sastanka kojeg su činili nefrolog, urolog i imunogenetičar, odlučeno je da primatelj broj 2 i primatelj broj 4 dobiju po jedan bubreg. Primatelj broj 2 bio je mlada osoba koja je bila podudarna u 7/10 alela s potencijalnim darivateljem, dok je primatelj broj 4 imao 2 podudarnosti u lokusu HLA-DRB1*, jednu podudarnost u lokusu HLA-C, dvije podudarnosti u lokusu HLA-B i jednu podudarnost u lokusu HLA-A* i HLA-DQB. Bez HLA tipizacije, odnosno određivanja alela kako pacijenta na listi čekanja, tako i potencijalnih darivatelja koji se dobiju iz Eurotransplanta, nema ni uspješne, a ni općenito transplantacije solidnih organa.

6. ZAKLJUČAK

1. Sustav HLA najsloženiji je genetski sustav kod čovjeka. Čini ga niz osobitosti koje nije moguće pronaći ni u jednom genskom sustavu. Predstavlja jedan od najpolimorfnijih genskih sustava kod čovjeka.
2. HLA tipizacija podrazumijeva određivanje tkivnih antigena i gena serološkim metodama i metodama molekularne biologije (PRC-SSP i SSO, RT-PCR i NGS).
3. Uz niz ostalih osobitosti, glavna značajka ovog sustava nalazi se u transplantaciji solidnih organa i transplantaciji krvotvornih matičnih stanica.
4. Broj transplantacija u Hrvatskoj naglo je porastao nakon pridruženja Hrvatske Eurotransplantu. Ističe se 2015. godina kada je Hrvatska bila prva zemlja u svijetu, kako po broju transplantacija, tako i po broju darivatelja.
5. Za samu transplantaciju solidnih organa podrazumijeva se čitav niz vrlo složenih parametara zadanih Eurotransplantom i Europskom federacijom za imunogenetiku kao što su imunogenetski testovi primatelja i darivatelja, cross match, praćenje PRA kod pacijenata koji su na listi čekanja za solidne organe te nefrološka obrada.
6. Transplantacija tkiva i organa timski je rad koji zahtijeva svakodnevno praćenje najnovijih metoda molekularne biologije, poboljšanja imunosupresije od strane nefrologa i pristup svakom pacijentu sa velikom dozom empatije.

7. LITERATURA

1. Andreis I, Batinić D, Čulo Filip, Grčević D, Marušić M, Taradi M, et al. *Imunologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.
2. Mehra NK. *The HLA Complex in Biology and Medicine: A Resource Book*. Boydell & Brewer Ltd; 2010. 616 p.
3. Amos DB. *History of HLA: Ten Recollections. (HLA – A Mouser’s Recollections)*.
4. Choo SY. The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications. *Yonsei Med J*. 2007 Feb 28;48(1):11–23.
5. Begovich AB, McClure GR, Suraj VC, Helmuth RC, Fildes N, Bugawan TL, et al. Polymorphism, recombination, and linkage disequilibrium within the HLA class II region. *J Immunol*. 1992 Jan 1;148(1):249–58.
6. González-Galarza FF, Takeshita LYC, Santos EJM, Kempson F, Maia MHT, da Silva ALS, et al. Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jan;43(Database issue):D784-788.
7. HLA nomenklatura @ hla.alleles.org [Internet]. [pristupljeno 25.04.2024.]. Dostupno na: <https://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>
8. Koskela S, Ritari J, Hyvärinen K, Kwan T, Niittyvuopio R, Itälä-Remes M, et al. Hidden genomic MHC disparity between HLA-matched sibling pairs in hematopoietic stem cell transplantation. *Sci Rep*. 2018 Mar 29;8(1):5396.
9. Svejgaard A, Ryder LP. HLA and Disease. In: Bach FH, Good RA, editors. *Clinical Immunobiology* [Internet]. Elsevier; 1980 [pristupljeno 15.05.2024.]. p. 173–81. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780120700042500177>
10. INFORMATIVNI-LETAK-TRANSPLANTACIJA-BUBREGA.pdf [Internet]. [pristupljeno 15.05.2024.]. Dostupno na: <https://kbc-rijeka.hr/wp-content/uploads/2017/06/INFORMATIVNI-LETAK-TRANSPLANTACIJA-BUBREGA.pdf>
11. Denic A, Glasscock RJ, Rule AD. Structural and Functional Changes With the Aging Kidney. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2016 Jan;23(1):19–28.
12. Bax L, van der Graaf Y, Rabelink AJ, Algra A, Beutler JJ, Mali WPTM, et al. Influence of atherosclerosis on age-related changes in renal size and function. *Eur J Clin Invest*. 2003 Jan;33(1):34–40.

13. Morrissey PE, Yango AF. Renal transplantation: older recipients and donors. *Clin Geriatr Med.* 2006 Aug;22(3):687–707.
14. Gallagher JC, Rapuri P, Smith L. Falls are associated with decreased renal function and insufficient calcitriol production by the kidney. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007 Mar;103(3–5):610–3.
15. Nacionalne smjernice za obradu i odabir primatelja i darivatelja bubrega.pdf [Internet]. [pristupljeno 16.05.2024.]. Dostupno na: <https://zdravlje.gov.hr/UserDocsImages//dokumenti/Tekstovi%20razni//Nacionalne%20smjernice%20za%20obradu%20i%20odabir%20primatelja%20i%20darivatelja%20bubrega.pdf>
16. Zakon o presađivanju ljudskih organa u svrhu liječenja - Zakon.hr [Internet]. [pristupljeno 20.05.2024.]. Dostupno na: https://www.zakon.hr/z/556/Zakon-o-presa%C4%91ivanju-ljudskih-organa-u-svrhu-lije%C4%8Denja#google_vignette
17. Bašić Jukić N, Kaštelan Ž. Transplantacija bubrega. Zagreb: Medicinska naklada; 2016.
18. Giessing M. Donors with malignancies-risk or chance? *Transplant Proc.* 2012;44(6):1782–5.
19. Gill J, Bunnapradist S, Danovitch GM, Gjertson D, Gill JS, Cecka M. Outcomes of kidney transplantation from older living donors to older recipients. *Am J Kidney Dis.* 2008 Sep;52(3):541–52.
20. Žunec R, Grubić Z, Balen S. Važnost imunogenetike u transplantaciji organa. *Medix.* 2011;17(92/93).
21. Buckley RH. 27. Transplantation immunology: organ and bone marrow. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Feb;111(2 Suppl):S733-744.
22. Eurotransplant [Internet]. [pristupljeno 25.05.2024.]. Cooperating saves lives. Dostupno na: <https://www.eurotransplant.org/about-eurotransplant/cooperating-saves-lives/>
23. Eurotransplant [Internet]. [pristupljeno 25.05.2024.]. Allocation of organs. Dostupno na: <https://www.eurotransplant.org/allocation/allocation-of-organs/>
24. Terasaki PI, McCLELLAND JD. Microdroplet Assay of Human Serum Cytotoxins. *Nature.* 1964 Dec;204(4962):998–1000.
25. Amos DB, Bach FH. PHENOTYPIC EXPRESSIONS OF THE MAJOR HISTOCOMPATIBILITY LOCUS IN MAN (HL-A): LEUKOCYTE ANTIGENS AND MIXED LEUKOCYTE CULTURE REACTIVITY. *Journal of Experimental Medicine.* 1968 Oct 1;128(4):623–37.

26. Mulley WR, Kanellis J. Understanding crossmatch testing in organ transplantation: A case-based guide for the general nephrologist. *Nephrology (Carlton)*. 2011 Feb;16(2):125–33.
27. Absher M. CHAPTER 1 - Hemocytometer Counting. In: Kruse PF, Patterson MK, editors. *Tissue Culture* [Internet]. Academic Press; 1973 [pristupljeno 27.05.2024.]. p. 395–7. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012427150050098X>
28. Thorsby E. A short history of HLA. *Tissue Antigens*. 2009 Aug;74(2):101–16.
29. Chacon-Cortes D, Griffiths LR. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *BSAM*. 2014 May 28;2:1–9.
30. Katalinić N, Crnić Marčetić T, Balen S. Praćenje protutijela HLA prije transplantacije bubrega Luminex tehnikom. *Medicina Fluminensis : Medicina Fluminensis*. 2020 Dec 1;56(4):490–7.
31. HLA-DR tipizacija PCR amplificiranjem sa sekvencijski specifičnim početnicama (PCR-SSP) u 2 sata: Alternativa serološkoj DR tipizaciji u kliničkoj praksi uključujući podudaranje davatelja i primatelja u kadaveričnoj transplantaciji - Olerup - 1992 - Tkivni antigeni - Wiley Online Library [Internet]. [pristupljeno 27.05.2024.]. Dostupno na: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-0039.1992.tb01940.x>
32. Bunce M, O'Neill CM, Barnardo MC, Krausa P, Browning MJ, Morris PJ, et al. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens*. 1995 Nov;46(5):355–67.
33. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*. 1992;39(5):225–35.

8. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci

Ime i prezime: Klara Cvitković

Datum rođenja: 10.01.2003.

Mjesto rođenja: Sinj

Državljanstvo: Hrvatsko

E-mail: klaracvitkovic10@gmail.com

Obrazovanje

2009. – 2013. OŠ fra Pavla Vučkovića, Brnaze

2013. – 2017. OŠ fra Pavla Vučkovića, Sinj

2017. – 2021. Opća gimnazija Dinka Šimunovića, Sinj

2021. – 2024. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija u Splitu, preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Aktivnosti i vještine

Strani jezici: engleski jezik

Digitalne vještine: intranet, MS Office, komunikacijski programi

Vozačka dozvola: B kategorija