

METODE OTKRIVANJA ANTITIJELA NA HLA ANTIGENE KOD BOLESNIKA KOJI ČEKAJU BUBREŽNU TRANSPLANTACIJU TE KOMBINIRANU TRANSPLANTACIJU GUŠTERAČA-BUBREG

MIRELA ANČIĆ, BLAŽENKO MARAVIĆ¹, MAJA RADMAN² i VEDRAN KOVAČIĆ²

Klinički bolnički centar Split, Odjel za transfuzijsku medicinu, ¹Odjel za urologiju i ²Klinika za unutrašnje bolesti, Split, Hrvatska

Najbolji način liječenja kronične terminalne bubrežne bolesti je bubrežna transplantacija. Kod transplantacije je osobito važan podatak postotak takozvanih panel reaktivnih antitijela (PRA) koja su usmjerena na ljudski leukocitni antigen (HLA, engl. *Human Leukocyte Antigen*). Za određivanje postotka PRA u senzibiliziranih bolesnika koji čekaju na bubrežnu transplantaciju danas koristimo više metoda od kojih su najvažnije CDC (engl. *Complement-Dependent Cytotoxicity*) odnosno citotoksičnost ovisna o komplementu. Što je veća PRA vrijednost, veća je vjerojatnost pozitivnog *cross-match-a* sa slučajnim donatorom i niža vjerojatnost primanja transplantata. Uspoređujući osjetljivost laboratorijskih metoda za određivanje postotka PRA u serumu bolesnika može se zaključiti kako su se ELISA i protočna citometrija pokazali osjetljivijima i specifičnijima.

Ključne riječi: antitijela na HLA, transplantacija bubrega, transplantacija gušterača-bubreg

Adresa za dopisivanje: Doc. dr. sc. Vedran Kovačić, dr. med.
Klinika za unutrašnje bolesti
KBC Split
Šoltanska 1
21 000 Split, Hrvatska
Tel: +38521557456; e-pošta: vedkovac@inet.hr

Kronična bubrežna bolest dovodi postupno do kronične terminalne bubrežne bolesti i potrebe za nadomještanjem bubrežne funkcije dijalizom. Za ishod bolesnika najbolji način liječenja kronične terminalne bubrežne bolesti je transplantacija bubrega. Ima dokaza kako je vrijeme preživljenja presatka bolje ako do bubrežne transplantacije dođe prije nego se započne liječenjem dijalizom (1).

Transplantacijski centri u kojima se izvode transplantacije bubrega s kadaveričnog davatelja moraju posjedovati točne i ažurirane podatke kao što su podudarnost ABO sustava krvnih grupa, tkivni antigeni sustava HLA (HLA-A, HLA-B, HLA-DR), podatci o transfuzijama, spolu, trudnoći (ako je mogući primatelj žena), podatci o prethodnim transplantacijama bubrega, uz osobne podatke iz pripadajućih dijalitičkih centara, a osobito važan podatak je postotak ta-

kozvanih panel reaktivnih antitijela (PRA) (2). PRA je zapravo rezultat imunoloških testova određivanja posebnih antitijela i izražava se kao postotak između 0 % i 99 %. Ta antitijela su usmjerena između ostalog i na ljudski leukocitni antigen (HLA, engl. *Human Leukocyte Antigen*), bjelancevinu koja postoji na većini stanica u tijelu. Svaka populacija će imati različite HLA antigene, pa se PRA test razlikuje od zemlje do zemlje. Danas oko 25 % bolesnika u SAD koji čekaju na bubrežnu transplantaciju ima PRA >10 % dok u zemljama Europske unije oko 14 % takvih bolesnika ima PRA >5 % (3).

Osnovni preduvjet za transplantaciju s kadaveričnog darivatelja je podudarnost tkivnih antigena sustava HLA i negativna križna reakcija (engl. *cross-match*) između seruma primatelja i HLA davatelja. Redovito praćenje senzibilizacije (četiri puta godišnje) mogućeg

primatelja bubrega koji se nalazi na listi čekanja je od iznimne važnosti. Do senzibilizacije može doći ako je primatelj prethodno primao krvne transfuzije, bio već prethodno transplantiran ili u slučaju trudnoće. Sve studije su dokazale kako je pretransplantacijski postotak panel reaktivnih antitijela (PRA) visoki rizični faktor za bolesnike nakon transplantacije kadaveričnog bubrega. Hrvatska je članica Eurotransplanta, koji klasificira bolesnike prema PRA: 0–5 % su neimunizirani, PRA 5–85 % imuniziran, PRA >85 % smatraju se visokoimuniziranima. Za skupinu visokoimuniziranih uveden je poseban alokacijski sustav prihvatljive nepodudarnosti (engl. *Acceptable Mismatch* – AM) gdje se određuju svi oni aleli HLA protiv kojih nema protutijela, pa se u slučaju postojanja mogućnosti nastoji transplantirati organ davatelja s takvom konstelacijom HLA alela (4).

Za određivanje postotka PRA kod senzibiliziranih bolesnika koji čekaju na bubrežnu transplantaciju danas koristimo više metoda, od kojih su najvažnije CDC (engl. *Complement-Dependent Cytotoxicity* (odnosno citotoksičnost ovisna o komplementu, što je serološka metoda, zatim metoda protočne citometrije (engl. *Flow Cytometry Crossmatch*, FCXM) i konačno metodu ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), što je DNK tehnika. Pri tome se primjenjuju cijeli nizovi reagensa kojima je moguće odrediti sve HLA antigene što obično postoje u različitim etničkim skupinama (5).

Svrha testa ELISA je utvrđivanje je li određeni protein prisutan u uzorku i ako je, u kojem postotku. Postoje dvije glavne varijacije za ovu metodu: može se odrediti postotak antitijela u uzorku ili koliko je proteina vezano za antitijelo. Protočna citometrija je metoda kojom se mjere fizikalna svojstva stanice. Mjerenje raspršenja svjetlosti i florescencije koja nastaje prolaskom kroz fokusnu lasersku zraku daje informacije o fizikalno kemijskim svojstvima stanice. Primjenjuje se za mjerenje koncentracije različitih autoantitijela.

Povijest kadaverične transplantacije bubrega seže davnih 60-ih godina prošlog stoljeća kada su Pate i Terasaki dokazali kako je nazočnost antitijela u serumu bolesnika koja su reagirala na HLA antigene donora bila veliki rizik za gubitak bubrežnog alografta (7). Tijekom proteklih 40 godina razumijevanje složenosti problematike postotka učestalosti PRA na ishod transplantacije bubrega znatno je uznapredovalo, uz otkrivanje sve senzitivnijih i složenijih metoda (8). Danas ima sve više dokaza o sve većoj učestalosti odbacivanja transplantata među bolesnicima s pozitivnim *cross-match-om* koji je otkriven bilo metodom CDC ili protočnom citometrijom (9). Što je veća PRA vrijednost, veća je vjerojatnost pozitivnog *cross-match-a* sa slučajnim donorom i niža je vjerojatnost primanja

transplantata. U SAD 12 % senzibiliziranih bolesnika (posebno oni s PRA >80 %) pripadaju jednoj od skupina primatelja na listi čekanja koje su u najnepovoljnijem položaju, te primaju manje od 5 % kadaveričnih bubrega (10).

Ipak, odabir metode otkrivanja PRA je sve veći izazov. Tako su Gebel i Bray (11) pokazali kako 25 % potencijalnih primalaca koji su CDC metodom bili nesenzibilizirani, ako se kod njih koristi protočna citometrija, može se dokazati senzibiliziranost ispitivanih bolesnika. Lee i sur. (12) proveli su retrospektivnu studiju koja je obuhvatila 529 bolesnika čiji su serumi testirani tehnikom ELISA (DNK tehnika) metodom i serološkom metodom CDC (citotoksičnost ovisna o komplementu). HLA antitijela pronađena ELISA metodom bila su u rasponu od 43–54 % što je uključivalo 24 % pacijenata sa slabom reaktivnošću, 17 % s jakom reaktivnošću. Autori su jasno pokazali kako je ELISA osjetljivija od CDC u detekciji PRA. Bray i sur. (13) su testirali u retrospektivnoj studiji 492 seruma da bi se odredilo imaju li bolesnici antitijela za HLA antigene i ako ih ima, koje su specifičnosti. Oko 25 % bolesnika imali su PRA >30 %, a od toga polovica PRA >80 %. Autori su dokazali kako je FCXM tehnika osjetljivija od CDC u detekciji PRA.

ELISA razlikuje IgG nasuprot IgM i ima prednost nad CDC metodom, jer pruža testove velikog broja uzoraka na vremenski učinkovitiji način. Klinička procjena testova metode protočne citometrije dala je dobre rezultate temeljene na istodobnoj višestrukoj detekciji specifičnih antinuklearnih antitijela te rezultirala dobrim slaganjem s metodom ELISA koje su od neizmjerne važnosti u slučaju pozitivnog ili negativnog *cross-match-a* (14). U odnosu na metode CDC i ELISA protočna citometrija se pokazala najosjetljivijom metodom u što točnijem određivanju postotka PRA u bolesnika na listi čekanja.

Zaključno, otkrivanje postotka PRA je od važnosti za transplantaciju bubrega kod pripreme za transplantaciju bubrega. Metode koje koristimo moraju biti dovoljno osjetljive kako bismo dobili točne podatke o postotku PRA. Oni bolesnici kod kojih je otkriven visoki postotak PRA jednom od tih tehnika, u slučaju negativnog *cross-match-a* imaju prednost kod dobivanja bubrega, jer je to jedina mogućnost da će visoko-senzibilizirani pacijenti doći do transplantata.

L I T E R A T U R A

1. EBPG Expert Group on Renal Transplantation. The European Best Practice Guidelines for Renal Transplantation. Nephrol Dial Transplant 2002; (Suppl 4): 1-67.
2. Duquesnoy RJ, Witvliet M, Doxiadis de Fijter IIN, Frans HJ. Class HLA Matchmaker-based strategy to identify acceptable kidney transplant candidates. Tranpl Int 2004; 17: 22-30.
3. Huber L, Lachmann N, Dürr M i sur. Identification and therapeutic management of highly sensitized patients undergoing renal transplantation. Drugs. 2012; 72: 1335-54.
4. Doxiadis I, Class FH. Transplantation of highly sensitized patients via the acceptable mismatch program or desensitization? We need both. Curr Opin Organ Transplant 2009; 14: 410-13.
5. Duquesnoy RJ. HLA Matchmaker: A Molecular Based Algoritam for Histocompatibility. I. Description of the Algoritam. Hum Immunol 2002; 63: 339-52.
6. Hui-lin M, Xun-bo J, Xiang-tie L, Hong-wei W, Jia-ju L. Impact of human leukocyr te antigen matching and recipients panel reactive antibodies on two year outcome in presensitized renal alograft recipients . Chin Med J 2009; 122: 420-6.
7. Pate R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. N Eng J Med 1969; 280: 735-9.
8. Mahoney RJ, Ault KA, Given SR i sur. The flow cytometric crossmatch and early renal transplant loss. Transplantation 1990; 49: 527-35.
9. Lazda VA, Mozes MF. An Evaluation of HLA Cross-Reactive Group Matching on Graft Survival in Deceased Donor Kidney Recipients. Transplant Proc 2005; 37: 661-3.
10. Cecka JM. Kidney transplantation in the United States. Clin Transpl 2008; 1-18.
11. Gebel HM, Bray RA. Approaches for transplanting the sensitized patient: biology versus pharmacology. Nephrol Dial Transplant 2008; 23: 2454-7.
12. Lee PC, Ozawa M, Hung CJ, Lin YJ, Chang SS, Chou TC. Reappraisal of HLA Antibody Analsis and Crossmatching in Kidney Transplatation. Transplant Proc 2009; 41: 95-8.
13. Bray RA, Nolen JDL, Larsen C i sur. Transplantating the Highly Sensitized Patient: The Emory Algorithm. Am J Transplant 2006; 6: 2307-15.
14. Merion RM, Ashby VB, Wolfe RA i sur. Deceased-Donor Characteristic and the Survival Benefits of Kidney Transplantation. JAMA 2005; 294: 2726-33.
15. Stratta RJ, Rohr MS, Suundberg AK i sur. Intermediate-term outcomes with expanded criteria deceased donors in kidney transplantation: a spectrum or specter of quality? Ann Surg 2006; 243: 594-601.

S U M M A R Y

METHODS FOR DETECTION OF ANTIBODIES TO HLA ANTIGENS IN PATIENTS AWAITING KIDNEY TRANSPLANTATION AND COMBINED PANCREAS-KIDNEY TRANSPLANTATION

M. ANČIĆ, B. MARAVIĆ¹, M. RADMAN² and V. KOVAČIĆ²

Split University Hospital Center, Department of Transfusion Medicine, ¹Department of Urology and ²University Department of Internal Medicine, Split, Croatia

The best possibility to treat chronic renal disease is renal transplantation. Especially important fact in transplantation is the percentage of so-called panel reactive antibody (PRA) that is focused on the human leukocyte antigen. There are several methods to determine the percentage of PRA in sensitized patients awaiting kidney transplants. The most important is the complement-dependent cytotoxicity. A higher value of PRA implies greater likelihood of positive cross-match with random donor and lower probability of receiving a transplant. Comparing the sensitivity of laboratory tests for determination of PRA percentage in patient serum, it is concluded that ELISA and flow cytometry proved to be more sensitive and specific.

Key words: HLA antigens, kidney transplantation, combined pancreas-kidney transplantation