

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NATALIJA PIŠEC

**MAGISTRSKA NALOGA**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NATALIJA PIŠEC

**VPLIVI PRISOTNOSTI IN SPECIFIČNOSTI PROTITELES ANTI-HLA  
BOLNIKOV PRED IN PO ALOGENSKI PRESADITVI LEDVIC  
UMRLIH DAROVALCEV NA DELOVANJE PRESADKA**

**INFLUENCE OF PATIENTS' HLA ANTIBODY PRESENCE AND  
SPECIFICITY BEFORE AND AFTER ALOGENIC CADAVERIC  
KIDNEY TRANSPLANTATION ON GRAFT FUNCTION**

**MAGISTRSKA NALOGA**  
**MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE**

Ljubljana, 2016

## **IZJAVA**

Magistrsko naložko sem opravljala v Centru za tipizacijo tkiv, Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino pod mentorstvom izr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm. in somentorstvom dr. Blanke-Vidan Jeras, mag. farm., spec.

Iskreno se zahvaljujem somentorici dr. Blanki Vidan-Jeras, mag. farm., spec. in mentorju izr. prof. dr. Matjažu Jerasu, mag. farm., za strokovno pomoč, usmerjanje pri delu, vzpodbude in koristne nasvete.

Za sodelovanje se iskreno zahvaljujem prof. dr. Aljoši Kandusu, dr. med. in gospe Radi Marinković iz Centra za transplantacijo ledvic UKC Ljubljana. Še posebej pa se zahvaljujem prof. dr. Mihi Arnolu, dr. med., za ovrednotenje kliničnih podatkov bolnikov in izvedbo statistične obdelave podatkov.

Hvala vsem sodelavkam v Centru za tipizacijo tkiv za moralno podporo in pomoč. Tajani iz KBC Rijeka hvala za pomoč pri izvajanjtu testov.

Nenazadnje pa se iskreno zahvaljujem mojim domačim, ki so mi ves čas stali ob strani in me vztrajno spodbujali.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm., in somentorstvom dr. Blanke-Vidan Jeras, mag. farm., spec.

Natalija Pišec

Ljubljana, junij 2016

Predsednica komisije: prof. dr. Marija Sollner Dolenc

Član komisije: doc. dr. Jurij Trontelj

## KAZALO

<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	I
<b>SEZNAM KRATIC .....</b>	IV
<b>KAZALO SLIK .....</b>	V
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	VI
<b>KAZALO GRAFOV .....</b>	VII
<b>POVZETEK.....</b>	VIII
<b>ABSTRACT .....</b>	IX
<b>1. UVOD .....</b>	1
<b>1.1. ZGODOVINA .....</b>	1
<b>1.2. ANTIGENI HLA .....</b>	2
<b>1.2.1. ZGRADBA ANTIGENOV HLA.....</b>	2
<b>1.2.2. FUNKCIJA.....</b>	3
<b>1.3. IMUNSKI MEHANIZMI VPLETENI V ZAVRNITEV ALOGENSKEGA PRESADKA .....</b>	4
<b>1.3.1. PREPOZNAVANJE ALOGENSKIH TKIVNIH ANTIGENOV.....</b>	4
<b>1.3.2. FAZA SENZIBILIZACIJE .....</b>	5
<b>1.3.3. EFEKTORSKA FAZA .....</b>	5
<b>1.4. OBLIKE ZAVRAČANJA PRESADKA .....</b>	6
<b>1.4.1. HIPERAKUTNA ZAVRNITEV.....</b>	6
<b>1.4.2. AKUTNA ZAVRNITEV .....</b>	6
<b>1.4.3. KRONIČNA ZAVRNITEV .....</b>	6
<b>1.5. PROTITELESA PROTI MOLEKULAM HLA.....</b>	7
<b>1.5.1. DOLOČANJE PROTITELES PROTI MOLEKULAM HLA Z MIKROLIMFOCITOTOKSIČNIM TESTOM.....</b>	7
<b>1.5.1.1.Mikrolimfocitotoksični test (CDC) .....</b>	7
<b>1.5.1.2.Presejalni test CDC .....</b>	9
<b>1.5.1.3.Navzkrižni preizkus pred presaditvijo ledvice .....</b>	9
<b>1.5.2. DOLOČANJE PROTITELES PROTI MOLEKULAM HLA S TESTI NA TRDNIH NOSILCIH .....</b>	10
<b>1.5.2.1.Tehnologija xMAP Luminex® .....</b>	10

<b>1.5.2.2.</b> Navzkrižni preizkus s testom Donor Specific Antibody – metoda Luminex® (test LXM) .....	11
<b>1.5.2.3.</b> Določitev specifičnosti protiteles anti-HLA s testom LabScreen Single Antigen metoda Luminex® (test LSA) .....	12
<b>1.6. CENTER ZA TIPIZACIJO TKIV</b> .....	12
<b>1.7. EVROTRANSPLANT</b> .....	12
<b>1.8. OCENJEVANJE FUNKCIJE PREŽIVETJA PRESADKA</b> .....	13
<b>1.8.1.</b> KAPLAN – MEIERJEVA METODA .....	13
<b>1.8.2.</b> COXOV REGRESIJSKI MODEL.....	13
<b>1.8.3.</b> PRIMERJAVA KRIVULJ PREŽIVETJA S TESTOM LOG RANK .....	13
<b>1.8.4.</b> FISHERJEV NATANČNI TEST VERJETNOSTI.....	14
<b>2. NAMEN DELA</b> .....	15
<b>3. MATERIALI IN METODE</b> .....	16
<b>3.1. SERUMSKI VZORCI</b> .....	16
<b>3.1.1.</b> NAVZKRIŽNI PREIZKUS S TESTOM DONOR SPECIFIC ANTIBODY – METODA LUMINEX® (TEST LXM) .....	16
<b>3.1.2.</b> DOLOČITEV SPECIFIČNOSTI PROTITELES ANTI-HLA S TESTOM LABSCREEN SINGLE ANTIGEN – METODA LUMINEX® (TEST LSA) .....	16
<b>3.2. MATERIAL</b> .....	17
<b>3.3. NAVZKRIŽNI PREIZKUS LUMINEX® (LXM)</b> .....	17
<b>3.3.1.</b> PRINCIP NAVZKRIŽNEGA PREIZKUSA S TESTOM DONOR SPECIFIC ANTIBODY – METODA LUMINEX® (TEST LXM) .....	17
<b>3.3.2.</b> REAGENTI.....	17
<b>3.3.3.</b> RAČUNALNIŠKI PROGRAM ZA OBDELAVO PODATKOV .....	18
<b>3.3.4.</b> POSTOPEK.....	18
<b>3.3.4.1.</b> Priprava lizata.....	18
<b>3.3.4.2.</b> Izvedba testa .....	18
<b>3.3.4.3.</b> Meritve .....	20
<b>3.3.5.</b> OBDELAVA REZULTATOV .....	20
<b>3.4. DOLOČANJE SPECIFIČNOSTI PROTITELES PROTI MOLEKULAM HLA S TESTOM LABSCREEN SINGLE ANTIGEN (LSA)</b> .....	21
<b>3.4.1.</b> PRINCIP TESTA LABSCREEN SINGLE ANTIGEN ZA DOLOČITEV SPECIFIČNOSTI PROTITELES ANTI-HLA – METODA LUMINEX® (TEST LSA) .....	21

<b>3.4.2. REAGENTI.....</b>	21
<b>3.4.3. RAČUNALNIŠKI PROGRAM ZA OBDELAVO PODATKOV .....</b>	21
<b>3.4.4. POSTOPEK.....</b>	21
<b>3.4.4.1.Izvedba testa .....</b>	21
<b>3.4.4.2.Meritve .....</b>	22
<b>3.4.5. OBDELAVA REZULTATOV .....</b>	23
<b>3.5.DOLOČITEV TKIVNE (NE)SKLADNOSTI MED PREJEMNIKI IN DAROVALCI LEDVIC.....</b>	23
<b>3.6.OCENA DELOVANJA PRESAJENIH LEDVIC.....</b>	23
<b>3.7.STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV .....</b>	24
<b>4. REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	25
<b>4.1.REZULTATI NAVZKRIŽNEGA PREIZKUSA LUMINEX® (LXM) .....</b>	25
<b>4.2.REZULTATI TESTIRANJA SPECIFIČNOSTI PROTITLES HLA (TEST LSA)</b> .....	30
<b>4.3.STATISTIČNA OBDELAVA .....</b>	33
<b>4.3.1. PRIMERJAVA REZULTATOV TESTOV LXM IN LSA S KLINIČNIMI PODATKI .....</b>	35
<b>4.3.2. KAPLAN MEIER-JEVE KRIVULJE PREŽIVETJA PRESADKA BREZ ZAVRNITVENIH REAKCIJ .....</b>	39
<b>5. SKLEP .....</b>	43
<b>6. LITERATURA .....</b>	44

## **SEZNAM KRATIC**

HLA – humani levkocitni antigeni (angl. Human Leucocyte Antigens)

CDC – od komplementa odvisna citotoksična reakcija (angl. Complement Dependent Cytotoxicity )

APC – antigene predstavljoče celice

TCR – T-celični receptor

T<sub>H</sub> – CD4<sup>+</sup> celice T pomagalke

DC – dendritične celice

DTH – reakcije zapoznjele preobčutljivosti

CTL – CD8<sup>+</sup> citotoksični limfociti T

IL-2 – interlevkin-2

IFN- $\gamma$  – interferon gama

IFN- $\beta$  – interferon beta

PBMC – mononuklearne celice iz periferne krvi (angl. Peripheral Blood Mononuclear Cells)

PRA – pozitivne reakcije s celicami panela (angl. Panel Reacting Antibodies)

DTT – ditiotreitol (angl. Dithiothreitol)

PE – fikoeritrin

SA – streptavidin

LXM – navzkrižni preizkus z metodo Luminex®

LSA – test LABScreen Single Antigen

CTT – Center za tipizacijo tkiv

EFI – Evropska federacija za imunogenetiko

DSA – za darovalčeve antigene HLA specifična protitelesa (angl. Donor Specific Antibodies)

MFI – povprečna vrednost intenzitete fluorescence (angl. Mean Fluorescence Intensity)

OGF – ocena glomerularnega pretoka

## KAZALO SLIK

**Slika 1:** Zgradba molekul HLA razredov I in II.

**Slika 2:** Načini prepoznavanja aloantigenov pri zavrnitvi presadka.

**Slika 3:** Princip limfocitotoksičnega testa.

**Slika 4:** Limfociti v limfocitotoksičnem testu (CDC) pod invertnim svetlobnim mikroskopom, po barvanju z barvilm eozin-Y (100-kratna povečava).

**Slika 5:** Delovanje ditiotreitola (DTT).

**Slika 6:** Mikrokroglice, ki jih uporablja tehnologija xMAP.

**Slika 7:** Shematski prikaz čitalca v prirejenem pretočnem citometru.

## KAZALO PREGLEDNIC

**Preglednica I:** Rezultati navzkrižnih preizkusov izvedenih z metodo Luminex (LXM).

**Preglednica II:** Rezultati testiranja specifičnosti prisotnih protiteles s testom LSA.

**Preglednica III:** Primerjava rezultatov testov LXM in LSA ter izračun verjetnosti Fisherjevega natančnega testa .

**Preglednica IV:** Značilnost statistične povezave med pozitivnimi rezultati testov LXM in LSA s kliničnimi podatki o zavrnitvah presadka.

**Preglednica V:** Prisotnost za darovalca specifičnih protiteles proti antigenom HLA I. razreda, določenih s testom LXM v povezavi z zavrnitvami presadkov.

**Preglednica VI:** Prisotnost za darovalca specifičnih protiteles proti antigenom HLA I. razreda, določenih s testom LXM, v povezavi z zavrnitvami presadkov.

**Preglednica VII:** Prisotnost za darovalca specifičnih protiteles proti antigenom HLA I. razreda, določenih s testom LSA, v povezavi z zavrnitvami presadkov.

**Preglednica VIII:** Prisotnost za darovalca specifičnih protiteles proti antigenom HLA I. razreda, določenih s testom LSA, v povezavi z zavrnitvami presadkov.

**Preglednica IX:** Prisotnost za darovalca specifičnih protiteles proti antigenom HLA II. razreda, določenih s testom LXM, v povezavi z zavrnitvami presadkov.

**Preglednica X:** Prisotnost za darovalca specifičnih protiteles proti antigenom HLA II. razreda, določenih s testom LXM, v povezavi z zavrnitvami presadkov.

**Preglednica XI:** Prisotnost za darovalca specifičnih protiteles proti antigenom HLA II. razreda, določenih s testom LSA, v povezavi z zavrnitvami presadkov.

**Preglednica XII:** Prisotnost za darovalca specifičnih protiteles proti antigenom HLA II. razreda, določenih s testom LSA, v povezavi z zavrnitvami presadkov.

**Preglednica XIII:** Korelacija med rezultati testov LXM in LSA.

## KAZALO GRAFOV

**Graf 1:** Preživetje brez zavnitve v odvisnosti od izida testa LXM HLA I. razreda s serumi odvzetimi pred presaditvijo.

**Graf 2:** Preživetje brez zavnitve v odvisnosti od izida testa LXM HLA II. razreda s serumi odvzetimi pred presaditvijo.

**Graf 3:** Preživetje brez zavnitve v odvisnosti od prisotnosti za darovalca specifičnih protiteles proti antigenom HLA I. razreda dokazanih s testom LSA.

**Graf 4:** Preživetje brez zavnitve v odvisnosti od prisotnosti za darovalca specifičnih protiteles proti antigenom HLA II. razreda dokazanih s testom LSA.

## **POVZETEK**

Pri presaditvi ledvic igrajo izjemno pomembno vlogo v prejemniku predhodno prisotna protitelesa anti-HLA, ki lahko povzročijo zavrnitev presadka. Pri 100 bolnikih s presajenimi ledvicami v UKC Ljubljana med leti 2000 in 2014 smo, z novo občutljivo multipleksno metodo Luminex®, ki temelji na pretočni citometriji, izvedli navzkrižne preskuse med njihovimi serumskimi vzorci, odvzetimi tik pred presaditvijo ter lizati mononuklearnih krvnih celic nesorodnih umrlih darovalcev, od katerih so prejeli organe. Izvedli smo tudi dodatno testiranje s testom LABScreen Single Antigen (LSA) za določitev specifičnosti v serumih bolnikov prisotnih protiteles anti-HLA. Poleg tega smo opredelili za darovalčeve antigene HLA specifična protitelesa DSA za vsak par bolnik/prejemnik – darovalec. Rezultate smo primerjali s kliničnimi podatki o preživetju in zavrnitvenih epizodah presajenih ledvic. Prisotnost protiteles, usmerjenih proti antigenom HLA I. in II. razreda darovalcev ledvic, ki smo jih določili v serumskih vzorcih bolnikov z navzkrižnim preizkusom z metodo Luminex® (test LXM), ni bila povezana s povečanim tveganjem za pojav zavrnitvenih reakcij in odpovedi presadkov. Primerjava obeh testov, v našem laboratoriju predhodno validiranega LSA in LXM, je razkrila, da z njima pridobimo različne informacije o prisotnosti bolnikovih specifičnih protiteles usmerjenih proti antigenom HLA darovalca. S statistično analizo podatkov smo dokazali vpliv prejemnikovih, za darovalca specifičnih, protiteles, določenih s testom LSA, na preživetje presadka. Statistično značilnost smo potrdili za protitelesa proti antigenom HLA II. razreda, kar kaže na njihov klinični pomen.

**Ključne besede:** protitelesa, humani levkocitni antigeni (HLA), metoda Luminex®, preživetje presadka

## **ABSTRACT**

Pre-existing HLA antibodies of graft recipients recognizing HLA antigens of donors play an important role in kidney transplantation, potentially leading to graft rejection. We performed crossmatches of sera of 100 patients who underwent kidney transplantation between 2000 and 2006, that were drawn just prior to transplantation, with lysates of mononuclear cells obtained from corresponding donors, using a new sensible multiplex flow citometry based Luminex® method. Additionally we used LABScreen Single Antigen test (LSA) to detect and specify HLA antibodies present in patients' sera and checked each patient for her/his donor specific anti-HLA antibodies. The results were compared with clinical data of kidney graft survival and rejection episodes. We found no correlation between the presence of antibodies directed against donor class I and II HLA antigens, that were detected with the Luminex® crossmatch test (LXM), and higher risk of rejection episodes and graft failure. By comparing results of both tests, the LSA that has been previously validated in our laboratory, and the LMX, we showed that they provide different information about the presence of donor specific anti-HLA antibodies in patients sera. Statistical analysis of data showed the influence of donor specific antibodies, determined by the LSA test, on graft survival. Statistical significance was observed in case of anti-class II HLA antibodies, showing their clinical relevance.

Keywords: human leukocyte antigens (HLA), antibodies, Luminex® method, graft survival

# **1. UVOD**

Pri dokončni odpovedi nekaterih organov, kot so ledvica, srce, jetra, pljuča, se je kot način zdravljenja uveljavilo presajanje organov in sicer predvsem od mrtvih darovalcev, pri ledvici pa lahko tudi od živih, večinoma sorodnih oseb. Pri teh posegih pa naletimo na imunske obrambne mehanizme, ki lahko povzročijo resne zaplete in odpoved presajenih organov zaradi zavrnitve.

## **1.1. ZGODOVINA**

Prve poskuse presajanja tkiv in organov so izvedli na živalih v začetku prejšnjega stoletja. Carrel je presajal ledvice z enega psa na drugega, vendar so presadki že po nekaj dneh prenehali delovati. Sredi 40-tih je Gorer s presajanjem tumorjev na miših ugotovil, da je imunski odziv na presajeno rakavo tkivo odvisen od antigenov, ki jih ima darovalec, prejemnik pa ne, in da je z njegovo zavrnitvijo običajno povezan tudi pojav izoaglutininov. Te so dokazali z aglutinacijo in drugimi metodami. Snell je skupino genov, ki določajo uspešnost presajanja tumorjev, poimenoval histokompatibilnostni geni. Gorer in Snell sta v nadaljnih poskusih z disociiranimi tumorji dokazala ne le obstoj aglutinirajočih temveč tudi citotoksičnih in zaščitnih protiteles in opisala humoralni mehanizem uničenja alogenskega presadka. V istem obdobju je Medawar, ki je preučeval histologijo alogenskih presadkov kože, opisal tudi potek celičnega imunskega odziva na presajeno tkivo. Nadaljni poskusi, večinoma s kožnimi presadki, so bili namenjeni preučevanju celičnega imunskega odziva, protitelesa pa so bila nekaj časa sekundarnega pomena. Gorer in Boyse sta nato dokazala, da so tako kot tumorske, na delovanje citotoksičnih protiteles zelo občutljive tudi normalne celice, še posebej v prisotnosti komplementa (1).

V 50-ih letih prejšnjega stoletja so trije znanstveniki skoraj istočasno in neodvisno drug od drugega odkrili protitelesa, ki so aglutinirala levkocite drugih oseb. Histokompatibilnostne antogene pri človeku so zato poimenovali Human Leucocyte Antigens (HLA). Jean Dausset, ki je za to odkritje prejel Nobelovo nagrado, je v krvi bolnikov, ki so prejeli veliko število transfuzij, dokazal aloprotitelesa, ki so zlepljala levkocite večine drugih oseb. Jon van Rood in Rose Payne pa sta s testiranjem serumov žensk, ki so večkrat rodile, na levkocitih prostovoljcev dokazala prisotnost protiteles z različnimi vzorci reakcij, za katera se je kasneje izkazalo, da so protitelesa anti-HLA-Bw4 in anti-HLA-Bw6 (2). V raziskovanje

histokompatibilnostnega kompleksa se je vključilo še več raziskovalcev, ki so se vsakih nekaj let sestali na mednarodnih delavnicah, kjer so si izmenjevali izkušnje, vzorce reakcij in primerjali rezultate testov. Standardizacijo testiranja je omogočila vpeljava mikrolimfocitotoksičnega testa, ki je od komplementa odvisna citotoksična reakcija oz. angl. Complement Dependent Cytotoxicity (CDC), pri kateri uporabimo za test samo 1 mikroliter seruma. Ta test je v uporabi še danes (3).

V 60-tih letih prejšnjega stoletja so ugotovili, da hiperakutno zavrnitev ledvice povzročijo protitelesa prisotna pred presaditvijo in da tovrstna zavrnitev ni posledica infiltracije limfocitov v tkivo presadka. Ta uničajoča oblika takojšnje zavrnitve ledvice je nastopila v roku nekaj minut po spojivti žil presadka s prejemnikovimi in je bila vedno povezana s predhodno alosenzibilizacijo ali z neskladnostjo krvne skupine (prisotnost naravnih protiteles). Dane Kismeyer-Nielson in sodelavci so nazorno prikazali ta fenomen pri dveh bolnicah, ki sta pred presaditvijo ledvice imeli veliko protiteles anti-HLA zaradi večkratnih porodov in prejetih transfuzij polne krvi. Williams in sodelavci pa so nato predvidevali, da bi hiperakutna zavrnitev presadka lahko bila povezana s protitelesi proti antigenom HLA in da bi se temu lahko izognili z izvedbo navzkrižnega preizkusa med darovalcem in prejemnikom pred presaditvijo (1).

## 1.2. ANTIGENI HLA

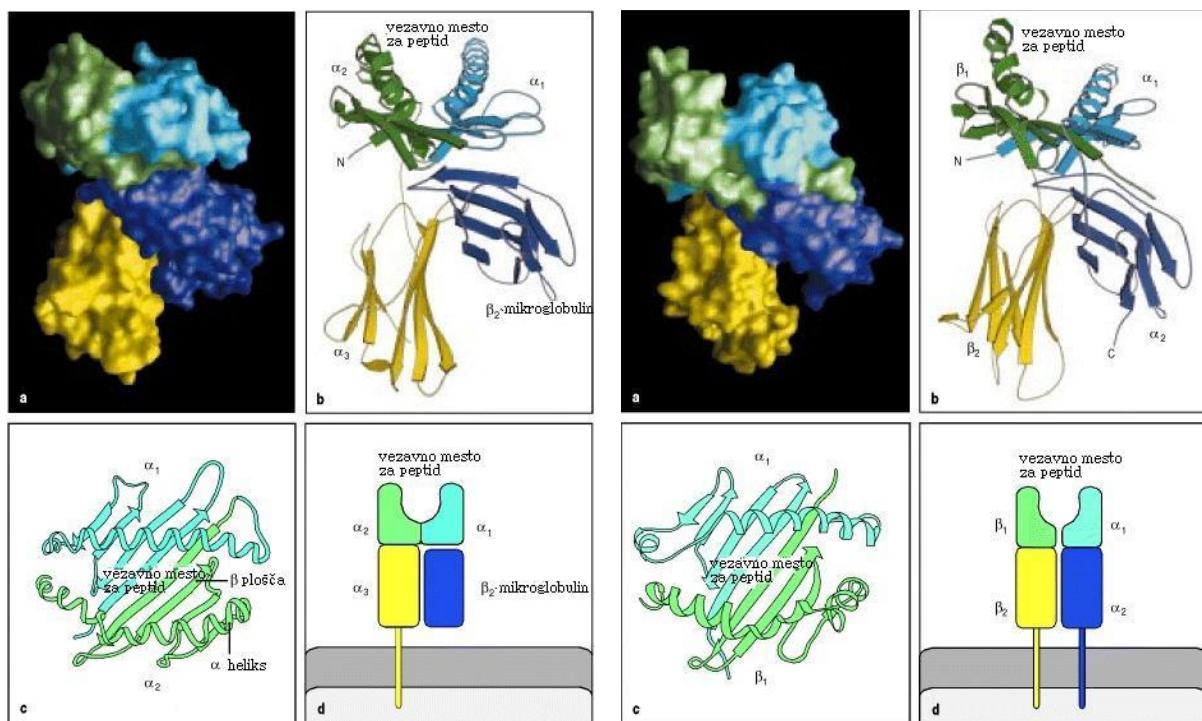
Glavno vlogo pri prepoznavanju lastnega in tujega imajo v človeškem imunskemu sistemu tkivni antigeni HLA. To so transmembranski glikoproteini. Kodirajo jih geni poglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa, ki ležijo na krajšem kraku 6. kromosoma in so izraženi kodominantno. Njihova naloga je predstavljanje antigenskih peptidov celičnim receptorjem, izraženim na limfocitih T, kar v končni fazi privede do uničenja tujkov.

Ločimo dva razreda molekul HLA, ki se razlikujeta tako v zgradbi kot funkciji.

### 1.2.1. ZGRADBA ANTIGENOV HLA

Molekulo HLA I. razreda sestavlja težka transmembranska polipeptidna veriga  $\alpha$  in z njo nekovalentno povezani  $\beta 2$ -mikroglobulin, ki vpliva na izražanje molekule na površini celice. Predstavljanje peptidov omogočata domeni  $\alpha 1$  in  $\alpha 2$ , ki tvorita nišo za vezavo peptida (Slika 1) (4).

Molekula HLA II. razreda je zgrajena iz dveh nekovalentno povezanih transmembranskih polipeptidnih verig  $\alpha$  in  $\beta$ , nišo za vezavo peptida pa sestavlja domeni  $\alpha_1$  in  $\beta_1$  (Slika 1) (5). Sistem antigenov HLA je izredno polimorfen, kar pomeni, da obstajajo številne različice teh molekul znotraj populacije. Večina polimorfizma je ravno v področju niše, kar vpliva na vezavo peptida. Posamezniki smo tako bolj ali manj uspešno sposobni predstaviti določen peptid v imunskem sistemu, zaradi česar smo se tudi bolj ali manj sposobni braniti pred posameznimi nalezljivimi boleznimi. Ravno te inter-individualne razlike pa so tudi vzrok, da so antigeni HLA pomembno vpleteni v zavrnitev presadka (4, 5).



**Slika 1:** Zgradba molekul HLA razredov I (levo) in II (desno); prirejeno po (4).

Legenda:

- a. računalniški grafični prikaz molekule
- b. shematski prikaz 3D strukture
- c. shematski prikaz strukture vezavnega mesta za peptid (vezavna niša)
- d. shematski prikaz molekule

### 1.2.2. FUNKCIJA

- molekule I. razreda (lokusi A, B in C) vežejo in predstavljajo antigenske peptide nastale v celici (virusne ali lastne) celicam T, ki na svoji površini izražajo molekule CD8 (citotoksični limfociti T),

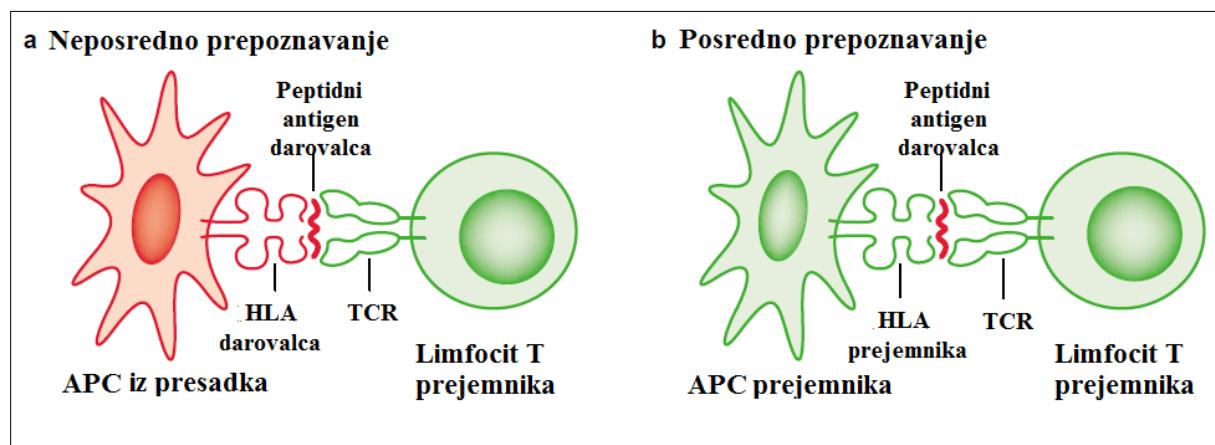
- molekule II. razreda (lokusi DR, DQ, DP) pa vežejo in predstavljajo peptide, ki so nastali z razgradnjo bakterij, celicam T, ki na svoji površini izražajo molekule CD4 (celice T pomagalke)

Medtem ko so molekule HLA I. razreda normalno izražene na površini vseh celic z jedrom in trombocitih, pa so molekule HLA II. razreda prisotne le na specializiranih antigenih predstavljaljajočih celicah (APC), med katere sodijo mieloidne dendritične celice, aktivirani makrofagi in limfociti B (6).

### 1.3. IMUNSKI MEHANIZMI VPLETENI V ZAVRNITEV ALOGENSKEGA PRESADKA

#### 1.3.1. PREPOZNAVANJE ALOGENSKIH TKIVNIH ANTIGENOV

Prepoznavanje aloantigenov HLA poteka posredno in neposredno (Slika 2) (7).



**Slika 2:** Načini prepoznavanja aloantigenov pri zavrnitvi presadka. Legenda: a. neposredno prepoznavanje, b. posredno prepoznavanje. Okrajšave: APC – antigeni predstavljaljajoče celice, TCR – T-celični receptor; pritejeno po (7).

Pri posrednem prepoznavanju tkivni antigeni, ki jih vnesemo v prejemnika s presadkom, vstopijo v antigeni predstavljaljajoče celice (APC), v njih se razgradijo v peptidne fragmente, ki jih prejemnikovi antigeni HLA II. razreda predstavijo  $CD4^+$  limfocitom T (tako kot tiste bakterijskega izvora). Nekateri proteini ledvičnega presadka pa se razgradijo v peptide v citosolu in ti lahko vstopijo v endoplazmatski retikulum, kjer se vežejo na molekule HLA I. razreda (tako kot tisti virusnega izvora) (4, 5, 8).

Prejemnikovi limfociti T lahko prepoznaajo alogenske molekule HLA darovalca tudi neposredno, skupaj z vezanim peptidom, in sicer na v presadku zaostalih APC darovalca,

potem ko po presaditvi prispejo v lokalne bezgavke. Temu sledi neposreden imunski napad na presadek oz. akutna zavnitev.

Zavnitev presadka je torej posledica celično posredovanega imunskega odziva na aloantigene, ki so prisotni na presadku. Osrednjo vlogo v tem procesu imajo limfociti T. Zavračanje presadka lahko razdelimo v dve fazи:

- fаза senzibilizacije – klonska namnožitev specifičnih limfocitov v odzivu na aloantigene presadka;
- efektorsko fazо – uničenje presadka.

### **1.3.2. FAZA SENZIBILIZACIJE**

Limfociti T ( $CD4^+$  in  $CD8^+$ ) prepoznaјo aloantigene presadka s pomočjo APC in se odzovejo s klonsko namnožitvijo. Imunski odziv na šibko imune tkivne antigene je običajno blag, kadar jih je več, pa lahko v kombinaciji izzovejo tudi močnejšo zavnitveno reakcijo.

Za aktivacijo  $CD4^+$  celic pomagalk ( $T_H$ ) mora priti do povezave z APC, ki poleg predstavitve aloantigenov zagotavlja tudi potrebne kostimulacijske signale. Kot APC lahko služijo različne celice v presadku (glede na tip tkiva). Najpogosteje so to dendritične celice (DC), ker se nahajajo v večini tkiv in na svoji površini konstitutivno izražajo molekule HLA II. razreda. Lahko pa tudi prejemnikove APC migrirajo v presadek in tam endocitirajo tuje aloantigene, jih predelajo in predstavijo z lastnimi molekulami HLA.

### **1.3.3. EFEKTORSKA FAZA**

V fazi aktivne zavnitve sodelujejo različni imunski mehanizmi. Običajno gre za celično posredovane mehanizme, ki vključujejo reakcije zapoznele preobčutljivosti (DTH), katerih glavni efektorji so makrofagi, ter s citotoksičnimi limfociti (CTL) povzročeno citotoksičnost. Redkeje pride do lize celic zaradi aktivacije komplementa, ki jo sprožijo protitelesa vezana nanje (od protiteles odvisna citotoksičnost - ADCC). V končni fazи limfociti T in makrofagi masovno preplavijo presadek in ga uničijo. Vnetni citokini, kot so interleukin-2 (IL-2), interferon gama (IFN- $\gamma$ ) in interferon beta (IFN- $\beta$ ), ki jih izločajo celice  $T_H$ , igrajo osrednjo vlogo v reakcijah zavnitve. Tako IL-2 stimulira klonsko namnožitev limfocitov in je ključnega pomena za nastanek efektorskih CTL. IFN- $\gamma$  ima pomembno vlogo pri DTH, saj pospeši vdor makrofagov v presadek in njihovo aktivacijo, IFN- $\beta$  pa deluje neposredno citotoksično na presajeno tkivo oz. organ. Številni citokini pospešijo zavnitev tudi tako, da izzovejo povečano izražanje molekul HLA I. ali II. razreda na celicah presadka.

## **1.4. OBLIKE ZAVRAČANJA PRESADKA**

Glede na vpletjenost mehanizma zavrnitvene reakcije ločimo humoralno in celično zavrnitev, glede na čas, v katerem pride do aloimunske reakcije, pa hiperakutno, akutno in kronično zavrnitev (8, 9).

### **1.4.1. HIPERAKUTNA ZAVRNITEV**

Nastopi v prvih 24 urah po presaditvi, lahko že v nekaj minutah. Povzroči jo prisotnost specifičnih protiteles prejemnika proti darovalčevim antigenom HLA ali krvnoskupinskim antigenom. Protitelesa se vežejo na žilni endotelij presajenega organa, aktivirajo komplement, temu pa sledi vdor nevtrofilcev v presajeni organ, hitra konstrikcija žil, žilni edem, nalaganje trombocitov, nastanek krvnih strdkov, vaskulitis in nekroza. Tovrstni zavrnitvi se lahko izognemo z upoštevanjem rezultata navzkrižnega preizkusa pred presaditvijo organa, ko soočimo celice darovalca s serumom bolnika. Kadar je reakcija pozitivna, presaditve ne izvedemo (4, 8-13).

### **1.4.2. AKUTNA ZAVRNITEV**

Pojavi se v prvih nekaj tednih po presaditvi. Zaostale darovalčeve APC, predvsem DC, neposredno aktivirajo prejemnikove limfocite T, ki nato napadejo žilni endotelij presadka. Temu lahko sledi njihova migracija skozi žilno steno in napad na parenhimske celice ledvice ter sprožitev mehanizmov reakcije zapoznele preobčutljivosti. Kot smo že omenili, so v potek DTH vpleteni predvsem makrofagi, poleg teh pa tudi nevtrofilci, eozinofilci, limfociti B in naravne celice ubijalke. Pri tem je pomembno sproščanje določenih citokinov in pa morebitne virusne okužbe, ki lahko poškodujejo tkivo (8-13).

### **1.4.3. KRONIČNA ZAVRNITEV**

Lahko nastopi mesece ali celo leta po presaditvi. Mehanizma tovrstne zavrnitve sta počasna celična in protitelesna aloreaktivnost, z najverjetnejšo perzistentnim potekom DTH, pri čemer aktivirani prejemnikovi makrofagi proizvajajo mezenhimske rastne dejavnike. K zavračanju pripomorejo tudi ishemische/reperfuzijske poškodbe tkiva, virusne okužbe in nefrotoksično delovanje zdravil, ki zavirajo imunski odziv (npr. ciklosporin). Pojavijo se vaskulopatije, glomerularna fibroza in atrofija, lahko pride tudi do zamašitve določenih žil zaradi

proliferacije celic gladkega mišičja v intimi arterij, čemur sledi progresivna izguba ledvične funkcije (8-13).

Kronično zavrnitev pripisujemo posrednemu prepoznavanju aloantigenov, ki je povezano tudi z nastankom protiteles proti molekulam HLA, izraženim na presadku.

V kolikor imata darovalec in prejemnik enake antigene HLA, sta tkivno skladna. To pa še ne pomeni, da ne bo prišlo do zavrnitvene reakcije. Poleg antigenov HLA namreč obstajajo še drugi, šibkejši ali minor tkivni antigeni, ki jih imunski sistem prejemnika lahko prepozna, ko jih v obliki peptidov vezanih na molekule HLA predstavijo prejemnikove APC. So pa te zavrnitvene reakcije blažje kot tiste vzpodbujene z aloantigeni HLA (4, 8).

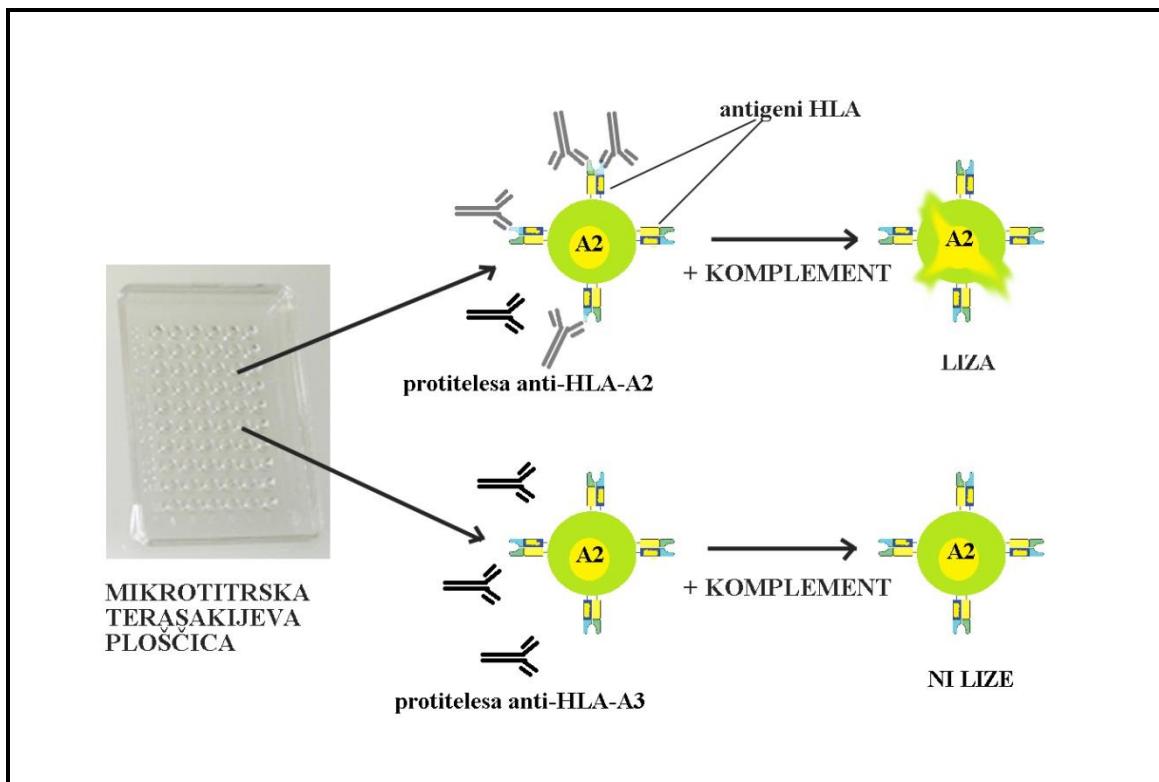
## **1.5. PROTITELESA PROTI MOLEKULAM HLA**

Do tvorbe protiteles proti molekulam HLA pride po stiku imunskega sistema s tujimi antigeni HLA, npr. po transfuziji polne krvi, po alogenski presaditvi tkiv in organov ali v nosečnosti. Protitelesa proti molekulam HLA niso škodljiva za plod, težave pa lahko povzročijo ob transfuzijah ali presaditvah (14-18). Pri bolnikih, ki čakajo na presaditev ledvice zato obvezno 4-krat letno določamo morebitno prisotnost in specifičnost protiteles proti antigenom HLA, na podlagi izsledkov tovrstnih testov pa tudi določimo tiste antigene HLA, ki jih presadek ne sme imeti. To so t.i. nesprejemljivi oz. prepovedani antigeni HLA (25-27).

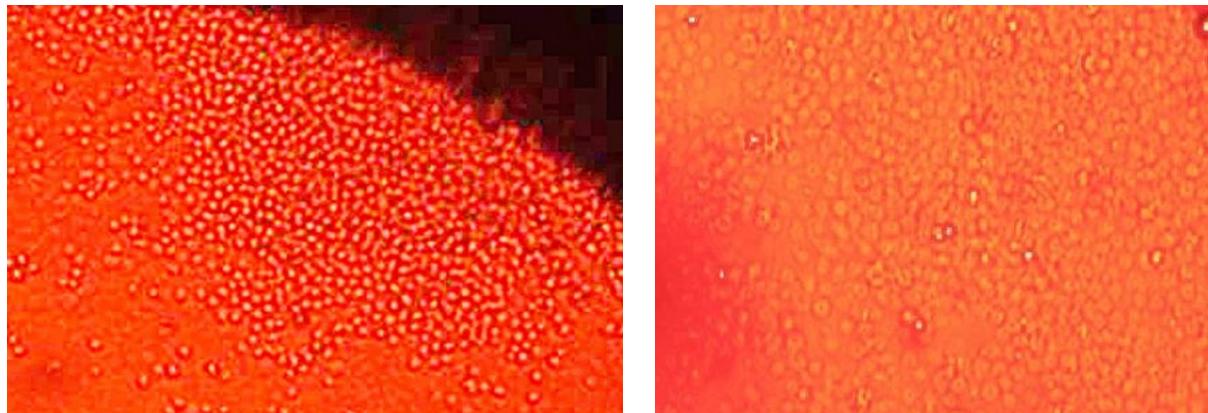
### **1.5.1. DOLOČANJE PROTITELES PROTI MOLEKULAM HLA Z MIKROLIMFOCITOTOKSIČNIM TESTOM**

#### **1.5.1.1. Mikrolimfocitotoksični test (CDC)**

Mikrolimfocitotoksični test temelji na od komplementa odvisni citotoksični reakciji (angl. Complement Dependent Cytotoxicity – CDC) (Slika 3). Izvajamo jo v mikrotitrski Terasakijevi ploščici. V testu pomešamo 1 µL seruma bolnika z 1 µL mešanice mononuklearnih celic iz periferne krvi (PBMC) izbrane osebe oz. darovalca organa. PBMC pridobimo iz polne krvi s centrifugiranjem na gostotnem gradientu (1.077 g/mL). Po inkubaciji dodamo kunčji serum kot vir komplementa, ponovno inkubiramo in dodamo barvilo eozin-Y (3). V serumu prisotna protitelesa anti-HLA, specifična za antigene izražene na celicah, se vežejo nanje, z nastalim imunskim kompleksom pa se aktivira komplement in tvori litične komplekse, ki poškodujejo celične membrane.



**Slika 3:** Princip limfocitotoksičnega testa (CDC). V serumu prisotna protitelesa anti-HLA, specifična za antogene izražene na celicah, se vežejo nanje, z nastalimi imunskimi kompleksi pa se aktivira komplement in tvori litične komplekse, ki poškodujejo celične membrane. Če v serumu prisotna protitelesa niso specifična za antogene HLA, izražene na celicah, se ne vežejo nanje in do lize ne pride.



a. Negativna reakcija

b. Pozitivna reakcija

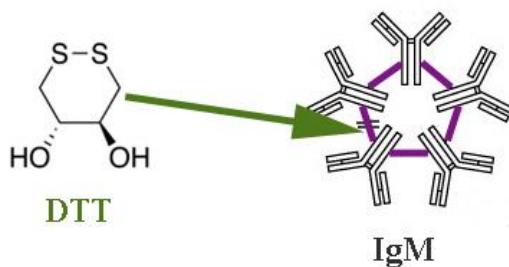
**Slika 4:** Limfociti v limfocitotoksičnem testu (CDC) pod invertnim svetlobnim mikroskopom po barvanju z barvilo eozin-Y (100-kratna povečava). a. negativna reakcija - barvilo ne vdre v celice, ker celična membrana ni poškodovana. b. pozitivna reakcija - barvilo prodre skozi luknjice v membranah celic, ki se zato povečajo in obarvajo.

Dodano barvilo nato prodre skozi poškodovane membrane v celice, kar opazujemo pod invertnim svetlobnim mikroskopom (Slika 4). Celice, na katere se protitelesa ne vežejo, ostanejo po dodatku barvila neobarvane. Rezultat reakcije je določitev deleža obarvanih celic, kar podamo z ocenami od 1 do 8, pri čemer ocena 1 predstavlja negativno reakcijo.

### 1.5.1.2. Presejalni test CDC

V presejalnem testu izvedemo teste CDC med serumi bolnikov in svežimi ali odmrznjenimi PBMC 45-55 oseb (celični panel), katerih tip HLA določimo predhodno. Rezultate podamo kot odstotke pozitivnih reakcij s celicami panela (% PRA). Specifičnost protiteles v posameznem serumu določimo s primerjavo tipov HLA celic s pozitivno reakcijo, pri čemer iščemo ponavljajoče se skupne antigene. Ker v testu uporabljamo PBMC pridobljene iz periferne krvi, med katerimi je delež limfocitov B, ki imajo poleg antigenov HLA I. razreda izražene tudi antigene HLA II. razreda, majhen (10-15 %), lahko na ta način določimo samo protitelesa proti molekulam HLA I. razreda.

Vzporedno izvedemo tudi enake teste z dodatkom ditiotreitolu (DTT), s katerim reduciramo in tako pretrgamo disulfidne vezi med podenotami pentamernih protiteles IgM (Slika 5), s čimer jim onemogočimo vezavo in citotoksično delovanje. Na ta način, v primeru pozitivnega rezultata, ločimo, ali gre za protitelesa razredov IgG ali IgM.



**Slika 5:** Delovanje ditiotreitolu (DTT). DTT reducira in tako pretrga disulfidne vezi med podenotami pentamernih protiteles IgM, ki s tem izgubijo zmožnost vezave in citotoksičnega delovanja.

### 1.5.1.3. Navzkrižni preizkus pred presaditvijo ledvice

V ta namen uporabimo mikrolimfocitotoksični test (CDC). V testu pomešamo po 1  $\mu\text{L}$  seruma bolnika z 1  $\mu\text{L}$  suspenzije iz bezgavke ali vranice s centrifugiranjem na gostotnem gradientu pridobljenih mononuklearnih celic izbranega darovalca organa. Pri senzibiliziranih bolnikih uporabimo tudi serume iz prejšnjih obdobij, v katerih smo s presejalnimi testi določili najvišje

vrednosti PRA. Vzporedno izvedemo tudi navzkrižni preizkus z dodatkom ditiotreitolom (DTT), da v primeru pozitivnega rezultata ločimo, ali gre za protitelesa razreda IgG ali IgM. Pozitiven rezultat navzkrižnega preizkusa s katerimkoli od bolnikovih serumov v testu predstavlja zadržek za presaditev.

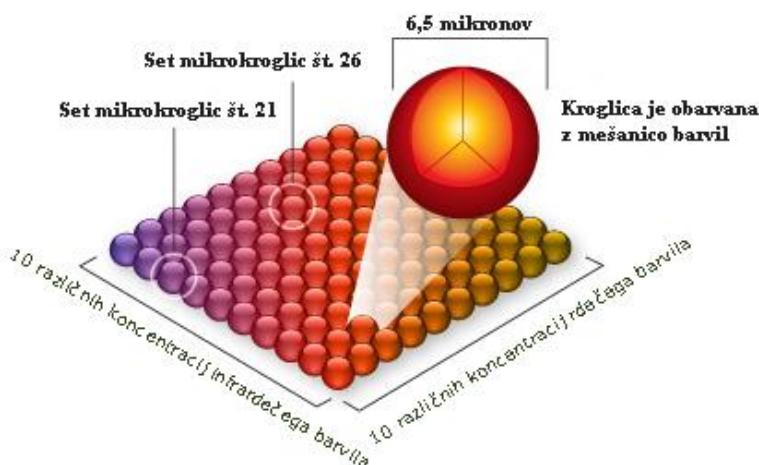
V kolikor dokažemo prisotnost protiteles razreda IgM, izvedemo tudi avtologni navzkrižni preizkus, s katerim preverimo reaktivnost protiteles v bolnikovem serumu z njegovimi lastnimi celicami. V primeru dokaza prisotnosti avtolognih protiteles, pozitiven navzkrižni preizkus ne predstavlja zadržka za presaditev ledvice.

### **1.5.2. DOLOČANJE PROTITELES PROTI MOLEKULAM HLA S TESTI NA TRDNIH NOSILCIH**

Z razvojem različnih tehnologij se na tržišču pojavljajo novi testi, za katere proizvajalci obljudljajo veliko občutljivost in uporabnost. Ena od novejših je tehnologija Luminex® xMAP.

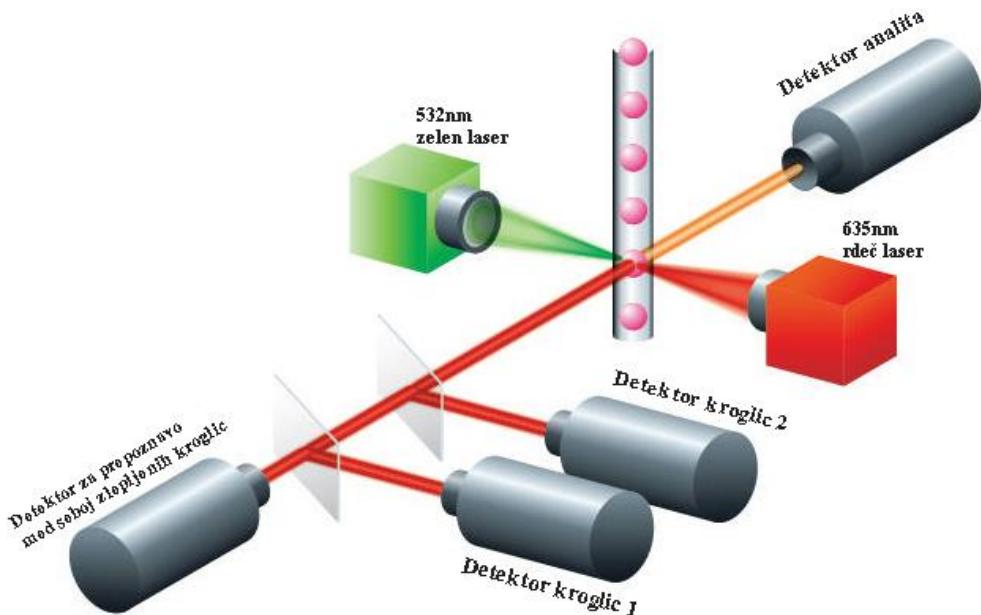
#### **1.5.2.1. Tehnologija xMAP Luminex®**

Tehnologija xMAP temelji na uporabi polistirenskih kroglic velikosti 5,6 µm, ki jih napolnijo z rdečimi in infrardečimi fluorescenčnimi barvili. Pri tem različne skupine kroglic obarvajo z različnimi razmerji obeh vrst barvil, s čimer lahko pripravijo do 100 različnih setov mikrokroglic z edinstvenimi barvnimi spektri (Slika 5), ki jih prepoznamo in razlikujemo s pomočjo posebnega pretočnega citometra. Z vezavo različnih monoklonskih protiteles na različne mikrokroglice lahko izvedemo do 100 testov v enem reakcijskem volumnu (19).



**Slika 6:** Mikrokroglice, ki jih uporablja tehnologija xMAP; prirejeno po (19).

Kroglice se s pomočjo toka nosilne tekočine (angl. sheath fluid) v kapilari razporedijo ena za drugo in vstopijo v pretočno celico, kjer jih laserska svetloba ekscitira, čitalec pa zazna vrsto in jakost emitirane svetlobe in s tem jakost testnega signala vsake posamezne kroglice. Štirje detektorji poskrbijo za zaznavo jakosti fluorescence testiranega analita, identifikacijo kroglic (1-100), pa tudi za razlikovanje med enojnimi kroglicami in takimi, ki se držijo skupaj (Slika 7).



**Slika 7:** Shematski prikaz čitalca signalov v prirejenem pretočnem citometru; prirejeno po (19).

V testih za določanje protiteles z metodo Luminex® imamo na fluorescenčno označene polistirenske kroglice vezane antigene HLA. Razred vezanih protiteles lahko določimo glede na uporabljena sekundarna protitelesa. Običajno določamo samo protitelesa anti-HLA razreda IgG. Nekaj teh testov že uporabljamo za določanje protiteles anti-HLA pri bolnikih, ki se vključujejo oz. so že vključeni v čakalno listo Evrotransplanta (20-25).

### 1.5.2.2. Navzkrižni preizkus s testom Donor Specific Antibody – metoda Luminex® (test LXM)

Limfocite darovalca, ki jih hranimo v tekočem dušiku, odtajamo in liziramo. Lizat dodamo mešanici dveh skupin različno fluorescirajočih polistirenskih kroglic, na katere se ulovijo s celic sproščeni antigeni HLA I. in II razreda. Kroglicam s pritrjenimi antigeni HLA dodamo serum bolnika oz. prejemnika, dodamo raztopino sekundarnih protiteles anti-human-IgG, označenih z imunofluorescenčnim barvilm. Slednja se vežejo na protitelesa bolnika, pritrjena

na antigene HLA na kroglicah, tako da lahko izmerimo fluorescenco s prirejenim pretočnim citometrom (26).

#### **1.5.2.3. Določitev specifičnosti protiteles anti-HLA s testom LabScreen Single Antigen – metoda Luminex® (test LSA)**

Skupine kroglic s točno določenimi pritrjenimi antigeni HLA inkubiramo s serumom bolnika. Nato dodamo sekundarno protitelo anti-human-IgG, označeno z imunofluorescenčnim barvilom za detekcijo protiteles bolnika, vezanih na antigene na kroglicah, ter izmerimo fluorescenco s prirejenim pretočnim citometrom (27).

### **1.6. CENTER ZA TIPIZACIJO TKIV**

Center za tipizacijo tkiv (CTT) je del Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino. V laboratorijih CTT opravljamo teste tkivne skladnosti za potrebe nacionalnih programov presajanja organov in tkiv. V primeru umrlih možnih darovalcev organov je čas zelo dragocen, zato zagotavljamo celoletno 24-urno dosegljivost laboratorijskih delavcev, ki po obvestilu koordinatorja pridejo na delo, da opravijo tipizacijo HLA potencialnega umrlega darovalca in/ali navzkrižne preizkuse – v ta namen imamo organizirano službo 24-urne stalne pripravljenosti vse dni v letu. CTT je akreditiran pri Evropski federaciji za imunogenetiko (EFI), kar je pogoj za sodelovanje naše države v Evrotransplantu.

### **1.7. EVROTRANSPLANT**

Od leta 2000 je Slovenija vključena v mednarodno neprofitno organizacijo za dodeljevanje organov Evrotransplant, ki ima svoj sedež v Leidnu na Nizozemskem. Od tam koordinirajo dodeljevanje organov umrlih darovalcev bolnikom iz Avstrije, Belgije, Nemčije, Nizozemske, Luksemburga, Slovenije, Hrvaške in Madžarske. Za vključitev v Evrotransplant je bila potrebna meddržavna pogodba, ki zagotavlja nadzorovano in transparentno dodeljevanje organov po vnaprej določenih kriterijih. V primeru presaditve ledvice je eden najpomembnejših tkivna skladnost v antigenih HLA-A, HLA-B in HLA-DR (25, 28, 29).

## **1.8. OCENJEVANJE FUNKCIJE PREŽIVETJA PRESADKA**

Kadar je izid, ki nas zanima, doba preživetja ali pa čas do kakšnega drugega pomembnega dogodka, uporabimo oceno funkcije preživetja.

Cilji analize preživetja so:

- Ocena porazdelitvene funkcije oz. funkcije preživetja.
- Primerjava porazdelitev oz. funkcij preživetja.
- Iskanje povezave med izidom in časom preživetja ter napovednimi dejavniki.

Vrednost funkcije preživetja v danem času je delež oseb, ki so še žive v tem času. V večini študij se dogaja, da nekaterih časov ne poznamo, vemo le, da so bolniki preživeli neko obdobje, končnega dogodka pa še ni bilo. Temu pojavu rečemo krvnenje ali cenzoriranje (angl. censoring) (30).

Za krvnenje obstajajo različni razlogi, npr.:

- oseb ne moremo več spremljati (angl. lost to follow up)
- smrt zaradi drugih razlogov
- konec študije (najbolj pogosto).

Zaradi krvnenja potrebujemo posebne statistične metode, saj z okrnjenimi podatki ne moremo izračunati aritmetične sredine ali narisati ustreznega histograma.

### **1.8.1. KAPLAN - MEIERJEVA METODA**

Časovno lestvico najprej razdelimo na intervale tako, da so časi dogodkov ali krvnitev na mejah intervalov. Potem izračunamo pogojne verjetnosti preživetja v vsakem časovnem intervalu in iz njih izračunamo verjetnost preživetja za poljubno obdobje in sicer z množenjem pogojnih verjetnosti do danega trenutka.

### **1.8.2. COXOV REGRESIJSKI MODEL**

To je model sorazmernega tveganja, s katerim testiramo vplive različnih dejavnikov na preživetje.

### **1.8.3. PRIMERJAVA KRIVULJ PREŽIVETJA S TESTOM LOG RANK**

Statistični test za preskušanje ničelne hipoteze, da vzorca prihajata iz iste populacije, temelji na običajni predpostavki, in sicer: če velja ničelna hipoteza, pričakujemo, da bo število dogodkov v posamezni skupini sorazmerno številu enot v skupini. Na tej osnovi izračunamo

pričakovano število dogodkov v vsaki skupini in ga primerjamo z ugotovljenim številom dogodkov.

#### **1.8.4. FISHERJEV NATANČNI TEST VERJETNOSTI**

Statistična metoda za primerjanje dveh neodvisnih spremenljivk, ki temelji na kontingenčnih tabelah 2x2, je uporabna za manjše skupine vzorcev (do 100). Test je veljaven tudi v primeru, da so pričakovane frekvence v posameznih poljih manjše od 5.

## **2. NAMEN DELA**

Z uporabo tehnologije Luminex®, ki je bolj občutljiva za določanje prisotnosti in specifičnosti protiteles anti-HLA kot standardni limfocitotoksični test (CDC), bomo določili uporabno in napovedno vrednost tovrstnih testov, in sicer v povezavi s kliničnimi podatki in podatki o zavrnitvenih reakcijah po presaditvah ledvic. S testom Luminex SA (LSA) bomo določili tudi specifičnosti protiteles anti-HLA, prisotnih v serumih bolnikov, in preverili, če so protitelesa v serumih s pozitivnim rezultatom v navzkrižnih preizkusih Luminex® (LXM) specifična za antigene HLA darovalca. Predvsem nas bodo zanimala protitelesa usmerjena proti antigenom HLA II. razreda, ki jih v klasičnem testu CDC ne moremo zaznati.

### **3. MATERIALI IN METODE**

#### **3.1. SERUMSKI VZORCI:**

Uporabili smo serume bolnikov, ki so jim presadili ledvice slovenskih ali tujih darovalcev (dodelitev v okviru Evrotransplanta) v obdobju od leta 2000 do 2006. Odvzeti so bili tik pred presaditvijo in nato še 3-6 tednov po presaditvi. Ob presaditvi so bili bolniki stari od 18 do 66 let (povprečna starost  $45 \pm 11$  let). Iz podatkov o tipu HLA darovalcev in bolnikov smo lahko ugotovili stopnje skladnosti oz. določili s prejemniki neskladne antigene HLA prisotne na presajenih ledvicah. Serumski vzorci bolnikov, odvzeti v času njihovega vodenja na čakalni listi, so bili v času pred presaditvijo vključeni v redne presejalne teste za določitev prisotnosti in specifičnosti protiteles anti-HLA s testom CDC. Bolnikom smo določili tudi morebitne nesprejemljive neskladnosti v antigenih HLA. Za vse bolnike smo pred presaditvijo opravili navzkrižni preizkus CDC z darovalcem ledvice, ki je bil v vseh primerih negativen.

Povprečni čas spremeljanja bolnikov je bil 11 let in pol. Klinične podatke o delovanju presajenih ledvic in morebitnih zavrnitvenih reakcijah so nam posredovali nefrologi iz Centra za transplantacijo ledvic UKC Ljubljana. Za oceno delovanja ledvic smo uporabili vrednosti kreatinina izmerjene 1 in 5 let po presaditvi ter oceno glomerularnega pretoka (OGF). Slednjo smo izračunali s pomočjo aplikacije na internetni strani [http://www.ditera.eu/povezave/medicinski\\_izracuni/2010110823194727/](http://www.ditera.eu/povezave/medicinski_izracuni/2010110823194727/) (31).

##### **3.1.1. NAVZKRIŽNI PREIZKUS S TESTOM DONOR SPECIFIC ANTIBODY – METODA LUMINEX® (TEST LXM)**

Testirali smo serume 106 bolnikov. V kolikor so nekateri med njimi imeli kakšno zavrnitveno epizodo in smo zato dobili še dodatne serumske vzorce, smo testirali tudi te. V kolikor je prišlo do odpovedi presadka, smo v test vključili tudi tisti serum bolnika, ki so ga odvzeli za testiranje pri ponovni vključitvi na čakalni spisek. Bolnike, za katere nismo imeli imeli na razpolago zamrznjenih limfocitov darovalcev njihovih ledvic, pa smo izločili.

##### **3.1.2. DOLOČITEV SPECIFIČNOSTI PROTITELES ANTI-HLA S TESTOM LABSCREEN SINGLE ANTIGEN – METODA LUMINEX® (TEST LSA)**

Serumi 103 bolnikov, ki so jim transplantirali ledvico v obdobju od leta 2000 do 2006, odvzeti tik pred presaditvijo ledvice, in serum enega, odvzet po presaditvi (seruma odvzetega pred presaditvijo nismo imeli).

### **3.2. MATERIAL:**

- aparat LABSCAN™ 100
- polavtomatske pipete s pripadajočimi nastavki za enkratno uporabo: 10-100 µL, 0,5-10 µL, 100-1000 µL (Biohit, Sartorius, Nemčija)
- plastične banjice 50 ml (Costar, Corning Incorporated, ZDA)
- šestkanalna polavtomatska pipeta 100-1000 µL (Biohit, Sartorius, Nemčija)
- stresalnik (Ika, Nemčija)
- mikroplošče s 96 vdolbinami à 0,3 mL za izvedbo testa (Whatman, GE Healthcare Life Science, ZDA)
- pokrivna aluminijasta folija (Thermo Scientific, ZDA)

### **3.3. NAVZKRIŽNI PREIZKUS LUMINEX® (LXM):**

#### **3.3.1. PRINCIP NAVZKRIŽNEGA PREIZKUSA S TESTOM DONOR SPECIFIC ANTIBODY – METODA LUMINEX® (LXM)**

Limfocite darovalca, ki smo jih hranili v tekočem dušiku, smo odtajali in lizirali. Lizat smo dodali mešanici dveh skupin različno fluorescirajočih polistirenских kroglic, na katere se ulovijo antigeni HLA I. (skupina 1) in II. razreda (skupina 2) iz lizata. Kroglicam s pritrjenimi antigeni HLA smo nato dodali serum bolnika, nato pa še raztopino sekundarnih protiteles anti-human-IgG, označenih z imunofluorescenčnim barvilm za detekcijo protiteles bolnika, ki so se vezala na antigene HLA na kroglicah. Temu sledijo meritve intenzitete fluorescence s pritejenim pretočnim citometrom.

#### **3.3.2. REAGENTI:**

- Testni kit Lifecodes Donor Specific Antibody (Immucor, prej Gen-probe, ZDA), v katerem so:
  - pufer za spiranje
  - kroglice, na katere se pripnejo antigeni HLA
  - koncentrirani konjugat (LMCJS)
  - koncentriran konjugat streptavidina s fikoeritrinom (SA-PE) (LMSA)
  - medij za razredčenje vzorca (LMSD)
  - reagent za kontrolo lizata (LMLCR)
  - pufer za lizo limfocitov (LMLLB)

- pozitivna kontrola (LMPC)
- negativna kontrola (MLLNB)
- izsušeni kontrolni limfociti (MDLC)
- medij za celice McCoy's (Sigma, Nemčija)

### **3.3.3. RAČUNALNIŠKI PROGRAM ZA OBDELAVO PODATKOV**

- MatchIt (Immucor, prej Gen-probe, ZDA)

### **3.3.4. POSTOPEK**

#### **3.3.4.1. Priprava lizata:**

Suspenzijo odmrznjenih limfocitov smo vrteli 10 minut pri 1.500 obratih/ minuto (380 g), odstranili supernatant in dodali z vodo 10-krat razredčen koncentrat lizirajočega medija ( $100 \mu\text{L}$  razredčenega medija za  $30 \times 10^6$  limfocitov). Suspenzijo smo mešali in občasno stresali na stresalniku, vse dokler celice niso popolnoma razpadle. Lizat smo centrifugirali 5 minut na 1.500g, da so se ostanki celic posedli na dno epruvete. Tekočino nad usedlino smo s pipeto previdno prenesli v čisto epruvetko. V kolikor lizata nismo nameravali uporabiti v 4 urah, smo ga zamrznili na  $-70^\circ\text{C}$  in ga nato tik pred uporabo odmrznili.

#### **3.3.4.2. Izvedba testa:**

Medij za spiranje in redčenje celičnih vzorcev smo ogreli na sobno temperaturo. Določili in v planu plošče na papirju smo označili razpored vzorcev in kontrol, s katerimi smo preverili uspešnost celične lize in pritrditve antigenov HLA na kroglice.

Nato smo lizate tako kot serumske vzorce centrifugirali 5 minut na 8.000-12.000 obratov/ minuto (12.000-14.000 g). Epruveto z mikrokroglicami smo najprej centrifugirali, da so se posedle tudi tiste, ki bi bile morda pritrjene na pokrov, in jo nato previdno stresali na stresalniku tako, da smo kroglice enakomerno suspendirali. V posebej označenih epruvetah smo pomešali potrebni količini celičnih lizatov in suspenzije kroglic, ki smo jih izračunali glede na število predvidenih testov (za vsak posamezen test po  $8 \mu\text{L}$  lizata in  $5 \mu\text{L}$  suspenzije kroglic). Mešanice smo nato 20-30 sekund previdno stresali na stresalniku, da smo jih dobro premešali in inkubirali 30 minut v temi na sobni temperaturi. Vsakih 10 minut smo vsebino pretresli na stresalniku. Med inkubacijo smo pripravili reagent za kontrolo lizata (LCR), in sicer tako, da smo za en test zmešali  $5 \mu\text{L}$  LCR s  $45 \mu\text{L}$  medija za redčenje vzorcev, ter ga do uporabe shranili v temi.

Po končani inkubaciji smo v mešanice dodali po 42 µL medija za spiranje za vsak posamezen test in jih 30 sekund stresali na stresalniku. Po 55 µL razredčene mešanice kroglic in lizatov smo nato prenesli v vdolbinice mikrotitrsko plošče, ki smo jih predhodno določili za posamezne teste in to vpisali v načrte plošč. V vdolbinice smo dodali po 100 µL medija za spiranje, plošče pokrili s samolepilno pokrivno aluminijasto folijo, jih pretresli na stresalniku in centrifugirali 5 minut pri 2.800 obratih/minuto (1288 g), nato pa previdno odstranili pokrivno folijo. Supernatante smo iz vdolbinic odstranili z enim samim sunkovitim obratom ploščice (flick off), nato pa jo z vdolbinicami obrnjenimi navzdol popivnali s papirnato brisačo. V vdolbinice smo dodali po 250 µL medija za spiranje, ploščico pokrili s samolepilno pokrivno aluminijasto folijo, jo pretresli na stresalniku (do 1.000 tresljajev/minuto), centrifugirali 5 minut pri 2.800 obratih/minuto (1288 g) in previdno odstranili pokrivno folijo in na enak način kot prej odstranili supernatant (flick off). Postopek spiranja s po 250 µL medija za spiranje na vdolbinico smo ponovili še dvakrat.

Po zadnjem spiranju smo v vdolbinice, ki smo jih določili za teste kontrole lizata, dodali razredčen reagent LCR. V tiste, namenjene testiranju vzorcev, pa smo dodali po 38 µL medija za redčenje vzorcev in po 12 µL serumov bolnikov. Mikrotitrsko plošče smo nato pokrili s samolepilno aluminijasto folijo in jih 30 minut stresali na stresalniku (600 tresljajev/minuto) pri sobni temperaturi. Po končanem stresanju smo v vdolbinice dodali po 100 µL medija za spiranje, mikrotitrsko plošče pokrili s samolepilno pokrivno aluminijasto folijo, jih pretresli na stresalniku (do 1.000 tresljajev/minuto) in nato centrifugirali 5 minut pri 2.800 obratih/minuto (1288 g). Previdno smo odstranili pokrivno folijo in supernatant odstranili tako, kot smo opisali v prejšnjem odstavku. V vdolbinice smo dodali po 250 µL medija za spiranje, mikrotitrsko plošče pokrili s samolepilno pokrivno aluminijasto folijo, jih pretresli na stresalniku (ne premočno) in centrifugirali 5 minut pri 2.800 obratih/minuto (1288 g). Nato smo previdno odstranili pokrivno folijo in na enak način kot prej odstranili supernatant. Postopek spiranja s po 250 µL medija za spiranje na vdolbinico smo ponovili še dvakrat.

Med inkubacijo oz. med centrifugiranjem smo pripravili razredčeno raztopino konjugata streptavidin-fikoeritrin (SA-PE) in sicer po 5 µL LMSA in 45 µL medija za spiranje, za vsak test kontrole lizata. Za vse ostale teste smo razredčeni konjugat pripravili tako, da smo za vsak posamezen test zmešali po 5 µL LMCJS s 45 µL pufra za spiranje. Oba razredčena reagenta smo do uporabe hranili zaščitenega pred svetlobo.

Po zadnjem spiranju smo v vdolbinice, ki so bile določene za teste kontrole lizata, dodali po 50 µL razredčenega reagenta SA-PE, v tiste, namenjene testom pa po 50 µL razredčenega konjugata. Mikrotitrsko plošče smo pokrili s samolepilno pokrivno aluminijasto folijo in jih

inkubirali 30 minut na stresalniku (600 tresljajev/minuto). Nato smo odstranili pokrivno folijo in v vse vdolbinice s testi dodali po 150 µL medija za spiranje ter plošče na kratko pretresli na stresalniku (do 1.000 tresljajev/minuto). Po tem so bile plošče pripravljene za merjenje v aparatu Labscan TM, pri čemer pa smo morali meritve opraviti najkasneje v 4 urah. Neporabljene reagente smo do naslednje uporabe shranili v hladilnik.

### **3.3.4.3. Meritve:**

Meritve smo izvedli v aparatu Labscan TM 100. Aparat smo vklopili in izvedli predpisani postopek dnevnega spiranja (predpriprava), enkrat na dva tedna pa še kalibracijo aparata. Ogrevanje laserja je trajalo približno 20 minut.

Pripravili smo načrt vzorcev na vsaki mikrotitrski plošči (plan) in izbrali ustrezne teste (LXM): »new batch« (1 test) ali »new multibatch« (več različnih testov). Vpisali smo ime testa (leto, mesec, dan in ime serije brez pik), potrdili izbiro »new batch« in med ponujenimi izbrali željen test.

Vpisali smo razpored vzorcev in preverili ujemanje mest posameznih vzorcev na testni plošči ter potrdili vnos (»finish«).

Kadar smo izvedli več različnih testov, smo ponovno kliknili na »new batch«, izbrali nov test, vpisali vzorce ter preverili ujemanje mest vzorcev na testni plošči. V primeru neskladja smo uskladili računalniško shemo z načrtom testne plošče. Nato smo zaključili vnos.

Testno ploščo smo vstavili v aparat in zagnali merjenje (»run batch«, »start plate«), potek meritve pa smo lahko spremljali na ekranu (»data aquisition«).

Po končanem merjenju smo testno ploščo odstranili iz aparata, podatke pa izvezili v računalniško mapo Luminex/output, kjer so bili dostopni za nadaljno obdelavo, ki smo jo izvedli s programom MatchIT.

Nato smo izvedli postopek za dnevni izklop aparata .

### **3.3.5. OBDELAVA REZULTATOV**

Rezultate smo obdelali s programom MatchIT. Za pozitivne smo šteli poprečne vrednosti izmerjene intenzitete fluorescence (MFI), ki so bile višje od 1.000.

### **3.4. DOLOČANJE SPECIFIČNOSTI PROTITELES PROTI MOLEKULAM HLA S TESTOM LABSCREEN SINGLE ANTIGEN (LSA):**

#### **3.4.1. PRINCIP TESTA LABSCREEN SINGLE ANTIGEN ZA DOLOČITEV SPECIFIČNOSTI PROTITELES ANTI-HLA – METODA LUMINEX® (TEST LSA)**

Mikrokroglicam s pritrjenimi antigeni HLA najprej dodamo serumski vzorec bolnika, nato pa še sekundarna protitelesa anti-human-IgG, označena z imunofluorescenčnim barvilom. Slednja prepoznavajo protitelesa bolnika, ki so se vezala na antigene HLA na kroglicah, nato pa izmerimo intenziteto fluorescence s prirejenim pretočnim citometrom.

#### **3.4.2. REAGENTI:**

- testni kompleti One Lambda LabScreen SA
  - pufer za spiranje
  - mikrokroglice, na katere so pritrjeni posamezni antigeni HLA
- kozji anti-human IgG (LS-AB2) konjugiran s fikoeritrim
- negativna kontrola (človeški serum brez protiteles HLA)
- Fosfatna fiziološka raztopina PBS (Dulbecco's PBS) brez kalcija in magnezija (Lonza, Belgija)
- deionizirana voda

#### **3.4.3. RAČUNALNIŠKI PROGRAM ZA OBDELAVO PODATKOV**

- Fusion 3.3 (One Lambda, ZDA)

#### **3.4.4. POSTOPEK:**

##### **3.4.4.1. Izvedba testa:**

Vsebino epruvet z mikrokroglicami LabScreen smo pretresli na stresalniku ali premešali z večkratnim pipetiranjem gor-dol. Glede na število preiskovanih serumskih vzorcev bolnikov smo v vdolbinice prazne testne plošče nakapljali po 3 µL suspenzije kroglic in po 20 µL negativne kontrole in serumov, skladno z vnaprej pripravljenim razporedom.

Ploščo smo inkubirali 30 minut v temi na sobni temperaturi.

Vmes smo pripravili razredčeno raztopino za spiranje (wash buffer) iz 10-kratnega koncentrata, in sicer tako, da smo 1 delu koncentrata dodali 9 delov deionizirane vode. Po končani inkubaciji smo v vdolbinice mikrotitrsko plošče dodali po 150 µL raztopine za spiranje, jo pokrili s folijo in pretresli na stresalniku. Nato smo ploščo centrifugirali 5 minut pri 2.800 obratih/minuto (1288 g).

Raztopino za spiranje smo odstranili z enim samim sunkovitim gibom in obratom ploščice (flick off), potem pa dodali po 200 µL raztopine za spiranje, ploščo pokrili s folijo, jo pretresli na stresalniku in centrifugirali 5 minut pri 2.800 obratih/minuto (1288 g).

Raztopino za spiranje smo odstranili na enak način kot prvič. Celoten postopek spiranja z 200 µL raztopine za spiranje smo ponovili še enkrat.

Potem, ko smo s pufrom za spiranje razredčili 100-kratni koncentrat anti-humanih protiteles IgG konjugiranih s fikoeritrinom (99 µL pufra + 1 µL protiteles), smo v vsako vdolbinico dodali po 100 µL tega reagenta, ploščo pokrili s folijo in jo pretresli na stresalniku.

Sledila je 30 – minutna inkubacija na sobni temperaturi, nato pa centrifugiranje 5 minut pri 2.800 obratih/minuto (1288 g).

Supernatante z nevezanimi protitelesi smo odstranili z enim samim sunkovitim obratom ploščice (flick off) in spiranje s po 200 µL raztopine za spiranje, centrifugiranje in odstranitev supernatanta ponovili še dvakrat.

Nato smo v vsako vdolbinico dodali po 80 µL DPBS, ploščo pokrili s folijo in jo pretresli na stresalniku. S tem so bili vzorci pripravljeni za merjenje v aparatu Labscan TM, meritve pa smo morali opraviti v 24 urah, pri čemer smo ploščo do analize hranili v hladilniku. Pred meritvijo smo ploščo še enkrat pretresli na stresalniku.

#### **3.4.4.2. Meritve:**

Meritve smo izvedli v aparatu Labscan TM 100. Aparat smo vklopili, izvedli dnevno spiranje ter enkrat na dva tedna še kalibracijo. Ogrevanje laserja je trajalo približno 20 minut.

V računalniškem programu »Notepad« smo pripravili seznam vzorcev, pri čemer je bila na prvem mestu vedno negativna kontrola.

Izbrali smo teste (LS1A04, LS2A01) in sicer »new batch« (1 test) ali »new multibatch« (več različnih testov), v aparatu vpisali ime testa (leto, mesec, dan in ime serije brez pik) potrdili izbiro »new batch« in med ponujenimi izbrali željeni test. Vpisali smo seznam vzorcev, ga potrdili z izbiro »upload patient list«, preverili ujemanje mest posameznih vzorcev na testni plošči in nato zaključili vnos »finish«. V kolikor smo imeli več različnih testov, smo ponovno potrdili izbiro »new batch«, izbrali nov test in vstavili seznam vzorcev. Nato smo preverili

ujemanje pozicij vzorcev in v primeru neskladij ročno uskladili računalniško shemo z načrtom testne plošče ter zaključili vnos.

Testno ploščo smo vstavili v aparat in pognali merjenje (»run batch«, »start plate«), potek analize pa smo lahko spremljali na ekranu (»data aquisition«).

Po končanem merjenju smo testno ploščo odstranili iz aparata, podatke pa izvozili v računalniško mapo Luminex/output, kjer so bili dostopni za nadaljno obdelavo s programom HLA fusion. Nato smo izvedli postopek za dnevni izklop aparata.

#### **3.4.5. OBDELAVA REZULTATOV**

Rezultate smo obdelali s programom HLA fusion. Za pozitivne smo šteli vrednosti MFI, ki so bile višje od 2000.

### **3.5. DOLOČITEV TKIVNE (NE)SKLADNOSTI MED PREJEMNIKI IN DAROVALCI LEDVIC**

Za vse pare darovalec – bolnik smo pregledali in primerjali podatke o rezultatih tipizacije antigenov HLA, stopnjo tkivne skladnosti med njimi ter določili medsebojno neskladne antigene HLA. Pri bolnikih smo pred njihovo vključitvijo v čakalni spisek opravili tipizacije lokusov HLA-A, -B in -DR, enako pa tudi pri darovalcih organov. To je zadoščalo za potrebe ugotavljanja oz. usklajevanja tkivne skladnosti v okviru programa Evrotransplant. V večini primerov zato (ne)skladnosti v antigenih HLA-C in HLA-DQ nismo mogli opredeliti. Le pri tistih transplantiranih bolnikih, pri katerih smo testirali serumske vzorce, ki smo jih odvzeli po presaditvi ledvice zaradi suma na humoralno zavrnitev presadka, smo za namen dokazovanja prisotnosti protiteles proti darovalčevim neskladnim molekulam HLA izvedli tudi tipizacije antigenov HLA lokusov C in/ali DQ (tudi pri darovalcu).

### **3.6. OCENA DELOVANJA PRESAJENIH LEDVIC**

Za oceno delovanja presajenih ledvic smo uporabili vrednosti kreatinina, izmerjene med rednimi pregledi bolnikov pri nefrologu, in sicer 1 in 5 let po presaditvi ter oceno glomerularnega pretoka (OGF), ki smo ga izračunali po enačbi MDRD, ki poleg vrednosti serumskega kreatinina upošteva tudi starost, spol in raso:

$$\text{OGF} \left( \frac{\text{mL}}{\text{min}} \text{m}^2 \right) = 175 \times \left( \frac{S_{\text{Cr}}}{88,4} \right)^{-1,154} \times (\text{starost})^{-0,203} \times (0,742 \text{ za ženske}) \times (1,212 \text{ za temnopolte})$$

- $S_{\text{Cr}}$ : serumski kreatinin v  $\mu\text{mol/L}$
- starost: leta

Podatek o glomerulni filtraciji podajamo glede na standardizirano telesno površino, to je  $1,73 \text{ m}^2$ .

Vrednosti OGF smo izračunali po navodilu nefrologa, in sicer s pomočjo aplikacije, ki je na voljo na internetni strani [http://www.ditera.eu/povezave/medicinski\\_izracuni/2010110823194727/](http://www.ditera.eu/povezave/medicinski_izracuni/2010110823194727/). Nefrolog je nato iz teh podatkov ocenil delovanje ledvice za vsakega posameznega bolnika.

### 3.7. STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Korelacijo smo izračunali s statističnim paketom SPSS (opisna statistika, t-test, hi-kvadrat test, Coxova regresijska analiza, analiza preživetja po metodi Kaplan-Meier), ki je primeren za uporabo na osebnih računalnikih. Statistično obdelavo s programom SPSS (IBM, ZDA) je izvedel prof. dr. Miha Arnol, dr. med. na Centru za transplantacijo ledvic, kjer program uporablja tudi za statistično obdelavo njihovih raziskav.

Rezultate obeh testov smo primerjalno ovrednotili s Fisherjevim natančnim testom. To je metoda za primerjavo 2 neodvisnih spremenljivk, ki temelji na kontingenčnih tabelah  $2 \times 2$ , in je uporabna predvsem za manjše skupine vzorcev do 100. Za izračun smo uporabili interaktivno tabelo, dostopno na internetni strani Vassar College, ki je del učbenika »Concepts and Applications of Inferential Statistics« (32).

Formula za izračun verjetnosti ( $p$ ) po Fisherjevi natančni metodi:

$$p = \frac{P! Q! R! S!}{N!} \cdot \frac{1}{a! b! c! d!}$$

## **4. REZULTATI IN RAZPRAVA**

Izbrali smo 106 bolnikov, ki so bili ob presaditvi stari od 18 do 66 let (povprečna starost  $45 \pm 11$  let). Pri 22 od njih je v obdobju spremljanja (povprečno 11,6 let) prišlo vsaj do ene bodisi humoralne (9 primerov) ali celične (13 primerov) zavrnitvene reakcije. Zaradi premajhnega števila jih nismo mogli razdeliti glede na vrsto zavrnitvene reakcije. Pri 14 bolnikih je prišlo do odpovedi presadka, in sicer v 9 primerih zaradi zavnritev, v 1 zaradi povrnitve osnovne bolezni, v 4 pa zaradi drugih razlogov. Dvanajst bolnikov je umrlo z delajočim presadkom. Za nekatere bolnike nismo imeli na razpolago obeh serumskih vzorcev, bodisi tistega odvzetega tik pred (3 bolniki) ali pa tistega odvzetega 3-6 tednov po presaditvi ledvice (11 bolnikov). Pri primerjavi rezultatov testiranja serumskih vzorcev pred in po presaditvi nismo ugotovili bistvenih razlik, zato smo se pri nadaljnji analizi osredotočili izključno na vzorce odvzete v zadnjih 24-ih urah pred presaditvijo. Izjema je bila le ena bolnica z zavrnitveno reakcijo, pri kateri smo testirali serum odvzet po presaditvi, saj vzorca odvzetega pred presaditvijo nismo imeli. Tako smo skupaj testirali serumske vzorce 104 bolnikov.

Rezultate testa LXM smo primerjali s kliničnimi podatki o zavrnitvenih reakcijah in delovanju presajenih ledvic (vrednosti kreatinina in ocena glomerulne filtracije – OGF, in sicer po 1 in 5 letih po presaditvi ledvice, odpoved presadka). Dva bolnika sta imela odpoved presadka v prvem letu, in sicer oba zaradi ne-imunoloških vzrokov (tromboza, intersticijska fibroza), 5 pa v času med prvim in petim letom po presaditvi. Po 5 letih je tako delovalo še 93% presajenih ledvic, po 10 pa 92%, seveda ob upoštevanju preživetja bolnikov. Povprečni čas od presaditve do zavrnitve je bil 67 mesecev, mediana 61 mesecev (2 do 160 mesecev), interkvartilni razpon (25% – 75%) pa 6 do 120 mesecev.

### **4.1. REZULTATI NAVZKRIŽNEGA PREIZKUSA LUMINEX® (LXM)**

**Preglednica I:** Rezultati navzkrižnih preizkusov izvedenih z metodo Luminex® (LXM); pozitivni rezultati so označeni z 1, negativni pa z 0. Legenda: LXM – navzkrižni preizkus z metodo Luminex®, MFI – povprečna vrednost intenzitete fluorescence, tx – presaditev.

Bolnik	Datum odvzema seruma pred tx	LXM (MFI)				Datum odvzema seruma po tx	LXM (MFI)			
		HLA I (MFI)	poz/ neg	HLA II (MFI)	poz/ neg		HLA I (MFI)	poz/ neg	HLA II (MFI)	poz/ neg
B1	8.1.2000	630	0	1018	1	7.2.2000	195	0	170	0
B2						9.2.2000	211	0	220	0
B3	7.4.2000	1073	1	1148	1	11.5.2000	210	0	203	0
B4	8.4.2000	2594	1	4172	1					
B5	12.4.2000	585	0	606	0	16.5.2000	142	0	172	0
B6	13.4.2000	1547	0	1267	0	24.5.2001	1128	0	700	0
B7	14.4.2000	372	0	333	0	26.5.2000	191	0	198	0
B8	20.4.2000	432	0	1062	1	15.5.2000	297	0	1101	1
B9	23.4.2000	221	0	173	0	15.5.2001	120	0	132	0
B10	24.4.2000	223	0	120	0	17.5.2000	166	0	155	0
B11	24.4.2000	170	0	134	0	15.5.2000	201	0	129	0
B12	28.4.2000	1031	0	794	0	31.5.2000	89	0	108	0
B13	4.5.2000	225	0	185	0	29.5.2000	307	0	193	0
B14	18.5.2000	133	0	794	0	8.6.2000	111	0	477	0
B15	21.6.2000	774	0	802	0	12.7.2000	189	0	203	0
B16	24.6.2000	655	0	548	0	19.7.2000	407	0	278	0
B17	8.7.2000	511	0	849	0	2.8.2000	227	0	220	0
B18	9.7.2000	595	0	459	0	9.8.2000	242	0	161	0
B19	16.8.2000	738	0	515	0	19.9.2000	111	0	144	0
B20	23.8.2000	390	0	338	0	13.9.2000	144	0	138	0
B21	19.9.2000	1361	1	711	0	10.10.2000	500	0	467	0
B22	16.11.2000	420	0	432	0	18.12.2000	331	0	308	0
B23	20.11.2000	1119	0	530	0	16.1.2000	344	0	288	0
B24	7.12.2000	5776	1	1087	0	16.1.2001	1312	1	504	0
B25	10.1.2001	4658	1	1841	1	6.2.2001	337	0	322	0
B26	10.2.2001	2257	1	1918	1	11.4.2001	482	0	414	0
B27	27.3.2001	1453	1	1100	1	23.4.2001	579	0	459	0
B28	27.3.2001	1699	1	395	0	24.4.2001	335	0	369	0

B29	27.3.2001	1308	0	1585	0	23.4.2001	521	0	5059	1
B30	18.6.2001	1270	1	667	0	10.7.2001	526	0	214	0
B31	23.6.2001	823	0	637	0	7.8.2001	267	0	257	0
B32	23.6.2001	602	0	482	0	1.8.2001	160	0	167	0
B33	21.7.2001	1418	0	767	0	20.8.2001	1082	0	785	0
B34	7.8.2001	2376	1	3581	1	18.10.2001	616	0	453	0
B35	8.8.2001	344	0	317	0					
B36	8.8.2001	2891	0	2809	0	23.10.2001	628	0	652	0
B37	15.8.2001	1352	0	1145	0	28.9.2001	436	0	370	0
B38	18.8.2001	894	0	1318	1	25.9.2001	211	0	237	0
B39	18.8.2001	589	0	444	0	4.10.2001	227	0	578	0
B40	22.8.2001	1450	1	1671	1	6.10.2001	87	0	85	0
B41	22.8.2001	209	0	302	0	26.9.2001	370	0	483	0
B42	30.8.2001	1559	0	1233	0	23.10.2001	387	0	365	0
B43	15.10.2001	1462	1	529	0	6.11.2001	432	0	2406	1
B44	15.10.2001	276	0	291	0	13.11.2001	680	0	285	0
B45	19.10.2001	2457	1	1465	0	12.11.2001	703	0	502	0
B46	30.10.2001	1470	0	1200	0	3.12.2001	802	0	705	0
B47	31.10.2001	551	0	476	0					
B48	16.11.2001	3331	1	740	0					
B49	16.11.2001	618	0	425	0	7.2.2001	191	0	185	0
B50	17.11.2001	3612	1	2239	0					
B51	17.11.2001	1731	1	1270	1	17.12.2001	321	0	295	0
B52	13.12.2001	1620	0	1329	0	3.1.2002	1148	0	917	0
B53	18.1.2002	131	0	130	0	26.2.2002	83	0	93	0
B54	19.1.2002	322	0	3758	1	12.2.2002	181	0	2526	1
B55	19.1.2002	320	0	261	0	11.2.2001	322	0	239	0
B56	4.2.2002	632	0	567	0	6.3.2002	280	0	269	0
B57	10.2.2002	966	0	741	0	5.3.2002	596	0	3850	1
B58	10.2.2002	2279	1	2300	1	28.3.2002	227	0	209	0
B59	14.2.2002	893	0	512	0	28.3.2002	225	0	248	0
B60	10.3.2002	319	0	270	0	2.4.2002	262	0	182	0
B61	10.3.2002	1105	0	996	0	6.5.2002	287	0	311	0

B62						4.6.2002	493	0	349	0
B63	12.3.2002	1957	1	2510	1	16.4.2002	205	0	349	0
B64	16.4.2002	886	0	473	0	3.6.2002	464	0	420	0
B65	16.5.2002	2337	1	803	0	21.6.2002	607	0	314	0
B66	13.7.2002	1534	1	2605	1	10.9.2002	1046	1	1195	1
B67	16.11.2002	1104	1	965	0	16.12.2002	513	0	476	0
B68	19.12.2002	519	0	496	0					
B69	19.12.2002	1662	1	1625	1	10.1.2003	259	0	195	0
B70	21.12.2002	392	0	408	0	17.1.2003	266	0	227	0
B71	13.1.2003	961	0	726	0	10.2.2003	225	0	249	0
B72	13.1.2003	746	0	721	0	4.2.2003	435	0	376	0
B73	28.2.2003	1484	0	1030	0	2.6.2003	1060	0	860	0
B74						26.6.2003	538	0	365	0
B75	28.5.2003	261	0	251	0	19.6.2003	225	0	323	0
B76	26.6.2003	810	0	1169	1	18.7.2003	337	0	534	0
B77	29.7.2003	1060	0	928	0	2.11.2003	2158	1	7548	1
B78	30.7.2003	1168	1	1191	1	20.8.2003	288	0	312	0
B79	29.8.2003	603	0	16591	1	26.9.2003	113	0	332	0
B80	29.8.2003	325	0	503	0	16.10.2003	100	0	1994	1
B81	3.10.2003	574	0	850	0	3.11.2003	195	0	578	0
B82	4.11.2003	1062	1	415	0	25.11.2003	396	0	314	0
B83	4.11.2003	806	0	1006	1					
B84	8.11.2003	1171	1	1158	1	1.12.2003	417	0	291	0
B85	6.4.2004	283	0	460	0	18.5.2004	190	0	198	0
B86	8.5.2004	821	0	982	0	18.6.2004	1177	1	14568	1
B87	28.5.2004	778	0	511	0	24.6.2004	166	0	168	0
B88	30.5.2004	231	0	185	0	23.6.2004	199	0	196	0
B89	1.6.2004	623	0	501	0	29.6.2004	567	0	497	0
B90	9.6.2004	681	0	459	0	21.7.2004	715	0	500	0
B91	9.6.2004	246	0	178	0	11.8.2004	433	0	398	0
B92	25.6.2004	224	0	390	0	13.8.2004	128	0	313	0
B93	15.7.2004	531	0	1310	1	19.8.2004	264	0	723	0
B94	16.7.2004	457	0	404	0	6.8.2004	333	0	351	0

B95	16.7.2004	456	0	464	0	11.8.2004	1092	0	1589	1
B96	12.8.2004	429	0	471	0	6.9.2004	249	0	403	0
B97	16.10.2004	1372	1	3104	1	8.11.2004	311	0	468	0
B98	27.12.2004	781	0	591	0					
B99	3.3.2005	596	0	471	0					
B100	4.1.2006	1222	1	661	0	1.2.2006	142	0	157	0
B101	8.3.2006	931	0	2129	1	5.4.2006	510	0	2132	1
B102	12.4.2006	1744	1	667	0					
B103	12.4.2006	819	0	576	0	12.5.2006	539	0	348	0
B104	22.4.2006	1421	1	2220	1					
B105	7.12.2006	445	0	327	0	29.10.2006	146	0	160	0
B106	7.12.2006	320	0	276	0	29.12.2006	110	0	120	0

Kot pozitivne smo obravnavali vrednosti MFI, ki so bile več kot 1000. Pri visokih vrednostih MFI, izmerjenih na kroglicah negativne kontrole, pa smo kot pozitivne upoštevali vse tiste rezultate, kjer so bile vrednosti MFI za 1000 enot večje od njih. S serumskimi vzorci, odvzetimi pred presaditvijo, smo pri 29 bolnikih dobili pozitiven navzkrižni preizkus (XM) z antigeni HLA I. razreda, pri 25 pa z antigeni HLA II. razreda, med vsemi pa je bilo 16 takih s pozitivnim rezultatom z antigeni obeh razredov. S serumskimi vzorci, odvzetimi po presaditvi, pa smo dobili pozitiven rezultat XM z antigeni HLA I. razreda pri 4 bolnikih, z antigeni HLA II. razreda pa pri 11, med njimi pa so bili tudi 3 s pozitivnim rezultatom z antigeni HLA obeh razredov.

Iz izsledkov testa LXM nismo mogli razbrati, ali gre pri pozitivnih rezultatih dejansko za protitelesa, ki so specifična za darovalčeve antigene HLA, zato smo se odločili, da serumske vzorce, odvzete pred presaditvijo, še dodatno testiramo s testom LSA za določitev specifičnosti protiteles, obenem pa izračunamo še korelacijo dobljenih rezultatov z napovedjo zavrnitvenih reakcij. Test smo že predhodno validirali in ga v Centru za tipizacijo tkiv uporabljamo že vrsto let. Tudi rezultate testa LSA smo primerjali s kliničnimi podatki o zavrnitvenih reakcijah in delovanju presajenih ledvic (vrednosti kreatinina in ocena glomerulne filtracije – OGF; in sicer 1 in 5 let po presaditvi ledvice; odpoved presadka) ter izračunali medsebojno korelacijo omenjenih parametrov s statističnim paketom SPSS (opisna

statistika, t-test, hi-kvadrat test, Coxova regresijska analiza in analiza preživetja po metodi Kaplan-Meier).

## 4.2. REZULTATI TESTIRANJA SPECIFIČNOSTI PROTITELES HLA (TEST LSA)

**Preglednica II:** Rezultati testiranja specifičnosti prisotnih protiteles s testom LSA. Navedena so neskladja v antigenih HLA med darovalcem in bolnikom; z rdečo barvo so označeni tisti antigeni HLA, zoper katere smo dokazali prisotna specifična protitelesa, navedene pa so tudi MFI le-teh. Antigeni HLA-C in HLA-DQ v oklepajih so bili določeni samo z metodo CDC, ne pa tudi na nivoju DNK (istorične tipizacije, tipizacije opravljene v tujih centrih). Antigeni HLA-A in HLA-B, prikazani v oklepajih pa pomenijo, da ima darovalec različno podskupino istega antiga HLA (usklajevanje v za lokuse HLA-A in HLA-B okviru Evrotransplanta poteka na nivoju nadskupin).

Legenda: LSA – LabScreen Single Antigen

MFI – povprečna vrednost intenzitete fluorescence

Bolnik	Datum presaditve	Neskladja v HLA I	Neskladja v HLA II	LSA I (MFI)	LSA II (MFI)
B1	8.1.2000	A31,B7	DR9		
B3	7.4.2000	A2,A68, <b>B8</b>	DR11	3.340	
B4	8.4.2000	<b>A28,B38</b>	<b>DR8</b>	5.400	9.750
B5	12.4.2000	<b>A31</b> ,B60	DR4,DR13	7.330	
B6	13.4.2000	A30,A68,B7,B56	DR15		
B7	14.4.2000	<b>A25</b> ,B14	DR3	2.710	
B8	20.4.2000	<b>A33</b> ,B62	DR4,DR12, DQA1*03:01	7.200	3.780
B9	23.4.2000	A3,A32,B18			
B10	24.4.2000	<b>A2,A33</b> ,B14	<b>DR5</b>	3.700	
B11	24.4.2000	B52			
B12	28.4.2000				
B13	4.5.2000	A31,B8	DR4		
B14	18.5.2000	A3,B44,B38,(Cw5)	DR4		10.280
B15	21.6.2000	A3,A26,B44			
B16	24.6.2000	B7, <b>B35</b> ,Cw4	DQ5	3.750	
B17	8.7.2000	<b>A23</b> ,B7,(Cw4,Cw7)	DR7	7.440	

B18	9.7.2000	A3,A23,B7,Cw7	DR15		
B19	16.8.2000	A33,B44	DR1,DR13		
B20	23.8.2000	A1,A32,(Cw2)	DR16		
B21	19.9.2000	A3,B7	DR15		
B22	16.11.2000	A2,A23,B44,B21,Cw5			
B23	20.11.2000	A24,A32, <b>B15</b>		9.180	
B24	7.12.2000	A26,B44	DR11	13.010	
B25	10.1.2001	A2,B27	DR1, <b>DQ5</b>		10.560
B26	10.2.2001	<b>A2</b> ,A26,B38	DR13	11.980	
B27	27.3.2001	A24, <b>B44</b>	DR11	1.690	
B28	27.3.2001	<b>A24</b> ,A68, <b>B44</b>	DR11	6.810	
B29	27.3.2001	A30			
B30	18.6.2001	A32,A68,B27	DR3		
B31	23.6.2001	<b>A1</b> ,B8,B44		7.640	
B32	23.6.2001	A2,B44			
B33	21.7.2001	B7	DR9,(DQ5,9)		
B34	7.8.2001	A24	DR1		
B35	8.8.2001	A24,B44	DR11,DQ3		1.000
B36	8.8.2001	A24	DR11		
B37	15.8.2001	A2,A24,B44			
B38	18.8.2001	A33	DR8		
B39	18.8.2001	A2,A33,B38	DR8		
B40	22.8.2001	A1,A2,B35,(B57),Cw4			
B41	22.8.2001	A2,B18	DR14		
B42	30.8.2001	B60,Cw3	DR9		
B43	15.10.2001				
B44	15.10.2001				
B45	19.10.2001	A2,A23,B44,B60,Cw3, Cw4			
B46	30.10.2001	(A30),B53,Cw4	DR13		
B47	31.10.2001	A30,B53,Cw2,Cw4	DR13	1.200	
B48	16.11.2001	B27,B50,Cw5			
B49	16.11.2001	A1,B27,(B50),Cw5,Cw6	DR7		
B50	17.11.2001	B18,B35,Cw4			

B51	17.11.2001	A24,B35,Cw4,Cw7			
B52	13.12.2001	B41			
B53	18.1.2002	A2,B62	DR13		
B54	19.1.2002	A1	DR13		
B55	19.1.2002	A3			
B56	4.2.2002				
B57	10.2.2002		DR4, DQA1*03:01, DQ8		1.670
B58	10.2.2002	A2,B38,B51,Cw2,Cw7			
B59	14.2.2002		DR14		
B60	10.3.2002	A2,A11,B7,B60			
B61	10.3.2002	A25,B18	DR1	3.340	
B63	12.3.2002	A24,B44,Cw2	DR14		
B64	16.4.2002	(B57)	DQ7		3.550
B65	16.5.2002	<b>A1</b> ,A3,B7	DR15	15.800	
B66	13.7.2002	A1,A11,B18	DR11		
B67	16.11.2002	A68,B27,Cw1	DR4		
B68	19.12.2002	A24,B44,Cw15	DR15		
B69	19.12.2002	A24,B44,(Cw5)	DR15		
B70	21.12.2002	B51	DR13		
B71	13.1.2003	A3,B7,B18	DR7	1.500	
B72	13.1.2003	A3,B7,(Cw5,7)	DR7		
B73	28.2.2003	A30,B18,Cw5	(DQ2,8)		
B74	28.5.2003	A26,A33,B38	DR4		
B75	26.6.2003	A33,B8	(DQ1,2)		
B76	26.6.2003	A26,A33,B8	DR3,DQ2,DQ3		
B77	29.7.2003	A2,B39,B47,(Cw6)	DR7	3.350	
B78	30.7.2003	A2,A3,B39,B47,Cw6	DR7		
B79	29.8.2003	A3, <b>B60</b> ,Cw3	<b>DR13</b>	21.780	22.800
B80	29.8.2003	<b>A2</b> ,B60,Cw3	DR13	1.610	
B81	3.10.2003	B8,Cw6	DR1		
B82	4.11.2003	B44,B49		19.930	
B83	4.11.2003	B49,Cw7	DR3		
B84	8.11.2003	A2,B51	DR12		

B85	6.4.2004	A11,B60,Cw3	<b>DR8</b>		9.900
B86	8.5.2004	A1,A3,B27,Cw5	DR15		
B87	28.5.2004	A3,B35			
B88	30.5.2004	A24			
B89	1.6.2004	A3,B57	DR1		
B90	9.6.2004	A2, <b>B35</b> ,Cw4	DR12	1.260	
B91	9.6.2004	A3,B35	DR12		
B92	25.6.2004	A11,B35	DR15		
B93	15.7.2004	A26,A33,B41			
B94	16.7.2004	<b>A1</b> ,A26,B7,B38,Cw7		8.240	
B95	16.7.2004	A1,A26,B38	DR13		
B96	12.8.2004	A2,A29,B8			
B97	16.10.2004	A2,B57,Cw5	DR11, (DQ3)		
B98	27.12.2004	A30,B13	DR9		
B99	3.3.2005	A24,B60	DR15		
B100	4.1.2006	A33,B39	DR1		
B101	8.3.2006	A24,Cw12			
B102	12.4.2006	<b>A1</b> , <b>A2</b> ,B56	DR1	3.850	
B103	12.4.2006	A1,B56	DR1		
B104	22.4.2006	<b>A25</b> ,B60	DR8	1.340	
B105	7.12.2006	A11			
B106	7.12.2006	B7,B35,Cw4,Cw7			

Pri 20 bolnikih smo dokazali prisotnost protiteles specifičnih za darovalčeve antigene HLA I. razreda, pri 9 pa za HLA II. razreda, med vsemi temi pa so imeli 4 bolniki protitelesa specifična za antigene obeh razredov.

#### 4.3. STATISTIČNA OBDELAVA

Kot smo že omenili, smo korelacijo primerjanih parametrov izračunali s statističnim paketom SPSS. Statistično obdelavo z SPSS so izvedli v Centru za transplantacijo ledvic.

Primerjavo rezultatov obeh testov smo statistično ovrednotili s Fisherjevim natančnim testom v Centru za tipizacijo tkiv.

**Preglednica III:** Primerjava rezultatov testov LXM in LSA ter izračun verjetnosti Fisherjevega natančnega testa .

Legenda: LXM – navzkrižni preizkus z metodo Luminex®

LSA – LabScreen Single Antigen

MFI – povprečna vrednost intenzitete fluorescence

DSA – za darovalčeve antigene HLA specifična protitelesa

NS – ni statistično značilno ( $p>0,005$ )

S – je statistično značilno ( $p<0,005$ )

	Zavnitev N	Brez zavnitve N	Zavnitev vs Brez zavnitve Vrednost p, Fisherjev natančni test	Statistična značilnost
Poz. LXM I.razred	7	22	0.414	NS
Poz. LXM II.razred	8	17	0.109	NS
Poz. LXM I+II	5	11	0.191	NS
Poz. LSA HLA I (DSA)	9	17	0.052	NS
Poz. LSA HLA II (DSA)	8	1	0.00001	S
Poz. LSA HLA I+II (DSA)	3	0	0.008	S

**Preglednica IV:** Značilnost statistične povezave med pozitivnimi rezultati testov LXM in LSA s kliničnimi podatki o zavnitvah presadka.

Legenda: LXM – navzkrižni preizkus z metodo Luminex®

LSA – LabScreen Single Antigen

MFI – povprečna vrednost intenzitete fluorescence

DSA – za darovalčeve antigene HLA specifična protitelesa

NS – ni statistično značilno ( $p>0,005$ )

S – je statistično značilno ( $p<0,005$ )

	Zavnitev N	Brez zavnitve N	Zavnitev vs Brez zavnitve Vrednost p, Fisherjev natančni test	Statistična značilnost
Poz. LXM+LSA (DSA) HLA I	5	5	0.01	S
Poz. LXM+LSA (DSA) HLA II	3	1	0.01	S
Poz. LXM+LSA (DSA) HLA I + II	1	0	0.17	NS

### 4.3.1. PRIMERJAVA REZULTATOV TESTOV LXM IN LSA S KLINIČNIMI PODATKI

Število preiskovanih bolnikov: 104

Število zavnitev presadkov: 22

Parameter: zavnitev presadka\*      Pozitivni testi LXM z antigeni HLA I. razreda – serumski vzorci odvzeti pred presaditvami ledvic

**Preglednica V:** Prisotnost za darovalca specifičnih protiteles proti antigenom HLA I. razreda, določenih s testom LXM v povezavi z zavnitvami presadkov.

		Pozitivni testi LXM z antigeni HLA I. razreda, pred presaditvijo		Skupaj
		Ne	Da	
Zavnitev presadka	Ne	Število bolnikov Delež	60 73,2%	82 100%
	Da	Število bolnikov Delež	15 68,2%	22 100%
Skupaj		Število bolnikov Delež	75 72,1%	104 100%

Parameter: tip zavnitve\*      Pozitivni testi LXM z antigeni HLA I. razreda – serumski vzorci odvzeti pred presaditvami ledvic

**Preglednica VI:** Prisotnost za darovalca specifičnih protiteles proti antigenom HLA I. razreda, določenih s testom LXM, v povezavi z zavnitvami presadkov.

		Pozitivni testi LXM z antigeni HLA I. razreda, pred presaditvijo		Skupaj
		Ne	Da	
Tip zavnitve	Celično posredovana	Število bolnikov Delež	9 69,2%	13 100%
	Posredovana s protitelesi	Število bolnikov Delež	6 66,7%	9 100%
Skupaj		Število bolnikov Delež	15 68,2%	22 100%

Parameter: zavnitev presadka\*

**Preglednica VII:** Prisotnost za darovalca specifičnih protiteles proti antigenom HLA I. razreda, določenih s testom LSA, v povezavi z zavnitvami presadkov.

			Za darovalca specifična protitelesa proti antigenom HLA I. razreda		Skupaj
			Ne	Da	
Zavnitev presadka	Ne	Število bolnikov	65	17	82
		Delež	79,3%	20,7%	100%
	Da	Število bolnikov	13	9	22
		Delež	59,1%	40,9%	100%
Skupaj		Število bolnikov	78	26	104
		Delež	75,0%	25,0%	100%

Parameter: tip zavnitve\*

**Preglednica VIII:** Prisotnost za darovalca specifičnih protiteles proti antigenom HLA I. razreda, določenih s testom LSA, v povezavi z zavnitvami presadkov.

			Za darovalca specifična protitelesa proti antigenom HLA I. razreda		Skupaj
			Ne	Da	
Tip zavnitve	Celično posredovana	Število bolnikov	6	7	13
		Delež	46,2%	53,8%	100%
	Posredovana s protitelesi	Število bolnikov	7	2	9
		Delež	77,8%	22,2%	100%
Skupaj		Število bolnikov	13	9	22
		Delež	59,1%	40,9%	100%

Parameter: zavnitev presadka\*      Pozitivni testi LXM z antigeni HLA II. razreda – serumski vzorci odvzeti pred presaditvami ledvic

**Preglednica IX:** Prisotnost za darovalca specifičnih protiteles proti antigenom HLA II. razreda, določenih s testom LXM, v povezavi z zavnitvami presadkov.

			Pozitivni testi LXM z antigeni HLA II. razreda, pred presaditvijo		Skupaj
			Ne	Da	
Zavnitev presadka	Ne	Število bolnikov	65	17	82
		Delež	79,3%	20,7%	100%
	Da	Število bolnikov	14	8	22
		Delež	63,6%	36,4%	100%
Skupaj		Število bolnikov	79	25	104
		Delež	76,0%	24,0%	100%

Parameter: tip zavrnitve\*

Pozitivni testi LXM z antigeni HLA II. razreda – serumski vzorci odvzeti pred presaditvami ledvic

**Preglednica X:** Prisotnost za darovalca specifičnih protiteles proti antigenom HLA II. razreda, določenih s testom LXM, v povezavi z zavrnitvami presadkov.

			Pozitivni testi LXM z antigeni HLA II. razreda, pred presaditvijo		Skupaj
			Ne	Da	
Tip zavrnitve	Celično posredovana	Število bolnikov	6	7	13
		Delež	46,2%	53,8%	100%
Skupaj	Posredovana s protitelesi	Število bolnikov	8	1	9
		Delež	88,9%	11,1%	100%
			15	7	22
			63,6%	36,4%	100%

Parameter: zavrnitev presadka\*

**Preglednica XI:** Prisotnost za darovalca specifičnih protiteles proti antigenom HLA II. razreda, določenih s testom LSA, v povezavi z zavrnitvami presadkov.

			Za darovalca specifična protitelesa proti antigenom HLA II. razreda		Skupaj
			Ne	Da	
Zavrnitev presadka	Ne	Število bolnikov	81	1	82
		Delež	98,8%	1,2%	100%
Skupaj	Da	Število bolnikov	14	8	22
		Delež	63,6%	36,4%	100%
			95	9	104
			91,3%	8,7%	100%

Parameter: tip zavrnitve\*

**Preglednica XII:** Prisotnost za darovalca specifičnih protiteles proti antigenom HLA II. razreda, določenih s testom LSA, v povezavi z zavrnitvami presadkov.

			Za darovalca specifična protitelesa proti antigenom HLA II. razreda		Skupaj
			Ne	Da	
Tip zavrnitve	Celično posredovana	Število bolnikov	10	3	13
		Delež	76,9%	23,1%	100%
Skupaj	Posredovana s protitelesi	Število bolnikov	4	5	9
		Delež	44,4%	55,6%	100%
			14	9	22
			63,6%	36,4%	100%

Pričakovali smo boljšo korelacijo med rezultati testa LXM in zavrnitvenimi reakcijami, saj smo imeli na mikrokroglicah vezane dejanske antigene HLA darovalca, v testu LSA pa rekombinantne antigene HLA.

Rezultati testov LXM in LSA niso bili primerljivi, saj niso bili statistično značilno enakovredni (Preglednica XIII). Presenetljivo je, da smo pri samo 13% bolnikov z obema testoma dobili pozitiven rezultat, medtem ko je bilo ujemanje negativnih rezultatov nekoliko boljše (52%).

#### **Preglednica XIII:** Korelacija med rezultati testov LXM in LSA

Legenda: LXM – navzkrižni preizkus z metodo Luminex®

LSA – LabScreen Single Antigen

NS – ni statistično značilno ( $p>0,005$ )

S – je statistično značilno ( $p<0,005$ )

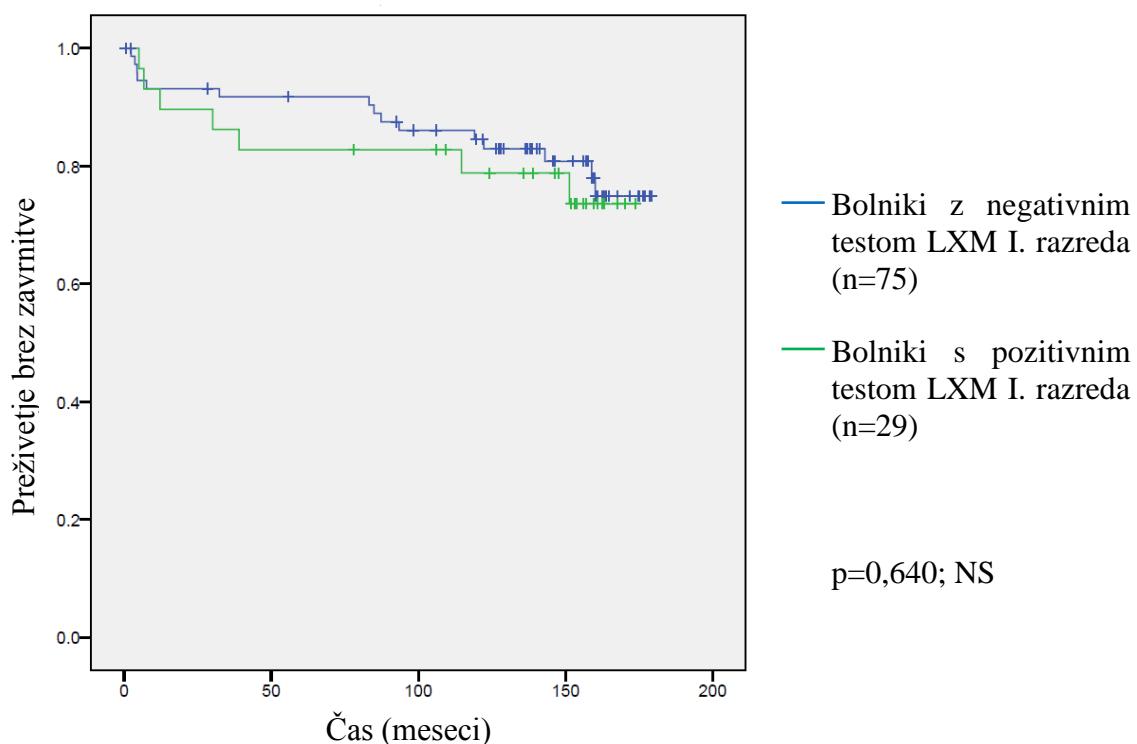
	Test LXM N=103 f (%)	Test LSA N=103 f (%)	LXM vs LSA p	Statistična značilnost	LXM+LSA N=103 f (%)
Poz HLA I+II	34	28	0.182	NS	13
Poz HLA I	29	23	0.019	S	11
Poz HLA II	22	7	0.036	S	4
Neg HLA I+II	66	72			52

Pri 50% bolnikov s pozitivnim testom LSA za specifična protitelesa proti darovalčevim antigenom HLA II. razreda dobimo tudi pozitivne vrednosti testa LXM z antigeni HLA II. razreda. Le pri 16% bolnikov s pozitivnim testom LXM z antigeni HLA II. razreda pa smo s testom LSA dokazali prisotnost specifičnih protiteles proti darovalčevim antigenom HLA II. razreda. Vprašamo se lahko, ali smo s testom LXM z antigeni HLA II. razreda zaznali lažno pozitivne reakcije ali pa je morda test LSA za antigene HLA II. razreda premalo občutljiv (lažno negativni rezultati).

Težave po presaditvi je imelo 37% bolnikov s pozitivnimi testi LXM z antigeni II. razreda in 33 % tistih, ki smo jim dokazali prisotnost specifičnih protiteles zoper določene darovalčeve antigene omenjenega razreda s testom LSA.

#### 4.3.2. KAPLAN MEIERJEVE KRIVULJE PREŽIVETJA PRESADKA BREZ ZAVRNITVENIH REAKCIJ

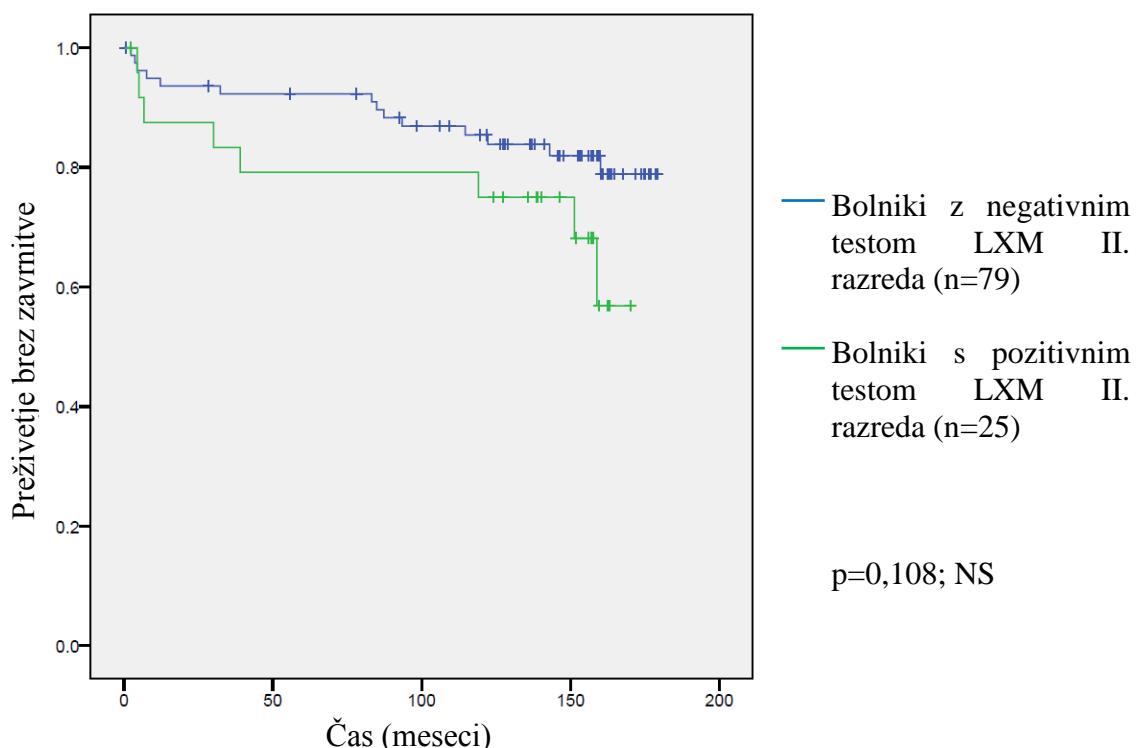
Pri bolnikih z negativnim in pozitivnim testom LXM z antigeni HLA I. razreda nismo ugotovili razlik v dolgoročnem preživetju presadkov (graf 1).



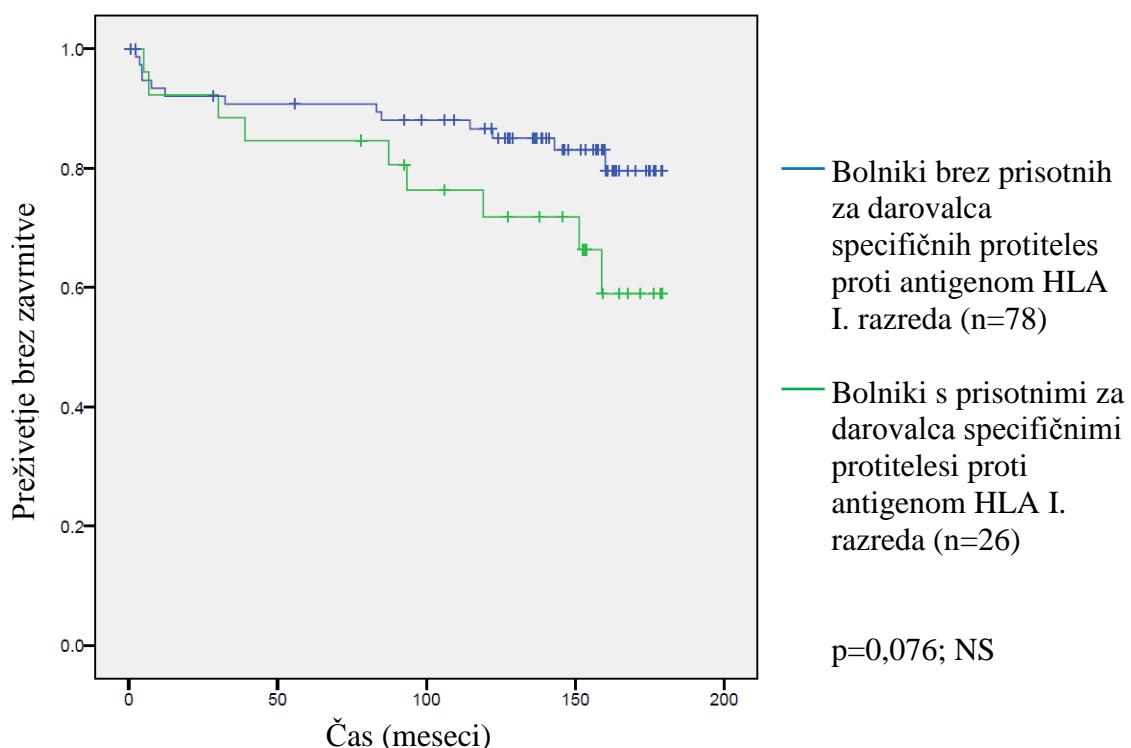
**Graf 1:** Preživetje brez zavrnitve v odvisnosti od izida testa LXM HLA I. razreda s serumi odvzetimi pred presaditvijo.

Pri bolnikih s pozitivnim testom LXM z antigeni HLA II. razreda smo opazili slabše preživetje, kot pri bolnikih z negativnim testom, vendar statistično neznačilno, verjetno zaradi premajhnega vzorca (graf 2).

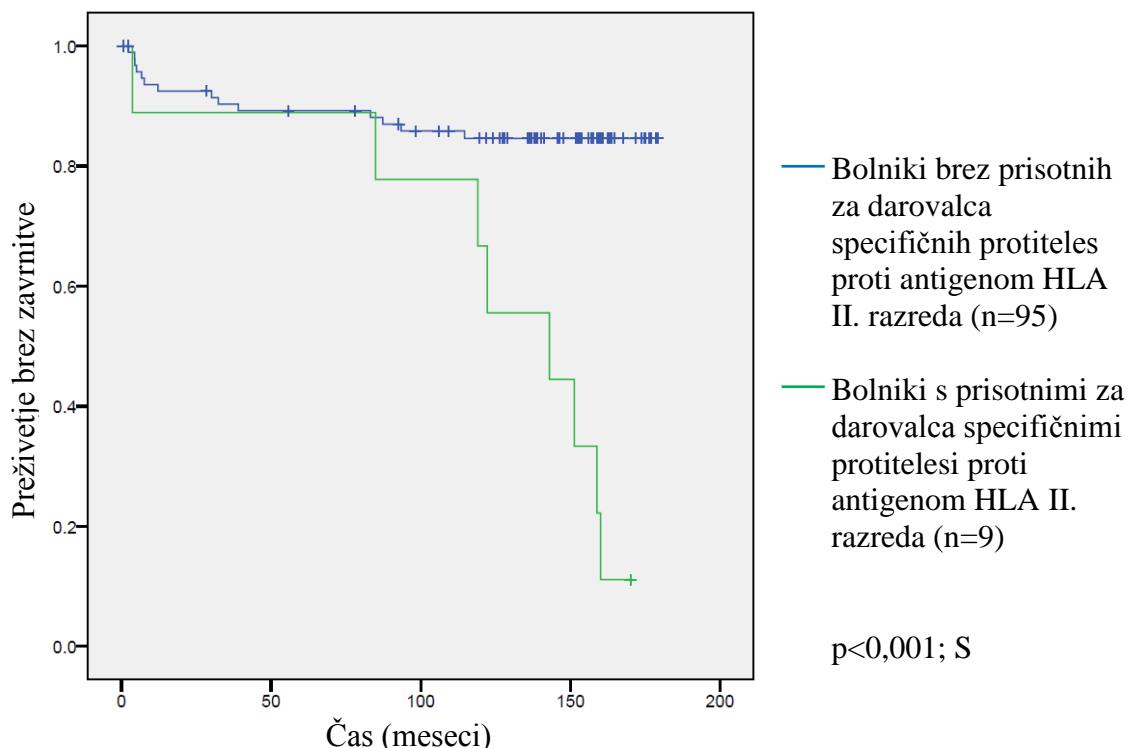
Pri bolnikih, pri katerih smo s testom LSA dokazali prisotnost za darovalce specifičnih protiteles proti antigenom HLA I. razreda, v prvih 4 letih po presaditvi nismo zaznali razlik, v primerjavi s tistimi brez tovrstnih protiteles, kasneje pa smo pri njih opazili zmanjšano preživetje presadkov (graf 3).



**Graf 2:** Preživetje brez zavnitve v odvisnosti od izida testa LXM HLA II. razreda s serumi odvzetimi pred presaditvijo.



**Graf 3:** Preživetje brez zavnitve v odvisnosti od prisotnosti za darovalca specifičnih protiteles proti antigenom HLA I. razreda dokazanih s testom LSA.



**Graf 4:** Preživetje brez zavrnitve v odvisnosti od prisotnosti za darovalca specifičnih protiteles proti antigenom HLA II. razreda dokazanih s testom LSA.

Pri bolnikih, ki smo jim s testom LSA dokazali prisotnost za darovalca specifičnih protiteles proti določenim antigenom HLA II. razreda, v prvih 8 letih po presaditvi nismo zaznali razlik v primerjavi z bolniki brez tovrstnih protiteles, nato pa je začela krivulja preživetja presadkov pri bolnikih s protitelesi strmo padati (graf 4).

Zaradi obsežnosti statistične analize vseh rezultatov in grafov ne moremo predstaviti, so pa na vpogled v CTT. Za predstavitev smo izbrali najbolj ilustrativne primere.

Kljud temu, da s testom CDC tako v presejalnih testih kot v navzkrižnih preizkusih, izvedenih pred presaditvijo ledvic, nismo določali specifičnih protiteles proti antigenom HLA II. razreda, ni v nobenem primeru prišlo do hiperakutne zavrnitve. Test CDC je torej dovolj občutljiv in zanesljiv za preprečitev hiperakutne zavrnitve ledvic. S pomočjo kombinacije testov CDC, LSA in bolnikove imunološke zgodovine se poskušamo izogniti temu, da bi bolnik dobil organ z antigeni HLA, proti katerim je kadarkoli tvoril protitelesa, saj specifičnosti HLA, določene na ta način, uvrščamo med t.i. nesprejemljiva ali prepovedana neskladja v primeru presaditve. Po do sedaj dostopni literaturi pa protitelesa, ki jih določimo zgolj s testom LSA, obravnavamo kot dejavnik tveganja za zavrnitvene epizode.. Naši

rezultati kažejo, da z njim lahko ugotavljamo klinično relevantna DSA, zato menimo, da s tem testom lahko zadovoljivo določimo neskladnosti HLA, ki predstavljajo bodisi tveganje za zavrnitev presadka ali z upoštevanjem dogodkov, ki lahko povzročijo imunizacijo bolnika, prepovedane neskladnosti. Posledično test LXM za bolnike, za katere so bili prepovedani antigeni HLA na podlagi LSA že upoštevani pri izbiri ponujene ledvice umrlega darovalca, ni potreben. Prednost testa LSA je tudi, da ga lahko izvedemo znotraj daljšega časovnega obdobja, ko je bolnik še na čakalni listi. Slabi strani testa LXM sta tudi tehnična zahtevnost ter dolgotrajnost izvedbe v primerjavi s klasičnim limfocitotoksičnim navzkrižnim preizkusom. Zato je LXM manj primeren za izvedbo tik pred presaditvijo ledvice, ko je čim krajši čas hladne ishemije organa ključnega pomena za uspeh presaditve.

## **SKLEP**

Prisotnost protiteles, usmerjenih proti antigenom HLA I. in II. razreda darovalcev ledvic, ki smo jih določili v serumskih vzorcih bolnikov s testom LXM, ni bila statistično značilno povezana s povečanim tveganjem za pojav zavrnitvenih reakcij in odpovedi presadkov.

Primerjava obeh testov, in sicer v našem laboratoriju predhodno validiranega testa LSA s testom LXM, je razkrila, da z njima pridobimo različne informacije o prisotnosti bolnikovih specifičnih protiteles proti antigenom HLA darovalca. Ugotovili smo, da je test LXM preveč zamuden, da bi ga izvajali tik pred presaditvijo ledvice. Za naš laboratorij je tako test LSA primernejši, saj je izvedljiv v daljšem časovnem obdobju in z njim lahko določimo za posameznega bolnika nesprejemljive antigene HLA v obdobju, ko je ta še na čakalni listi.

S statistično analizo podatkov smo dokazali vpliv za darovalce specifičnih protiteles anti-HLA, določenih s testom LSA v serumih bolnikov, na preživetje presadka brez zavrnitvenih reakcij. Statistično značilnost smo določili v primeru protiteles, ki prepoznavajo antigene HLA II. razreda, s čimer smo dokazali njihov klinični pomen v primeru presaditve ledvic.

## **6. LITERATURA**

1. Brent L: A History of Transplantation Immunology, 1st Edition. Academic Press, 1996
2. Thorsby E: A short history of HLA. *Tissue Antigens* 2009; 74: 101-116
3. Terasaki PI, McCleland J: Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 1964; 204: 998.
4. Murphy K: Janeway's Immunobiology, 8.izdaja, Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, 2012
5. Mahdi BM: A glow of HLA typing in organ transplantation. Review. *Clinical and Translational Medicine* 2013; 2: 6
6. P. Malhotra, S. Malu, S. Kapur: Immunology of Transplant Rejection;  
<http://www.eMedicine.medscape.com>; dostop 4.1.2015
7. Expert Reviews in Molecular Medicine, Cambridge Journals 2002;  
[http://journals.cambridge.org/fulltext\\_content/ERM/ERM4\\_03/S1462399402004283sup001.pdf](http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM4_03/S1462399402004283sup001.pdf); dostop 22.5.2016
8. Afzali B, Lechler RI, Hernandez-Fuentes MP: Allore cognition and the alloresponse: clinical implications. *Tissue Antigens* 2007; 69: 545-556
9. Terasaki PI: Humoral Theory of Transplantation. *American Journal of Transplantation* 2003; 3: 665-673
10. Colvin BC: Antibody-Mediated Renal Allograft Rejection: Diagnosis and Pathogenesis. Review. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 1046-1056
11. Slavcev A: Donor-Specific Antibodies and Kidney Transplant Rejection. *Annals of Transplantation* 2003; 8-3
12. Gupta A: Clinical Relevance of Pre-transplant HLA Donor Specific Antibodies (DSA) in Renal Patients waiting for a Transplant: A Risk Factor. *Human Immunology* 2009; 70-8: 618-622
13. Leffell MS, Zachary AA: Antiallograft antibodies: relevance, detection, and monitoring. Review. *Curr Opin Organ Transplant* 2010; 15-1: 2-7
14. Tongio MM, Berrebi A, Mayer S. Anti-HL-A foeto-maternal immunization. Persistence of antibodies. *Tissue Antigens* 1973; 3-2: 115–122
15. Middleton D, Nelson SD, and Martin J: Sources of HLA typing sera. *Ulster Med J* 1978; 47-2

16. Novotny VMJ, vDoorn R, Witvliet MD, Claas FHJ, Brand A: Occurrence of Allogeneic HLA and Non-HLA Antibodies After Transfusion of Prestorage Filtered Platelets and Red Blood Cells: A Prospective Study. *Blood* 1995; 85:7
17. Lefaucheur C et all: Pre-existing Donor-Specific HLA Antibodies Predict Outcome in Kidney Transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 1398-1406
18. Wasowska BA, Baldwin WM: Role of B Lymphocytes and Alloantibodies in Organ Transplantation. *Immunobiology of Organ Transplantation*, Kluver Academic/ Plenum Publishers, New York, 2004
19. <http://www.ebioscience.com/knowledge-center/product-line/procartaplex/technology.htm>; dostop 22.5.2016
20. Caro-Oleas JL et al.: Clinical relevance of HLA donor-specific antibodies detected by single antigen assay in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 0: 1–8
21. Piscacia A, Infante T, Napoli C: Luminex and antibody detection in kidney transplantation. *Clin Exp Nephrol* 2012; 16-3: 373-81
22. Gombos P, Opelz G, Scherer S, Morath C, Zeier M, Schemmer P, Süsal C: Influence of Test Technique on Sensitization Status of Patients on the Kidney Transplant Waiting List. *American Journal of Transplantation* 2013; 13: 2075-2082
23. Roelen DL, Doxiadis IN, Claas FHJ: Detection and clinical relevance of donor specific HLA antibodies: a matter of debate. *Review*. *Transplant International*, 2012; 25: 604-610
24. Wu P, Jin J, Everly MJ, Lin C, Terasaki P, Chen J: Impact of alloantibody strength in crossmatch negative DSA positive kidney transplantation. *Clinical Biochemistry*, 2013; 46: 1389-1393
25. Vidan-Jeras B: Izzivi pri določanju protiteles proti tkivnim antigenom HLA pred presaditvijo ledvice umrlega darovalca. 6. JESENOVČEVI dnevi, Ljubljana, 2014
26. Immucor: LIFECODES Donor Specific Antibody Product Insert. <http://www.immucor.com/LIFECODES%20Documents/LC977RUO.13%20-%20LIFECODES%20DSA%20IFU%20RUO.pdf> – dostop 22.5.2016
27. One Lambda: Product insert LABScreen™. [http://www.onelambda.com/content/dam/onelambda/en/TDX/Documents/securedocs/docs/Product\\_Insert/LS-LSCN-PI-EN-00.pdf](http://www.onelambda.com/content/dam/onelambda/en/TDX/Documents/securedocs/docs/Product_Insert/LS-LSCN-PI-EN-00.pdf) – dostop 22.5.2016

28. Eurotransplant Manual. Chapter 4: Kidney (ETKAS and ESP) <https://members.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=H4+ETKAS+Februar+26%2C+2016.pdf> – dostop 22.5.2016
29. Eurotransplant Manual. Chapter 10: Histocompatibility Testing [https://members.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=chapter10\\_histocompatibility7.pdf](https://members.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=chapter10_histocompatibility7.pdf) – dostop 22.5.2016
30. Stare J.: Krivulje preživetja. Med Mes 2005; 1-12: 10-5.
31. [http://www.ditera.eu/povezave/medicinski\\_izracuni/2010110823194727/](http://www.ditera.eu/povezave/medicinski_izracuni/2010110823194727/); dostop 24.7.2014
32. VassarStats: Website for Statistical Computation <http://vassarstats.net/tab2x2.html>; dostop 17.4.2015