

# Raspodjela gena HLA i senzibilizacija HLA kod bolesnika na listi čekanja za kadaveričnu transplantaciju bubrega

---

Kljajić, Julijana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:278482>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno - matematički fakultet  
Biološki odsjek

Julijana Kljajić

**Raspodjela gena HLA i senzibilizacija HLA kod bolesnika na listi  
čekanja za kadaveričnu transplantaciju bubrega**

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen je u Odjelu za tipizaciju tkiva Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, Kliničkog bolničkog centra Zagreb, pod vodstvom prof.dr.sc. Zorane Grubić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

## **ZAHVALE**

Najiskrenije se zahvaljujem svojoj dragoj mentorici, prof.dr.sc. Zorani Grubić što me s velikim strpljenjem i stručnim savjetima vodila kroz izradu ovog diplomskog rada, za koji me motivirala upravo njezina obrazovna djelatnost te predanost i ljubav prema vlastitom poslu. Hvala Vam na pruženoj prilici, poklonjenom vremenu i prenesenom znanju koje ću ponijeti dalje u otkrivanje novih znanstvenih spoznaja.

Također, srdačno se zahvaljujem svim djelatnicima Odjela za tipizaciju tkiva KBC-a Zagreb na razumijevanju i ugodnoj radnoj atmosferi, a posebno dr.sc. Mariji Burek Kamenarić i mag. biol. mol. Mariji Maskalan što su svojom nesebičnom pomoći i prijateljskim odnosom učinile izradu ovog diplomskog rada lijepim i korisnim iskustvom.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji i dečku što su mi bili oslonac u svakom trenutku i što su mi svojom ljubavlju i bezuvjetnom potporom omogućili da na ovom studentskom putu stignem do cilja. Bez Vas ne bi bila osoba kakva sam danas, hvala Vam! Hvala i svim mojim prijateljima na zajedničkom stvaranju nezaboravnih uspomena na najljepše doba naših života.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

## **Raspodjela gena HLA i senzibilizacija HLA kod bolesnika na listi čekanja za kadaveričnu transplantaciju bubrega**

Julijana Kljajić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U radu su analizirani bolesnici na listi čekanja za kadaveričnu transplantaciju bubrega (N=874) te njihovi kadaverični davatelji. Svim ispitanicima određeni su geni lokusa HLA-A, -B i -DRB1 metodom lančane reakcije polimerazom i oligonukleotidima specifičnih sekvenci (engl. *Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Oligonucleotids – PCR-SSO*), a senzibiliziranim bolesnicima protutijela anti-HLA određena su metodom Luminex. Geni HLA-A nisu pokazali statistički značajne razlike između bolesnika i kontrole. Gen HLA-B\*08 je bio statistički značajno učestaliji među bolesnicima u odnosu na kontrolu, dok su manju učestalost pokazali HLA-DRB1\*07 i HLA-DRB1\*16. Usporedbom raspodjele gena HLA između kadaveričnih davatelja iz Hrvatske i Eurotransplanta, uočena je statistički značajno veća zastupljenost HLA-B\*35, HLA-DRB1\*11 i HLA-DRB1\*16 među domaćim kadaveričnim davateljima te manja zastupljenost HLA-A\*29, HLA-B\*07, HLA-B\*08, HLA-B\*44 i HLA-B\*40(B60). Broj nepodudarnosti HLA-ABDR „222“ bio je češće prisutan između primatelja i domaćih kadaveričnih davatelja, dok su nepodudarnosti „000“ i „101“ bile češće prisutne između primatelja i stranih kadaveričnih davatelja. Raspodjela gena HLA među nesenzibiliziranim i senzibiliziranim bolesnicima ukazala je na gen HLA-A\*24 kao zaštitni za senzibilizaciju, dok su HLA-B\*51, DRB1\*13 i HLA-DRB1\*14 čimbenici rizika za senzibilizaciju. Kod senzibiliziranih bolesnika najčešće su utvrđena protutijela anti-HLA usmjerena protiv: A23, A24, A25, B27, B35, B44, Cw2, Cw5, Cw7, Cw17, DR1, DR4, DR9, DR15 i DQ9.

(52 stranica, 9 slika, 18 tablica, 49 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: zatajenje bubrega, geni HLA, nepodudarnost HLA, protutijela anti-HLA

Voditelj: Dr.sc. Zorana Grubić, red.prof., KBC Zagreb

Ocjenjivači: Dr.sc. Zorana Grubić, red.prof., KBC Zagreb

Dr.sc. Nada Oršolić, red.prof., PMF Zagreb

Dr. sc. Inga Marijanović, doc., PMF Zagreb

Zamjena: Dr. sc. Vesna Benković, izv.prof., PMF Zagreb

Rad prihvaćen: 04.07.2018.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

## **The distribution of HLA genes and HLA sensitization among patients on cadaveric kidney transplantation waiting list**

Julijana Kljajić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

In this study we analyzed patients on waiting list (N=874) for kidney transplantation and their cadaveric donors. HLA-A, -B and -DRB1 genes were typed by polymerase chain reaction and sequence specific oligonucleotides (PCR-SSO) method, while HLA antibodies were determined by Luminex method. Frequency of HLA-A genes did not show significant difference between patients and controls. Among patients, HLA-B\*08 gene was significantly more frequent than among controls, while HLA-DRB1\*07 and HLA-DRB1\*16 genes had a lower incidence. Comparison of HLA gene distribution between cadaveric donors from Croatia and Eurotransplant showed significantly higher incidence of HLA-B\*35, HLA-DRB1\*11 and HLA-DRB1\*16, and lower incidence of HLA-A\*29, HLA-B\*07, HLA-B\*08, HLA-B\*44 and HLA-B\*40(60) among national cadaveric donors. HLA mismatch "222" was more often found between recipients and national cadaveric donors, while HLA mismatch "000" and "101" were more frequent between recipients and foreign cadaveric donors. Based on HLA gene distribution analysis among non-sensitized and sensitized patients, we can suggest that HLA-A\*24 has reduced risk for HLA sensitization, while HLA-B\*51, HLA-DRB1\*13 and HLA-DRB1\*14 have increased risk for HLA sensitization. Among sensitized patients, HLA specificities against which antibodies were most commonly found were: A24, A23, A25, B27, B44, B35, Cw5, Cw2, Cw7, Cw17, DR1, DR4, DR9, DR15 and DQ9.

(52 pages, 9 figures, 18 tables, 49 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: end stage renal disease, HLA gene, HLA mismatch, HLA antibody

Supervisor: Dr. Zorana Grubić, Prof., University Hospital Centre Zagreb

Reviewers: Dr. Zorana Grubić, Prof., University Hospital Centre Zagreb

Dr. Nada Oršolić, Prof., Faculty of Science, University of Zagreb

Dr. Inga Marijanović, Asst. Prof., Faculty of Science, University of Zagreb

Replacement: Dr. Vesna Benković, Assoc. Prof., Faculty of Science, University of Zagreb

Thesis accepted: 04.07.2018

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. GLAVNI SUSTAV TKIVNE SNOŠLJIVOSTI .....	1
1.1.1. GENI I MOLEKULE HLA RAZREDA I .....	2
1.1.2. GENI I MOLEKULE HLA RAZREDA II .....	3
1.1.3. PROTUTIJELA anti-HLA .....	4
1.2. ULOGA GENA, MOLEKULA I PROTUTIJELA anti-HLA U TRANSPLANTACIJI SOLIDNIH ORGANA .....	5
1.3. TRANSPLANTACIJA BUBREGA U REPUBLICI HRVATSKOJ .....	7
1.4. POVEZANOST GENA HLA S BOLESTIMA .....	13
1.5. POPULACIJSKA ISTRAŽIVANJA GENA HLA .....	15
2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	16
3. MATERIJALI I METODE .....	17
3.1. ISPITANICI .....	17
3.2. METODE .....	17
3.2.1. IZOLACIJA DNA .....	17
3.2.2. ODREĐIVANJE GENA HLA-A, -B I -DRB1 METODOM PCR-SSO .....	18
3.2.3. ODREĐIVANJE PROTUTIJELA anti-HLA METODOM LUMINEX .....	19
3.2.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....	20
4. REZULTATI .....	21
4.1. RASPODJELA GENA HLA-A, -B I -DRB1 U SKUPINI BOLESNIKA NA LISTI ČEKANJA ZA KADAVERIČNU TRANSPLANTACIJU BUBREGA .....	21
4.2. RASPODJELA GENA HLA-A, -B I -DRB1 MEĐU KADAVERIČNIM DAVATELJIMA IZ HRVATSKE I ZEMALJA ČLANICA EUROTRANSPLANTA .....	25
4.3. BROJ NEPODUDARNOSTI HLA-A, -B I -DRB1 IZMEĐU PRIMATELJA I KADAVERIČNOG DAVATELJA BUBREGA .....	29
4.4. RASPODJELA GENA HLA-A, -B I -DRB1 U SKUPINI NESENZIBILIZIRANIH I SKUPINI SENZIBILIZIRANIH MOGUĆIH PRIMATELJA BUBREGA .....	30
4.5. RASPODJELA SPECIFIČNOSTI PROTUTIJELA anti-HLA RAZREDA I I HLA RAZREDA II MEĐU BOLESNICIMA NA LISTI ČEKANJA ZA KADAVERIČNU TRANSPLANTACIJU BUBREGA .....	35
5. RASPRAVA .....	41
6. ZAKLJUČAK .....	46

7. LITERATURA.....	47
8. ŽIVOTOPIS .....	52



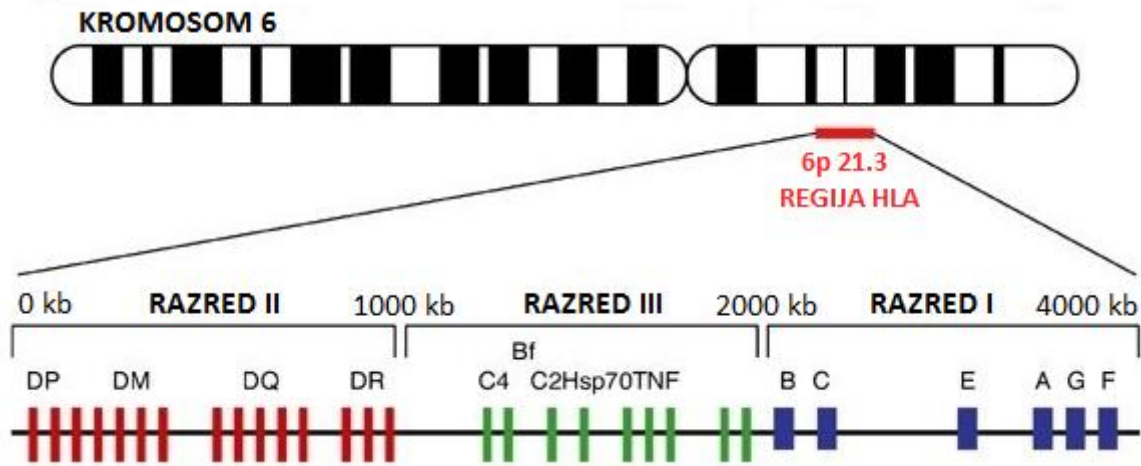
# 1. UVOD

## 1.1. GLAVNI SUSTAV TKIVNE SNOŠLJIVOSTI

Imunološki sustav je složen biološki sustav čija je funkcija razlikovanje vlastitog od stranog i posljedično uklanjanje stranih antigena, za što je najviše odgovoran glavni sustav tkivne snošljivosti (engl. *Major Histocompatibility Complex* – MHC) [1]. Sustav MHC je najkompleksniji genetski sustav, a u čovjeka je nazvan sustav HLA (engl. *Human Leukocyte Antigens*). Obuhvaća grupu površinskih staničnih proteina koje kodiraju geni regije HLA smještene na odsječku 21.3 kraćeg kraka kromosoma 6 te zauzima područje od približno četiri milijuna parova baza što čini 0,1% humanog genoma (Slika 1) [2].

Sustav gena HLA dijeli se na tri razreda (I, II i III) na osnovu njihove tkivne zastupljenosti, strukture i funkcije. Regija gena HLA razreda I smještena na telomeričnom kraju sustava, obuhvaća klasične gene (HLA-A, -B i -C) te neklasične gene (HLA-E, -F i -G). Na suprotnom centromeričnom kraju sustava smještena je regija HLA razreda II koja se dijeli na šest subregija: DR, DQ, DP, DM, DN, i DO. Između te dvije regije HLA nalazi se regija HLA razreda III u kojoj su geni koji imaju različite funkcije, geni koji kodiraju komponente komplementa C2 i C4, čimbenik B, citokin čimbenik nekroze tumora (engl. *Tumor Necrosis Factor* - TNF) te brojni drugi [3].

Dva glavna obilježja sustava HLA su veliki broj gena i polimorfizam (na svakom lokusu može se pojaviti jedan od brojnih alela HLA). Geni HLA izražavaju se kododominantno i nasljeđuju prema Mendelovim pravilima [4]. Svaki pojedinac ima po dva alela za svaki lokus HLA, po jedan naslijeđen od svakog roditelja [5]. Osoba može biti heterozigot ili homozigot za pojedini lokus HLA, a svaki naslijeđeni set alela na jednom kromosomu naziva se haplotip HLA. Većina alelskih varijanti gena HLA smještena je u egzonima 2 i 3 za gene HLA razreda I te u egzonu 2 za gene HLA razreda II, to su egzoni koji kodiraju regije proteina za vezanje stranih antigena [2]. Iako je razina rekombinacije u sustavu HLA niska, i dalje značajno doprinosi novim kombinacijama alela [6]. Poznato je da su aleli sustava HLA u snažnoj neravnoteži udruživanja (engl. *Linkage Disequilibrium* – LD), odnosno aleli susjednih usko vezanih lokusa HLA javljaju se u istom haplotipu češće, nego što bi se očekivalo na osnovu njihovih pojedinačnih učestalosti u populaciji [7].

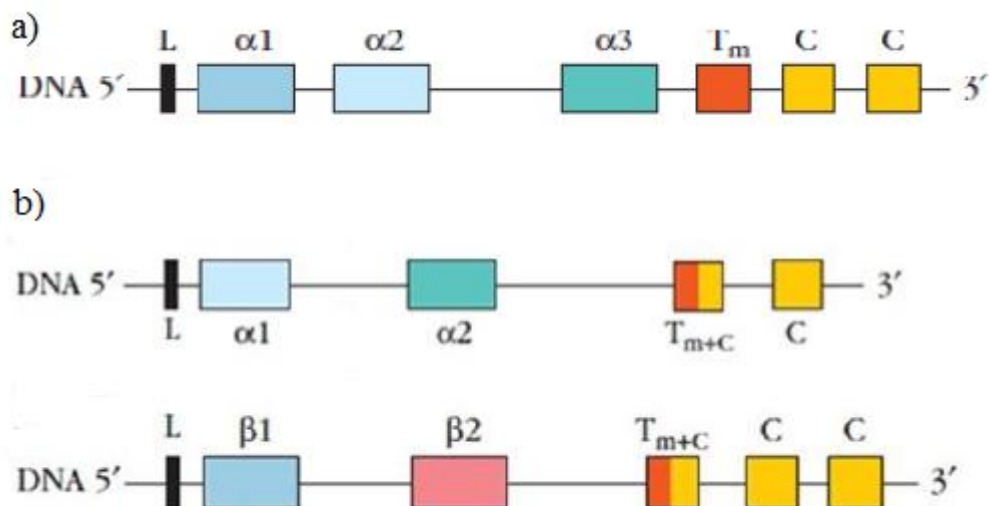


Slika 1. Shematski prikaz regije HLA na kraćem kraju kromosoma 6 (preuzeto i prilagođeno s [50]).

### 1.1.1. GENI I MOLEKULE HLA RAZREDA I

Egzoni (kodirjuće sekvence), odvojeni intronima (nekodirajuće sekvence), kodiraju različite regije molekula HLA razreda I i HLA razreda II. Na početku je 5' vodeći egzon koji kodira kratki signalni peptid. Izvanstanične domene  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  i  $\alpha 3$  lanca  $\alpha$  molekula HLA razreda I kodiraju egzoni 2, 3 i 4 (Slika 2). Sijedi egzon koji kodira transmembransku regiju, te su na kraju jedan ili dva završna egzona koji kodiraju citoplazmatske domene molekula HLA razreda I. Gen koji kodira lanac  $\beta$  smješten je na kromosomu 15 [6].

Molekule HLA razreda I građene su od dva polipeptidna lanca: lanac  $\alpha$  i lanac  $\beta$  koji se nekovalentno veže na lanac  $\alpha$  koji je građen od tri glikozilirane izvanstanične domene ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  i  $\alpha 3$ ), hidrofobnog transmembranskog dijela te završnog hidrofobnog dijela u citoplazmi (Slika 3). Najvažniji dio molekule HLA razreda I je onaj koji veže peptid jer je glavna funkcija molekula HLA da vežu dijelove prerađenih stranih antigena, čime tvore komplekse koje prepoznaju limfociti T. Taj se dio sastoji od domena  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$ , čineći pukotinu u koju se smješta antigenski ulomak od 8 do 11 aminokiselina. Domena  $\alpha 3$  je dio molekule sličan imunoglobulinu, a sadrži vezno mjesto za molekulu CD8<sup>+</sup> na citotoksičnim limfocitima T. Lanac  $\beta$  je nije polimorfan [8]. Molekule HLA razreda I (HLA-A, -B i -C) eksprimirane su na gotovo svim stanicama s jezgrom i trombocitima te prezentiraju unutarstanične peptide (virusnog ili vlastitog porijekla) CD8<sup>+</sup> citotoksičnim T stanicama [9].



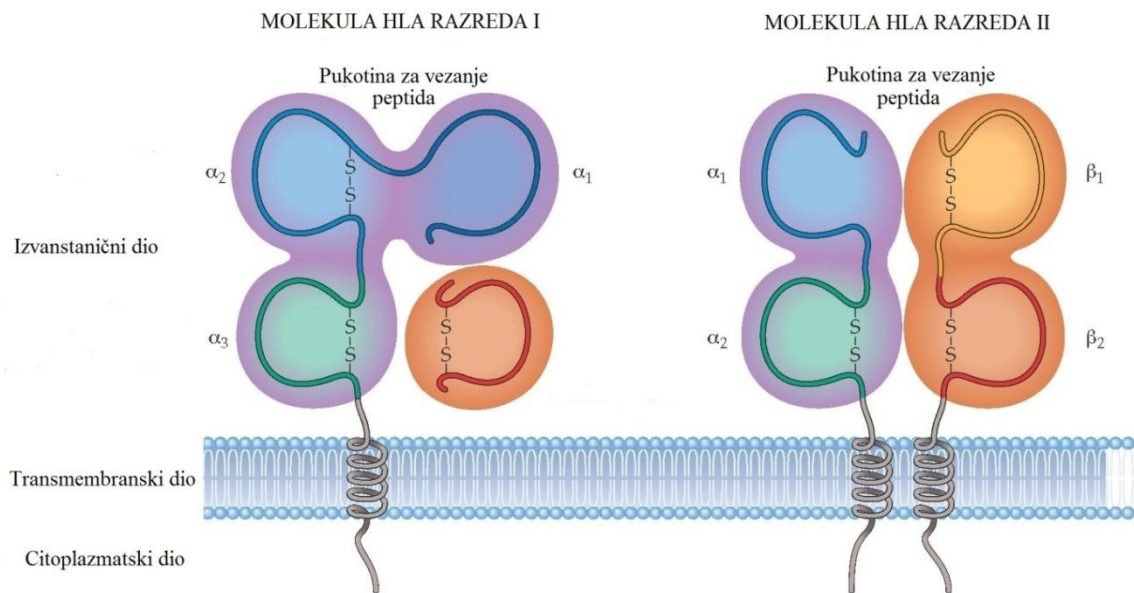
Slika 2. a) Gen HLA razreda I građen od 7 egzona koji kodiraju različite domene molekule HLA razreda I b) Geni HLA razreda II, gen A građen od 5 egzona i gen B građen od 6 egzona koji kodiraju različite domene molekule HLA razreda II (preuzeto i prilagođeno prema [6]).

### 1.1.2. GENI I MOLEKULE HLA RAZREDA II

Molekule HLA razreda II su koodirane s dva različita gena, gena A građen od 6 egzona koji kodiraju domene lanca  $\alpha$  i gen B građen od 5 egzona koji kodiraju domene lanca  $\beta$ . Kod oba gena egzon 1 je vodeći egzon. Egzoni 2 i 3 gena A kodiraju izvanstanične domene  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$ , a gena B izvanstanične domene  $\beta 1$  i  $\beta 2$ . Egzon 4 oba gena kodira transmembranski i citoplazmatski dio lanca, a egzon 5 samo citoplazmatski, dok gen B sadrži i egzon 6 za citoplazmatski dio lanca [6].

Molekule HLA razreda II građene su od dvaju međusobno sličnih, nekovalnetno vezanih lanaca  $\alpha$  i  $\beta$ . Slično kao i molekule HLA razreda I, sastoje se od četiri glikozilirane izvanstanične domene ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  i  $\beta 2$ ), hidrofobnog transmembranskog dijela te završnog hidrofobnog dijela u citoplazmi. Dio koji veže antigenski peptid tvore domene  $\alpha 1$  i  $\beta 1$ , tvoreći pukotinu u koju se vežu peptidi od 10 do 30 aminokiselina ili više. Dio molekule HLA razreda II koji slični konstantnom dijelu imunoglobulina čine domene  $\alpha 2$  i  $\beta 2$ , važni za nekovalentno vezanje lanaca  $\alpha$  i  $\beta$ . Molekula CD4<sup>+</sup> na pomoćničkom limfocitu T veže se na domenu  $\beta 2$  [8]. Molekule HLA razreda II (HLA-DR, -DQ i -DP) izražene su na ograničenom broju stanica (B limfociti, aktivirani T limfociti, monociti i makrofagi), ali ih je također

moгуće inducirati interferonom gama ( $\text{IFN}\gamma$ ) na drugim stanicama, kao što su na primjer endotelne stanice za vrijeme upalnog odgovora. Ove molekule prezentiraju izvanstanične peptide  $\text{CD4}^+$  pomoćničkim T stanicama [9].



Slika 3. Shematski prikaz građe molekule HLA razreda I i HLA razreda II (preuzeto i prilagođeno s [51]).

### 1.1.3. PROTUTIJELA anti-HLA

Izlaganje stranim antigenima HLA, odnosno senzibilizacija HLA putem transfuzije, trudnoće ili prethodne transplantacije dovodi do stvaranja protutijela anti-HLA. To su najčešće protutijela anti-HLA IgG ili IgM klase imunoglobulina, od kojih su samo protutijela IgG važna za transplantaciju solidnih organa. Takva pretransplantacijska protutijela anti-HLA mogu biti donor specifična protutijela (engl. *Donor-Specific Antibodies* - DSA) i dovesti do odbacivanja transplantata stoga ih je važno otkriti u testu seruma za prisutnost protutijela anti-HLA, odnosno probiru seruma (engl. *screening*) prije same transplantacije. Također, nakon transplantacije s HLA nepodudarnog davatelja mogu se razviti i posttransplantacijska donor specifična protutijela anti-HLA važna za daljnje preživljenje transplantata [10].

## 1.2. ULOGA GENA, MOLEKULA I PROTUTIJELA anti-HLA U TRANSPLANTACIJI SOLIDNIH ORGANA

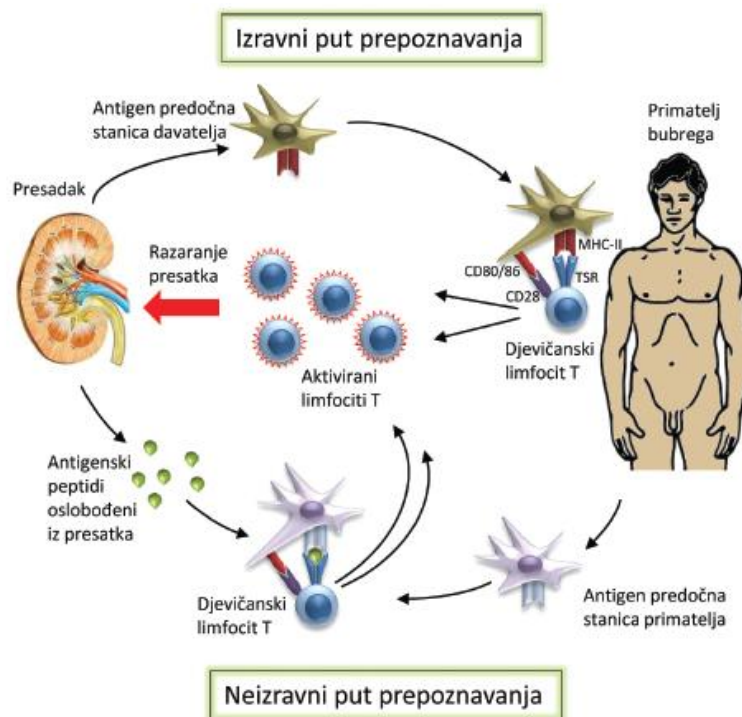
Transplantacija je presađivanje organa ili tkiva s jedne jedinice na drugu pri čemu se organi mogu presađivati sa živog ili mrtvog davatelja (kadaver). Danas se većinom presađuju pojedinačni organi (bubreg, jetra, gušterača, srce, pluća), ali se sve češće izvodi i tzv. multiorgansko presađivanje (npr. kod bolesnika sa šećernom bolesti tipa 1 i kroničnim zatajenjem rada bubrega presađuju se zajedno bubreg i gušterača) [3]. Transplantacija organa predstavlja idealni tretman za pacijente sa završnom fazom zatajenja organa. Na primjer, dokazano je da je transplantacija bubrega povezana s boljom kvalitetom života, manjom smrtnošću i smanjenim troškovima zdravstvene skrbi u usporedbi s bolesnicima na dijalizi [11].

Obzirom da je glavna biološka funkcija molekula HLA prezentacija stranih antigena T limfocitima, raznovrsnost gena HLA jako je važna ljudskoj populaciji jer tako omogućava bolje prepoznavanje i prezentaciju većeg broja stranih antigena. Međutim, u transplantaciji solidnih organa polimorfizam HLA predstavlja veliku imunološku barijeru te rizik od akutnog/kroničnog odbacivanja zbog transplantacije organa s HLA nepodudarnog davatelja [12]. Također, zbog velikog polimorfizma, molekule HLA pokreću imunološki odgovor i stvaranje protutijela anti-HLA nakon izlaganja stranim antigenima HLA [13]. Protutijela anti-HLA prisutna u serumu primatelja predstavljaju veliku zapreku uspješnoj transplantaciji te su također i *de novo* stvorena protutijela rizičan faktor za odbacivanje transplantata [14].

Transplantacijska reakcija je imunosna reakcija usmjerena prema molekulama HLA izraženim na površini stanica alogeničnog, odnosno stranog transplantiranog tkiva davatelja organa, a možemo ju podijeliti na hiperakutnu, akceleriranu akutnu, akutnu i kroničnu reakciju odbacivanja [4]. Tri glavna tipa tkivnih antigena koje imunološki sustav može prepoznati i izazvati transplantacijsku reakciju su antigeni ABO krvnih grupa, antigeni HLA i slabi tkivni antigeni (engl. *Minor Histocompatibility Antigens, mHAgS*) za koje se smatra da imaju minimalnu kliničku važnost u transplantaciji solidnih organa. Transplantacija ABO nepodudranog organa dovodi do brzog nakupljanja protutijela usmjerenih izravno protiv stranih antigena ABO sistema krvnih grupa, nakon čega se aktiviraju komponente komplekta, i drugi efektorski mehanizmi rezultirajući hiperakutnim odbacivanjem organa nekoliko minuta/sati nakon transplantacije [1]. Osim toga, hiperakutno odbacivanje organa posredovano je i citotoksičnim protutijelima IgG protiv molekula HLA, kao posljedica ranije

senzibilizacije, te dovodi do opsežne vaskularne tromboze transplantata. U prvom tjednu, a 24 sata nakon transplantacije može doći do akcelerirane akutne reakcije kao posljedice odgođenog imunskog odgovora na raniju senzibilizaciju na antigene HLA te u reakciji osim protutijela sudjeluju i stanični mehanizmi. Akutna reakcija odbacivanja posredovana protutijelima događa se većinom u prva tri tjedna nakon transplantacije, dok se akutna reakcija posredovana stanicama najčešće događa u prva tri mjeseca [4]. Dva su glavna mehanizma odbacivanja transplantata, odnosno prepoznavanja stranih antigena HLA davatelja: izravno prepoznavanje uzrokovano interakcijom primateljevih T stanica s nepodudarnim antigenima HLA na tzv. profesionalnim antigen-predočnim stanicama (engl. *Antigen-Presenting Cells* - APC) i to prvenstveno dendritičkim stanicama davatelja i neizravno prepoznavanje kod kojeg je T stanična aktivacija inducirana primateljevim APC stanicama koje prezentiraju antigene HLA iz transplantata (Slika 4) [15].

Svim transplantiranim bolesnicima daje se imunosupresivna terapija kako bi se smanjila mogućnost odbacivanja transplantata i njegov gubitak [5]. Međutim, na kraju je moguće i kronično odbacivanje transplantata kojemu su uzrok kombinacija imunoloških i neimunoloških faktora kao što su hipertenzija, imunosupresivna toksičnost, hiperkolesterolemija, prethodne bolesti davatelja, te promjene transplantata, koji dovode do sporo progresivnog nefunkcioniranja transplantata [1].



Slika 4. Izravni i neizravni put prepoznavanja stranih antigena HLA iz transplantata bubrega (preuzeto iz [4])

### 1. 3. TRANSPLANTACIJA BUBREGA U REPUBLICI HRVATSKOJ

Republika Hrvatska postala je punopravna članica najveće europske organizacije za razmjenu organa - Eurotransplanta u kolovozu 2007. godine i tako prihvatila zajednički program na temelju kojeg se određuje podudarnost između primatelja i kadaveričnog davatelja bubrega kojeg slijede sve zemlje članice (Austrija, Belgija, Hrvatska, Luksemburg, Mađarska, Nizozemska, Njemačka i Slovenija) [16].

Prije uvrštavanja na jedinstvenu listu čekanja za transplantaciju bubrega koja obuhvaća moguće primatelje bubrega svih zemalja članica Eurotransplanta, mora se napraviti tipizacija tkiva (engl. *tissue typing*) iz dva različita uzorka krvi i test seruma za prisutnost protutijela anti-HLA, odnosno probir seruma. Svi primatelji i davatelji bubrega moraju obavezno biti tipizirani za gene HLA-A, -B, i -DR (Slika 5), dok tipizacija gena HLA-C i -DQ za sada nije obavezna [52].

Nakon izvršene tipizacije kadaveričnog davatelja bubrega, određuje se broj gena na pojedinom lokusu za koje se oni razlikuju, odnosno broj nepodudarnosti HLA (engl. *mismatch* - MM). Podudaranje za gene HLA, odnosno što manji broj razlika u genima HLA između primatelja i davatelja smatra se glavnim genetičkim uvjetom kojim se postiže bolje preživljenje organa [16]. Svaka osoba ima po dva gena za svaki lokus HLA, broj nepodudarnosti u genima HLA može biti od 000 (svi geni HLA koji su uključeni u odabir su podudarni) do 222 (svi geni HLA koji su uključeni u odabir su različiti) (Tablica 1) [5].

<b>GEN HLA</b>	<b>PRIMATELJ</b>	<b>KADAVERIČNI DAVATELJ</b>	<b>BROJ NEPODUDARNOSTI HLA (MM)</b>
HLA-A*	01; 02	01; -	0
HLA-B*	08; -	08; 27	1
HLA-DRB1*	03; 11	01; 13	2

Tablica 1. Prikaz nepodudarnosti (MM) u genima HLA između kadaveričnog davatelja i primatelja bubrega na lokusima HLA-A, -B i -DRB1.



Eurotransplant International Foundation  
P.O. box 2304  
2301 CH Leiden  
The Netherlands

Phone: + 31 – 71 579 5700  
Fax: + 31 – 71 579 0515

Report form for HLA typing of organ donors

Matching Data

ETI - Donor number: 167254  
Gender:  Male  Female  
Date of Birth (dd - mm - yyyy): 13-12-1963  
Donor Center: CZATT  
Typing material :  PBL  Spleen  Lymph node  
Typing method: HLA (A / B):  Serology  DNA  
HLA (DR):  Serology  DNA  
Typing date (dd - mm - yyyy): 19-04-2018  
Blood group:  A  B  AB  O  
Rhesus (D):  Pos  Neg

HLA	split	broad	split	broad
A		A 2	A	A 3
B 65		B 14	B 62	B 15
DR		DR 4	DR 15	DR 2

Bw4	<input type="radio"/> Pos <input checked="" type="radio"/> Neg	Bw6	<input checked="" type="radio"/> Pos <input type="radio"/> Neg
split	broad	split	broad
Cw 10	Cw 3	Cw	Cw 8
DQ 8	DQ 3	DQ 6	DQ 1

DR51/DRB5	<input checked="" type="radio"/> Pos	<input type="radio"/> Neg
DR52/DRB3	<input type="radio"/> Pos	<input checked="" type="radio"/> Neg
DR53/DRB4	<input checked="" type="radio"/> Pos	<input type="radio"/> Neg

Remarks:

Typing Center: CZATT

Name:

Date / Time: 19-04-2018

Slika 5. Obrazac za prijavu tipizacije HLA kadaveričnog davatelja u programu Eurotransplanta.

Najstarija metoda za određivanje antigena HLA je serološka metoda tipizacije u kojoj su se prvotno koristili serumi s protutijelima anti-HLA protiv zajedničkih epitopa nekoliko antigena, a tek zatim serumi s protutijelima anti-HLA protiv specifičnih epitopa pojedinih antigena. Za ono što se smatralo da je jedan antigen HLA, kasnije se utvrdilo da zapravo predstavlja skupinu antigena HLA sa strukturalnom sličnošću.



Tako su se do danas zadržali izrazi „split“ ili uska serološka specifičnost za svaki pojedini antigen iz određene skupine te „broad“ ili široka serološka specifičnost za skupinu antigena sa sličnom strukturom [15]. Nepodudarnost primatelja i kadaveričnog davatelja u programu odabira Eurotransplanta za gene HLA-A i -B određuje se na razini „broad“, a za gene HLA-DRB1 na razini „split“ (Tablica 2). Tako npr. davatelj koji na lokusu HLA-A ima gen HLA-A\*23 će se smatrati podudarnim s primateljem koji ima gen HLA-A\*24, jer oba gena, određena molekularnom tipizacijom i pretvorena u serološke ekvivalente HLA-A23 odnosno HLA-A24, pripadaju prema široj specifičnosti u skupinu HLA-A9.

HLA-A	HLA-B		HLA-C	HLA-DR	HLA-DQ
A1	B7	B55(22)	Cw1	DR1	DQ2
A2	B8	B56(22)	Cw2	DR103	DQ4
A3	B13	B57(17)	Cw3	DR4	DQ5(1)
A11	B18	B58(17)	Cw4	DR7	DQ6(1)
A23(9)	B27	B59	Cw5	DR8	DQ7(3)
A24(9)	B35	B60(40)	Cw6	DR9	DQ8(3)
A25(10)	B37	B61(40)	Cw7	DR10	DQ9(3)
A26(10)	B38(16)	B62(15)	Cw8	DR11(5)	
A29(19)	B39(16)	B63(15)	Cw9(w3)	DR12(5)	
A30(19)	B41	B64(14)	Cw10(w3)	DR13(6)	
A31(19)	B42	B65(14)		DR14(6)	
A32(19)	B44(12)	B67		DR15(2)	
A33(19)	B45(12)	B71(70)		DR16(2)	
A34(10)	B46	B72(70)		DR17(3)	
A36	B47	B73		DR18(3)	
A43	B48	B75(15)		DR51	
A66(10)	B49(21)	B76(15)		DR52	
A68(28)	B50(21)	B77(15)		DR53	
A69(28)	B51(5)	B78			
A74(19)	B52(5)	B81			
A80	B53	B82			
	B54(22)				

Tablica 2. Lista antigena HLA uske specifičnosti („split“), u zagradama su navedene široke specifičnosti („broad“) (preuzeto i prilagođeno s [53]).

Protutijela anti-HLA određuju se testom citotoksičnosti ovisnoj o komplementu (engl. *Complement Dependent Cytotoxicity* - CDC) u kojem se koriste limfociti 50 prethodno HLA tipiziranih i izabranih nesrodnih osoba. Darivatelji su izabrani tako da njihovi geni HLA predstavljaju reprezentativni uzorak za populaciju stanovništva. Zbog tzv. panela limfocita darivatelja krvi, protutijela anti-HLA određena na ovaj način nazivaju se „panel-reaktivnim protutijelima“ (engl. *Panel Reactive Antibodies* – PRA) i izražavaju se u postotku (npr. 50% PRA znači da je 50% davatelja s panela limfocita reagiralo pozitivno s primateljevim serumom). Serum bolesnika na listi čekanja za kadaveričnu transplantaciju bubrega se testira svaka tri mjeseca, odnosno četiri puta godišnje [16]. Također je potrebno raditi testiranje na specifična protutijela anti-HLA dva i četiri tjedna nakon imunizirajućeg događaja (npr. transfuzija krvi). Za sve pozitivne probire seruma mora se prijaviti % PRA te se definirati neprihvatljivi antigeni HLA, odnosno oni antigeni HLA koje davatelj ne smije imati kao nepodudarne [52]. Bolesnici kojima % PRA iznosi 0–5% smatraju se neimuniziranima, oni s % PRA 5–85% imuniziranima, a oni s % PRA većim od 85% smatraju se visokoimuniziranim bolesnicima [16].

Kako bi se zasigurno isključilo postojanje citotoksičnih IgG protutijela anti-HLA u serumu primatelja, stvorenih protiv antigena HLA davatelja, prije same transplantacije izvodi se test križne reakcije (engl. *Cross Match* – CM) između seruma primatelja i limfocita izoliranih iz limfnog čvora ili slezene davatelja koristeći se metodom CDC. Koriste se tzv. povijesni uzorak i svježi uzorak seruma mogućeg primatelja i stanice davatelja, a transplantacija se odvija samo ako je test negativan jer se pozitivan test smatra apsolutnom kontraindikacijom za transplantaciju bubrega [16].

U Eurotransplantu postoji nekoliko programa prema kojima se rangiraju bolesnici na listi čekanja za transplantaciju bubrega: program prihvatljivih nepodudarnosti (engl. *Acceptable Mismatch* - AM), program alokacije bubrega u Eurotransplantu (engl. *Eurotransplant kidney allocation system* – ETKAS) i program „staro u staro“ (engl. *Eurotransplant Senior Program* - ESP) (Slika 5) [54].

1. Program AM je poseban program za visokosenzibilizirane bolesnike (% PRA >85) za koje je teško naći odgovarajućeg davatelja. Ovaj program koristi dokazane „prihvatljive antigene“, tj. antigene HLA na koje primatelj nije nikada stvorio specifično protutijelo anti-HLA i koji neće izazvati pozitivnu križnu reakciju. Pacijenti odabrani ovim programom imaju prednost pred svim ostalim pacijentima u programu ETKAS [54].

2. Program ETKAS se primjenjuje u slučaju kada je davatelj bubrega mlađi od 65 godina. Odabir potencijalnog primatelja bubrega se temelji na podudarnosti krvnih grupa ABO te dobivenih bodova prema kojima su rangirani na listi čekanja za transplantaciju bubrega. Bodove ostvaruju na osnovu podudarnosti u genima HLA-A, -B i -DRB1 između davatelja i primatelja, vjerojatnosti nepodudarnosti, vremenu čekanja provedenog na dijalizi, dobi, udaljenosti između centara primatelja i davatelja, % PRA te medicinske urgentnosti [54]. U tablici 3 prikazani su stupnjevi urgentnosti za transplantaciju.

<b>STATUS PRIMATELJA</b>	<b>TRANSPLANTACIJA</b>	<b>STUPANJ URGENTNOSTI</b>	<b>% PRA</b>
visoko urgentan (HU)	da	visok	/
za transplantaciju (T)	da	normalan	<6
imuniziran (I)	da	normalan	≥6<85
visoko imuniziran (HI)	da	normalan	≥85
nije za transplantaciju (NT)	ne	/	/

Tablica 3. Prikaz klasifikacije bolesnika na listi čekanja za transplantaciju bubrega prema programu Urgency code (preuzeto i prilagođeno s [54])

Sistem bodovanja:

Nakon pacijenata iz programa AM, prvo se rangiraju pacijenti s 000 razinom nepodudarnosti HLA i to prema dobivenim bodovima (0-400). Važni je naglasiti da djeca dobivaju bonus tj. bodovi za broj nepodudarnosti im se udvostručuju, uz 100 bodova koje dobiju na osnovu godina. Zatim se dobivaju bodovi na osnovu vjerojatnosti nepodudarnosti (engl. *Mismatch Probability* -MP) tj. izračunu vjerojatnosti dobivanja ponude za bubrež s 0 do 1 „broad“ HLA-A, HLA-B ili „split“ HLA-DRB1 nepodudarnosti na osnovu 1000 ponuđenih bubrega (0-100 bodova). Vrijeme čekanja provedeno na dijalizi se također boduje te se dobije 0,091 bod na dan. Za udaljenost među transplantacijskim centrima primatelja i davatelja moguće je dobiti 100-300 bodova. Pacijenti sa visoko urgentnim statusom (HU) dobivaju još dodatnih 500 bodova (Tablica 4) [54].

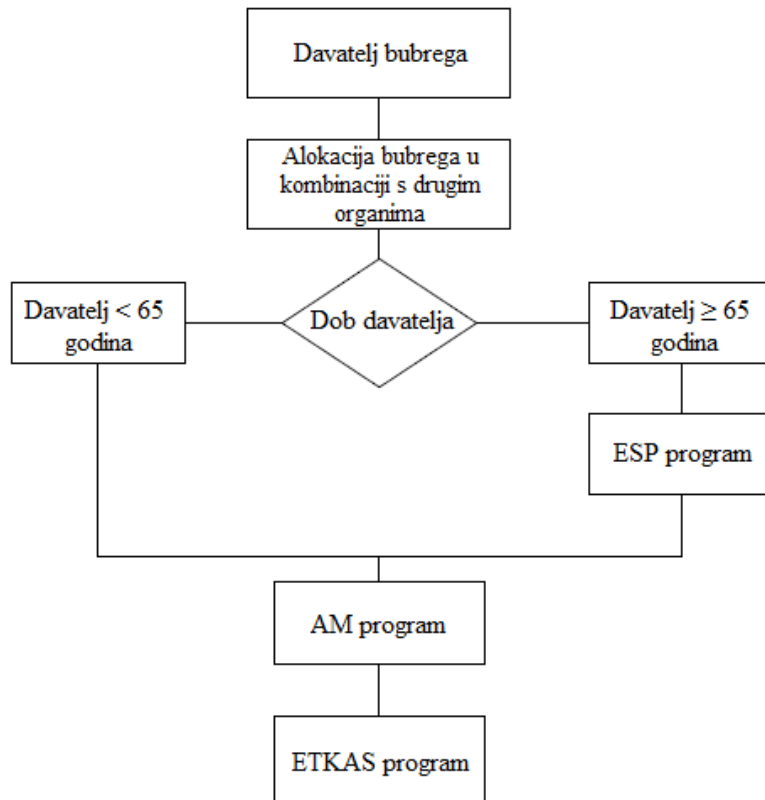
<b>KRITERIJ</b>	<b>BROJ BODOVA</b>
1. Nepodudarnost (MM) u genima HLA-A, HLA-B, HLA-DR	0-400
2. Vjerojatnost nepodudarnosti (MMP)	0-100
3. Vrijeme čekanja	0.09 bod/dan
4. Djeca	100
5. Udaljenost između centara primatelja i davatelja	100-300
6. Visoka urgentnost (HU)	500

Tablica 4. Prikaz kriterija i pridruženog broja bodova prema programu Eurotransplant Kidney allocation system (ETKAS) (preuzeto i prilagođeno s [54]).

Alokacijski algoritam:

1. Primatelji iz programa AM (odrasli i djeca)
2. Primatelji s 000 razinom nepodudarnosti u genima HLA
3. U slučaju ako je davatelj potpuni homozigot, primatelji se rangiraju od potpunih homozigota do potpunih heterozigota (djeca i ostali)
4. Svi drugi primatelji rangiraju se prema dobivenim bodovima

3. Program ESP ima za cilj smanjiti vrijeme hladne ishemije bubrega (vrijeme koje organ provede ohlađen, između prestanka krve opskrbe u tijelu davatelja i početka perfuzije prezervacijskom tekućinom do revaskularizacije nakon implantacije u primatelja), pa se prema njemu, bubreg davatelja starijeg od 65 godina transplantira primatelju starijem od 65 godina bez tipizacije HLA. Pacijenti se odabiru lokalno, regionalno i nacionalno te su rangirani na osnovu urgentnosti i vremenu čekanja provedenog na dijalizi [54].



Slika 5. Shematski prikaz alokacijskih programa transplantacije bubrega u Eurotransplantu (preuzeto i prilagođeno s [54]).

#### 1. 4. POVEZANOST GENA HLA S BOLESTIMA

Regija HLA gena se smatra jednom od najčešće spominjanih regija ljudskog genoma za koju je utvrđeno da je povezana s nastankom, odnosno zaštitom od nastanka različitih bolesti, uglavnom autoimune prirode [17]. Naime, neke bolesti pojavljuju se mnogo češće kod pojedinaca s određenim alelom, genom ili haplotipom HLA u odnosu na pojedince koji nemaju taj genetski biljeg. Međutim, ne postoji apsolutna povezanost nekog gena HLA s pojedinom bolesti što navodi na zaključak da geni HLA nisu isključivi uzročnici bolesti, već su jedan od gena uzročnika [18]. Za povezanost pojedinog gena HLA i bolesti izračunava se vrijednošću relativnog rizika (RR). Ako ne postoji povezanost RR će biti blizu 1, ako postoji pozitivna povezanost, bit će veći od 1, no ako je povezanost negativna, bit će manji od 1. Što

je odstupanje od 1 veće, bilo na pozitivnu ili negativnu stranu, to je povezanost gena HLA s pojedinom bolesti veća [3].

Povezanost gena HLA-B\*27 s nastankom ankilozantnog spondilitisa (AS) je jedna od najjačih do sad poznatih povezanosti nekog od gena HLA s određenom bolešću. Poznato je da je 90-95% bolesnika s AS-om pozitivno za ovaj gen. Međutim, nisu svi aleli HLA-B\*27 jednako podložni za razvoj AS-a, npr. aleli B\*27:02, B\*27:04 i B\*27:05 su povezani s AS-om, dok aleli B\*27:06 i B\*27:09 nisu [19].

Jedna druga bolest, reumatoidni artritis (RA) također je povezana s genima HLA. Naime kod RA je uveden pojam „zajednički epitopi“ jer je otkriveno da većina bolesnika s RA dijeli zajedničku sekvencu od 5 aminokiselina (QKRAA, QRRRA, or RRRRA) na poziciji 70-74 lanca β molekule HLA-DR. Ovaj slijed je kodiran od nekoliko različitih alela DRB1 (DRB1\*01:01, DRB1\*01:02, DRB1\*04:01, DRB1\*04:04, DRB1\*04:05, DRB1\*04:08, DRB1\*10:01 i DRB1\*14:02) [20].

Primjer bolesti povezane s genima HLA je celijakija kod koje je više od 90% bolesnika pozitivno za heterodimer HLA-DQ2 koji je kodiran s genima HLA-DQA\*05 i DQB1\*02, dok je većina preostalih bolesnika pozitivna za molekule DQ8 kodirane s DQA1\*03:01-DQB1\*03:02. Molekule DQ2 i DQ8 su potrebne, ali nisu dovoljne za nastanak celijakije, jer velik broj gena koji nisu vezani s HLA doprinose nastanku celijakije pa zapravo dosta pojedinaca s eksprimiranim molekulama DQ2 i DQ8, ne oboli [19]. Rezultati istraživanja u hrvatskoj populaciji su pokazali da je među 63 bolesnika oboljela od celijakije, 59 (93,7%) imalo molekule DQ2, dok su preostala 3 (4,8%) bolesnika imala molekule DQ8. Samo jedan bolesnik nije imao ni molekule DQ2 ni molekule DQ8, nego je bio nositelj samog alela DQB1\*02 [21].

Skoro 100% pojedinaca, europskog porijekla, oboljelih od narkolepsije ima haplotip HLA DRB5\*01:01~DRB1\*15:01~DQA1\*01:02~DQB1\*06:02. Smatra se da taj haplotip predstavlja potreban, ali ne dovoljan rizični faktor za narkolepsiju jer 15-25% pojedinaca u općoj populaciji nosi taj haplotip povezan s narkolepsijom. Nedavno je pokazano da je najbolji biološki marker za narkolepsiju, deficijencija neuropeptida hipokretina-1 iz hipotalamusa čije su razine u cerebrospinalnoj tekućini znatno smanjene, pa čak i nedetektibilne kod skoro svih HLA-DRB1\*15:01 pozitivnih osoba s narkolepsijom [22].

## 1. 5. POPULACIJSKA ISTRAŽIVANJA GENA HLA

U antropološkim istraživanjima, frekvencije alela i haplotipova HLA predstavljaju važan izvor informacija za istraživanje pojedinih populacija i njihovih migracija te miješanje s drugim populacijama. Upravo je glavna karakteristika hrvatske populacije velika raznolikost haplotipova HLA zbog povijesnih utjecaja, odnosno veza s drugim slavenskim i baltičkim populacijama prije migracije na Balkanski poluotok, miješanje s prijašnjim populacijama iz jugoistočne Europe te nedavno miješanje sa susjednim populacijama [23]. Također, visoko polimorfan sustav HLA je moćan genetički alat u istraživanju nasljeđivanja, porijekla te genetičke povijesti populacija [24]. Istraživanja su pokazala da se raspodjela alela HLA razlikuje do jedne do druge etničke skupine, ali i između članove iste etničke skupine koji žive na različitom geografskom području [25].

S obzirom na zastupljenost aleli HLA se mogu podijeliti na:

- a) vrlo česte - učestalost >5,0% - zastupljeni u cijelom u svijetu (npr. A\*02:01)
- b) česte - učestalost 1,0-5,0% - zastupljeni u velikom broju populacija (npr. A\*25:01)
- c) rijetke - učestalost 0,1-1,0% - zastupljeni u manjem broju populacija (npr. B\*27:14)
- d) vrlo rijetke - učestalost <0,1% - zastupljeni u nekoliko populacija (npr. B\*14:11) [26]

Tako se npr. raspodjela alela gena HLA-B\*27, kojih ima preko 213, razlikuje među različitim populacijama ne samo u svijetu, već i u Europi. Alel HLA-B\*27:05 je pokazao najveću rasprostranjenost, prisutan je u skoro svim populacijama, ali je dominantan unutar populacija europskog porijekla. Smatra se najstarijim od svih alela HLA-B\*27 iz kojeg su različitim mutacijama nastajali novi aleli [27]. Njegova učestalost se smanjuje od sjevera prema jugu Europe, za razliku od drugog najčešćeg alela HLA-B\*27:02 koji je nastao na Bliskom Istoku te se iz tog dijela svijeta proširio dalje. Njegova učestalost raste od sjevera prema jugu Europe [28]. Istraživanje provedeno u Hrvatskoj je također pokazalo da su aleli HLA-B\*27:05 i HLA-B\*27:02 najučestaliji, međutim bili su prisutni i neki od rijetkih alela s učestalošću manjom od 2% (HLA-B\*27:01, HLA-B\*27:03, HLA-B\*27:04, HLA-B\*27:08 i HLA-B\*27:14) [29].

## **2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Hipoteza:

Podudarnost u genima HLA između primatelja i kadaveričnog davatelja organa poboljšava preživljenje transplantata, a prisustvo protutijela anti-HLA je ograničavajući čimbenik u transplantaciji.

Ciljevi:

1. Analizirati učestalost gena HLA u cjelokupnoj skupini primatelja bubrega.
2. Istražiti učestalost gena HLA u skupinama domaćih i stranih kadaveričnih davatelja bubrega.
3. Odrediti broj nepodudarnosti HLA unutar skupine bolesnika koji su primili bubreg od domaćeg, odnosno stranog kadaveričnog davatelja.
4. Među senzibiliziranim bolesnicima utvrditi vrstu protutijela anti-HLA te ustanoviti postoji li povezanost između fenotipa HLA i stvaranja protutijela anti-HLA.
5. Usporediti dobivene rezultate s rezultatima drugih istraživanja.



### 3. MATERIJALI I METODE

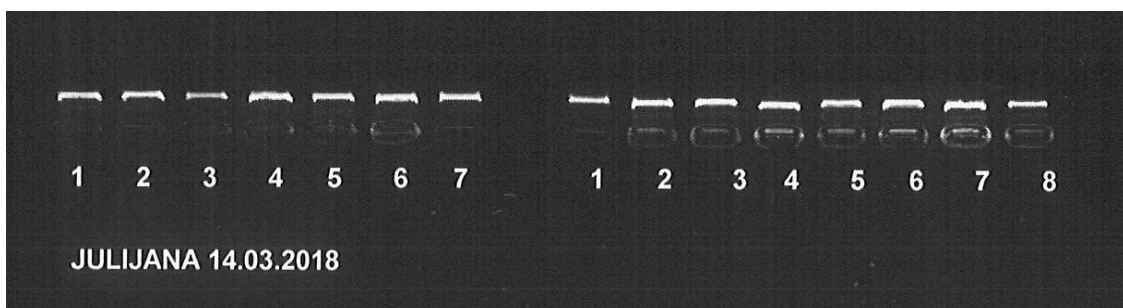
#### 3.1. ISPITANICI

Istraživanje je provedeno na skupini od 874 bolesnika na listi čekanja za kadaveričnu transplantaciju bubrega, od kojih je 606 bolesnika bilo nesenzibilizirano, a 268 senzibilizirno. Istraživanje je provedeno u skladu s etičkim načelima KBC-a Zagreb. Kontrolnu skupinu činilo je 4000 zdravih nesrodnih ispitanika iz Hrvatskog registra dobrovoljnih darivatelja krvotvornih matičnih stanica [30]. Također, provedena je i analiza raspodjele gena HLA među kadaveričnim davateljima, od kojih je u skupini iz Hrvatske bilo 422, a u skupini iz zemalja članica Eurotransplanta 289. Svim ispitanicima određeni su geni HLA-A, -B, -DRB1, za što im je bilo potrebno uzeti 5 mL periferne krvi s EDTA, a senzibiliziranim bolesnicima je određena vrsta protutijela anti-HLA za što im je uzeto 5 mL krvi bez antikoagulansa (serum).

#### 3.2. METODE

##### 3.2.1. IZOLACIJA DNA

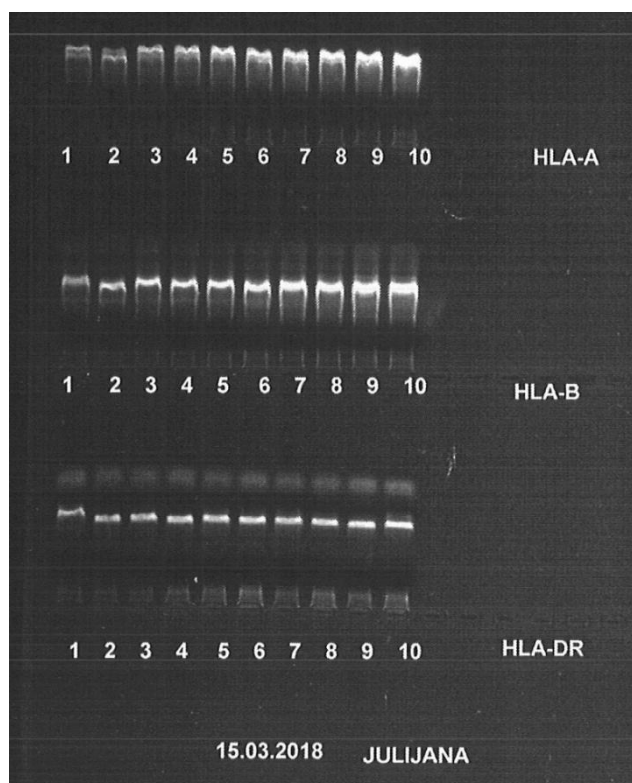
Pomoću komercijalnog seta za izolaciju DNA (Nucleospin, Macherey Nagel, Düren, Njemačka), izolirana je DNA iz 2 mL periferne krvi svih ispitanika. Set sadrži proteinazu K, apsolutni etanol, pufere B1, B5, B3, BW, BE, reagens B2, te NucleoSpin epruvete i kolone. Molekula DNA specifično se veže na silikatnu membranu unutar kolumne te njezina koncentracija na kraju postupka iznosi 30 ng/ $\mu$ l. Provjera uspješnosti izolacije DNA izvodila se elektroforezom na 1,5%-tnom agaroznom gelu obojenim bojom GelRed (GenoVision Inc, West Chester, PA, SAD) koristeći pufer 1xTBE (Slika 7).



Slika 7. Fotografija agaroznog gela nakon uspješne izolacije DNA iz periferne krvi ispitanika, brojevi od 1 do 7 predstavljaju broj ispitanika u prvoj izolaciji, dok brojevi od 1 do 8 predstavljaju broj ispitanika u drugoj izolaciji.

### 3.2.2. ODREĐIVANJE GENA HLA-A, -B I -DRB1 METODOM PCR-SSO

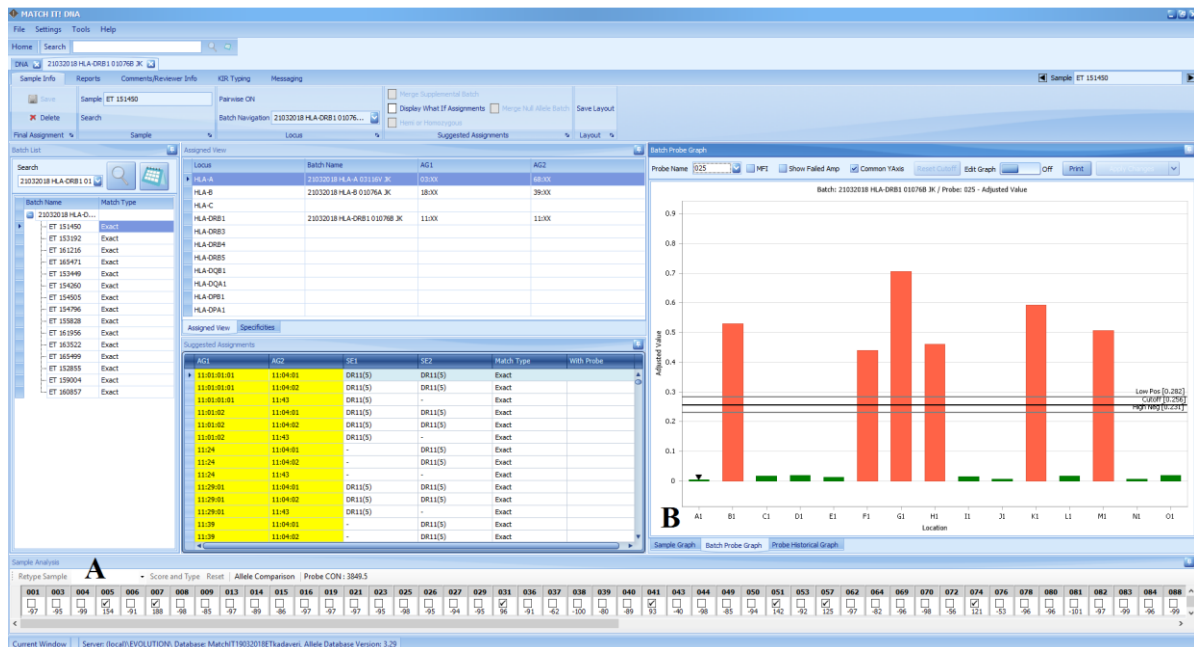
Metodom lančane reakcije polimerazom i oligonuklotidima specifičnih sekvenci (engl. *Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Oligonucleotids – PCR-SSO*) umnožila se izolirana DNA ispitanika tj. egzon 2 i 3 za određivanje gena HLA razreda I i egzon 2 za određivanje gena HLA razreda II, pomoću početnica obilježenih biotinom. Provjera uspješnosti umnažanja izvodila se elektroforezom na 1,5%-tnom agaroznom gelu obojenim bojom GelRed (GenoVision Inc, West Chester, PA, SAD) koristeći pufer 1xTBE (Slika 8).



Slika 8. Fotografija agaroznog gela nakon uspješnog umnažanja DNA, odnosno gena HLA na lokusima HLA-A, -B i -DRB1 ispitanika, metodom PCR-SSO, brojevi od 1 do 10 predstavljaju broj ispitanika.

Nakon toga uslijedila je hibridizacija produkata PCR s oligonukleotidima specifičnima za određene gene HLA. Oligonukleotidi su vezani na površini mikrosfera (polistirenske kuglice veličine 5,6 mikrona s crvenim ili infracrvenim fluorokromom u unutrašnjosti). Nakon završetka hibridizacije, u reakcijsku smjesu dodavala se fluorescentna boja SAPE (engl. *streptavidin phycoerythrin*). Samo ako je došlo do specifičnog vezanja određene oligonukleotidne probe za komplementarni slijed nukleotida na produktu PCR, došlo je do reakcije između boje SAPE i biotina. Luminex aparat je detektirao fluorescenciju i na taj način određivao pozitivne i negativne hibridizacijske reakcije.

Rezultati su se analizirali računalnim programom MATCH IT DNA (Slika 9) te su se odredili geni HLA na niskoj rezoluciji koja podrazumijeva molekularnu tipizaciju HLA na dvije znamenke.



Slika 9. Izgled rezultata analize postupka hibridizacije DNA (metodom PCR-SSO) u kompjuterskom programu MATCH IT DNA. A) Prikaz svih pozitivnih reakcija, odnosno mikrosfera za uzorak A1 (označene kvačicom). B) Grafički prikaz svakog pojedinog uzoraka u reakciji s mikrosferom 25, za uzorak A1 mikrosfera 25 pokazuje negativnu reakciju, dok za uzorak B1 pokazuje pozitivnu reakciju.

### 3.2.3. ODREĐIVANJE PROTUTIJELA anti-HLA METODOM LUMINEX

Za određivanje protutijela anti-HLA koriste se posebne filter pločice s 96 jažica te komercijalni set koji sadrži kuglice s umjetno sintetiziranim antigenima HLA vezanim na površini, odgovarajući pufer i sekundarno protutijelo. Test sadrži 7 kuglica za određivanje protutijela anti-HLA razreda I (HLA-A, -B i -C), 5 kuglica za određivanje protutijela anti-HLA razreda II (HLA-DR i -DQ) te 4 kontrolne kuglice (pozitivna i negativna kontrola). Prije same upotrebe potrebno je dobro resuspendirati kuglice 30 sekundi. U jažicu filter pločice stavilo se 40  $\mu$ l pufera, 5  $\mu$ l kuglica i 12  $\mu$ l testiranog uzorka seruma bolesnika. Slijedila je inkubacija 30 minuta na sobnoj temperaturi uz trešnju tijekom koje dolazi do specifičnog vezanja protutijela anti-HLA iz seruma s odgovarajućim antigenom HLA na kuglici. Nakon

ispiranja nevezanih protutijela anti-HLA u jažicu dodalo se 50 $\mu$ l konjugata (kozja anti-humana IgG protutijela konjugirana s fikoeritriinom) koji se vezao na kompleks protutijelo anti-HLA-antigen HLA. Slijedila je još jedna inkubacija od 30 minuta nakon koje se testirani uzorak analizirao na Luminex aparatu koji je očitavao intenzitet fluorescencije svake pojedine kuglice. Rezultati su se analizirali koristeći računalni program MATCH IT ANTIBODY.

### **3.2.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA**

Učestalost gena HLA-A, -B i -DRB1 u ispitivanim skupinama određena je direktnim brojanjem. U slučaju da je na nekom od lokusa HLA osoba imala samo jedan gen HLA, ispitanik je smatran homozigotom i uračunat je dva puta isti gen. Također, i broj nepodudarnosti gena HLA-A, -B i -DRB1 između primatelja i kadaveričnog davatelja bubrega određen je direktnim brojanjem. Usporedba između pojedinih skupina napravljena je uz pomoć 2x2 kontingencijske tablice i Fisherovog egzaktnog testa koristeći GraphPad softwar (QuickCalcs kalkulator) pri čemu je razina statističke značajnosti bila  $P < 0,05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. RASPODJELA GENA HLA-A, -B I -DRB1 U SKUPINI BOLESNIKA NA LISTI ČEKANJA ZA KADAVERIČNU TRANSPLANTACIJU BUBREGA

U skupini bolesnika na listi čekanja za kadaveričnu transplantaciju bubrega (N=874), na lokusu HLA-A najčešći je bio gen HLA-A\*02 (32,15%), zatim geni HLA-A\*01 (13,90%), HLA-A\*24 (12,19%) i HLA-A\*03 (11,56%). Najmanju učestalost pokazali su geni HLA-A\*69 (0,06%) i HLA-A\*80 (0,06%) (Tablica 5).

**Tablica 5. Učestalost gena HLA-A među bolesnicima na listi čekanja za kadaveričnu transplantaciju bubrega (N=874) i kontroli (N=4000)**

GEN HLA-	BOLESNICI (N=874)		KONTROLA (N=4000)		P
	No.	%	No.	%	
A*01	243	0,1390	997	0,1246	
A*02	562	0,3215	2418	0,3132	
A*03	202	0,1156	994	0,1242	
A*11	104	0,0595	553	0,0691	
A*23	34	0,0195	200	0,0250	
A*24	213	0,1219	911	0,1139	
A*25	50	0,0286	251	0,0314	
A*26	85	0,0486	385	0,0481	
A*29	11	0,0063	73	0,0091	
A*30	23	0,0132	137	0,0171	
A*31	38	0,0217	185	0,0231	
A*32	64	0,0366	314	0,0393	
A*33	35	0,0200	164	0,0205	
A*66	6	0,0034	31	0,0039	
A*68	76	0,0435	369	0,0461	
A*69	1	0,0006	7	0,0009	
A*80	1	0,0006	6	0,0007	

Legenda: No. - broj pojavljivanja gena HLA; % - učestalost gena HLA; P - statistički značajna razlika između ispitivanih skupina

Zastupljenost preostalih gena lokusa HLA-A nije bila viša od 10%. Nema statistički značajne razlike u učestalostima gena HLA-A između skupine bolesnika na listi čekanja za kadaveričnu transplantaciju bubrega i kontrole.

Na lokusu HLA-B u istraživanoj skupini uočeno je 35 različitih gena. Najveću zastupljenost pokazao je gen HLA-B\*51 (12,47%), slijedili su ga geni HLA-B\*35 (12,24%), HLA-B\*08 (9,27%) i HLA-B\*18 (8,47%). Istovremeno, najmanja učestalost (0,06%) utvrđena je za gene HLA-B\*54, HLA-B\*59, HLA-B\*72 i HLA-B\*73. Između skupine bolesnika i kontrole postoji statistički značajna razlika u učestalosti gena HLA-B\*08 ( $P=0,0414$ ) koji je češće bio prisutan među bolesnicima (Tablica 6).

**Tablica 6. Učestalost gena HLA-B među bolesnicima na listi čekanja za kadaveričnu transplantaciju bubrega (N=874) i kontroli (N=4000)**

GEN HLA-	BOLESNICI (N=874)		KONTROLA (N=4000)		P
	No.	%	No.	%	
B*07	114	0,0652	568	0,0709	
B*08	162	0,0927	622	0,0778	0,0414
B*13	55	0,0315	302	0,0377	
B*18	148	0,0847	655	0,0818	
B*27	118	0,0675	497	0,0621	
B*35	214	0,1224	1113	0,1391	
B*37	16	0,0092	75	0,0094	
B*38	85	0,0486	351	0,0439	
B*39	54	0,0309	248	0,0309	
B*41	10	0,0057	68	0,0085	
B*44	139	0,0795	744	0,0930	
B*45	3	0,0017	15	0,0019	
B*47	7	0,0040	11	0,0014	
B*48	4	0,0023	11	0,0014	
B*49	37	0,0212	154	0,0193	
B*50	12	0,0069	118	0,0147	
B*51	218	0,1247	908	0,1136	
B*52	27	0,0154	117	0,0146	

GEN HLA-	BOLESNICI (N=874)		KONTROLA (N=4000)		P
	No.	%	No.	%	
B*53	8	0,0046	54	0,0068	
B*54	1	0,0006	2	0,0003	
B*55	23	0,0132	100	0,0125	
B*56	26	0,0149	79	0,0099	
B*57	46	0,0263	213	0,0266	
B*58	21	0,0120	84	0,0105	
B*59	1	0,0006	0	0	
B*40(60)	37	0,0212	111	0,0139	
B*40(61)	46	0,0263	182	0,0228	
B*15(62)	62	0,0355	314	0,0393	
B*15(63)	6	0,0034	34	0,0042	
B*14(64)	6	0,0034	27	0,0034	
B*14(65)	28	0,0160	170	0,0212	
B*15(71)	7	0,0040	22	0,0028	
B*15(72)	1	0,0006	11	0,0014	
B*15(73)	1	0,0006	7	0,0009	
B*15(75)	5	0,0029	2	0,0002	

Legenda: No. - broj pojavljivanja gena HLA; % - učestalost gena HLA; P - statistički značajna razlika između ispitivanih skupina

Na lokusu HLA-DRB1, gen HLA-DRB1\*11 (18,14%) je bio najzastupljeniji. Geni HLA-DRB1\*13 (12,53%), HLA-DRB1\*01 (11,90%) i HLA-DRB1\*03 (10,98%) su također pokazali frekvencije veće od 10%. Najmanju učestalost imao je gen HLA-DRB1\*09 (0,40%) koji je bio prisutan samo kod 7 ispitanika. Geni HLA-DRB1\*07 (P=0,0037) i HLA-DRB1\*16 (P=0,0492) su statistički značajno manje bili prisutni među bolesnicima nego u kontroli (Tablica 7).

**Tablica 7. Učestalost gena HLA-DRB1 među bolesnicima na listi čekanja za kadaveričnu transplantaciju bubrega (N=874) i kontroli (N=4000)**

GEN HLA-	BOLESNICI (N=874)		KONTROLA (N=4000)		P
	No.	%	No.	%	
DRB1*01	208	0,1190	903	0,1130	
DRB1*03	192	0,1098	800	0,1001	
DRB1*04	176	0,1007	769	0,0958	
DRB1*07	132	0,0755	782	0,0978	0,0037
DRB1*08	60	0,0343	274	0,0343	
DRB1*09	7	0,0040	21	0,0026	
DRB1*10	19	0,0109	83	0,0104	
DRB1*11	317	0,1814	1333	0,1668	
DRB1*12	29	0,0166	123	0,0154	
DRB1*13	219	0,1253	964	0,1205	
DRB1*14	66	0,0378	311	0,0388	
DRB1*15	168	0,0961	802	0,1002	
DRB1*16	155	0,0887	835	0,1043	0,0492

Legenda: No. - broj pojavljivanja gena HLA; % - učestalost gena HLA; P - statistički značajna razlika između ispitivanih skupina



## 4.2. RASPODJELA GENA HLA-A, -B I -DRB1 MEĐU KADAVERIČNIM DAVATELJIMA IZ HRVATSKE I ZEMALJA ČLANICA EUROTRANSPLANTA

Broj kadaveričnih davatelja (N=711) je manji nego broj bolesnika (N=874) jer u nekim situacijama oba bubrega mogu biti transplantirana bolesnicima u zemlji iz kojeg je i kadaverični davatelj. Takva situacija je bila i unutar naših ispitivanih skupina, stoga je broj kadaveričnih davatelja iz Hrvatske bio 422, a iz zemalja članica Eurotransplanta 289. U tablici 8 prikazana je usporedba raspodjele gena HLA-A između ove dvije grupe kadaveričnih davatelja.

**Tablica 8. Učestalost gena HLA-A među kadaveričnim davateljima iz Hrvatske (N=422) i iz zemalja članica Eurotransplanta (N=289)**

GEN HLA-	HR- KADAVERI (N=422)		ET-KADAVERI (N=289)		P
	No.	%	No.	%	
A*01	105	0,1244	67	0,1159	
A*02	276	0,3270	175	0,3028	
A*03	114	0,1351	89	0,1540	
A*11	51	0,0604	36	0,0623	
A*23	21	0,0249	14	0,0242	
A*24	81	0,0960	47	0,0813	
A*25	32	0,0379	20	0,0346	
A*26	37	0,0438	21	0,0363	
A*29	6	0,0071	13	0,0225	0,0174
A*30	10	0,0118	11	0,0190	
A*31	18	0,0213	20	0,0346	
A*32	37	0,0438	27	0,0467	
A*33	20	0,0237	8	0,0138	
A*34	1	0,0012	1	0,0017	
A*66	2	0,0024	4	0,0069	
A*68	33	0,0391	23	0,0398	
A*69	0	0	2	0,0035	

Legenda: ET - Eurotransplant; No. - broj pojavljivanja gena HLA; % - učestalost gena HLA; P - statistički značajna razlika između ispitivanih skupina

U skupini kadaveričnih davatelja iz Hrvatske kao i u skupini kadaveričnih davatelja iz zemalja članica Eurotransplanta, najučestaliji gen na lokusu HLA-A bio je HLA-A\*02 (32,70% odnosno 30,28%), dok je najmanju učestalost imao gen HLA-A\*34 sa samo jednim pojavljivanjem u obje skupine. Statistički značajna razlika ( $P=0,0167$ ) između grupa uočena je za gen HLA-A\*29 koji je približno 3 puta više bio zastupljen među kadaverima iz Eurotransplanta.

Raspodjela gena HLA-B pokazala je nekoliko statistički značajnih razlika između domaćih i stranih kadaveričnih davatelja. Gen HLA-B\*35 (13,98%) koji je imao najveću učestalost među domaćim kadaverima što je statistički značajno veća zastupljenost ( $P=0,0046$ ) u odnosu na strane kadavere. S druge strane, gen HLA-B\*07 je bio statistički značajno više prisutan među stranim kadaverima ( $P=0,0058$ ). Također, uočeno je da su i geni HLA-B\*08 ( $P=0,0504$ ), HLA-B\*44 ( $P=0,0080$ ) i HLA-B\*40(B60) ( $P=0,0448$ ) bili statistički značajno češći u grupi kadaveričnih davatelja iz Eurotransplanta u usporedbi s kadaveričnim davateljima iz Hrvatske (Tablica 9).

**Tablica 9. Učestalost gena HLA-B među kadaveričnim davateljima iz Hrvatske (N=422) i iz zemalja članica Eurotransplanta (N=289)**

GEN HLA-	HR- KADAVERI (N=422)		ET-KADAVERI (N=289)		P
	No.	%	No.	%	
B*07	60	0,0711	66	0,1142	0,0058
B*08	53	0,0628	53	0,0917	0,0504
B*13	27	0,0320	12	0,0208	
B*18	76	0,0900	37	0,0640	
B*27	54	0,0640	45	0,0779	
B*35	118	0,1398	52	0,0900	0,0046
B*37	11	0,0130	6	0,0104	
B*38	40	0,0474	18	0,0311	
B*39	23	0,0273	15	0,0260	
B*41	5	0,0059	5	0,0087	
B*44	73	0,0865	76	0,1315	0,0080
B*45	0	0	1	0,0017	
B*46	2	0,0024	0	0	
B*47	0	0	3	0,0052	

GEN HLA-	HR- KADAVERI (N=422)		ET-KADAVERI (N=289)		P
	No.	%	No.	%	
B*48	2	0,0024	1	0,0017	
B*49	25	0,0296	13	0,0225	
B*50	16	0,0190	5	0,0087	
B*51	85	0,1007	47	0,0813	
B*52	12	0,0142	3	0,0052	
B*53	4	0,0047	1	0,0017	
B*54	0	0	1	0,0017	
B*55	14	0,0166	8	0,0138	
B*56	7	0,0083	4	0,0069	
B*57	14	0,0166	13	0,0225	
B*58	15	0,0178	4	0,0069	
B*40(60)	20	0,0237	25	0,0433	0,0448
B*40(61)	14	0,0166	12	0,0208	
B*15(62)	41	0,0486	31	0,0536	
B*15(63)	4	0,0047	2	0,0035	
B*14(64)	4	0,0047	4	0,0069	
B*14(65)	20	0,0237	11	0,0190	
B*15(71)	3	0,0036	3	0,0052	
B*15(72)	2	0,0024	0	0	
B*15(76)	0	0	1	0,0017	

Legenda: ET - Eurotransplant; No. - broj pojavljivanja gena HLA; % - učestalost gena HLA;

P - statistički značajna razlika između ispitivanih skupina

Unatoč tome što je gen HLA-DRB1\*11 (15,48%; odnosno 14,53%) bio najčešći u obje grupe kadaveričnih davatelja, uočena je granična statistički značajna razlika ( $P=0,0519$ ) u njegovoj zastupljenosti. Za gene HLA-DRB1\*08 (1,9%; odnosno 3,11%) i HLA-DRB1\*14 (5,33%; odnosno 3,98%) je primijećena naizgled velika razlika u učestalostima, međutim ona nije bila statistički značajna. Za razliku od toga, gen HLA-DRB1\*16 je pokazao statistički značajnu razliku ( $P=0,0001$ ) u učestalosti koja je bila čak dvostruko veća među domaćim kadaverima u odnosu na strane kadavera (Tablica 10).

**Tablica 10. Učestalost gena HLA-DRB1 među kadaveričnim davateljima iz Hrvatske (N=422) i iz zemalja članica Eurotransplanta (N=289)**

GEN HLA-	HR- KADAVERI (N=422)		ET-KADAVERI (N=289)		P
	No.	%	No.	%	
DRB1*01	105	0,1244	68	0,1176	
DRB1*03	77	0,0912	62	0,1073	
DRB1*04	78	0,0924	68	0,1176	
DRB1*07	68	0,0806	59	0,1021	
DRB1*08	16	0,0190	18	0,0311	
DRB1*09	1	0,0012	3	0,0052	
DRB1*10	5	0,0059	8	0,0138	
DRB1*11	156	0,1848	84	0,1453	0,0519
DRB1*12	8	0,0095	13	0,0225	
DRB1*13	100	0,1185	76	0,1315	
DRB1*14	45	0,0533	23	0,0398	
DRB1*15	81	0,0960	64	0,1107	
DRB1*16	104	0,1232	32	0,0554	0,0001

Legenda: ET - Eurotransplant; No. - broj pojavljivanja gena HLA; % - učestalost gena HLA; P - statistički značajna razlika između ispitivanih skupina

#### 4.3. BROJ NEPODUDARNOSTI HLA-A, -B I -DRB1 IZMEĐU PRIMATELJA I KADAVERIČNOG DAVATELJA BUBREGA

Najčešće uočeni broj nepodudarnosti HLA između primatelja i kadaveričnih davatelja iz Hrvatske bio je 111 (24,35%) odnosno po jedna nepodudarnost na analiziranim lokusima HLA-A, HLA-B i HLA-DRB1, jednako kao i između primatelja i davatelja iz zemalja članica Eurotransplanta (22,74%). Međutim, potpuna podudarnost HLA-ABDR, odnosno MM „000“ između primatelja i domaćih kadavera nije zabilježena niti u jednom slučaju što je statistički značajno manje ( $P=0,0005$ ) nego kad je bio u pitanju kadaver iz neke druge zemlje članice Eurotransplanta. Slično tome, broj MM „101“ uočen je statistički značajno više ( $P=0,0156$ ), češće (dvostruko više slučajeva) između primatelja i stranih kadavera. Nasuprot tome, broj MM „222“, odnosno maksimalan broj nepodudarnosti na lokusima HLA-A, -B i -DRB1, uočeno je da je statistički značajno ( $P=0,0277$ ) zastupljeniji između primatelja i domaćih kadaveričnih davatelja (Tablica 11).

**Tablica 11. Broj nepodudarnosti HLA-A, -B, -DRB1 između primatelja i kadaveričnog davatelja bubrega**

MM HLA-A	MM HLA-B	MM HLA-DRB1	HR- KADAVERI (N=422)		ET-KADAVERI (N=289)		P
			No.	%	No.	%	
0	0	0	0	0	7	0,0234	0,0005
1	0	0	1	0,0017	3	0,0100	
2	0	0	0	0	1	0,0033	
0	1	0	1	0,0017	2	0,0067	
1	1	0	21	0,0365	18	0,0602	
2	1	0	13	0,0226	6	0,0201	
0	2	0	3	0,0052	0	0	
1	2	0	23	0,0400	11	0,0368	
2	2	0	14	0,0243	4	0,0134	
0	0	1	3	0,0052	4	0,0134	
1	0	1	10	0,0174	14	0,0468	0,0156
2	0	1	3	0,0052	2	0,0067	
0	1	1	28	0,0487	17	0,0569	

MM HLA-A	MM HLA-B	MM HLA-DRB1	HR- KADAVERI (N=422)		ET-KADAVERI (N=289)		P
			No.	%	No.	%	
1	1	1	140	0,2435	68	0,2274	
2	1	1	50	0,0870	31	0,1037	
0	2	1	21	0,0365	13	0,0435	
1	2	1	102	0,1774	41	0,1371	
2	2	1	53	0,0922	25	0,0836	
0	0	2	1	0,0017	0	0	
1	0	2	3	0,0052	2	0,0067	
2	0	2	2	0,0035	0	0	
0	1	2	15	0,0261	9	0,0301	
1	1	2	20	0,0348	10	0,0334	
2	1	2	8	0,0139	1	0,0033	
0	2	2	3	0,0052	2	0,0067	
1	2	2	20	0,0348	6	0,0201	
2	2	2	17	0,0296	2	0,0067	0,0277

Legenda: MM - nepodudarnost HLA; HR - Hrvatska; ET - Eurotransplant; No. - broj nepodudarnosti HLA; % - učestalost nepodudarnosti HLA; P - statistički značajna razlika između ispitivanih skupina

#### 4.4. RASPODJELA GENA HLA-A, -B I -DRB1 U SKUPINI NESENZIBILIZIRANIH I SKUPINI SENZIBILIZIRANIH MOGUĆIH PRIMATELJA BUBREGA

U obje skupine bolesnika na listi čekanja za kadaveričnu transplantaciju bubrega, nesenzibiliziranim (N=606) i senzibiliziranim (N=268), gen HLA-A\*02 je bio najzastupljeniji (21,27%; odnosno 34,14%). Gen HLA-A\*80 se pojavio samo jedanput među nesenzibiliziranim bolesnicima, a geni HLA-A\*66 i HLA-A\*69 među senzibiliziranim bolesnicima. Uočena je statistički značajno (P=0,0033) veća učestalost gena HLA-A\*24 među nesenzibiliziranim bolesnicima (13,70%) u odnosu na senzibilizirane bolesnike (8,77%) (Tablica 12).

**Tablica 12. Učestalost gena HLA-A među nesenzibiliziranim (N=606) i senzibiliziranim (N=268) bolesnicima na listi čekanja za kadaveričnu transplantacije bubrega**

GEN HLA-	NESENZIBILIZIRANI		SENZIBILIZIRANI		P
	MPB (N=606)		MPB (N=268)		
	No.	%	No.	%	
A*01	174	0,1436	69	0,1287	
A*02	379	0,3127	183	0,3414	
A*03	136	0,1122	66	0,1231	
A*11	65	0,0536	39	0,0728	
A*23	26	0,0215	8	0,0149	
A*24	166	0,1370	47	0,0877	0,0033
A*25	37	0,0305	13	0,0243	
A*26	62	0,0512	23	0,0429	
A*29	8	0,0066	3	0,0056	
A*30	16	0,0132	7	0,0131	
A*31	25	0,0206	13	0,0243	
A*32	40	0,0330	24	0,0448	
A*33	19	0,0157	16	0,0299	
A*34	0	0	0	0	
A*66	5	0,0041	1	0,0019	
A*68	53	0,0437	23	0,0429	
A*69	0	0	1	0,0019	
A*80	1	0,0008	0	0	

Legenda: MPB - mogući primatelj bubrega; No. - broj pojavljivanja gena HLA; % - učestalost gena HLA; P - statistički značajna razlika između ispitivanih skupina

Za razliku od lokusa HLA-A, na lokusu HLA-B u oboje skupine bolesnika nije bio najčešći isti gen. Među nesenzibiliziranim bolesnicima najzastupljeniji je bio HLA-B\*35 (11,96%), dok je među senzibiliziranim bolesnicima najčešći gen bio HLA-B\*51 (14,74%). Također, za gen HLA-B\*51 pokazana je manju zastupljenost među nesenzibiliziranim bolesnicima u usporedbi sa senzibiliziranim, ali je ta statistička značajnost bila na granici statističke značajnosti ( $P=0,0597$ ). Za sve ostale gene HLA-B nije uočena statistički značajna razlika u učestalostima između gena između ovih skupina bolesnika (Tablica 13).

**Tablica 13. Učestalost gena HLA-B među nesenzibiliziranim (N=606) i senzibiliziranim (N=268) bolesnicima na listi čekanja za kadaveričnu transplantaciju bubrega**

GEN HLA-	NESENZIBILIZIRANI		SENZIBILIZIRANI		P
	MPB (N=606)		MPB (N=268)		
	No.	%	No.	%	
B*07	80	0,0660	34	0,0634	
B*08	115	0,0949	47	0,0877	
B*13	44	0,0363	11	0,0205	
B*18	109	0,0899	39	0,0728	
B*27	89	0,0734	29	0,0541	
B*35	145	0,1196	69	0,1287	
B*37	10	0,0083	6	0,0112	
B*38	62	0,0512	23	0,0429	
B*39	41	0,0338	13	0,0243	
B*41	6	0,0050	4	0,0075	
B*44	89	0,0734	50	0,0933	
B*45	2	0,0017	1	0,0019	
B*46	0	0	0	0	
B*47	5	0,0041	2	0,0037	
B*48	4	0,0033	0	0	
B*49	23	0,0190	14	0,0261	
B*50	10	0,0083	2	0,0037	
B*51	139	0,1147	79	0,1474	0,0597
B*52	18	0,0149	9	0,0168	
B*53	4	0,0033	4	0,0075	



GEN HLA-	NESENZIBILIZIRANI		SENZIBILIZIRANI		P
	MPB (N=606)		MPB (N=268)		
	No.	%	No.	%	
B*54	0	0	1	0,0019	
B*55	15	0,0124	8	0,0149	
B*56	18	0,0149	8	0,0149	
B*57	35	0,0289	11	0,0205	
B*58	14	0,0116	7	0,0131	
B*59	1	0,0008	0	0	
B*40(60)	26	0,0215	11	0,0205	
B*40(61)	30	0,0248	16	0,0299	
B*15(62)	44	0,0363	18	0,0336	
B*15(63)	3	0,0025	3	0,0056	
B*14(64)	4	0,0033	2	0,0037	
B*14(65)	17	0,0140	11	0,0205	
B*15(71)	6	0,0050	1	0,0019	
B*15(72)	0	0	1	0,0019	
B*15(73)	1	0,0008	0	0	
B*15(75)	3	0,0025	2	0,0037	

Legenda: MPB - mogući primatelj bubrega; No. - broj pojavljivanja gena HLA; % - učestalost gena HLA; P - statistički značajna razlika između ispitivanih skupina

Analizom gena na lokusu HLA-DRB1, gen HLA-DRB1\*11 je pokazao najveću zastupljenost u skupini nesenzibiliziranih bolesnika (12,32%), kao i u skupini senzibiliziranih bolesnika (17,72%). Primijećeno je da je među senzibiliziranim bolesnicima gen HLA-DRB1\*13 bio statistički značajno ( $P=0,0500$ ) češće prisutan, nego među nesenzibiliziranima, kao i gen HLA-DRB1\*14 kojemu je učestalost bila približno dvostruko veća od učestalosti u nesenzibiliziranoj skupini bolesnika (Tablica 14).

**Tablica 14. Učestalost gena HLA-DRB1 među nesenzibiliziranim (N=606) i senzibiliziranim (N=268) bolesnicima na listi čekanja za kadaveričnu transplantacije bubrega**

GEN HLA-	NESENZIBILIZIRANI		SENZIBILIZIRANI		P
	MPB (N=606)		MPB (N=268)		
	No.	%	No.	%	
DRB1*01	147	0,1213	61	0,1138	
DRB1*03	136	0,1122	56	0,1045	
DRB1*04	123	0,1015	53	0,0989	
DRB1*07	100	0,0825	32	0,0597	
DRB1*08	42	0,0347	18	0,0336	
DRB1*09	3	0,0025	4	0,0075	
DRB1*10	11	0,0091	8	0,0149	
DRB1*11	222	0,1832	95	0,1772	
DRB1*12	22	0,0182	7	0,0131	
DRB1*13	139	0,1147	80	0,1493	0,0500
DRB1*14	36	0,0297	30	0,0560	0,0097
DRB1*15	121	0,0998	47	0,0877	
DRB1*16	110	0,0908	45	0,0840	

Legenda: MPB - mogući primatelj bubrega; No. - broj pojavljivanja gena HLA; % - učestalost gena HLA; P - statistički značajna razlika između ispitivanih skupina

#### **4.5. RASPODJELA SPECIFIČNOSTI PROTUTIJELA anti-HLA RAZREDA I I HLA RAZREDA II MEĐU BOLESNICIMA NA LISTI ČEKANJA ZA KADAVERIČNU TRANSPLANTACIJU BUBREGA**

U skupini senzibiliziranih bolesnika na listi čekanja za kadaveričnu transplantaciju bubrega, njih 202 (75,37%) je imalo IgG protutijela anti-HLA, odnosno 66 (24,63%) ih je imalo razvijena IgM protutijela anti-HLA koja nisu važna u odbacivanju transplantata. Među 202 bolesnika s IgG protutijelima, 97 (48,02%) bolesnika je razvilo protutijela anti-HLA razreda I i razreda II, 65 (32,18%) bolesnika je imalo protutijela anti-HLA razreda I, a kod 40 (19,80%) bolesnika su otkrivena protutijela anti-HLA razreda II.

U Tablicama 15-18 prikazana je raspodjela protutijela anti-HLA. Rezultati su za pojedina protutijela prikazani kao „broad“, odnosno „split“ jer kod svih bolesnika nije bilo moguće odrediti „split“ protutijelo. Tako su na primjer kod 120 bolesnika otkrivena protutijela anti-HLA-A10, od tog broja kod 37 bolesnika bila je riječ o anti HLA-A25, kod 31 bolesnika o protutijelu anti-HLA-26, anti-HLA-66 su također pronađena kod 31 bolesnika, kod 18 bolesnika je određeno da imaju anti-HLA-34, dok kod 3 bolesnika nije bilo moguće reći radi li se o protutijelu anti HLA-A25, anti-HLA-A26, anti-HLA-34 ili anti-HLA-66.

Najčešće uočena protutijela anti-HLA-A bila su: anti-HLA-A24 (9,09%), anti-HLA-A23 (7,93%) i anti-HLA-A25 (7,16%) (Tablica 15). Među protutijelima anti-HLA-B, najzastupljenija su bila: anti-HLA-B27 (4,71%), anti-HLA-B44 (3,40%) i anti-HLA-B35 (3,29%) (Tablica 16), dok su među protutijelima anti-HLA-C najučestalija bila: anti-HLA-Cw5 (12,24%) i anti-HLA-Cw2, anti-HLA-Cw7, anti-HLA-Cw17 s učestalošću od 9,18% (Tablica 17).

Među protutijelima na antigene HLA-DRB1, pet protutijela je pokazalo učestalost veću od 8,0% (anti-HLA-DR1, anti-HLA-DR4, anti-HLADR7, anti-HLA-DR9 i anti-HLA-DR15). Među svim protutijelima HLA razreda II, najčešće je bilo prisutno protutijelo anti-HLA-DQ9 (16,28%) (Tablica 18). Također treba spomenuti, da su bila prisutna i protutijela na gene HLA-DRB3 (protutijela anti-HLA-DR52), DRB4 (protutijela anti-HLA-DR53) i DRB5 (protutijela anti-HLA-DR51).

**Tablica 15. Specifičnost protutijela HLA razreda I (anti-HLA-A) među bolesnicima na listi čekanja za kadaveričnu transplantaciju bubrega**

Anti HLA- („broad“)	Anti HLA- („split“)	No.	%
<b>A1</b>		24	0,0464
<b>A2</b>		34	0,0658
<b>A3</b>		21	0,0406
<b>A9</b>		90	0,1741
	A23	41 (0,0793)	
	A24	47 (0,0909)	
	A23/A24	2 (0,0039)	
<b>A10</b>		120	0,2321
	A25	37 (0,0716)	
	A26	31 (0,0600)	
	A34	18 (0,0348)	
	A66	31 (0,0600)	
	A25/A26/A34/A66	3 (0,0058)	
<b>A11</b>		23	0,0445
<b>A19</b>		99	0,1915
	A29	16 (0,0309)	
	A30	11 (0,0213)	
	A31	12 (0,0232)	
	A32	31 (0,0600)	
	A33	17 (0,0329)	
	A74	11 (0,0213)	
	A29/A30/A31/A32/A33/A74	1(0,0019)	
<b>A28</b>		61	0,1180
	A68	27 (0,0522)	
	A69	27 (0,0522)	
	A68/A69	7 (0,0135)	
<b>A36</b>		18	0,0348
<b>A43</b>		19	0,0368
<b>A80</b>		8	0,0155

Legenda: No. - broj pojavljivanja protutijela anti-HLA razreda I (anti-HLA-A); % - učestalost protutijela anti-HLA razreda I

**Tablica 16. Specifičnost protutijela HLA razreda I (anti-HLA-B) među bolesnicima na listi čekanja za kadaveričnu transplantaciju bubrega**

Anti HLA- („broad“)	Anti HLA- („split“)	No.	%
<b>B5</b>		51	0,0559
	B51	25 (0,0274)	
	B52	24 (0,0263)	
	B51/B52	2 (0,0022)	
<b>B7</b>		25	0,0274
<b>B8</b>		25	0,0274
<b>B12</b>		54	0,0591
	B44	31 (0,0340)	
	B45	22 (0,0241)	
	B44/B45	1 (0,0011)	
<b>B13</b>		24	0,0263
<b>B14</b>		19	0,0208
	B64	2 (0,0022)	
	B65	2 (0,0022)	
	B64/65	15 (0,0164)	
<b>B15</b>		120	0,1314
	B62	20 (0,0219)	
	B63	26 (0,0285)	
	B75	20 (0,0219)	
	B76	28 (0,0307)	
	B77	22 (0,0241)	
	B62/B63/B75/B76/B77	4 (0,0044)	
<b>B16</b>		34	0,0372
	B38	19 (0,0208)	
	B39	14 (0,0153)	
	B38/39	1 (0,0011)	
<b>B17</b>		62	0,0679
	B57	29 (0,0318)	
	B58	29 (0,0318)	
	B57/B58	4 (0,0044)	
<b>B18</b>		27	0,0296

Anti HLA- („broad“)	Anti HLA- („split“)	No.	%
<b>B21</b>		50	0,0548
	B49	29 (0,0318)	
	B50	19 (0,0208)	
	B49/B50	2 (0,0022)	
<b>B22</b>		57	0,0624
	B54	14 (0,0153)	
	B55	20 (0,0219)	
	B56	22 (0,0241)	
	B54/B55/B56	1 (0,0011)	
<b>B27</b>		43	0,0471
<b>B35</b>		30	0,0329
<b>B37</b>		25	0,0274
<b>B40</b>		44	0,0482
	B60	20 (0,0219)	
	B61	19 (0,0208)	
	B60/B61	5 (0,0055)	
<b>B41</b>		14	0,0153
<b>B42</b>		19	0,0208
<b>B46</b>		8	0,0088
<b>B47</b>		27	0,0296
<b>B48</b>		12	0,0131
<b>B53</b>		28	0,0307
<b>B59</b>		12	0,0131
<b>B67</b>		8	0,0088
<b>B70</b>		26	0,0285
	B71	7 (0,0077)	
	B72	15 (0,0164)	
	B71/B72	4 (0,0044)	
<b>B73</b>		10	0,0110
<b>B78</b>		19	0,0208
<b>B81</b>		17	0,0186
<b>B82</b>		19	0,0208

Legenda: No. - broj pojavljivanja protutijela anti-HLA razreda I (anti-HLA-B); % - učestalost protutijela anti-HLA razreda I

**Tablica 17. Specifičnost protutijela HLA razreda I (anti-HLA-Cw) među bolesnicima na listi čekanja za kadaveričnu transplantaciju bubrega**

Anti HLA- („broad“)	Anti HLA- („split“)	No.	%
Cw1		3	0,0306
Cw2		9	0,0918
Cw3		11	0,1122
	Cw9	5 (0,0510)	
	Cw10	4 (0,0408)	
	Cw9/Cw10	2 (0,0204)	
Cw4		6	0,0612
Cw5		12	0,1224
Cw6		7	0,0714
Cw7		9	0,0918
Cw8		8	0,0816
Cw12		5	0,0510
Cw14		4	0,0408
Cw15		4	0,0408
Cw16		5	0,0510
Cw17		9	0,0918
Cw18		6	0,0612

Legenda: No. - broj pojavljivanja protutijela anti-HLA razreda I (anti-HLA-Cw); % - učestalost protutijela anti-HLA razreda I

**Tablica 18. Specifičnost protutijela anti-HLA razreda II (anti-HLA-DR i anti-HLA-DQ) među bolesnicima na listi čekanja za kadaveričnu transplantaciju bubrega**

Anti HLA- („broad“)	Anti HLA- („split“)	No.	%
<b>DR1</b>		36	0,0855
<b>DR3</b>		22	0,0523
	DR17	5 (0,0119)	
	DR18	4 (0,0095)	
	DR17/DR18	13(0,0309)	
<b>DR4</b>		36	0,0855
<b>DR7</b>		35	0,0831
<b>DR8</b>		20	0,0475
<b>DR9</b>		36	0,0855
<b>DR10</b>		24	0,0570
<b>DR11</b>		25	0,0594
<b>DR12</b>		17	0,0404
<b>DR13</b>		19	0,0451
<b>DR14</b>		23	0,0546
<b>DR15</b>		36	0,0855
<b>DR16</b>		33	0,0784
<b>DR51</b>		31	0,0736
<b>DR52</b>		9	0,0214
<b>DR53</b>		19	0,0451
<b>DQ2</b>		24	0,1116
<b>DQ3</b>		105	0,4884
	DQ7	30 (0,1395)	
	DQ8	34 (0,1581)	
	DQ9	35 (0,1628)	
	DQ7/DQ8/DQ9	6 (0,0279)	
<b>DQ4</b>		28	0,1302
<b>DQ5</b>		28	0,1302
<b>DQ6</b>		30	0,1395

Legenda: No. - broj pojavljivanja protutijela anti-HLA razreda II (anti-HLA-DR i anti-HLA-DQ); % - učestalost protutijela anti-HLA razreda II



## 5. RASPRAVA

Kronično zatajenje bubrega ili završna faza zatajenja bubrega (engl. *end stage renal disease* – ESRD) u konačnici zahtjeva transplantaciju bubrega ili boravak na dijalizi kao metode liječenja. S obzirom na veliki broj bolesnika s ESRD-om shvatljiv je i sve veći interes istraživača za istraživanja povezanosti gena HLA s ESRD-om [31]. Poznato je da nekoliko bolesti može dovesti do kroničnog zatajenja bubrega, poznato je i da se razlikuju po zastupljenosti među različitim populacijama, ali je ipak najčešće riječ o nefropatiji kao posljedici šećerne bolesti [32].

U našem istraživanju analizirali smo bolesnike s kroničnim zatajenjem bubrega koji su na listi čekanja za kadaveričnu transplantaciju bubrega te njihove davatelje. Prvi cilj ovog rada bio je istražiti raspodjelu gena HLA u skupini bolesnika i usporediti je sa zdravom kontrolom. Geni HLA-A\*02, A\*01, A\*24 i A\*03 su pokazali najveće učestalosti (>10%) među bolesnicima, kao i među kontrolnim ispitanicima te nije bilo statistički značajne razlike između te dvije skupine. Nasuprot našim rezultatima, Karahan i suradnici [33] uočili su negativnu povezanost nekih gena HLA-A (A\*11, A\*23, A\*24, A\*26, A\*29, A\*30, A\*32, A\*66, A\*68, A\*69) s primarnim bolestima koje dovode do ESRD-a. Slične rezultate navodi i Ebtesam u svom radu [34].

Među genima lokusa HLA-B, gen HLA-B\*08 je statistički značajno češće prisutan među našim bolesnicima, što je u skladu s istraživanjem provedenim u Kuvajtu, sugerira da bi gen HLA-B\*08 mogao biti rizičan faktor za razvoj ESRD [35]. Činjenica je da je ovaj gen sastavni dio tzv. autoimunog haplotipa: HLA-A\*01~B\*08~DRB1\*03 koji je povezan s brojnim autoimunim bolestima, među kojim je i šećerna bolest tipa 1. Također i saznanje da je ovaj haplotip HLA u snažnoj neravnoteži udruživanja s promotorom za gen koji kodira imunoregulatorni citokin TNF- $\alpha$ , zbog čega dolazi do povećanja njegove ekspresije, djelomično objašnjava povezanost ovog haplotipa HLA s autoimunim bolestima [36].

Za gen HLA-DRB1\*11 koji je bio najučestaliji u obje analizirane skupine (bolesnici i kontrola), nije uočena statistički značajna razlika između njih, što je u suprotnosti s istraživanjem provedenim u Brazilu [31]. Istovremeno, studija provedena među bolesnicima s ESRD-om iz Tajvana donosi zaključke da je uz gen HLA-DRB1\*11 i gen HLA-DRB1\*03 podložan za razvoj bolesti [37]. Rezultati istraživanja provedenog u Egiptu također ukazuju da su geni HLA-DRB1\*03 i DRB1\*11 podložni za razvoj nefropatije uzrokovane šećernom bolesti, te ih autori ističu kao rizične gene za razvoj ESRD-a [34].

Nasuprot tome, za gene HLA-DRB1\*07 i HLA-DRB1\*16 utvrdili smo statistički značajno smanjenu učestalost među bolesnicima, u usporedbi s kontrolom što ukazuje na mogući smanjeni rizik tih gena za razvoj ESRD-a. Morran i suradnici [38], između ostalih, također navode gene HLA-DRB1\*07 i HLA-DRB1\*16 kao zaštitne gene za šećernu bolest tipa 1, koja može dovesti do ESRD-a. Uočena je i negativna povezanost gena HLA-DRB1\*07 s membranoznim glomerulonefritisom, kao još jednom primarnom bolesti koja dovodi do ESRD-a [39].

Razlog razlikama u rezultatima između pojedinih istraživanja može biti prvenstveno u polimorfizmu i različitoj raspodjeli gena HLA u različitim populacijama, zatim u različitom broju osoba u skupinama bolesnika i kontroli, različitim metodama tipizacije HLA te različitim etiološkim faktorima koji su doveli do ESRD-a. No, otkrivanje povezanosti gena HLA s ESRD-om može biti koristan podatak za otkrivanje bolesnika s visokim rizikom za razvoj ESRD-a te njegove eventualne prevencije, odnosno odgode razvoja bolesti.

Naš sljedeći cilj je bio usporediti raspodjelu gena HLA između kadavera iz Hrvatske i Eurotransplanta. Poznato je da raspodjela gena HLA različita u različitim populacijama Europe pa smo istražili postoji li razlika i između ovih dviju skupina. Rezultati su pokazali statistički značajno smanjenu učestalost gena HLA-A\*29 među našim kadaverima u usporedbi sa stranim kadaverima. To je osobito važno za one bolesnike iz Hrvatske koji imaju gen HLA-A\*29 jer će tako češće dobiti bubreg, podudaran za taj gen, iz ostalih zemalja Eurotransplanta zbog veće učestalosti tog gena u tim zemljama [55].

Raspodjela gena HLA-B pokazala je najveći broj statistički značajnih razlika između naših dviju skupina kadaveričnih davatelja. Tako je uočena smanjena zastupljenost gena HLA-B\*07 među domaćim davateljima u odnosu na strane, dok je gen HLA-B\*35 bio najzastupljeniji što je u skladu s prijašnjim istraživanjem provedenim u Hrvatskoj, ali je sad pokazao i statistički značajnu razliku [40]. Dobiveni rezultati su u skladu s populacijskim istraživanjima provedenim u Europi gdje se jasno vidi da je prisutnost gena HLA-B\*35 veća na jugu nego na sjeveru Europe [55]. S druge strane, geni HLA-B\*08, HLA-B\*44 i HLA-B\*40 (serološki ekvivalent HLA-B60) su pokazali statistički značajno veće učestalosti među stranim kadaverima jer su ti geni i zastupljeniji među populacijama na sjeveru Europe [55].

Na lokusu HLA-DRB1, učestalost gena HLA-DRB1\*11 i -DRB1\*16 bila je statistički značajno veća među kadaveričnim davateljima iz Hrvatske što je u skladu s rastom učestalosti tog gena HLA od sjevera prema jugu Europe [55]. Rezultati ovog istraživanja potvrdili su

rezultate prethodnog istraživanja na manjem broju uzoraka (N=200) gdje autor također govori o statistički značajno (P=0,0001) većoj učestalosti gena HLA-DRB1\*16 među kadaverima iz Hrvatske u usporedbi s populacijskim podacima o raspodjeli gena HLA za Eurotransplant [40]. Time bolesnici, pozitivni za gene HLA-DRB1\*11 i -DRB1\*16, iz drugih zemalja članica Eurotransplanta imaju veću šansu dobiti bubreg, podudaran za ovaj gen, od kadavera iz Hrvatske, nego od kadaveričnih davatelja iz drugih zemalja članica Eurotransplanta.

Nadalje, cilj nam je bio usporediti i broj nepodudarnosti HLA-ABDR između primatelja i domaćih, odnosno stranih kadaveričnih davatelja. Poznato je da broj nepodudarnosti HLA ima velik utjecaj na daljnje preživljenje transplantata. Tako su rezultati istraživanja koje je uključivalo veliku skupinu bolesnika (N=189141) kojima je transplantiran bubreg (1. transplantacija), utvrdili da je nepodudarnost HLA imala utjecaj na preživljenje bubrega s 13% višim rizikom (HR=1,13) od odbacivanja kod jedne nepodudarnosti HLA, te 64% višim rizikom (HR=1,64) kod šest nepodudarnosti HLA [41]. U ovom radu nismo pratili preživljenje bubrega s obzirom na broj nepodudarnosti HLA-ABDR, već broj nepodudarnosti HLA-ABDR s obzirom na porijeklo kadaveričnog davatelja bubrega. Dobiveni rezultati su utvrdili da je broj nepodudarnosti HLA „222“ (niti jedan zajednički gen HLA-A, -B i -DRB1) statistički značajno više zastupljen u skupini bolesnika koji su transplantirani od kadavera iz Hrvatske, nego u skupini bolesnika koji su transplantirani od kadavera iz zemalja članica Eurotransplanta. Moguće objašnjenje leži u činjenici da su ti bolesnici bili vrlo urgentni te su zbog toga dobili veliki broj bodova kroz sistem bodovanja u Eurotransplantovom programu. Također, potpuna podudarnost nije zabilježena niti u jednom slučaju između primatelja i domaćih kadavera što je moguće zbog veće vjerojatnosti pronalaska HLA podudarnog davatelja iz ostalih zemalja članica Eurotransplanta koje zajedno čine veću zalihu gena HLA, nego sama Hrvatska.

Brojna istraživanja pokazala su da je senzibiliziranim bolesnicima puno teže naći odgovarajućeg davatelja zbog prisutnosti protutijela anti-HLA [42, 43]. Protutijela anti-HLA značajno doprinose odbacivanju transplantata a rezultat su imunizirajućih događaja kao što su trudnoća, transfuzija ili transplantacija. Treba spomenuti i činjenicu da svaki pojedinac može različito odgovoriti na imunizirajući događaj [44]. Iz tog razloga smo napravili i usporedbu raspodjele gena HLA među nesenzibiliziranim i senzibiliziranim bolesnicima.

Među genima lokusa HLA-A otkrivena je statistički značajno veća učestalost gena HLA-A\*24 kod nesenzibiliziranih bolesnika u usporedbi sa senzibiliziranim bolesnicima, što

navodi na pretpostavku da gen HLA-A\*24 ima smanjeni rizik za senzibilizaciju HLA, o čemu izvještavaju i autori iz Turske [45]. Karahan i suradnici su izvijestili o većoj učestalosti gena HLA-A\*03 i HLA-A\*66 u skupini senzibiliziranih bolesnika [46], što nije potvrđeno u ovom radu. Na lokusu HLA-B, geni HLA-B\*35 i HLA-B\*44 pokazali su trend povećane učestalosti (bez statističke značajnosti) među senzibiliziranim bolesnicima što je u skladu s istraživanjem provedenim u Brazilu [47]. Istovremeno među našim senzibiliziranim bolesnicima uočena je statistički značajno veća zastupljenost gena HLA-B\*51. U ovom trenutku nije moguće je donositi konačne zaključke o ovom genu kao rizičnom genu HLA za stvaranje protutijela anti-HLA. Naime, rezultate je nužno potvrditi na većem broju ispitanika, te provesti analize u koje bi uključivale HLA-B\*51 pozitivne, odnosno HLA-B\*51 negativne bolesnike koji su bili izloženi imunološkim događajima. Uočena statistički značajno veća zastupljenost gena HLA-DRB1\*13 i HLA-DRB1\*14 među senzibiliziranim bolesnicima je u skladu s rezultatima istraživanja Heise-a i suradnika [48], što navodi na pretpostavku da su to rizični geni za senzibilizaciju HLA. Treba spomenuti i rad autora iz Kine koji sugerira da vlastiti geni HLA nemaju utjecaja na stvaranje protutijela anti-HLA, a sama senzibilizacija HLA najviše ovisi o specifičnosti stranog antigena koji je nepodudaran s primateljevima [25]. Međutim, Heise i suradnici su istraživali upravo povezanost određenog fenotipa HLA primatelja s povećanim ili smanjenim rizikom stvaranja protutijela anti-HLA, te su pokazali da antigeni HLA-DR1, HLA-DR4 i HLA-DR7 imaju smanjeni rizik, dok antigeni HLA-DR2, HLA-DR3, HLA-DR6 i HLA-DR11 imaju povećani rizik za stvaranje protutijela anti-HLA [48]. Zaključci tog istraživanja su u skladu s našim rezultatima o povećanoj učestalosti gena HLA-DRB1\*13 i HLA-DRB1\*14 (koji spadaju u široku serološku skupinu HLA-DR6) među senzibiliziranim bolesnicima.

Kada govorimo o učestalosti protutijela anti-HLA, za očekivati bi bilo da je njihova učestalost u skladu s učestalošću gena HLA u populaciji, odnosno da se za one gene HLA koji su češći u populaciji stvara više protutijela anti-HLA, dok za one koji su rjeđi nastaje i manje protutijela. Neka od najučestalijih protutijela (anti-HLA-A24, anti-HLA-B44, anti-HLA-35, anti-HLA-DR15) su bila u skladu s zastupljenošću tih gena HLA u populaciji Hrvatske. Međutim, zanimljivo je primijetiti da rezultati dobiveni u ovom istraživanju, kao i nekoliko drugih radova, govore i o suprotnoj situaciji [25, 49]. Tako su među antitijelima anti-HLA-A najučestalija bila i anti-HLA-A23 i anti-HLA-A25, dok je učestalost samih gena HLA-A23 i HLA-25 u našoj populaciji niska (2,50%, odnosno 3,14%). Također među protutijelima anti-

HLA-B, najzastupljenije je bilo anti-HLA-B27, a učestalost samog gena u populaciji je 6,21%.

Najveći nesrazmjer između zastupljenosti i uočene senzibilizacije otkriven je za gen HLA-DRB1\*09 koji u hrvatskoj populaciji ima izrazito nisku zastupljenost (0,26%), a protutijelo anti-HLA-DR9 je bilo jedno od najčešćih (8,55%) protutijela anti-HLA-DR. Jedno od objašnjenja za ovakav nalaz moglo bi biti činjenica da je za većinu čestih gena HLA u populaciji manja vjerojatnost nepodudarnosti HLA između primatelja i davatelja, pa je u konačnici i manje stvaranje protutijela na nepodudarne antigene HLA davatelja nakon transplantacije. Također, moguće objašnjenje je i da su rjeđe zastupljeni antigeni HLA jači imunogeni, pa izazivaju češći imunološki odgovor i stvaranje protutijela anti-HLA.

## 6. ZAKLJUČAK

1. Među bolesnicima s ESRD-om na lokusu HLA-A nije uočena statistički značajna razlika u raspodjeli gena u usporedbi s kontrolom.
2. Na lokusu HLA-B, gen HLA-B\*08 je statistički značajno učestaliji ( $P=0,0414$ ) među bolesnicima nego u zdravoj kontroli, te predstavlja rizični faktor za razvoj ESRD-a.
3. Geni HLA-DRB1\*07 ( $P=0,0037$ ) i HLA-DRB1\*16 ( $P=0,0492$ ) su statistički manje zastupljeni među bolesnicima, što govori u prilog njihovoj zaštitnoj ulozi za razvoj ESRD-a.
4. Usporedba raspodjele gena HLA između kadaveričnih davatelja iz Hrvatske i kadaveričnih davatelja iz drugih zemalja Eurotransplanta pokazala je da su geni HLA-B\*35 ( $P=0,0046$ ), HLA-DRB1\*11 ( $P=0,0519$ ) i HLA-DRB1\*16 ( $P=0,0001$ ) češći među kadaverima iz Hrvatske, dok su geni HLA-A\*29 ( $P=0,0174$ ), HLA-B\*07 ( $P=0,0058$ ), HLA-B\*08 ( $P=0,0504$ ), HLA-B\*44 ( $P=0,0080$ ) i HLA-B\*40(60) ( $P=0,0448$ ) bili manje zastupljeni.
5. Broj nepodudarnosti HLA-ABDR „222“ statistički značajno ( $P=0,0277$ ) češće je bio prisutan između primatelja i domaćih kadaveričnih davatelja, dok su brojevi nepodudarnosti HLA-ABDR „000“ i „101“ češće prisutni između primatelja i stranih kadaveričnih davatelja ( $P=0,0005$ , odnosno  $P=0,0156$ ).
6. Učestalost gena HLA-A\*24 je bila viša ( $P=0,0033$ ) među nesenzibiliziranim bolesnicima u usporedbi sa senzibiliziranim bolesnicima.
7. Geni HLA-B\*51 ( $P=0,0597$ ), HLA-DRB1\*13 ( $P=0,0500$ ) i HLA-DRB1\*14 ( $P=0,0097$ ) su bili zastupljeniji među senzibiliziranim bolesnicima.
8. Visoke učestalosti protutijela anti-HLA-A24, B44, B35 i DRB15 su u skladu s učestalostima tih antigena tj. gena HLA u populaciji Hrvatske, dok visoke učestalosti protutijela anti-HLA-A23, A25, B27 i DR9 nisu u skladu s njihovim učestalostima u hrvatskoj populaciji.

## 7. LITERATURA

- [1] Phillips B.L., Callaghan C., “The immunology of organ transplantation,” *Surg. (United Kingdom)*, vol. 35, no. 7, pp. 333-340, 2017.
- [2] Alelign T., Ahmed M.M., Bobosha K., Tadesse Y., Howe R., Petros B., “Review Article Kidney Transplantation : The Challenge of Human Leukocyte Antigen and Its Therapeutic Strategies,” *Journal of Immunology Research*, pp.1-18, 2018.
- [3] Žunec R., “Molekularna tipizacija HLA, primjena u transplantaciji i dijagnostici,” *Klinička kemija i molekularna dijagnostika*, Zagreb: Medicinska naklada, pp. 292-300, 2008.
- [4] Trobonjača Z., Živčić-Ćosić S., Lisjak J., “Imunobiologija presađivanja bubrega,” vol. 46, no. 4, pp. 424-433, 2010.
- [5] Barlow A.D., “Kidney transplantation,” *Surgery*, vol. 35, no. 7, pp. 378-384, 2017.
- [6] Kindt T.J., Osborne B.A., Goldsby R.A., *Kuby Immunology*. New York: Freeman, W. H. & Company, pp. 161-184, 2006.
- [7] Thorsby E., Lie B.A., “HLA associated genetic predisposition to autoimmune diseases: Genes involved and possible mechanisms,” *Transplant Immunology*, vol. 14, pp. 175-182, 2005.
- [8] Andreis I., Batinić D., Čulo F. i sur., *Imunologija*. Zagreb: Medicinska naklada, pp. 98-113, 2004.
- [9] Howell W.M., Carter V., Clark B., “The HLA system: Immunobiology, HLA typing, antibody screening and crossmatching techniques,” *J. Clin. Pathol.*, vol. 63, no. 5, pp. 387–390, 2010.
- [10] Reynolds B.C., Tinckam K.J., “Sensitization assessment before kidney transplantation,” *Transplantation Reviews*, vol. 31, no. 1, pp. 18–28, 2017.
- [11] Grinyó J., “Why Is Organ Transplantation Clinically Important?,” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, vol. 3, no. 6, pp. 1-10, 2013.
- [12] Laperrousaz S., Tiercy J.M., Villard J., Ferrari-Lacraz S., “HLA and non-HLA polymorphisms in renal transplantation,” *Swiss Medical Weekly*, vol. 142, pp.1-12, 2012.
- [13] Halloran P.F., “The clinical importance of alloantibody-mediated rejection,” *American Journal of Transplantation*, no. 3, pp. 639-640, 2003.

- [14] Lefaucheur C. i sur, "Clinical relevance of preformed HLA donor-specific antibodies in kidney transplantation," *American Journal of Transplantation*, vol. 8, no. 2, pp. 324-331, 2008.
- [15] Takemoto S., Port F.K., Claas F.H.J., Duquesnoy R.J., "HLA matching for kidney transplantation," *Human Immunology*, vol. 65, no. 12, pp. 1489-1505, 2004.
- [16] Žunec R, Grubić Z, Balen S., "Važnost imunogenetike u transplantaciji organa," *Medix*, god XVII, broj 92/93, 2011.
- [17] Horton R.i sur., "Gene map of the extended human MHC," *Nature Reviews Genetics*, vol. 5, no. 12, pp. 889-899, 2004.
- [18] Trabace S., "HLA and Disease Associations," *J Headache Pain*, no.1, pp. 109-113, 2000.
- [19] Caillat-Zucman S., "Molecular mechanisms of HLA association with autoimmune diseases," *Tissue Antigens*, vol. 73, no. 1, pp. 1-8, 2009.
- [20] Gregersen P.K., Silver J., Winchester R.J., "The Shared Epitope Hypothesis," *Arthritis and Rheumatism.*, vol. 30, no. 11, pp. 1205–1212, 1987.
- [21] Žunec R., Grubić Z., Jurčić Z., Peršić M., Kaštelan A., Kerhin-Brkljačić V., "HLA-DQ2 heterodimer," no. 6, pp. 119-124, 2004.
- [22] Hor H. i sur., "Genome-wide association study identifies new HLA class II haplotypes strongly protective against narcolepsy," *Nature Genetics.*, vol. 42, no. 9, pp. 786-789, 2010.
- [23] Grubić Z., Žunec R., Čečuk-Jeličić E., Kerhin-Brkljačić V., Kaštelan A., "Polymorphism of HLA-A, -B, -DRB1, -DQA1 and -DQB1 haplotypes in a Croatian population," *European Journal of Immunogenetics*, vol. 27, no. 1, pp. 47-51, 2000.
- [24] Vojvodic D., Ademovic-Sazdanic S., "HLA Class I and Class II Polymorphism in the Population of Vojvodina, Serbia," *Coll. Antropol.*, no. 36, pp. 1379-1384, 2012.
- [25] Fu Q., Wang C., Zeng W., Liu L., "The correlation of HLA allele frequencies and HLA antibodies in sensitized kidney transplantation candidates," *Transplantation Proceedings*, vol. 44, no. 1, pp. 217–221, 2012.
- [26] Grubić Z., "Tipizacija HLA u procjeni kompatibilnog darivatelja," *Bilten KROHEMA 4*, pp. 42–44, 2012.
- [27] Khan M.A., "An Update on the Genetic Polymorphism of HLA-B\*27 With 213 Alleles Encompassing 160 Subtypes (and Still Counting)," *Current Rheumatology Reports*, vol. 19, no. 2, pp. 1-7, 2017.



- [28] Grubić Z., “Gen HLA-B27: polimorfizam, evolucija, raspodjela i povezanost s spoondiloartopacijama,” *Reumatizam*, vol. 53, no. 1, pp. 5-10, 2006.
- [29] Grubić Z., Žunec R., Štingl K., Sviličić D., Kerhin-Brkljačić V., “Haplotipske veze dva najčešća podtipa gena HLA-B\*27 u hrvatskoj populaciji,” *Reumatizam*, vol. 55, no. 1, pp. 5-9, 2008.
- [30] Grubic Z., Burek Kamenaric M., Mikulic M., Stingl Jankovic K., Maskalan M., Zunec, R., “HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 allele and haplotype diversity among volunteer bone marrow donors from Croatia,” *International Journal of Immunogenetics*, vol. 41, no. 3, pp. 211-221, 2014.
- [31] Crispim C.J. i sur., “HLA Polymorphisms as Incidence Factor in the Progression to End-Stage Renal Disease in Brazilian Patients Awaiting Kidney Transplant,” *Transplantation Proceedings*, vol. 40, no. 5, pp. 1333-1336, 2008.
- [32] Freedman I, Espeland A., Heise R., Canzanello J., “Racial Variation in Human Leukocyte Antigen in Insulin-Dependent Diabetic Nephropathy Frequency,” *Journal of the American Society of Nephrology*, no. 14, pp. 1467–1473, 1993.
- [33] Karahan G.E. i sur. “Impact of HLA on the Underlying Primary Diseases in Turkish Patients with End-Stage Renal Disease with End-Stage Renal Disease,” *Renal Failure*, vol. 31, no.1 pp. 44-49, 2009.
- [34] Osama A., Abdelazeem H.G., Ali M., Khalil R.Y. , “Human Leukocyte Antigens as A Risk Factor For The Primary Diseases Leading To End Stage Renal Disease In Egyptian Patients 1,” vol. 18, no. 2, pp. 13-21, 2011.
- [35] Mosaad Y.M. i sur., “Association between Human Leukocyte Antigens (HLA-A , -B , and -DR) and end-stage renal disease in Kuwaiti patients awaiting transplantation,” *Renal Failure*, vol.36, no. 8, pp. 1317-1321, 2014.
- [36] Lio D. i sur., “A genetically determined high setting of TNF- $\alpha$  influences immunologic parameters of HLA-B8,DR3 positive subjects: Implications for autoimmunity,” *Human Immunology.*, vol. 62, no. 7, pp. 705-713, 2001.
- [37] Dai C., Chu C., Chen S., Sun C., Lin M. Lee C., “Association between human leucocyte antigen subtypes and risk of end stage renal disease in Taiwanese: a retrospective study,” *BMC Nephrology*, pp. 1-8, 2015.
- [38] Morran M.P., Vonberg A., Khadra A., Pietropaolo M., “Immunogenetics of type 1 diabetes mellitus,” *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 42, pp. 42-60, 2015.
- [39] Freedman B.I., Spray B.J., Dunston G.M., Heise E.R., “HLA Associations in End-

- Stage Renal Disease Due to Membranous Glomerulonephritis: HLA-DR3 Associations With Progressive Renal Injury,” *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 23, no. 6, pp. 797-802, 1994.
- [40] Salamunović S., “Raspodjela alela humanih leukocitnih antigena kod kadaveričnih davatelja organa u Republici Hrvatskoj,” 2009.
- [41] Williams R.C., Opelz G., Mcgarvey C.J., Weil E.J., Chakkeria H.A., “The Risk of Transplant Failure With HLA Mismatch in First Adult Kidney Allografts From Deceased Donors,” *Transplantation*, vol. 100, no. 5, 2016.
- [42] Phelan P.J. i sur., “Analysis of waiting times on Irish renal transplant list,” *Clinical Transplantation*, vol. 24, no. 3, pp. 381-385, 2010.
- [43] Kim M.G. i sur., “Management of patients on the waiting list for deceased donor kidney transplantation,” *Transplantation Proceedings*, vol. 44, no. 1, pp. 66-71, 2012.
- [44] Akgul S.U. i sur., “Association Between HLA Antibodies and Different Sensitization Events in Renal Transplant Candidates,” *Transplantation Proceedings*, vol. 49, no. 3, pp. 425-429, 2017.
- [45] Duyarlılıđı Y. i sur., “Human Leukocyte Antigen Frequencies in Highly Sensitized Patients,” *Turkish Journal of Immunology*, vol. 3, no. 1, pp. 11-14, 2015.
- [46] Karahan G.E. i sur., “Association of HLA phenotypes of end-stage renal disease patients preparing for first transplantation with anti-HLA antibody status,” *Renal Failure*, vol. 32, no. 3, pp. 380-383, 2010.
- [47] Saito P.K., Yamakawa R.H., Aparecida E.P., Verissimo W., “Evaluation of the Humoral Immune Response to Human Leukocyte Antigens in Brazilian Renal Transplant Candidates,” *PLOS ONE* vol. 9, no. 6, 2014.
- [48] Heise E., Manning C., Thacker L., “HLA phenotypes of ESRD patients are risk factors in the panel-reactive antibody (PRA) response,” *Clinical Transplantation*, vol. 15, no. suppl. 6, pp. 22-27, 2001.
- [49] Idica A., Sasaki N., Hardy S., Terasaki P., “Unexpected frequencies of HLA antibody specificities present in sera of multitransfused patients,” *Clinical Transplantation*, pp. 139-159, 2006.

- [50] [https://www.google.hr/search?q=hla+genes&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahKEwic\\_qrWt\\_fbAhVFZlAKHV1pDogQ\\_AUICigB&biw=1366&bih=631#imgrc=IvGNoXtQGCnNKM](https://www.google.hr/search?q=hla+genes&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahKEwic_qrWt_fbAhVFZlAKHV1pDogQ_AUICigB&biw=1366&bih=631#imgrc=IvGNoXtQGCnNKM) (03.05.2018)
- [51] <https://microbeonline.com/difference-mhc-class-mhc-class-ii-proteins/> (03.05.2018)
- [52] <https://www.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=H10+Histocompatibility+September+2017+v4.41.pdf>
- [53] [http://hla.alleles.org/antigens/recognised\\_serology.html](http://hla.alleles.org/antigens/recognised_serology.html)
- [54] <https://www.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=H4+Kidney+February+20%2C+20181.pdf>
- [55] <http://www.allelefreqencies.net/default.asp>

## **8. ŽIVOTOPIS**

### **Osnovni osobni podaci**

Datum i mjesto rođenja: 13.12. 1994, Passau, Republika Njemačka

### **Obrazovanje**

- rujan 2001.- lipanj 2009. - Osnovna škola Ivan Goran Kovačić, Velika
- rujan 2009.- lipanj 2013. - Opća gimnazija Požega
- rujan 2013.- rujan 2016. - Odjel za biologiju, Sveučilište Josip Juraj Strossmayer u Osijeku
  - Preddiplomski studij biologije; naslov završnog rada: Oksidativni-antioksidativni status seruma štakora oboljelih od dijabetesa;  
mentor: prof.dr.sc.Elizabeta Has-Schön
- rujan 2016.- srpanj 2018. - Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

### **Osobne vještine**

- hrvatski (materinski), engleski, njemački
- želja i volja za učenjem i razvijanjem novih vještina, odgovornost, organiziranost, komunikativnost, suradljivost, upornost, kreativnost
- IT vještine (Microsoft Office: Word, Excel, PowerPoint), upravljanje programom za citiranje radova (Mendeley)
- crni pojas u taekwon-do-u

### **Ostale informacije**

- Sudjelovala u manifestaciji „Otvoreni dan Instituta Ruđer Bošković“ 2017. i 2018. godine te manifestaciji „Noć biologije“ 2018. godine
- Odrađivala stručnu praksu na PMF-u, na Zavodu za Animalnu fiziologiju pod vodstvom izv.prof.dr.sc. Ane Galov
- Odrađivala praksu na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za nasljedni rak pod vodstvom prof.dr.sc. Sonje Levanat