

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Aida Mujić Franić

**ODREĐIVANJE I KARAKTERIZACIJA PROTUTIJELA NA NON-HLA I HLA
ANTIGENE KAO PROCJENA IMUNOLOŠKOG RIZIKA OD ODBACIVANJA
BUBREŽNOG PRESATKA U BOLESNIKA S TERMINALNOM BUBREŽNOM
BOLESTI**

Doktorski rad

Osijek, 2024.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Aida Mujić Franić

**ODREĐIVANJE I KARAKTERIZACIJA PROTUTIJELA NA NON-HLA I HLA
ANTIGENE KAO PROCJENA IMUNOLOŠKOG RIZIKA OD ODBACIVANJA
BUBREŽNOG PRESATKA U BOLESNIKA S TERMINALNOM BUBREŽNOM**

BOLESTI

Doktorski rad

Osijek, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti

Znanstvena polja: Temeljne medicinske znanosti i Biologija

ODREĐIVANJE I KARAKTERIZACIJA PROTUTIJELA NA NON-HLA I HLA ANTIGENE KAO PROCJENA IMUNOLOŠKOG RIZIKA OD ODBACIVANJA BUBREŽNOG PRESATKA U BOLESNIKA S TERMINALNOM BUBREŽNOM BOLESTI

Aida Mujić Franić

Doktorski rad je izrađen pri Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicine, Laboratorij za tipizaciju tkiva, Klinički bolnički centar Rijeka

Mentor 1: prof. dr. sc. Ljubica Glavaš-Obrovac

Mentor 2: doc.dr.sc. Nataša Katalinić

Kratki sažetak doktorskog rada:

Transplantacija bubrega predstavlja najbolju metodu liječenja bolesnika u završnom stadiju kronične bubrežne bolesti. Uz senzibilizaciju na ljudski leukocitni antigen, na preživljavanje presatka važan utjecaj imaju i protutijela na antigene izvan sustva HLA (protutijela non-HLA). Zbog njihove potencijalne uloge u odbacivanju transplantata i aktivaciji komplementa dobiveni rezultati naglašavaju važnost detaljnog imunološkog testiranja prije transplantacije, uključujući i određivanje protutijela non-HLA. Dobivene spoznaje otvaraju put za bolje razumijevanje mehanizama odbacivanja i mogućih terapijskih ciljeva za poboljšanje ishoda transplantacije bubrega.

Broj stranica:

Broj slika:

Broj tablica:

Broj literaturnih navoda:

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi:

Datum obrane:

Povjerenstvo za obranu:

- 1.
- 2.
- 3.
4. Zamjena člana Povjerenstva:

Doktorski rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg Sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruder Bošković Institute
Doctoral Study of Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Interdisciplinary Area of Science
Scientific Fields: Basic Medical Sciences and Biology

**DETERMINATION AND CHARACTERIZATION OF ANTIBODIES TO NON-HLA
AND HLA ANTIGENS AS AN ASSESSMENT OF THE IMMUNOLOGICAL RISK OF
KIDNEY TRANSPLANT REJECTION IN PATIENTS WITH TERMINAL KIDNEY
DISEASE**

Aida Mujić Franić

Thesis performed at: The doctoral thesis was made at the Clinical Institute for Transfusion Medicine, Laboratory for Tissue Typing, Clinical Hospital Center Rijeka

Supervisor/s: 1: prof. dr. sc. Ljubica Glavaš-Obrovac
2: doc.dr.sc. Nataša Katalinić,

Short abstract:

Kidney transplantation is the best treatment option for patients with end-stage chronic kidney disease. In addition to sensitization against the human leukocyte antigen, antibodies against antigens outside the HLA system (non-HLA antibodies) also have an important influence on graft survival. Due to their potential role in graft rejection and complement activation, the results obtained emphasize the importance of detailed immunological testing prior to transplantation, including the determination of non-HLA antibodies. The findings pave the way for a better understanding of the mechanisms of rejection and potential therapeutic targets to improve the outcome of kidney transplantation.

Number of pages:

Number of figures:

Number of tables:

Number of references:

Original in:

Key words:

Date of the thesis defense:

Reviewers:

- 1.
- 2.
- 3.
4. (substitute)

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Imunosni sustav čovjeka.....	1
1.1.1. Stanična imunost	1
1.1.2. Humoralna imunost	3
1.1.3. Sustav komplementa.....	5
1.2. Glavni sustav tkivne podudarnosti	8
1.2.1. Molekule HLA razreda I.....	9
1.2.2. Molekule HLA razreda II	10
1.3. Transplantacija i transplantacijska reakcija	10
1.3.1. Imunoreakcija odbacivanja posredovana stanicama	11
1.3.2. Imunoreakcija odbacivanja posredovana protutijelima.....	11
1.4. Protutijela HLA.....	13
1.5. Protutijela non-HLA.....	15
1.5.1. Važnost određivanja protutijela non-HLA u predviđanju ishoda transplantacije.....	16
1.5.2. Tipovi protutijela non- HLA u transplantaciji bubrega.....	18
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	20
3. MATERIJAL I METODE	21
3.1. Ispitanici	21
3.1.1. Uključni i isključni kriteriji.....	22
3.1.2. Etička načela istraživanja.....	22
3.1.3. Plan provođenja testiranja.....	23
3.2. Upotrebljavani reagensi, kemikalije i materijal	24
3.3. Metode	25
3.3.1. Probir seruma na protutijela anti-HLA	25
3.3.1.1. Testiranje metodom limfocitotoksičnosti ovisne o komplementu (metoda CDC).....	25
3.3.1.2. Probir seruma na protutijela anti-HLA razreda I i razreda II testom LMX	27
3.3.1.3. Određivanje specifičnosti protutijela anti-HLA testovima LSA I i LSA II.....	28
3.3.1.4. Određivanje prisutnosti i specifičnosti IgG protutijela non-HLA testom LNHLA	29
3.3.1.5. Određivanje prisutnosti komplement vezujućih protutijela non-HLA	31
3.3.2.1. Veličina uzorka.....	32
3.3.2.2. Općenite statističke metode	32

3.3.2.3. Statističke metode u određivanju komplement vezujućih protutijela non-HLA.....	33
4. REZULTATI.....	35
4.1. Osnovna obilježja ispitanika.....	35
4.2. Probir seruma ispitanika na prisutnost protutijela anti-HLA.....	37
4.3. Specifičnosti protutijela anti-HLA u ispitivanoj populaciji.....	38
4.4. Određivanje IgG protutijela non-HLA.....	43
4.5. Komplement-vezujuća protutijela non-HLA.....	45
4.6. Usporedba rezultata testiranja IgG protutijela non-HLA i komplement vezujućih protutijela non-HLA.....	49
4.7. Povezanost rezultata testiranja IgG protutijela anti-HLA, IgG protutijela non-HLA i komplement-vezujućih protutijela non-HLA.....	51
4.8. Povezanost protutijela non-HLA sa osnovnom bolesti, prethodnim imunizirajućim događajima, metodom i vremenskim periodom dijalitičkog liječenja.....	52
5. RASPRAVA.....	63
5.1. Karakterizacija protutijela anti-HLA.....	64
5.2. Specifičnosti IgG protutijela non-HLA u ispitivanoj populaciji.....	66
5.3. Određivanje komplement-vezujućih protutijela non-HLA.....	67
5.4. Korelacija između IgG protutijela non-HLA i komplement vezujućih protutijela non-HLA.....	72
5.5. Korelacija između IgG protutijela anti-HLA i protutijela non-HLA.....	73
5.6. Povezanost protutijela non-HLA sa osnovnom bolesti, prethodnim imunizirajućim događajima i metodom dijalitičkog liječenja.....	75
5.7. Ograničenja istraživanja.....	78
5.7. Buduća istraživanja.....	79
6. ZAKLJUČCI.....	80
7. LITERATURA.....	82
8. SAŽETAK.....	93
9. SUMMARY.....	95
10. PRILOZI.....	97

POPIS KRATICA

ABMR - odbacivanje posredovano protutijelima, prema engl. *antibody-mediated rejection*

ADCC - stanična citotoksičnost posredovana protutijelima, prema engl. *antibody-mediated cell cytotoxicity*

APC - antigen–predočne stanice, prema engl. *antigen presenting cells*

ARHGDI2 - faktor izmjene gvanin nukleotida 2, prema engl. *Rho guanine nucleotide exchange factor 2*

AT1R – angiotensin II tip 1 receptor, prema engl. *angiotensin II type 1 receptor*

CDC - limfocitotoksičnost ovisna o komplementu, prema engl. *complement-dependent cytotoxicity*

CM - križna reakcija, prema engl. *crossmatch*

CREGs - križno reaktivna skupina, prema engl. *cross-reactive groups*

CUT OFF - standardna granična vrijednost, prema engl. *cut-off*

DGF – odgođena funkcija presatka, prema engl. *delayed graft function*

DSA - donor specifična protutijela, prema engl. *donor specific antibody*

DTT - 2,3-dihidroksi-1,4-ditiolbutan, ditiotreitol, prema engl. *dithiothreitol*

EDTA - Etilendiamintetraoctena kiselina

ELISA - enzimski imunotest, prema engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*

ETAR- endotelin A receptor

HLA - ljudski leukocitni antigen, prema engl. *human leukocyte antigen*

HSP - protein toplinskog šoka, prema engl. *heat shock proteins*

KBC - klinički bolnički centar

KIR - receptori slični imunoglobulinima prirodnoubilačkih stanica, prema engl. *killer cell immunoglobulin-like receptor*

LMX - test za probir seruma na prisutnost ili odsutnost protutijela anti-HLA razreda I i II, prema engl. *Lifecodes lifescreen deluxe*

LNHLA - test za određivanje specifičnosti IgG protutijela non-HLA

LSA I - test za određivanje specifičnosti protutijela anti-HLA razreda I, prema engl. *Lifecodes Single Antigen*

LSA II - test za određivanje specifičnosti protutijela anti-HLA razreda II, prema engl. *Lifecodes single antigen*

MAC - membranski napadni kompleks, prema engl. *membrane attack complex*

MBL - lektin koji veže manozu, prema engl. *manose-binding lectin*

MICA – glavni antigen histokompatibilnog kompleksa klase I povezan s lancem prema engl. *major histocompatibility complex class I-related chain antigens*

MFI - medijan intenziteta fluorescencije, prema engl. *median fluorescence intensity*

MHC - glavnog sustava tkivne podudarnosti, prema engl. *major histocompatibility complex*

NK - prirodno ubilačke stanice, prema engl. *natural killer*

PE - fikoeritrin, prema engl. *phycoerythrin*

% PRA - postotak panel reaktivnih protutijela, prema engl. *% panel reactive antibodies*

RCF - relativna centrifugalna sila, prema engl. *relative centrifugal force*

TAP - transporter povezan s obradom antigena, prema engl. *transporter associated with antigen processing*

TCR - T-stanični receptor, prema engl. *T-cell receptor*

1. UVOD

1.1. Imunosni sustav čovjeka

Imunosni sustav je iznimno kompleksan i fino podešen sustav koji se prilagođava različitim prijetnjama kako bi održao homeostazu u tijelu. Osnovna zadaća mu je razlikovanje vlastitog od tuđeg, što uključuje pokretanje imunosne reakcije prema stranim molekulama uz istovremenu toleranciju prema vlastitim antigenima. Prema stranim antigenima pokreće imunosnu reakciju koja ima za cilj uništavanje i uklanjanje stranih patogena iz tijela. S druge strane, prema vlastitim antigenima imunosni sustav razvija toleranciju kako bi spriječio autoimune reakcije. Sastoji od staničnih i molekularnih komponenti koje se međusobno udružuju i nadopunjuju [1].

Patogeni iz organizma mogu se ukloniti pomoću nespecifičnih (urođenih) i specifičnih (stečenih) mehanizama koji prema svojim izvršnim mehanizmima obuhvaćaju humoralnu i staničnu imunost. Antigen–predočne stanice (engl. *antigen presenting cells* – APC) mastociti, polimorfonuklearni leukociti, limfociti, i prirodno ubilačke stanice (engl. *natural killer* – NK) nositelji su stanične imunosti, dok su limfociti B nositelji humoralne imunosti. U mehanizme specifične imunosti uključeno je mnogo gena i molekula. Jednu od središnjih imunoregulacijskih uloga imaju geni glavnog sustava tkivne podudarnosti, MHC (od engl. *major histocompatibility complex* - MHC), u ljudi nazvanog HLA (od engl. *human leukocyte antigen* – ljudski leukocitni antigen). Imaju iznimno važnu ulogu u transplantacijskoj medicini, kao i u ispitivanju genetske sklonosti prema različitim bolestima, reproduktivnoj imunologiji, sudskoj medicini, transfuzijskom liječenju, antropološkim proučavanjima [2].

1.1.1. Stanična imunost

Stanični imunosni odgovor usmjeren je prema unutarstaničnim stranim peptidima do kojih protutijela ne mogu doprijeti. Nositelji ovog oblika imunosti su limfociti T koji prepoznaju prerađeni antigen predodčen uz molekulu HLA na površini membrane specijaliziranih stanica (tzv. spregnuto prepoznavanje). Zbog spregnutog prepoznavanja funkcionalnost imunološkog sustava definirana je izuzetnim polimorfizmom molekula HLA. Stečena imunosna reakcija započinje u perifernim limfoidnim tkivima (limfni čvorovi, slezena, limfoidna tkiva sluznica) u kojima se prepoznavanjem kompleksa peptid-HLA aktiviraju i diferenciraju nezreli limfociti T

u CD4+ ili CD8+ izvršne stanice, a manji dio u memorijske limfocite T [2]. Limfociti T nastaju od matičnih stanica u koštanoj srži i zatim sazrijevaju u timusu, gdje dolazi do njihove selekcije. Timus napuštaju samo limfociti T koji prepoznaju strane antigene vezane u komplekse s vlastitim MHC molekulama. Ključni su za stanični imunski odgovor. Dijele se na pomoćničke, regulacijske i citotoksične. Limfociti T mogu se podijeliti u dvije velike populacije, CD4+ i CD8+, koji imaju različitu specifičnost prema molekulama HLA razreda I i razreda II. Limfociti CD4+ i CD8+ se nakon aktivacije antigenom diferenciraju u različite populacije stanica koje aktiviraju različite mehanizme i imaju različite izvršne funkcije [3].

CD4+ pomagački limfociti T dijele se temeljem proizvodnje citokina na Th1, Th2, Th17, Tfh, Th9 i Th22, s tim da se smatra da to nije konačan broj subpopulacija pomagačkih limfocita T. Sve te stanice prepoznaju strane peptide predstavljene molekulama razreda II HLA na stanicama koje predstavljaju antigen (dendritičke stanice, makrofagi i B limfociti) [4].

CD8+ limfociti T su izvršni mehanizam stanične imunosti uključene u imunoreakciju odbacivanja presatka. Oni pokazuju spregnuto prepoznavanje antigena s HLA razredom I. U prisutnosti upalnih citokina i odgovarajućeg antigena stanice se aktiviraju i snažno proliferiraju. Aktivirani CD8+ limfociti T migriraju u presađeni organ i potiču smrt stanica presatka putem izravnog citotoksičnog uništavanja ciljnih stanica ili pak putem proizvodnje INF- γ koji aktivira fagocitnu aktivnost makrofaga. CD8+ limfociti T oštećuju stanice bubrežnog presatka putem oslobađanja citotoksičnih molekula ili pak u izravnom kontaktu sa navedenim stanicama putem receptora Fas koji inducira apoptozu u ciljnim stanicama [5].

Ovisno o vrsti T-staničnog receptora (engl. *T-cell receptor* - TCR) koji izražavaju kategorizirane su kao $T\alpha/\beta$ i $T\gamma/\delta$ stanice. Tri glavne podskupine limfocita T koje nose α i/ili β receptor su CD4+ pomoćne stanice i CD8+ citotoksične i CD4+ CD25+ regulatorne T stanice. Limfociti T koji izražavaju γ/δ TCR imaju sposobnost ubijanja širokog spektra tumorskih stanica. Prednosti ovih stanica u terapiji raka temelje se na njihovoj neovisnosti o ekspresiji HLA na tumorskim stanicama i njihovoj relativnoj neosjetljivosti na neke inhibitorske molekule (kao što je PD-1) [4].

NK stanice razvijaju se u koštanoj srži i dio su staničnog imunskog odgovora te su sposobni prepoznati i uništiti zaražene ili promijenjene stanice (npr., tumorske stanice) bez prethodne senzibilizacije. One nemaju presloženi receptor za antigene (klonotipski receptor) kao što to imaju limfociti T i B zbog čega se ubrajaju u prirodenu imunost. One imaju niz

aktivacijskih i inhibicijskih receptora na svojim membranama. Aktivirajući receptori prepoznaju ligande koji se nalaze na oštećenim ili inficiranim stanicama, a inhibicijski signali prepoznaju normalne zdrave stanice. Receptori skupine KIR (od engl. *killer cell immunoglobulin-like receptor*) najvažnija su skupina inhibicijskih receptora NK stanica [5].

APC su stanice koje prezentiraju antigen, uključujući dendritične stanice i makrofage. Prezentiraju antigene limfocitima T kako bi pokrenule staničnu imunost uzastopnom isporukom signala 1 (antigen), signala 2 (kostimulacija) i signala 3 (posredovani polarizirajući signali topivim ili membranski vezanim faktorima). Na sličan način oni mogu potaknuti i voditi diferencijaciju limfocita B prema plazma stanicama. Dendritičke stanice i makrofagi učinkovito preuzimaju velike antigene (kao što su čestice, imunološki kompleksi i virus koji putuju kroz subkapsularni sinus) i prezentiraju ih naivnim limfocitima B u perifernim limfoidnim organima [6].

1.1.2. Humoralna imunost

Imunost posredovana protutijelima naziva se humoralna imunost. Limfociti B razvijaju se u koštanoj srži i ključni su za humoralnu imunost. Oni proizvode protutijela (imunoglobuline) koji prepoznaju i vezuju se za patogene, označavajući ih za uništenje od strane drugih dijelova imunskog sustava. Protutijela prepoznaju jedinstvenu molekulu patogena, zvanu antigen, preko Fab varijabilne regije. Svaki vrh "Y" protutijela sadrži paratop koji je specifičan za jedan određeni epitop na antigenu, čime se ove dvije strukture precizno vežu tvoreći imunokomplekse. Premda je osnovna struktura svim protutijelima zajednička, variranjem primarnog slijeda aminokiselina ona poprimaju veliki broj različitih konfiguracija. Monomer je osnovna jedinica protutijela i ima izgled slova Y. Sastoji se od dva laka (κ ili λ) i dva teška (α , γ , ϵ , δ ili μ) peptidna lanca međusobno povezana disulfidnim vezama. Teški lanac ima jednu varijabilnu i tri konstantne domene, a laki po jednu varijabilnu i jednu konstantnu. Varijabilne domene čine mjesto na koje se veže antigen (Fab). Konstantne domene (Fc) imaju efektorsku funkciju i određuju biološka svojstva molekule prema kojima se u čovjeka se razlikuje pet razreda protutijela: imunoglobulin A (IgA), imunoglobulin D (IgD), imunoglobulin E (IgE), imunoglobulin G (IgG), imunoglobulin M (IgM) [7]. Imunoglobulini su heterodimerne molekule sastavljene od dvaju lakih lanaca i dva teška lanca povezanih disulfidnim vezama. Protutijela razreda IgM i IgA nazivaju se imunoglobulinskim polimerima jer pored osnovnih

četveročlanih jedinica imaju i dodatne neimunoglobulinske lance. Razina imunoglobulina u plazmi odraz je brzine sinteze i brzine razgradnje protutijela. Tako se u serumu nalazi oko polovina ukupne količine prisutnih IgG u tijelu, oko 2/3 IgA i 1/4 IgM [7].

Protutijela koja se pojavljuju u prvom kontaktu sa stranim antigenom su razreda IgM, a slijede IgG i IgA. Što dulje traje imunoreakcija, to se stvara širi spektar specifičnosti protutijela za antigen. Za sekundarnu reakciju dovoljna je manja doza antigena od one u primarnoj reakciji, a faza indukcije gotovo da je upola kraća. Visoki titar protutijela odnosi se pretežno na razred IgG i traje dulje negoli u primarnoj reakciji.

Imunoglobulin G (IgG) je najznačajniji i najzastupljeniji serumski imunoglobulin koji čini oko 75% ukupnih imunoglobulina. Njegova je koncentracija izrazito ovisna o antigenskoj stimulaciji. On je glavni imunoglobulin koji se stvara u sekundarnoj reakciji, a najvažnija mu je funkcija neutraliziranje toksina, aktiviranje komplementa i poboljšanje fagocitoze opsonizacijom. Prema strukturi i funkciji razlikuju se četiri podrazreda: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Podrazredi IgG1 i IgG3 mogu se vezati za makrofage i bez prisutnosti antigena i imaju svojstvo aktivacije sustava komplementa odnosno skupa membranskih i serumskih proteina koji kao dio humoralne imunosti sudjeluju u uklanjanju stranih molekula [8].

Imunoglobulin A (IgA) je po količini drugi imunoglobulin u plazmi i prvi u ekstravaskularnim tekućinama, posebno vanjskim sekretima. IgA je sastojak sline, suza, sekreta probavnog sustava, bronhalnog sekreta, vaginalnog, nazalnog sekreta i kolostruma. Njegova osnovna funkcija je lokalna zaštita sluznica od virusa i bakterija. Agregati IgA mogu aktivirati komplement alternativnim putem, ali nije sigurno da li to ima biološko značenje. Također, IgA smanjuje apsorpciju neživih makromolekularnih antigena kroz sluznicu crijeva nakon imunizacije [2].

Imunoglobulin M (IgM) čini oko desetinu mase serumskih imunoglobulina, a zbog velike molekularne mase naziva se makroglobulinom. IgM je prvi imunoglobulin koji se pojavljuje u primarnoj reakciji. On je najuspješniji u vezanju komplementa jer je dovoljna samo jedna jedina molekula da pokrene niz lančanih reakcija aktivacije komplementa. Najvažnija uloga IgM je zaštita intravaskularnog prostora od bakterijemije. Jedini je imunoglobulin što se stvara protiv određenih ugljikohidratnih antigena na površini eritrocita koji određuju krvne grupe, primjer AB0 sustav. Taj razred uz IgD je najzastupljeniji na površini limfocita B [2].

Imunoglobulin E (IgE) najmanje je zastupljen razred u serumu. IgE ne prolazi kroz posteljicu, a njegova proizvodnja započinje već u rano fetalno doba. Ovaj termolabilni razred imunoglobulina čine reagini, protutijela koja posreduju u atopičnim alergijskim reakcijama. Ona imaju svojstvo homocitotropnosti tj. svojim ulomkom Fc čvrsto se vežu za receptore FCεR na površini mastocita i bazofila [2].

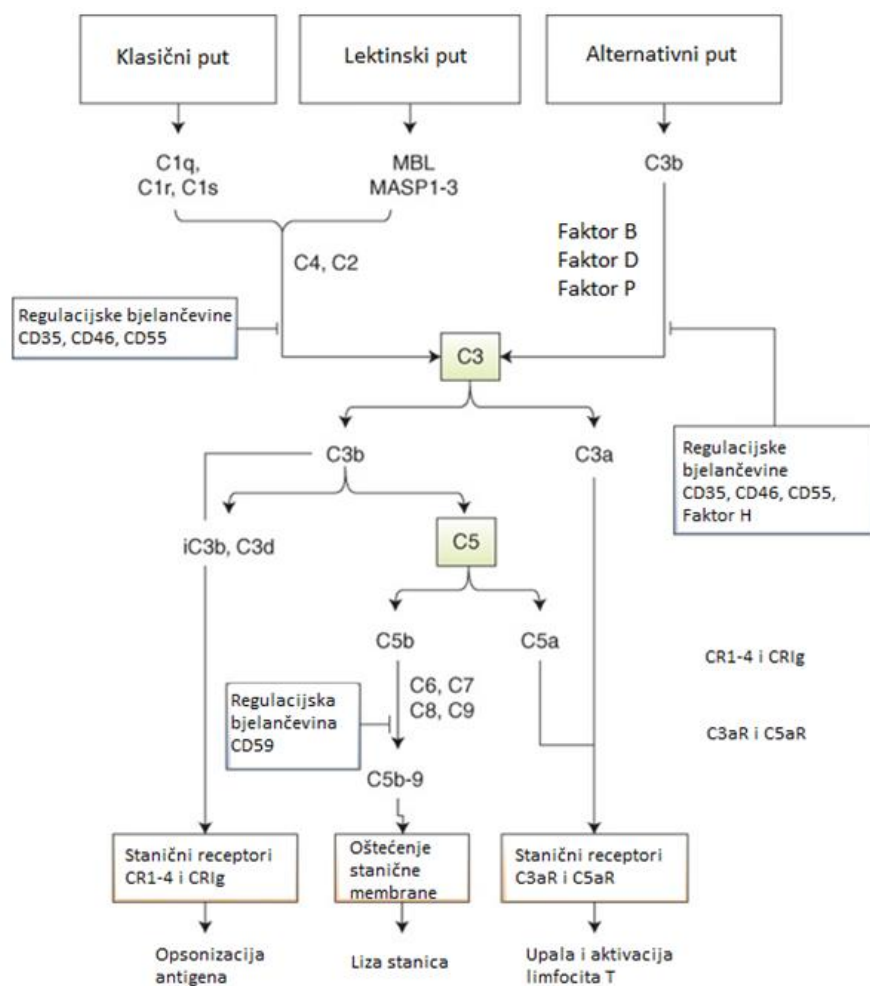
Imunoglobulin D (IgD) obično se nalazi na površini B limfocita zajedno s drugim razredima imunoglobulina. Funkcija IgD još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, ali pretpostavlja se da igra ulogu u aktivaciji B limfocita i njihovom odgovoru na antigene. IgD također može djelovati kao receptor za antigene na površini stanica, što se odnosi na sposobnost imunoglobulina da prepoznaju i vežu se za specifične antigene. Iako se IgD ne nalazi u visokim koncentracijama u krvotoku kao IgG ili IgM, smatra se ključnim dijelom imunološkog sustava. Njegova puna uloga i mehanizmi djelovanja još uvijek su predmet istraživanja u imunologija [2].

1.1.3. Sustav komplementa

Sustav komplementa ključni je dio imunskog sustava koji povezuje urođeni i stečeni imunitet. Sastoji se od proteinskih komponenti koje djeluju kao posrednici humoralne imunosti. Komponente sustava komplementa uobičajeno se nalaze u inaktivnom obliku, a mogu se aktivirati klasičnim, lektinskim ili alternativnim putem (Slika 1.).

Aktivacija klasičnim putem najčešće počinje međusobnim prepoznavanjem i reagiranjem komponente komplementa C1 s molekulama protutijela. Protutijelo stječe sposobnost prepoznavanja C1 tek nakon vezanja sa specifičnim antigenom. Time se mijenja prostorna konfiguracija protutijela pa se na ulomku Fc otkriva vezno mjesto za C1. Proces aktivacije pokrenut će se ako se bar dva (od njih šest) aktivna mjesta istodobno vežu sa dva različita ulomka Fc. Najveću sposobnost aktivacije imaju molekule IgM, zatim IgG1 i IgG3, te donekle IgG2. Ostali imunoglobulini ne mogu ga aktivirati klasičnim putem. IgM duguje svoju veliku sposobnost aktivacije komplementa zbog toga što na svojoj molekuli ima 5 ulomaka Fc, pa je jedna molekula IgM dovoljna za početak aktivacije. Klasični put se inicira vezanjem specifičnih antitijela (najčešće IgM ili IgG) na antigenske strukture na površini patogena. Ovo ključno vezanje inicira aktivaciju C1 kompleksa, koji se sastoji od C1q, C1r i C1s. Kada C1q prepozna i veže antitijela, aktivira se enzimski dio kompleksa (C1r i C1s), što rezultira aktivacijom C4 i C2 komponenti. Aktivirane C4 i C2 tvore C3 konvertazu, ključnu točku u

klasičnom putu. C3 konvertaza zatim cijepa komponentu C3, generirajući fragmente C3a i C3b. C3b ima ključnu ulogu u daljnjem tijeku reakcije, vezujući se na površinu patogena i potičući daljnju aktivaciju komplementarnih komponenti. Ova kaskada događaja rezultira formiranjem kompleksa komplementa, uključujući C5b, C6, C7, C8 i C9, koji zajedno čine membranski napadni kompleks. Membranski napadni kompleks ima sposobnost probijanja staničnih membrana patogena, što dovodi do njihove lize i uništavanja. Osim toga, C3b potiče fagocitozu, proces u kojem prepoznaju i unose patogene označene C3b. Zatim počinje cijepati C5, pa uključuje C5 konvertazu klasičnog (C4b2aC3b) ili alternativnog (C3bBbC3b) puta. Cijepanjem C5 nastaje snažan anafilatoksin C5a i fragment C5b, koji pokreće terminalni dio kaskade, zajedničke za sve aktivacijske puteve [9]. Lektinski put aktivacije – sličan je klasičnom, no za njega nisu potrebna protutijela, pa se može smatrati jednim od nespecifičnih mehanizama imunološke obrane. Aktivacija započinje tako da se manozna i drugi šećeri na površini spoje sa serumskom bjelančevinom zvanom lektin koji veže manozu (engl. *mannose-binding lectin*, MBL), a građom je vrlo sličan komponenti C1q klasičnog puta. Alternativni put aktivacije – za njega također nije potreban kompleks antigen-protutijelo, pa time i on pripada nespecifičnom mehanizmu imunološke obrane. Zasniva se na neprekidnoj spontanoj hidrolizi C3, pri čemu nastaje C3(H₂O) uz koji se veže plazmatski protein faktor B [10].



Slika 1.

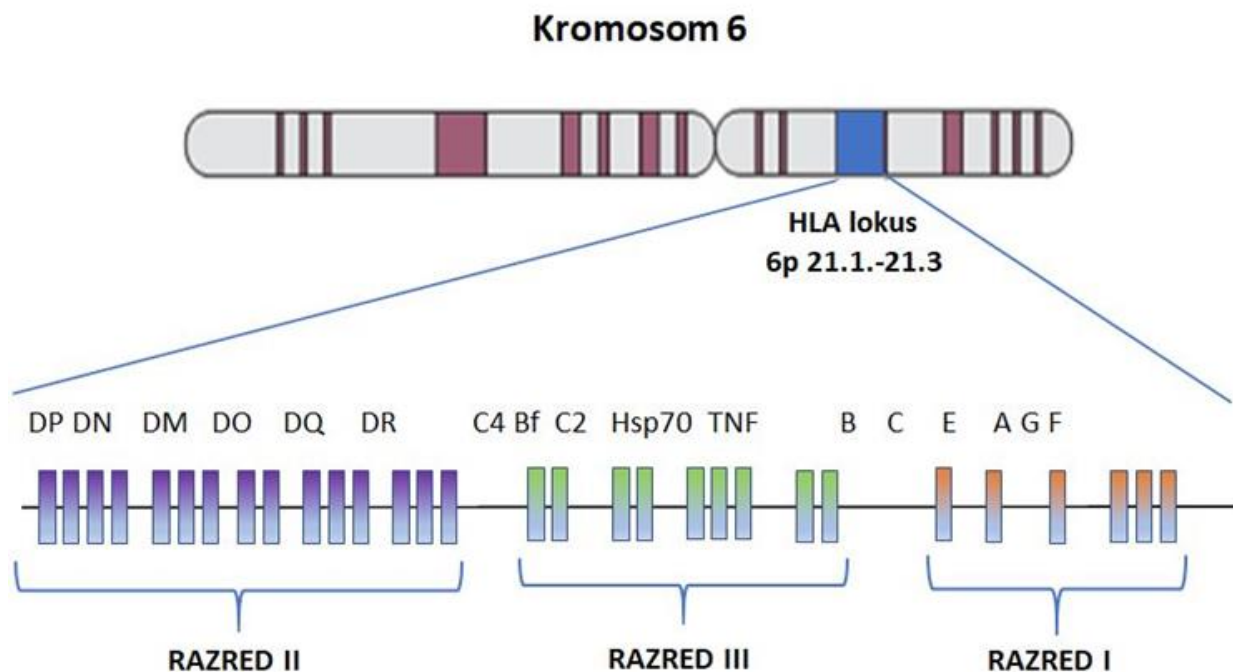
Aktivacija komplementa klasičnim, alternativnim i lektinskim putem. (Preuzeto i prilagođeno prema: [11]).

Sustav komplementa također ima ulogu u različitim fiziološkim procesima, kao što su kontrola upalnih reakcija, eliminacija imunološki označenih stanica te poticanje obrambenih mehanizama tijela. Proučavanje sustava komplementa ima širok spektar kliničkih značajki, uključujući ulogu u autoimunim bolestima, transplantaciji, upalnim bolestima i drugim patološkim stanjima. Većina komponenti komplementa nastaje u jetri, no neke se mogu stvarati i u epitelnim stanicama tankog crijeva, te u makrofagima i monocitima [10].

1.2. Glavni sustav tkivne podudarnosti

Glavni sustav tkivne podudarnosti u ljudi, sustav HLA, kodira molekule na površini stanice, specijalizirane za predočavanje antigenskih peptida receptorima limfocita T. Kompleks gena HLA (200 gena) nalazi se na kratkom kraku kromosoma 6 i zauzima područje od 4 milijuna parova baza u jezgri DNA, što čini oko 1% ljudskog genoma. Shematski prikaz raspodjele regija HLA koje se nalaze na kratkom kraku kromosoma 6 prikazan je na slici 2. Glavno obilježje ovog sustava su brojni polimorfizmi [12]. Na temelju najnovijeg završavanja nomenklature (siječanj 2024. godine) postoji 38 008 HLA i srodnih alela opisanih nomenklaturom HLA i uključenih u IPD-IMGT/HLA bazu podataka (<https://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>).

Sustav HLA dijeli se u tri razreda: razred I (A, B i C), razred II (DP, DM, DO, DQ i DR) i razred III (Slika 2.). Izvan kompleksa HLA nalazi se nekoliko gena strukturno sličnim genima razreda I, a nazivaju se genima HLA Ib (kako bi se razlikovali od klasičnih gena HLA razreda I, te su slabo polimorfni. Genska obitelj MIC pripada genima HLA Ib i sastoji se od pet gena od kojih samo MIC-A i MIC-B stvaraju odgovarajuće molekule. Osim navedenih u slabo polimorfne, pseudogene spadaju i geni HLA razreda I (HLA-H,-J,-K,-L). Geni koji kodiraju $DM\alpha$ i $DM\beta$ lance, kao i geni koji kodiraju α i β lance DO molekule ($DO\alpha$ odnosno $DO\beta$), također se nalaze u regiji razreda II. Među genima HLA nalaze se i geni razreda III koji se od ostala dva razreda HLA razlikuju po tome što uloga njihovih produkata nije prezentacija antigena. Uključuju gene odgovorne za sintezu komponenti komplementa (C2, C4A, C4B), čimbenika tumorske nekroze, faktora B te proteina toplinskog šoka (engl. *heat shock proteins* – HSP) [13].



Slika 2. Shematski prikaz raspodjele regija HLA koje se nalaze na kratkom kraku kromosoma 6

1.2.1. Molekule HLA razreda I

Molekule HLA razreda I nalaze se na svim stanicama s jezgrom u obliku heterodimernih glikoproteina vezanih na membranu. Stvaraju kompleks s unutarstaničnim peptidima koji spregnutim prepoznavanjem aktivira CD8⁺ citotoksične limfocite T. Unutarstanični peptidi se razgrađuju djelovanjem citosolnih proteaza koje tvore proteasom, kompleks u čiju šupljinu ulaze antigeni, a sastoji se od četiri prstena koji tvore cilindar obložen proteolitičkim podjedinicama. Manji peptidi posredovanjem prijenosnih proteina TAP 1 i TAP 2 (od engl. transporter associated with antigen processing), prelaze iz citosola u endoplazmatsku mrežicu [14].

Sinteza molekule HLA razreda I započinje u ribosomima gdje se sintetizira α lanac. Prijenosom u endoplazmatsku mrežicu spaja se s kalneksinom. Kada se na α lanac veže β 2 mikroglobulin, molekula se odvoji od kalneksina i spaja s kalretikulinom. Tada se na TAP prijenosnike veže tapasin, a na kalretikulin izomeraza Erp57 što omogućuje povezivanje molekule HLA s antigenim peptidima. Kompleks HLA razreda I sa stranim peptidom odvaja se od sustava bjelančevina i kroz Golgijev aparat prenosi na površinu stanice [15].

1.2.2. Molekule HLA razreda II

Način predočavanja peptida uz molekule HLA razreda II u odnosu na razred I je posve različit. Antigeni HLA razreda II nalaze se na posebnim stanicama koje predočuju antigen (dendritične stanice, makrofagi, limfociti B). Makrofagi i limfociti B ograničenog su djelovanja, te predočuju antigen samo u sklopu molekula HLA razreda II već aktiviranim CD4+ limfocitima T. Procesom endocitoze izvanstanični antigeni ulaze u endosome stanice gdje se razgrađuju djelovanjem kiselih proteaza, poput katepsina B, D, S i L. Molekule HLA razreda II nakon sinteze na ribosomima ulaze u endoplazmatsku mrežicu u kojoj se tri molekule HLA vežu za jedan invarijantni lanac te kalneksin. Iz endoplazmatske mrežice izlazi mjehurić s kompleksom molekule HLA razreda II i invarijantnog lanca koji se stapa s endosomima. Invarijantni lanac se razgrađuje, a na njegovo mjesto se veže peptid. Kompleks molekule HLA razreda II i stranog peptida prenosi se na površinu stanične membrane gdje aktivira CD4+ pomoćničke limfocite T koji dalje sudjeluju u razvoju stanične i humoralne imunosti [16].

1.3. Transplantacija i transplantacijska reakcija

Transplantacija je metoda izbora za liječenje bolesnika s terminalnim stadijem kroničnih bolesti, pa tako i za bolesnike sa kroničnim bubrežnim zatajenjem. Prije same transplantacije i prije donošenja konačne odluke o mogućnosti transplantacije moraju se isključiti ili utvrditi apsolutne i relativne kontraindikacije, kao i druga stanja koja zahtijevaju dodatnu pripremu [18]. Apsolutne kontraindikacije su: proširena maligna bolest s predviđenim kratkim trajanjem života, HIV pozitivitet, aktivna infektivna bolest i/ili bilo koja bolest s očekivanim trajanjem života manjim od dvije godine. Relativne kontraindikacije su: infekcija, koronarna srčana bolest, aktivni hepatitis, aktivna ulkusna bolest, periferna okluzivna arterijska bolest, cerebrovaskularna bolest, aktivno korištenje opojnih tvari, slabo kontrolirana psihoza, dokazana nesuradnja bolesnika [18].

Brojna istraživanja dokazala su povezanost sustava HLA s uspjehom transplantacije bubrega. Važnost sustava HLA u transplantaciji organa je u imunološkom prepoznavanju stranih antigena (molekula) i poticanju imunološke reakcije odbacivanja. Glavnu ulogu u transplantacijskoj imunološkoj reakciji imaju antigeni (molekule) razreda I HLA-A, -B i -C te antigeni (molekule) razreda II HLA-DR, -DQ i -DP.

Transplantacijska reakcija je imunoreakcija prema nepodudarnim molekulama presatka. Ovo svojstvo u transplantaciji tkiva i organa predstavlja najveću prepreku uspješnosti postupka. Tijekom transplantacije umjetnim se putem unosi velika količina alogernih molekula koje su domaćinu u manjoj ili većoj mjeri strane. Prema antigenima presatka koje primatelj nema razvit će se imunosna transplantacijska reakcija koja ugrožava funkciju presađenog tkiva ili organa te može uzrokovati odbacivanje presatka. Početno oštećenje organa povećava ekspresiju antigena HLA na stanicama presatka, te dovodi do otpuštanja atehzijskih molekula, kemokina i citokina koji potiču prirodni imunosni odgovor posredovan stanicama i/ili protutijelima [19]. Izvršne stanice prirodne imunosti su prirodno-ubilačke stanice NK koje uništavaju ciljnu stanicu te sudjeluju u aktivaciji stečene imunosti [20]. Humoralnu prirodenu imunost čine prirodna protutijela na antigene iz sustava krvnih grupa, sustav komplementa, kolektini, pentraksini i ficolini. Uz prirodenu imunost postupkom transplantacije organa dokazi do aktivacije stečene stanične i humoralne imunosti u kojoj su molekule HLA najvažniji antigeni, a ključne stanice su limfociti T i B.

1.3.1. Imunoreakcija odbacivanja posredovana stanicama

Kod zdravih stanica peptidi u utoru molekule HLA potječu iz autoloških proteina te citotoksični T-limfociti na njih neće reagirati, odnosno neće ih prepoznati kao strani antigen. Međutim, ako se u utoru molekule HLA nalaze peptidi koji u sebi sadrže izmijenjene sekvence (npr. mutacije kod tumora), koji mogu biti i podrijetlom od mikrobnog antigena (npr. pri virusnim infekcijama) ili stranih polimorfnih gena (npr. iz presatka), CD8+ limfociti T će ovakve stanice prepoznati kao strane i započeti kaskadu imunoloških reakcija s ciljem njihovog uništenja [21].

1.3.2. Imunoreakcija odbacivanja posredovana protutijelima

Humoralni imunosni odgovor nastaje kao reakcija na dostupne, izvanstanične strane antigene stvaranjem protutijela. Organizam je sposoban stvoriti protutijela na svaki strani antigen zahvaljujući izrazitom polimorfizmu slijeda aminokiselina u dijelu molekule koja prepoznaje i veže antigen. Protutijela mogu uzrokovati akutni ili kronični oblik odbacivanja presatka [22]. Dio limfocita B diferencira se u populaciju dugovjekih memorijskih stanica koje su jedan od nositelja imunološkog pamćenja. Protutijela oblažu komplementarne molekule

presatka što dovodi do aktivacije komplementa ili stanica NK. Komplement potiče opsonizaciju, a sam se aktivira do kompleksa MAC (od engl. *Membrane Attack Complex*) koji uzrokuje oštećenje membrane i lizu stanice [23]. Stanice NK djeluju mehanizmom citotoksičnosti posredovane protutijelima (od engl. *Antibody-Mediated Cell Cytotoxicity*, ADCC). Vezanje Fc receptora stanica NK na imunoglobuline IgG1 i IgG3 razreda potiče reakciju ispuštanja perforina i granzima u ciljnu stanicu i konačnu apoptozu [24]. Ponovni kontakt sa istim antigenom aktivirat će stanice s pamćenjem te će manja količina antigena uzrokovati bržu i jaču reakciju, sa višim titrom protutijela IgG. Reakcija traje duže u odnosu na primarni odgovor. Vrijeme poluživota protutijela IgG je desetak puta veće od poluživota protutijela IgE razreda. Liječenje imunosupresivnim lijekovima ubrzava katabolizam protutijela IgG. Veza između antigena i protutijela je reverzibilna i slaba, u najvećoj mjeri ovisi o stupnju prostorne podudarnosti što znači da je veza najjača pri najmanjoj udaljenosti između molekula.. Čvrstoća veze, odnosno afiniteta protutijela, ovisio Van der Walsovim silama, elektrostatskim silama, vodikovim vezama, hidrofobnim vezama, pH, ionskoj jakosti medija i temperaturi. Dok afinitet definira reakciju epitopa i paratopa, aviditet označuje čvrstoću veze antigena i protutijela. U transplantaciji dužina hladne ishemije povećava sintezu C3 komponentne komplementa u presatku što ima značajan utjecaj u aktivaciji komplementa [25]. Tijekom reperfuzije organa dolazi do stvaranja C5a i C5b-9 kompleksa koji imaju izravno toksično djelovanje na epitel bubrežnih tubula što uzrokuje akutnu tubularnu nekrozu [26]. Moždana smrt davatelja povećava izražaj nekih komponenti komplementa poput C1q, C1r, C1s, C2, C3, C4, C6, i faktora B kao i njihovih gena što objašnjava bolje rezultate transplantacije organa sa živih darovatelja [27].

1.4. Protutijela HLA

HLA-specifična protutijela nastaju kao odgovor imunskog sustava na strane antigene HLA. Afinitet vezanja s antigenom i razred proizvedenih protutijela ovise o različitim čimbenicima, kao što su put imunizacije, količina i struktura stranih antigena, postojanost i vrsta imunološke reakcije i imunološki status domaćina. Antigeni podražaji koji kod primatelja dovode do stvaranja protutijela na nepodudarne molekule HLA mogu se pojaviti tijekom trudnoće, transplantacije ili transfuzije krvi. Međutim, neki bolesnici razvijaju protutijela HLA i u nedostatku bilo kojeg od ovih imunizirajućih događaja [28].

Protutijela se vežu na specifične epitope na površini HLA antigena. Epitopi mogu biti prisutni na jednom antigenu HLA ili mogu biti zajednički za više antigena. Prijašnjih godina su se zajednički epitopi (za više antigena) definirali na temelju križno reaktivnih skupina (engl. - *Cross-Reactive Groups* - CREGs) u serološkom testiranju [29,30]. Napredak u tehnologiji doveo je do definiranja epitopa kao niza kontinuiranih kratkih linearnih sekvenci od najviše tri polimorfna aminokiselinska ostatka na površini molekule koji se nazivaju tripleti. Poslije se u indukciji odgovora protutijelima odredila uloga epleta s obzirom na konfiguraciju, dužih i često diskontinuiranih sekvenci polimorfnih aminokiselina koje se nalaze na položaju dostupnom protutijelima [31].

Danas se za kvantificiranje nepodudarnosti između epleta/tripleta HLA davatelja i primatelja, mogu koristiti računalni programi kao što su *HLAMatchmaker*, *PIRCHE* i drugi [32].

HLAMatchmaker je strukturno utemeljen algoritam koji alele HLA smatra nizovima različitih molekularnih konfiguracija koje mogu prepoznati HLA antitijela važna u transplantaciji. To je algoritam temeljen na eksperimentalno potvrđenim epitopima protutijelima definiranim polimorfnim aminokiselinama u konfiguracijama koje se nazivaju eplets. Time je moguće odabrati donora s minimalnim brojem nepodudarnih antigena HLA i izbjeći odgovora protutijela [32,33].

PIRCHE® je istraživačka, potpuno digitalna tehnologija podudaranja epitopa koja se temelji na kliničkim laboratorijskim podacima i najsuvremenijim algoritmima umjetne inteligencije. Ovaj računalni program predviđa i kvantificira pacijentov dugoročni imunološki rizik i odgovor na strane transplantate [33].

Tijekom posljednjih nekoliko godina, uz ulogu nepodudarnih tripleta, epleta, istražuje se i uloga različitih fizikalno-kemijskih svojstava nepodudarnih aminokiselina u stvaranju protutijela HLA nakon transplantacije. Treba naglasiti da uz određivanje epitopa i pravilnu upotrebu (ne)podudarnosti epitopa u kliničkoj transplantaciji treba definirati antigenost kao i imunogenost epitopa [34].

Klinički značaj protutijela HLA u transplantaciji organa

Protutijela HLA su značajni čimbenici rizika za odbacivanje presatka i posljedičnoneuspjeh transplantacije. U transplantaciji solidnih organa uvelike je prepoznata klinička važnost protutijela specifičnih za nepodudarne antigene HLA-A, -B, -DR i -DQ davatelja. Patel i Terasaki su 60-tih godina prošlog stoljeća prvi izvijestili da je prisutnost protutijela primatelja na nepodudarne antigene izraženih na donorskim limfocitima glavni faktor rizika za trenutni gubitak presatka. Njihovo je otkriće, potvrđeno u mnogim kasnijim studijama, bilo je toliko uvjerljivo da se čak i sada procjena imunogenog rizika za primatelje presatka i odluke o dodjeli bubrežnih presađaka temelje na testu toksičnosti limfocita [35]. Pri procjeni uloge HLA u kliničkoj transplantaciji dva su aspekta koja treba uzeti u obzir. Prvi, primatelj prepoznaje nepodudarne molekule HLA izražene na stanicama davatelja kao tuđe što izaziva imunogeni odgovor kod primatelja. Drugi aspekt je uloga protutijela na molekule HLA razreda I i molekule HLA razreda II kod bolesnika koji već imaju protutijela HLA prije transplantacije ili koji razviju protutijela HLA nakon transplantacije [35].

Kod bolesnika sa odgođenom funkcijom presatka (engl. *delayed graft function* – DGF), rizik od gubitka presatka dodatno se povećava ako su protutijela anti-HLA ili donor specifična protutijela anti-HLA prisutna prije transplantacije. U prisutnosti protutijela anti-HLA ili DSA, incidencija odbacivanja dokazanih biopsijom, uključujući odbacivanja posredovana protutijelima, značajno se povećava kod bolesnika s DGF-om i bez njega. U novije vrijeme transplantacije, osim ne imunoloških čimbenika, i prisutnost protutijela anti-HLA razreda I i II prije transplantacije povećava rizik od DGF-a [36].

1.5. Protutijela non-HLA

Protutijela koja nisu HLA protutijelapovezana su sa širokim rasponom autoimunih bolesti, ali mogu biti prisutna kao rezultat stvaranja protutijela nakon transplantacije, što je vjerojatno povezano s povećanom izloženosti antigenu u kontekstu oštećenja tkiva (Slika 3.) Moguće je da patogeni poput Epstein-Barr virusa, Parvo virusa B19, SARS-Covid 19 izazivaju imunosnu aktivaciju te pojavu autoreaktivnih protutijela usmjerenih na endotelne stanice, receptor za angiotenzin II i brojne strukturne proteine uključujući kolagene s posljedičnim gubitkom tolerancije prema vlastitom [38]. Protutijela non-HLA mogu se klasificirati kao aloprotutijela koja su usmjerena protiv polimorfnih antigena koji se razlikuju između primatelja i donora ili, češće, kao autoantitijela koja prepoznaju vlastite antigene koji su obično kriптиčni [39]. Ova protutijela prepoznaju non-HLA antigene koji se nalaze u različitim tkivima i stanicama kao što su endotelne vaskularne stanice, vaskularne stanice glatkih mišića, tubularne epitelne stanice, podociti, mezangijske stanice i imunološke stanice. Budući da je vaskularni endotel glavna komponenta između imunološkog sustava primatelja i presađenog bubrega, većina antigena su endotelni autoantigeni koji pokreću stvaranje protutijela non-HLA. Mehanizmi stvaranja protutijela non-HLA nisu u potpunosti još razjašnjeni. Obje vrste protutijela, i auto i aloantitijela usmjerena protiv antigena non-HLA dijele neke zajedničke korake u patofiziološkom mehanizmu njihova razvoja. Na slici 3. prikazani su različiti predloženi modeli koji uglavnom se temelje na znanstveno-istraživačkim studijama provedenim na životinjskim ili ljudskim staničnim kulturama [40].

Smatra se da je prvi korak u razvoju protutijela non-HLA ozljeda endotela i izlaganje neoantigenima ili kriптиčnim antigenima. Prije transplantacije ovu je ozljedu mogao uzrokovati jedan ili više čimbenika kao što su akutna ozljeda bubrega, kronična bubrežna bolest, lupusni nefritis, žarišna segmentalna glomeruloskleroza, dijabetes ili preeklampsija. Razvoj stvaranja protutijela non-HLA nakon transplantacije organa složeniji je i uključuje specifične čimbenike povezane s transplantacijom kao što su različiti uzroci ozljede endotela poput ishemijske-reperfuzijske ozljede, BK virusne nefropatije, akutnog pijelonefritisa presatka, protutijela anti-HLA, odbacivanje i vrsta primijenjene imunosupresije [39].

Terasaki je još 2003. zaključio da non-HLA imunološki čimbenici više pridonose neuspjehu transplantata nego protutijela HLA omjer je 40% nasuprot 20%. U različitim vrstama

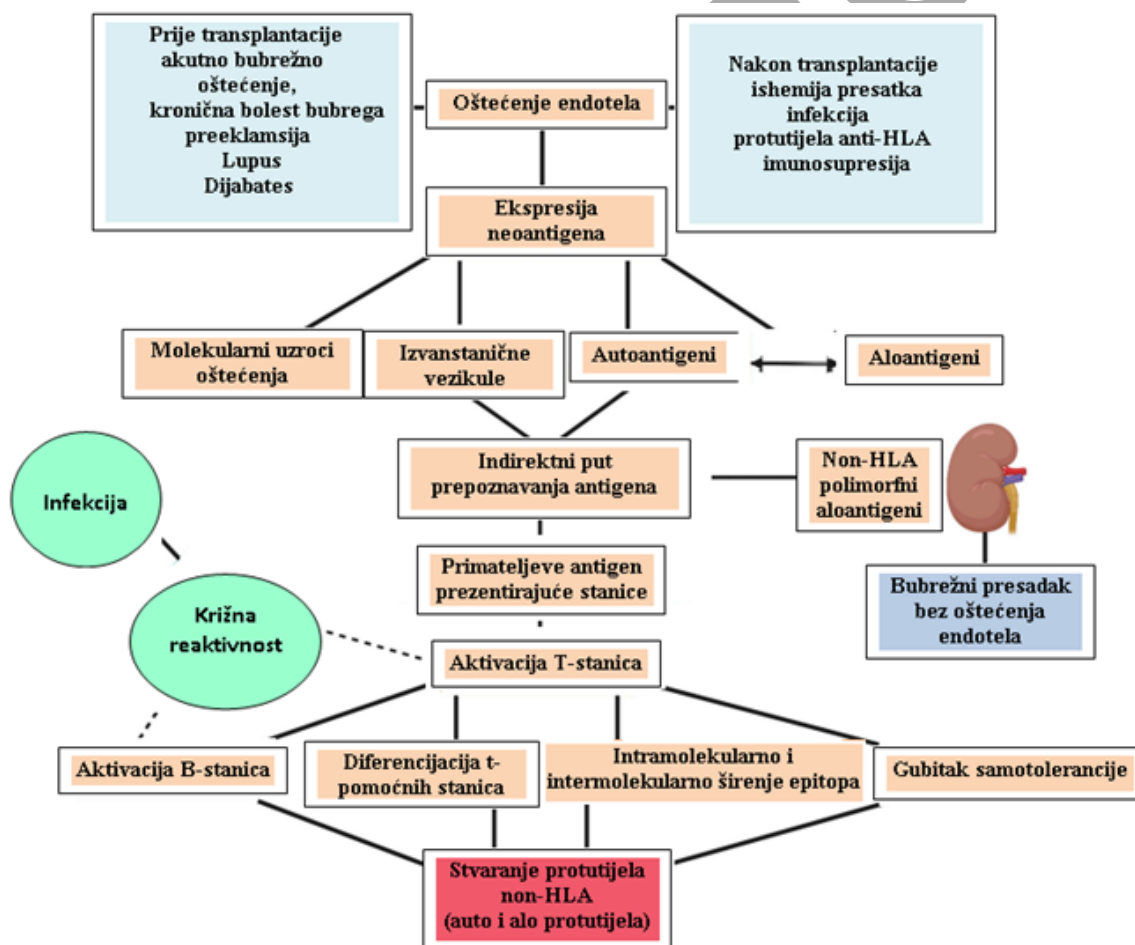
transplantacije solidnih organa, utvrđeno je da su protutijela non-HLA povezana s brojnim reakcijama posredovanim protutijelima i dugoročnim preživljenjem presatka [41].

Drugi mehanizam kojim protutijela usmjerena na unutarstanične non-HLA antigene doprinose odbacivanju mogla bi biti izloženost ovim antigenima nakon ishemijske reperfuzijske ozljede, procesa kojim bi protutijela mogla vezati svoje mete i inducirati oštećenje stanica [41]. Dosadašnja istraživanja pridonose sve većem broju dokaza da specifična protutijela non-HLA utječu na ishod presatka neovisno ali i u suradnji s protutijelima HLA specifičnim za davatelja [42].

1.5.1. Važnost određivanja protutijela non-HLA u predviđanju ishoda transplantacije

Sve je više dokaza o važnosti protutijela non-HLA u ishodu transplantacije, pa postoji potreba za procjenom učinkovitosti protutijela non-HLA i funkciju presatka. Donor specifična protutijela glavni su faktor uključen u patofiziologiju odbacivanja posredovanog protutijelima (engl. *antibody-mediated rejection* - ABMR). Međutim, u posljednja dva desetljeća, od prijavljenih slučajeva odbacivanja u nedostatku anti-HLA protutijela, počela se prepoznavati važnost protutijela usmjerenih protiv antigena izvan glavnog kompleksa histokompatibilnosti. Tako je utvrđena prisutnost protutijela non-HLA, a autoimunost se počela bolje razumjeti u patologiji odbacivanja. Do danas opisano je nekoliko protutijela non-HLA protiv endotelnih, epitelnih ili raznih proteina, a koje se može povezati s odbacivanjem presatka bubrega i drugih organa [39]. Za mnoge pacijente koji imaju disfunkciju presatka i pokazuju histološke karakteristike odbacivanja posredovanog protutijelima na biopsiji, nisu otkrivena donor specifična protutijela HLA (engl. *donor specific antibody* – DSA). Mnogi non-HLA specifični antigeni izražavaju se u vaskularnom endotelu i često se otkrivaju nakon ozljede presatka. Iako su još uvijek protutijela non-HLA u fazi istraživanja, pokazalo se da su protutijela non-HLA povezana s disfunkcijom ili odbacivanjem presatka [43]. Protutijela non-HLA mogu biti usmjerena protiv auto- ili aloantigena i biti prisutna prije transplantacije ili *de novo* stvorena nakon transplantacije. Pretpostavlja se da protutijela HLA i non-HLA imaju sinergistički učinak.

Dok protutijela HLA mogu izazvati oštećenje endotela i naknadno izlaganje autoantigenima što rezultira stvaranjem autoantitijela, upalni odgovor induciran protutijelima non-HLA može zauzvrat pojačati ekspresiju HLA i time učiniti presadak sklonijim aloimunom odgovoru. [44].



Slika 3. Mehanizmi stvaranja protutijela non-HLA. [Preuzeto i prilagođeno prema 39].

U proteklom desetljeću razvoj testova za otkrivanje i probir protutijela omogućio je identifikaciju sve većeg broja protutijela non-HLA. Kontinuirano se ulažu naporu za razvoj pouzdanih i osjetljivih dijagnostičkih testova za određivanje specifičnosti protutijela non-HLA. Ovo je bitno s obzirom na tehničke poteškoće testova i velike varijacije u prijavljenim pojavama protutijela. Osim toga, važno je uzeti u obzir specifičnost davatelja kako bi se izvukli klinički relevantni zaključci iz analiza protutijela non-HLA [45].

Unatoč velikom broju dostupnih testova, probir na prisutnost protutijela non-HLA još se uvijek rutinski ne upotrebljava u kliničkoj praksi u transplantacijskoj medicini [40]. Danas na tržištu postoji više komercijalno dostupnih testova koji se upotrebljavaju za određivanje specifičnosti protutijela non-HLA. Nekoliko je relevantnih staničnih testova (citotoksični testovi ili protočni citometrijski testovi unakrsne podudarnosti) i testova čvrste faze (Luminex, enzimski imunosorbentni testovi) koji mogu odrediti potencijalno aloreaktivna protutijela [40].

Komercijalni testovi za određivanje protutijela non-HLA razvijeni su i dalje se razvijaju s ciljem pružanja precizne i standardizirane analize potrebne za procjenu rizika odbacivanja organa i drugih komplikacija povezanih s transplantacijom. Svi ti testovi omogućuju određivanje specifičnosti protutijela non-HLA u serumu pacijenata prije ili nakon transplantacije. [40,45].

1.5.2. Tipovi protutijela non- HLA u transplantaciji bubrega

Do danas je dokazano da u transplantaciji bubrega nekoliko protutijela non-HLA ima ključnu ulogu.

Anti-endotelna stanična protutijela (AECA) ciljaju endotelne stanice koje oblažu krvne žile. Mogu pridonijeti vaskularnoj upali i disfunkciji presatka [39,40]. *Protutijela protiv receptora angiotenzina II tipa 1 (AT1R)* vežu se za receptore angiotenzina II tipa 1, što dovodi do vazokonstrikcije i upale. Povišene koncentracije AT1R povezane su sa odbacivanjem posredovanim protutijelima i lošijim ishodima presatka [39,40]. *Protutijela protiv glavnog histokompatibilnog kompleksa razreda I (MICA)*: mogu uzrokovati odbacivanje i gubitak presatka. MICA je antigen non-HLA s ekspresijom na endotelnim stanicama. *Protutijela protiv perlekana*: mogu doprinijeti glomerulopatiji i odbacivanju bubrežnog presatka. Perlekan je proteoglikan koji se nalazi u glomerularnoj bazalnoj membrani. [39]. Povećane koncentracije

serumskog katepsina L, protutijela Perklan/LG3 i urinarnog LG3 zabilježene su kod primatelja bubrežnog presatka s vaskularnim odbacivanjem, što je ukazalo da *protutijelo LG3* može poslužiti kao biomarker i patofiziološki element vaskularne ozljede. Pokazalo se da su anti-LG3 protutijela otežavajući čimbenici za ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu, a ta su protutijela bila povezana s imunološko posredovanim vaskularnim odbacivanjem, odgođenom funkcijom presatka i nižom funkcijom presatka 1 godinu nakon transplantacije [39]. *Protutijela protiv agrina* opisana su kod transplantiranih bolesnika s glomerulopatijom, značajkom kroničnog bubrežnog odbacivanja uzrokovanog protutijelima. Protutijela anti-agrin mogu se klasificirati kao autoantitijela, koja nastaju nakon ekspresije agrina kao neoantigena [39]. Kolagen tipa IV i fibronektin važni su sastojci glomerularne bazalne membrane, a kod ozljede tkiva postaju auto-antigeni. *Preformirana i de novo protutijela protiv kolagena tipa IV i fibronektina* povećavaju rizik od razvoja transplantacijske glomerulopatije. [39].

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. Ispitati specifičnosti i svojstva aktivacije komplementa protutijela non-HLA, kao i protutijela HLA sustava u oboljelih od terminalne bubrežne bolesti koji se nalaze na listi čekanja za transplantaciju bubrega.
 2. Odrediti korelaciju između protutijela non-HLA i komplement vezujućih protutijela non-HLA
 3. Odrediti korelaciju između određenih specifičnosti anti-HLA i protutijela non-HLA
 4. Odrediti korelaciju protutijela non-HLA sa osnovnom bolesti, prethodnim imunizirajućim događajima, metodom i vremenskim periodom dijalitičkog liječenja.
- Usporediti rezultate ovog istraživanja s dostupnim podacima iz literature

Osnovna hipoteza ovog istraživanja bila je da u bolesnika izloženih nekom od imunizirajućih događaja (prethodne trudnoće, transplantacije, transfuzije) dokazat će se prisutnost protutijela na antigene HLA. U većine bolesnika u završnom stadiju bubrežne bolesti koji su uključeni u listu čekanja za transplantaciju bubrega dokazat će se prisutnost protutijela non-HLA.

Specifičnost protutijela non-HLA bit će širokog spektra, a neka od protutijela imati će i svojstvo aktivacije komplementa te potencijalno kliničku važnost u transplantaciji bubrega.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno na uzorcima bolesnika koji su tijekom 2022. godine bili na listi čekanja za transplantaciju bubrega u Kliničkom bolničkom centru (KBC) Rijeka. Na listi čekanja za transplantaciju bubrega tijekom 2022. godine bio je prijavljen 81 bolesnik. U istraživanje su uključena 74 bolesnika, starija od 18 godina, čiji su uzorci seruma prije transplantacije testirani najmanje dva konsekutivna puta u godini metodom CDC i Luminex tehnikom uz dostupne podatke o prethodnim imunizirajućim događajima. Uzorci seruma rutinski su testirani u Laboratoriju za tipizaciju tkiva KBC-a Rijeka u svrhu probira na prisutnost i određivanje specifičnosti protutijela anti-HLA, koje se provodi svaka tri mjeseca, tj. četiri puta godišnje. Ovo istraživanje provedeno je na uzorcima seruma iz 2022. godine, u kojima je metodom CDC dokazana imunizacija u najvećem postotku (% PRA) i dokazan najveći postotak virtualnog PRA pomoću Luminex tehnike. Kod neimuniziranih ispitanika odabran je posljednji testirani uzorak seruma koji zadovoljava uključivanje u istraživanje.

Svi serumi ispitanika u ovom istraživanju testirani su na prisutnost protutijela anti-HLA i na protutijela non-HLA. Testiranja su provedena u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu KBC-a Rijeka prema zahtjevima Eurotransplanta, (čiji član je i Laboratorij za tipizaciju tkiva Rijeka), što znači da se od svih histokompatibilnih i imunogenetskih laboratorija traži da provode testiranje protutijela anti-HLA koristeći serume prethodno tretirane s etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA). Od svih tretiranih seruma se je nakon centrifugiranja odvojilo 38 µl seruma u koji je dodano 2 µl 6% otopine EDTA.

Za potrebe ovog istraživanja, na temelju uobičajenih postupaka Eurotransplanta, dijagnoze su podijeljene u tri skupine: imunološke, neimunološke i upalne. Opis dijagnoza u pojedinoj skupini naveden je u Prilogu 1. Iz anamnestičkih podataka dobiveni su podaci o tome jesu li na dijalizi i za one koji jesu kojom metodom se liječe i koliko dugo.

3.1.1. Uključni i isključni kriteriji

Uključni kriteriji: Bolesnici stariji od 18 godina, čiji su uzorci prije transplantacije testirani najmanje dva konsektivna puta u godini metodom CDC i tehnikom Luminex u KBC-u Rijeka uz dostupne podatke o prethodnim imunizirajućim događajima. Isključni kriteriji: U istraživanje nije uključeno šest bolesnika s liste čekanja koji nisu zadovoljili gore navedene i postavljene uvjete, odnosno testiranje nije bilo provedeno ili je bilo provedeno samo djelomično (osobe testirane manje od 2 puta u godini, uzorci bolesnika nisu testirani svim navedenim metodama), bolesnici mlađi od 18 godina, nema dostupnih relevantnih anamnestičkih podataka, dio testiranja provedeno u drugom centru, preminuli bolesnici tijekom 2022. godine.

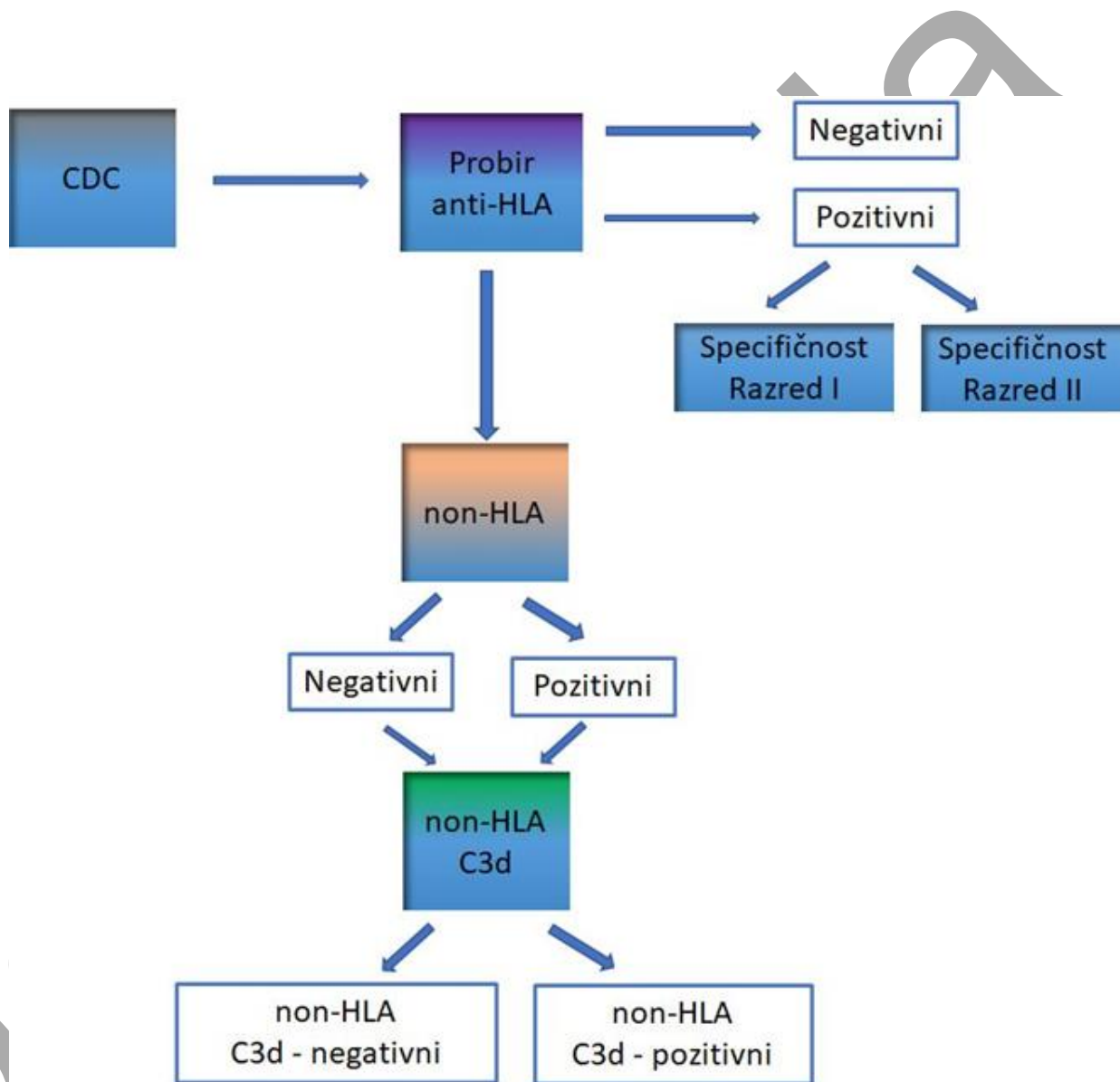
3.1.2. Etička načela istraživanja

Suglasnost ispitanika za sudjelovanje u istraživanju nije bilo potrebno jer se radi o anonimnom istraživanju, te je na sjednici Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Rijeka Klasa: 003-05/22-1/91, Ur.broj:2170-29-02/1-22-2 održanoj 19.kolovoza 2022. godine izdano odobrenje za provođenje istraživanja.

Podaci su prikupljeni u skladu s temeljnim etičkim i bioetičkim principima – osobni integritet (autonomnost), pravednost, dobročinstvo i neškodljivost – u skladu s Nirnberškim kodeksom i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije, a osigurana je zaštita tajnosti podataka dobivenih u istraživanju.

3.1.3. Plan provođenja testiranja

Plan provedenog istraživanja shematski je prikazan na Slici 4.



Slika 4. Shematski prikaz plana izvođenja testiranja

3.2. Upotrebljavani reagensi, kemikalije i materijal

Naziv	Proizvođač
RPMI 1640(N)	Lonza, Njemačka
DT-Dithiothreitol	Merck, SAD
L-Cystine	Merck, SAD
Trypan blue 3%o	Merck, SAD
Zečji komplement, liofiliziran (5 x 1 ml)	Inno-train Diagnostik, Njemačka Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Hrvatska
Natrij cloridi infundibile	
Pozitivna IgG kontrola	Inno-train Diagnostik, Njemačka
Pozitivna IgM kontrola	ET Leiden-NL, Nizozemska
Negativna kontrola: Humani AB serum	ZZTM-LTT Rijeka
Hanks solutio – HBSS	Euroclone, Italija
Terasakijeve pločice	Sarstedt, Njemačka
EDTA - Etilendiamintetraoctena kiselina	Merck Milipore, SAD
Lifecodes Single Antigen Class I – LSA I	Immucor GTI Diagnostics, SAD
Lifecodes Single Antigen Class II – LSA II	Immucor GTI Diagnostics, SAD
Lifecodes Non-HLA Antibody Kit – LNHLA	Immucor GTI Diagnostics, SAD
LIFECODES C3d Detection Kit	Immucor GTI Diagnostics, SAD
LIFECODES Lifescreen Deluxe Kit	Immucor GTI Diagnostics, SAD
HTS Millipore Multiscreen BV/ND Plates	Merck Milipore, SAD
SEALING TAPE Corning Thermowell	GREINER BIO-ONE, Austrija
Silverseal sealer, aluminium	GREINER BIO-ONE, Austrija
Sheat Fluid PLUS	Immucor GTI Diagnostics, Inc.
Luminex 200 Calibration Kit	Luminex / DiaSorin, Italija
Luminex 200 Performance Verification Kit	Luminex / DiaSorin, Italija
70 % Alkohol	KBC-RI -Ljekarna
10 % Varikina	TKI HRASNİK d.d., Hrvatska
Nastavci za pipete	Eppendorf, Austrija

3.3. Metode

3.3.1. Probir seruma na protutijela anti-HLA

U Laboratoriju za tipizaciju tkiva KBC-a Rijeka napravljen je probir seruma na prisutnost protutijela anti-HLA i određivanje njihove specifičnosti u bolesnika uključenih na Listu čekanja za transplantaciju bubrega u redovitom intervalu svaka tri mjeseca (četiri puta godišnje). Probir se izvodio usporedno metodom CDC-a i Luminex tehnologijom.

3.3.1.1. Testiranje metodom limfocitotoksičnosti ovisne o komplementu (metoda CDC)

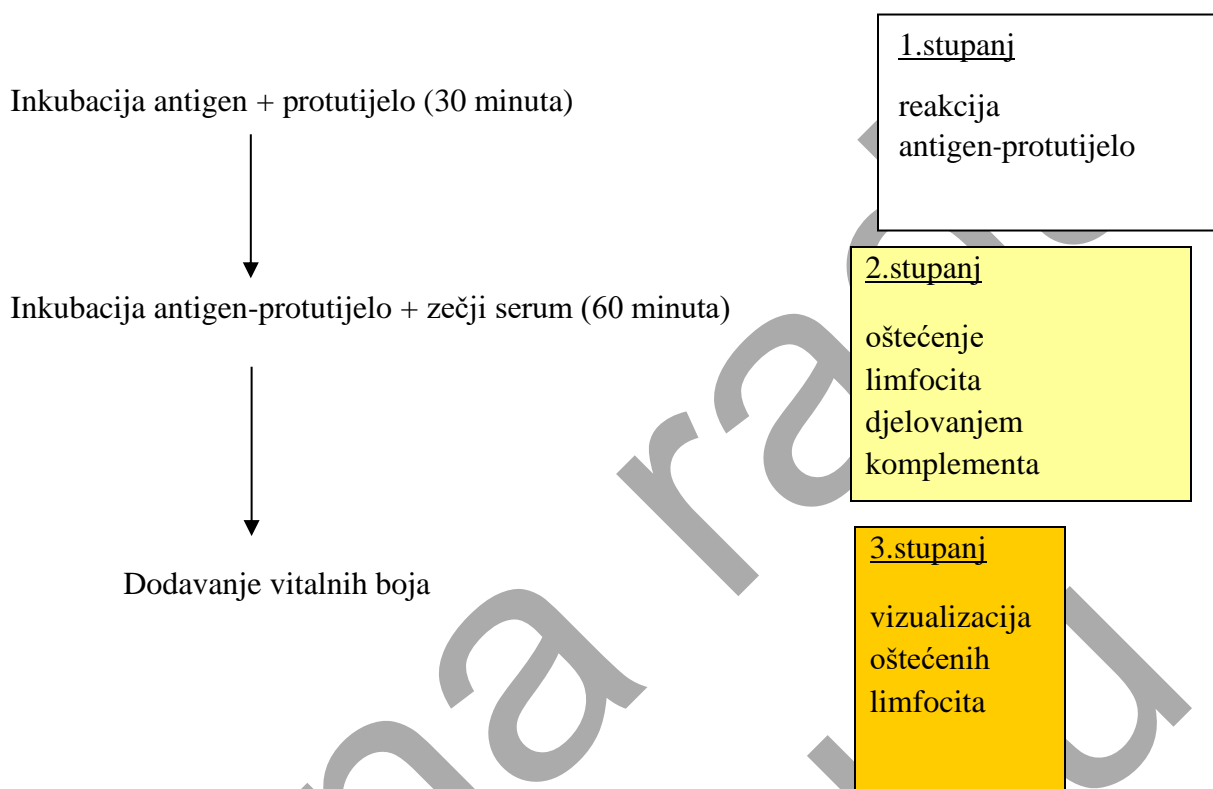
Serumi bolesnika testirani su pomoću panela limfocita s poznatim antigenima HLA. Limfociti iz panela inkubirani su sa serumima, a zatim je dodan zečji serum kao izvor komplementa. Ako su u serumu bila prisutna limfocitotoksična protutijela, ona su se vezala za specifičan antigen HLA na membrani limfocita, što je aktiviralo kaskadu komplementa i oštetilo membranu stanice stvaranjem završnog kompleksa. Za prikaz oštećenih i/ili mrtvih stanica upotrebljavale su se vitalne boje (tripan plavo, eozin) koje prodiru u limfocite kroz oštećenja na membrani i boje ih, što je vidljivo pod inverznim mikroskopom. Test se izvodio na sobnoj temperaturi (20°C – 25°C).

Rezultati testa očitani su inverznim mikroskopom prema bodovnoj skali odnosa oštećenih i vijabilnih limfocita prema slijedećem:

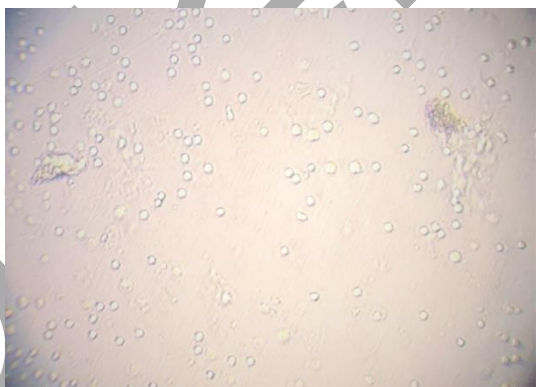
0	=	rezultat se ne može interpretirati
1	=	0% - 10% mrtvih stanica
2	=	11% - 20% mrtvih stanica
4	=	21% - 50% mrtvih stanica
6	=	51% - 80% mrtvih stanica
8	=	81% - 100% mrtvih stanica

Na Slici 5 shematski su prikazani postupci izvođenja testiranja metodom CDC. Slika 6 prikazuje žive limfocite (rezultat prema bodovnoj skali = 1), a Slika 7 prikazuje mrtve limfocite obojane tripan plavom bojom (rezultat prema bodovnoj skali = 8).

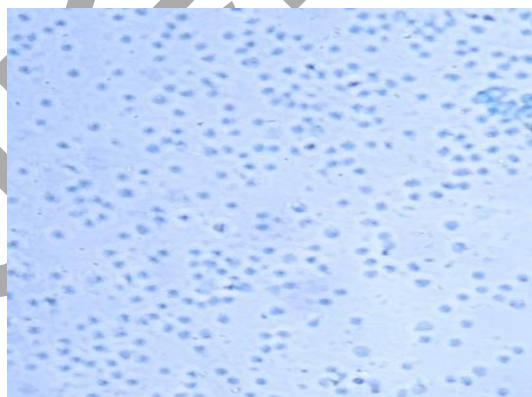
Shematski prikaz:



Slika 5. Shematski prikaz izvođenja testa CDC prikazanog po stupnjevima



Slika 6. Žive stanice – limfociti
(fotografija A. Mujić Franić)



Slika 7. Mrtve stanice – limfociti
(fotografija A. Mujić Franić)

Probir seruma ispitanika metodom CDC provodio se pomoću panela limfocita koji je obuhvatio 50 različitih davatelja limfocita. Panel limfocita poznatih antigena HLA odgovara sastavu i učestalosti koja se pojavljuje u populaciji stanovništva u Republici Hrvatskoj [46]. Svi serumi ispitanika koji su uključeni u probir testiraju se sa svim limfocitima iz panela

standardnom metodom CDC. Rezultati su očitani i prikazani kao postotak panel reaktivnih protutijela (% PRA) koji odražava stupanj imunizacije. Pozitivan rezultat testiranja metodom CDC definiran je kao postotak reaktivnih protutijela veći od 3%.

Stvorena protutijela anti-HLA mogu biti razreda IgM i/ili IgG. Smatra se da protutijela razreda IgM, za razliku od IgG protutijela, nemaju štetan učinak u transplantaciji bubrega. Za određivanje razreda kojem pripadaju stvorena protutijela anti-HLA, uzorci se testiraju sa i bez dodatka 2,3-dihidroksi-1,4-ditiolbutana (engl. *dithiothreitol* – DTT) [46]. DTT razara disulfidne veze u proteinu, pa tako i u molekuli IgM, te se ona raspada na monomere. Koncentracija DTT-a podešena je tako da razgradi disulfidne veze molekule IgM, ali ne i veze unutar protutijela IgG. Na ovaj način se u serumu ispitanika inaktiviraju samo protutijela razreda IgM, dok protutijela IgG ostanu intaktna. L-cistein štiti komponente komplemента od djelovanja DTT-a. DTT se dodaje prije prve inkubacije (antigen + protutijelo), dok se L-cistein dodaje u drugoj inkubaciji neposredno prije komplemента. Prisutnost protutijela anti-HLA i određivanje specifičnosti temelji se na analizi pozitivnih reakcija sa i bez DTT-a. Ako su u serumu prisutna protutijela anti-HLA razreda IgG, pozitivna reakcija metodom CDC bit će prisutna i sa i bez DTT-a. Ako je reakcija pozitivna bez DTT-a, a negativna s DTT-om, u serumu su prisutna protutijela razreda IgM [46]. Probir seruma metodom CDC s nesepariranim limfocitima (ukupna populacija limfocita T i B) omogućio je određivanje isključivo protutijela anti-HLA razreda I, budući da se antigeni HLA razreda I nalaze u membranama limfocita T i limfocita B. Zbog toga su, osim metodom CDC, svi serumi ispitanika testirani i tehnikom Luminex.

3.3.1.2. Probir seruma na protutijela anti-HLA razreda I i razreda II testom LMX

Probir seruma na prisutnost protutijela anti-HLA tehnikom Luminex napravljen je na dvije razine. Prva razina bila je probir seruma na prisutnost ili odsutnost protutijela anti-HLA. Ovaj probir učinjen je pomoću komercijalno dostupnog seta Lifecodes Lifescreen Deluxe (Immucor GTI Diagnostics, SAD) – LMX.

Test LMX se sastoji od setova mikrosfera konjugiranih s antigenima HLA razreda I i razreda II. Pomoću njega određivala se prisutnost protutijela IgG u serumu bolesnika.

Postupak:

Tubice s mikrosferama centrifugirane su 30 sekundi na 600 – 800 RCF i zatim vorteksirane barem 1 minutu kako bi se resuspendirale mikrosfere. Otopina konjugiranog proteina anti-ljudskog konjugata pripremljena je tako da je za svaki uzorak pipetirano 5 µl konjugata + 45 µl pufera za ispiranje. U jažice mikrotitarske ploče dodano je 100 – 300 µl destilirane vode, koja je nakon dviju do pet minuta uklonjena odsisavanjem pomoću vakuumpumpe. U svaku jažicu zatim je pipetom dodano 40 µl pufera za ispiranje. U odgovarajuće jažice na ploči pipetirano je po 12,5 µl negativnog i pozitivnog kontrolnog seruma, a zatim i po 12,5 µl seruma ispitanika. Na kraju je u svaku jažicu dodano po 5 µl dobro vorteksiranih mikrosfera. Pločica je prekrivena zaštitnom neprozirnom folijom te je inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi na laboratorijskoj tresilici u mraku (600 RPM). Nakon inkubacije ploče su isprane s puferom za ispiranje 4 puta, tako da je svaka jažica prvi put isprana sa 100 µl pufera za ispiranje, a zatim sa 250 µl još tri puta. Zatim je u jažice dodano 50 µl pripremljenog razrijeđenog konjugata. Pločica je zatim prekrivena zaštitnom neprozirnom folijom te je inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi na laboratorijskoj tresilici (600 RPM). Nakon inkubacije mikrosfere su dodatno razrijeđene s po 130 µl pufera za ispiranje u svaku jažicu. Pripremljeni uzorci očitani su pomoću uređaja Luminex 200 (Luminex/DiaSorin, Italija).

Svako testiranje praćeno je sustavom kontrole u cilju provjere aktivnosti reagensa te potvrde dobre tehničke izvedbe testa. Konačni rezultati testa LMX izraženi su kao pozitivni odnosno negativni za prisutnost protutijela anti-HLA razreda I i/ili razreda II (kvalitativna metoda). Rezultati su evaluirani kompjuterskim programom MATCH IT! Antibody (Immucor GTI Diagnostics).

3.3.1.3. *Određivanje specifičnosti protutijela anti-HLA testovima LSA I i LSA II*

Na uzorcima čiji je rezultat testom LMX bio pozitivan, testiranje se nastavilo drugom razinom testiranja – određivanjem specifičnosti protutijela anti-HLA razreda I i II pomoću testova Lifecodes Single Antigen – LSA I i / ili LSA II (Immucor GTI Diagnostics, SAD). Ovi testovi sadržavali su setove mikrosfera konjugiranih s molekulama HLA samo jedne specifičnosti. LSA I (od engl. *Lifecodes Single Antigen Class I*) sadrži setove mikrosfera od kojih je svaki set obložen antigenima HLA razreda I različitih specifičnosti. LSA II (*Lifecodes Single Antigen Class II*) sadržavao je setove mikrosfera obloženih antigenima razreda II. Za

razliku od testova LMX molekule HLA u testovima LSA su pročišćeni rekombinantni glikoproteini. Ovim testovima određene su specifičnosti protutijela IgG u serumu ispitanika stvorenih na antigene sustava HLA razreda I i II.

Sustav kontrole pri provođenju testova LSA uključuje i testiranje pozitivnog i negativnog kontrolnog seruma (komercijalni pripravci). Pozitivna kontrola bila je mikrosfera obložena s humanim IgG imunoglobulinom, a služi za provjeru reakcije konjugata s protutijelom HLA imunokompleksa. Negativna kontrolna mikrosfera nije bila konjugirana s molekulama HLA.

Postupak:

Tubice s mikrosferama centrifugirane su 30 sekundi na 600 – 800 RCF i zatim vorteksirane barem 1 minutu kako bi se resuspendirale mikrosfere. Otopina konjugiranog proteina anti-ljudskog konjugata pripremljena je tako da je za svaki uzorak pipetirano 5 µl konjugata + 45 µl pufera za ispiranje. U jažice mikrotitarske ploče dodano je 100 – 300 µl destilirane vode koja je nakon dviju do pet minuta uklonjena odsisavanjem pomoću vakuum pumpe. U svaku jažicu je zatim pipetom dodano 40 µl dobro vorteksiranih mikrosfera. U odgovarajuće jažice na ploči pipetirano je po 10 µl negativnog i pozitivnog kontrolnog seruma, a zatim i po 10 µl seruma ispitanika. Pločica je prekrivena zaštitnom neprozirnom folijom te je inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi na laboratorijskoj tresilici, u mraku (600 RPM). Nakon inkubacije ploče su isprane s puferom za ispiranje 4 puta tako da je svaka jažica pri put isprana sa 100 µl pufera za ispiranje, a zatim sa 250 µl još tri puta. Zatim je u jažice dodano 50 µl pripremljenog razrijeđenog konjugata. Pločica je zatim prekrivena zaštitnom neprozirnom folijom te je inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi na laboratorijskoj tresilici (600 RPM). Nakon inkubacije mikrosfere su dodatno razrijeđene s po 130 µl pufera za ispiranje u svaku jažicu. Pripremljeni uzorci očitani su pomoću uređaja Luminex 200 (Luminex/DiaSorin, Italija). Rezultati su evaluirani kompjuterskim programom MATCH IT! Antibody (Immucor GTI Diagnostics).

3.3.1.4. Određivanje prisutnosti i specifičnosti IgG protutijela non-HLA testom LNHLA

Svi uzorci seruma ispitanika uključeni u ovo istraživanje testirani su testom Lifecodes Non-HLA Antibody Kit (LNHLA) (Immucor GTI Diagnostics) za određivanje prisutnosti IgG

protutijela non-HLA. Test LNHLA sastoji se od setova različitih mikrosfera na koje su konjugirani pročišćeni rekombinantni ili komercijalno dostupni proteini izvan sustava HLA. U testu se nalazi 60 različitih antigenskih determinanti non-HLA vezanih na mikrosfere čime je bilo omogućeno određivanje 60 specifičnosti protutijela non-HLA (Prilog 2). Sustav kontrole uključivao je i testiranje pozitivnog i negativnog kontrolnog seruma (komercijalni pripravci). U reakciji s kontrolnim serumima vrijednosti MFI pozitivne kontrolne mikrosfere morale su biti $\geq 10\ 000$. Negativna kontrolna mikrosfera nije bila konjugirana s molekulama non-HLA. Testiranja su napravljena na aparatu Luminex 200 (Luminex/DiaSorin, Italija). Rezultati testa LNHLA evaluirani su kompjuterskim programom MATCH IT! Antibody (Immucor GTI Diagnostics).

Postupak :

Tubice s mikrosferama centrifugirane su 30 sekundi na 600 – 800 RCF i zatim vorteksirane barem 1 minutu kako bi se resuspendirale mikrosfere. Otopina IgG konjugata pripravljena je tako da je za svaki uzorak pripravljeno 5 μ l konjugata + 45 μ l pufera za ispiranje. U jažice mikrotitarske ploče dodano je 100 – 300 μ l destilirane vode koja je nakon dviju do pet minuta uklonjena odsisavanjem pomoću vakuum pumpe. U svaku jažicu zatim pipetom je dodano 40 μ l dobro vorteksiranih mikrosfera. U odgovarajuće jažice na ploči pipetirano je po 10 μ l negativnog i pozitivnog kontrolnog seruma, a zatim i po 10 μ l seruma ispitanika. Pločica je prekrivena zaštitnom neprozirnom folijom te je inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi na laboratorijskoj tresilici, u mraku (600 RPM). Nakon inkubacije ploče su isprane puferom za ispiranje 4 puta tako da je svaka jažica pri put isprana sa 100 μ l pufera za ispiranje, a zatim sa 250 μ l još tri puta. Zatim je u jažice dodano 50 μ l pripremljenog razrijeđenog konjugata. Pločica je zatim prekrivena zaštitnom neprozirnom folijom te je inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi na laboratorijskoj tresilici (600 RPM). Nakon inkubacije mikrosfere su dodatno razrijeđene s po 130 μ l pufera za ispiranje u svaku jažicu. Pripremljeni uzorci očitani su pomoću uređaja Luminex 200 (Luminex/DiaSorin, Italija). Rezultati su evaluirani kompjuterskim programom MATCH IT! Antibody (Immucor GTI Diagnostics).

3.3.1.5. *Određivanje prisutnosti komplement vezujućih protutijela non-HLA*

Za određivanje ima li dokazano protutijelo non-HLA svojstvo aktivacije komplementa, serumi svih ispitanika testirana su eksperimentalnim testom (LNHLA+C3d). Radi se o modificiranom testu LNHLA u kojem je umjesto IgG konjugata u drugoj inkubaciji upotrijebljen konjugat anti-C3d iz komercijalnog testa Lifecodes C3d Detection (Immucor GTI Diagnostics). Ovaj test time je postao kvalitativni test za otkrivanje komplementa vezanog na kompleks antitijelo/antigen u ljudskom serumu. Uz konjugat anti-C3d (anti-ljudsko C3d protutijelo konjugirano s fikoeritriinom) u eksperimentalnom testu upotrebljavani su i pozitivna kontrolna mikrosfera C3d, mješavina seruma netransfundiranih muškaraca kao izvor komplementa iz komercijalnog testa Lifecodes C3d Detection Kit (Immucor GTI Diagnostics).

Postupak:

U jažice mikrotitarske ploče dodano je 100 – 300 µl destilirane vode koja je nakon dviju do pet minuta uklonjena odsisavanjem pomoću vakuum pumpe. U svaku jažicu dodano je po 32 µl dobro vorteksiranih mikrosfera sa specifičnostima non-HLA iz testa LNHLA i 0,8 µl pozitivne kontrolne mikrosfere C3d. Pipetirano je po 8 µl negativnog i pozitivnog kontrolnog seruma, a zatim po 8 µl seruma ispitanika. Pločica je prekrivena zaštitnom neprozirnom folijom te je inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi na laboratorijskoj tresilici (600 RPM). Nakon inkubacije u svaku jažicu dodano je po 24 µl komplement seruma (C3dCS). Pločica je prekrivena zaštitnom neprozirnom folijom te je inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi na laboratorijskoj tresilici (600 RPM). Nakon inkubacije ploče su isprane s puferom za ispiranje 4 puta tako da je svaka jažica pri put isprana sa 100 µl pufera za ispiranje, a zatim sa 250 µl još tri puta. Nakon četvrtog ispiranja pipetirano je po 40 µl nerazrijeđenog C3d konjugata po jažici. Pločica je prekrivena zaštitnom neprozirnom folijom te je inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi na laboratorijskoj tresilici (600 RPM). Nakon inkubacije uzorci su isprani dva puta, prvi put sa 100 µl, a zatim sa 250 µl pufera za ispiranje. Nakon razrjeđivanja mikrosfera sa 160 µl pufera za ispiranje sadržaj u jažicama je promiješan i pripremljeni uzorci očitani su pomoću uređaja Luminex 200 (Luminex/DiaSorin, Italija). Rezultati su analizirani primjenom statističkih metoda opisanih u sljedećem poglavlju.

3.3.2. Statističke metode

3.3.2.1. Veličina uzorka

Za izračun veličine uzorka za procjenu proporcije upotrebljavana je formula:

$$n = N * X / (X + N - 1),$$

$$\text{gdje je } X = Z_{\alpha/2}^2 * p * (1 - p) / E,$$

pri čemu je: n - veličina uzorka, N - veličina populacije, $Z_{\alpha/2}$ - kritična vrijednost normalne raspodjele pri $\alpha/2$, p - pretpostavljena proporcija i E - pogreška procjene [47]

Uz interval pouzdanosti od 95%, vrijednost $Z_{\alpha/2}$ je 1,96 (pri razini značajnosti istraživanja $\alpha = 0.05$), te pretpostavljenu proporciju od 4 % – 34 %, potrebna veličina uzorka kreće se od 24 do 57 uzoraka, ovisno o pretpostavljenoj proporciji. Općenito, protutijela anti-HLA detektiraju se u oko 15 – 25 % [47] ispitanika. Ako se pretpostavi ta proporcija, preporučena veličina uzorka je od 49 do 54 uzorka.

3.3.2.2. Općenite statističke metode

Podaci su prikazani tablično i grafički. Kategorijski podaci prikazani su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Izravnim brojenjem utvrđene su apsolutne frekvencije sljedećih kategorijskih podataka: broj ispitanika s pozitivnim i negativnim rezultatima testova, broj specifičnosti protutijela anti-HLA, IgG protutijela non-HLA i komplement-vezujućih protutijela non-HLA, broj pojedinih imunizirajućih događaja. Relativne frekvencije izračunate su dijeljenjem apsolutnih frekvencija s brojem ispitanika u cijelom istraživanju ili pojedinoj podskupini. Za učestalosti kontinuiranih varijabli određen je 95%-tni interval pouzdanosti uz binomnu aproksimaciju.

Od veličina deskriptivne statistike upotrebljavani su: srednja vrijednost, medijan, minimum, maksimum te standardna devijacija.

Razlike brojčanih varijabli testirane su Fisherovim egzaktnim testom, dvostranim t- testom za dvije proporcije, testovima Mann-Whitney U i Kruskal-Wallis te point-biserijalnim koeficijentom korelacije.

Podaci dobiveni ovim istraživanjem obrađeni su u statističkim programima MedCalc Statistical Software version 22.021 (MedCalc Software, Ostend, Belgium) i SPSS Statistics 29 (IBM Corp. Released 2022. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 29.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

3.3.2.3. Statističke metode u određivanju komplement vezujućih protutijela non-HLA

Početna obrada podataka napravljena je upotrebom programskog jezika Python, verzija 3.12 (Python Software Foundation, SAD. Python Language Reference, <https://www.python.org/>) pomoću paketa NumPy, verzija 1.26.2, za rad s numeričkim podacima (<https://numpy.org/>) i paketa Seaborn, verzija 0.13.1, za vizualizaciju statističkih podataka (<https://seaborn.pydata.org/>). Za statističku obradu rezultata određivanja svojstva IgG protutijela non-HLA za vezanje komplementa upotrebljavani su podaci testiranja za IgG i C3d svih mikrosfera u panelu za svakog pacijenta. Svaki izmjereni podatak za IgG obuhvaćao je rezultat MFI dobiven direktnim očitavanjem testa LNHLA. Također, korišteni su podaci o tome je li pojedina mikrosfera pozitivna ili negativna za IgG protutijelo na antigen non-HLA konjugiran na tu mikrosferu, dobiveni iz MATCH IT! Antibody programa za analizu rezultata. Za testiranje LNHLA+C3d svaki izmjereni podatak obuhvaćao je rezultat MFI dobiven direktnim očitavanjem rezultata testa Luminex aparatom..Statistička obrada napravljena je posebno za svaki od 60 antigena non-HLA u panelu. Svaka pojedinačna obrada podataka za pojedini antigen uključivala je podatke za svih 74 pacijenata u istraživanju grupirane u 3 skupine: numerički rezultat MFI za IgG testiranje, kvalitativno pozitivan ili negativan za IgG, te numerički rezultat MFI za C3d testiranje.

Jedan od glavnih zadataka ovog istraživanja bio je odrediti graničnu vrijednost u testu LNHLA+C3d kojim bi se razlučivali C3d-pozitivni (aktiviraju komplement) od C3d-negativnih uzoraka ispitanika (ne aktiviraju komplement). Najprije su podaci statistički obrađeni metodama procjene gustoće pomoću jezgre (engl. *Kernel density estimation*, KDE) [48-51] i Gaussovog miješanog modela [51,52] kojima su dobivene potencijalne granične vrijednosti. Za procjenu hipoteze dolazi li uzorak pojedinog ispitanika iz populacije s normalnom raspodjelom upotrebljavan je Shapiro-Wilkov statistički test [53]. Mann-Whitney U test omogućio je usporedbu razlika između dva neovisna uzorka [54]. Za svaku potencijalnu graničnu vrijednost, za svaki antigen non-HLA napravljena je posebna matrica konfuzije. One vrijednosti koje su najbolje za odabir kao granične vrijednosti u određenom medicinskom istraživanju, uobičajeno

pokazuju najveću vrijednost za Youdenov indeks [55] i Matthewsov koeficijent korelacije (engl. *Matthews correlation coefficient*, MCC) [56,57]. U ovom istraživanju, kategorija „lažno negativni“ iz formula za Youdenov indeks i MCC, nije prikazivala grešku u testiranju, već grupirala ispitanike koji su stvorili IgG protutijela non-HLA, no koja ne vežu komplement. Zbog toga je definirana posebno prilagođena varijanta vrijednosti MCC, MCC_{adj} (od engl. *adjusted*, prilagođeno), koja tu činjenicu uzima u obzir. Formula za izračun koeficijenta MCC_{adj} jest:

$$MCC_{adj} = \frac{(TP * TN)}{\sqrt{(TP + FP)(TP)(TN + FP)(TN)}}$$

gdje su: TP = IgG-pozitivan i C3d-pozitivan rezultat (iznad vrijednosti za graničnu vrijednost koja se ispituje), TN = IgG-negativan i C3d-negativan rezultat (ispod vrijednosti za graničnu vrijednost koja se ispituje), FP = IgG-negativan i C3d-pozitivan rezultat te FN = IgG-pozitivan i C3d-negativan rezultat.

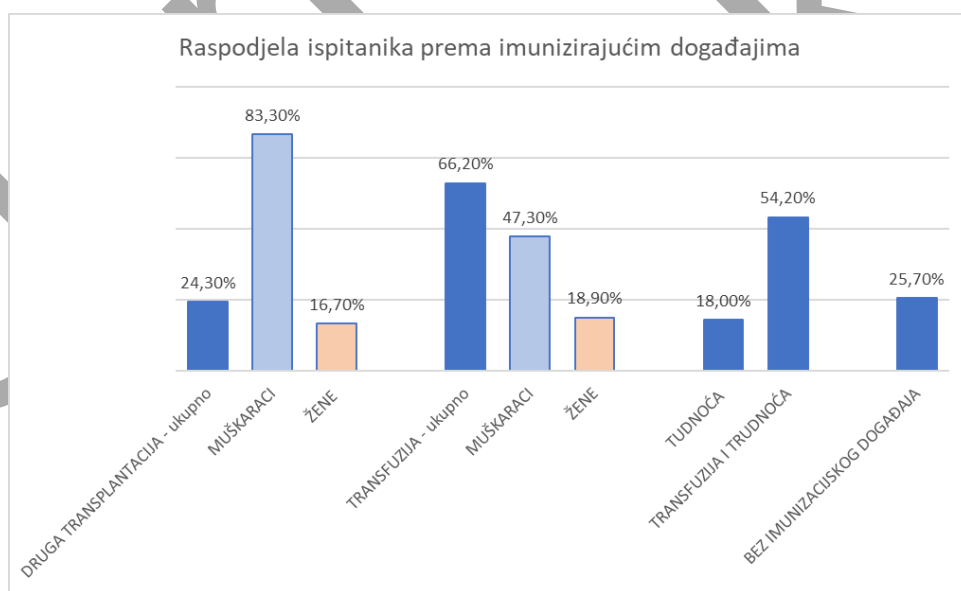
Ova vrijednost je upotrebljavana kao osnova za određivanje koja potencijalna vrijednost za graničnu vrijednost je najbolja. U pojedinim slučajevima, kad je više vrijednosti pokazivalo najbolju vrijednost MCC_{adj} , definiran je raspon u kojem se stvarna granična vrijednost najvjerojatnije nalazi. Vrijednosti MCC_{adj} kreću se od 0 do 1, gdje 1 označava savršeno predviđanje, a 0 potpuno neslaganje između predviđanja i opažanja.

4. REZULTATI

4.1. Osnovna obilježja ispitanika

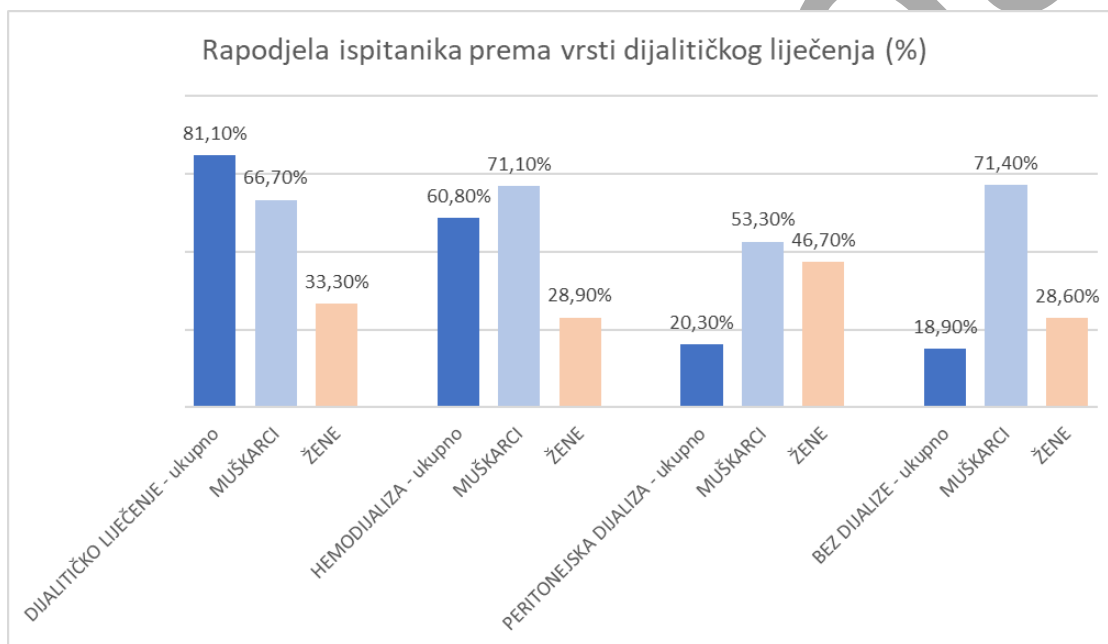
U ovo istraživanje bilo je uključeno 74 ispitanika, 50 (67,6 %) muškaraca i 24 (32,4 %) žene, od kojih su prikupljeni uzorci seruma. Svi ispitanici bili su na listi čekanja za transplantaciju bubrega u KBC-Rijeka. Prosječna starost ispitanika bila je $56,1 \pm 12,8$ godina, a medijan 58 godina. Najmlađi ispitanik imao je 21, a najstariji 77 godina.

Na drugu transplantaciju čekalo je 18 (24,3 %) ispitanika, od kojih je 15 (83,3 %) bilo muških i 3 (16,7 %) ženskih ispitanika. Transfuziju krvnih pripravaka prethodno je primilo 49 (66,2 %) ispitanika, od čega je bilo 35 (47,3 %) muškaraca i 14 (18,9 %) žena. Trudnoća se smatra uzrokom imunizacije kod 18 (75,0 %) ispitanica, a kombinacija transfuzije krvnih pripravaka i trudnoće kod 13 (54,2 %) ispitanica (Slika 8). U anamnezi 19 ispitanika (25,7 %) nije evidentiran niti jedan imunizirajući događaj.



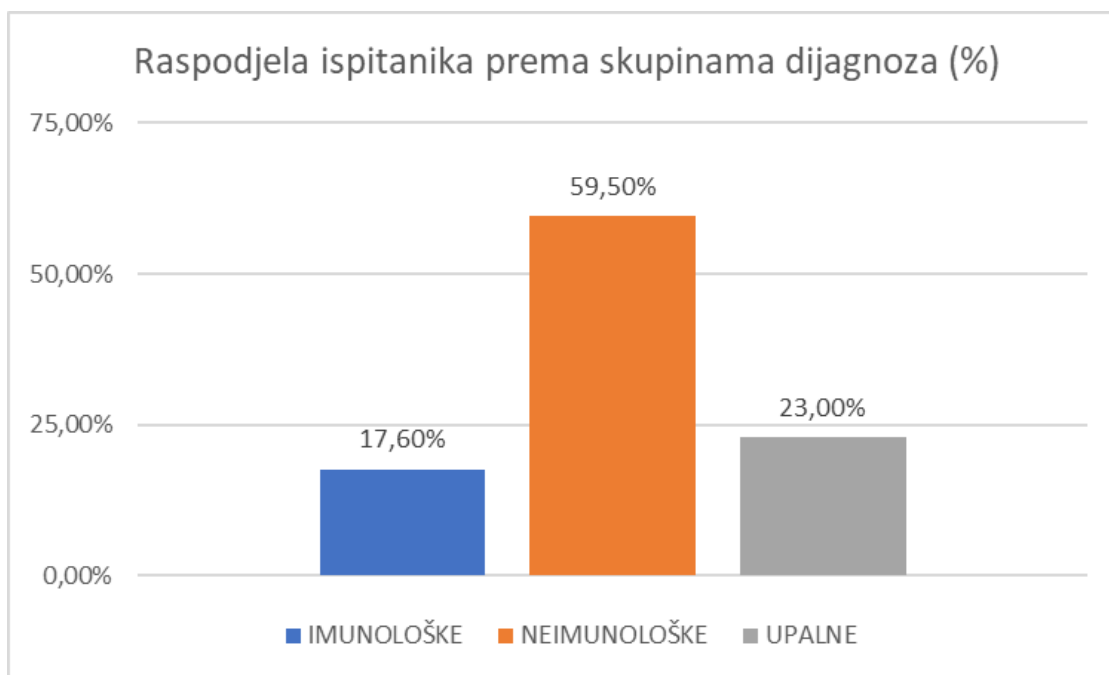
Slika 8. Grafički prikaz raspodjele ispitanika prema imunizirajućim događajima

Dijalitičko liječenje započelo je za 60 (81,1 %) ispitanika, 40 (66,7 %) muškaraca i 20 (33,3 %) žena. Hemodijalizom bilo je liječeno 45 (60,8 %) ispitanika, 32 (71,1 %) muškarca i 13 (28,9 %) žena, a peritonejskom dijalizom 15 (20,3 %) ispitanika, 8 (53,3 %) muškaraca i 7 (46,7 %) žena. Liječenje dijalizom nije započelo 14 (18,9 %) ispitanika, 10 muškaraca (71,4 %) i 4 žene (28,6 %). (Slika 9).



Slika 9. Grafički prikaz raspodjele ispitanika prema vrsti dijalitičkog liječenja

Prema vrsti dijagnoze u ispitivanje je bilo uključeno 13 (17,6 %) ispitanika oboljelih od imunoloških bolesti, 44 (59,5 %) ispitanika oboljelih od neimunoloških bolesti i 17 (23,0 %) ispitanika oboljelih od upalnih bolesti. Raspodjela ispitanika prema skupinama dijagnoza prikazana je na Slici 10.



Slika 10. Grafički prikaz raspodjele ispitanika prema skupinama dijagnoza

4.2. Probir seruma ispitanika na prisutnost protutijela anti-HLA

Testiranjem protutijela anti-HLA metodom CDC u serumima ispitanika utvrđeno je da je serum 21 (28,4 %) ispitanika bio pozitivan, što znači da je određen postotak reaktivnih panel protutijela veći od 3 %, dok je serum 53 (71,6 %) ispitanika bio negativan.

Serumi svih ispitanika bili su ispitani i testom za probir IgG protutijela anti-HLA testom čvrste faze s mikrosferama, koji razlikuje specifičnost protutijela na antigene HLA razreda I i razreda II. Od ispitivanih seruma 74 ispitanika, serumi 39 (52,7 %) ispitanika bili su pozitivni za protutijela anti-HLA razreda I, razreda II ili oboje dok su a serumi 35 ispitanika (47,3 %) bili su negativni. Usporedbom dobivenih učestalosti ispitanika s protutijelima anti-HLA metodom CDC i čvrste faze s mikrosferama dvostranim t-testom za dvije proporcije, dobivena statistička značajnost uz $p = 0,003$.

4.3. Specifičnosti protutijela anti-HLA u ispitivanoj populaciji

U ovom istraživanju određene su specifičnosti protutijela anti-HLA za pet klinički najvažnijih lokusa HLA: HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1, kao i za dodatne lokuse HLA-DRB3, -DRB4 i -DRB5. U grupi ispitanika u čijim serumima je probirnim testom dokazana prisutnost protutijela anti-HLA (39 ispitanika), testom za određivanje specifičnosti utvrđene su specifičnosti IgG protutijela anti-HLA na gotovo sve poznate antigene HLA. Jedine iznimke bili su antigeni HLA-B70, Cw11, Cw13 i DR53 na koje nisu utvrđena protutijela anti-HLA u ispitivanoj populaciji. Testiranje pozitivnih uzoraka seruma ispitanika na specifičnosti protutijela anti-HLA razreda I i II određene su specifičnosti IgG protutijela anti-HLA u serumima 32 (43,2 %) ispitanika. U serumima 42 (56,8 %) ispitanika nisu određena IgG protutijela anti-HLA. U serumima 26 (35,1 %) ispitanika utvrđena je specifičnost protutijela anti-HLA razreda I, a u serumima 21 (28,4 %) ispitanika HLA razreda II.

Antigenske specifičnosti utvrđenih protutijela anti-HLA razreda I u serumima ispitanika pozitivnih na probirnom testu prikazane su u Tablicama 1 do 3. Kod određenih antigenskih specifičnosti rezultati su prikazani u obliku antigena šire specifičnosti ili *broad* antigena (HLA-B14 je *broad* antigen za B64 i B65, HLA-B15 za B62, B63, B71, B72, B75, B76, B77, HLA-B40 za B60 i B61 te HLA-Cw3 za Cw9 i Cw10). Najčešća protutijela anti-HLA-A bila su anti-HLA-A2 (14,4 %) i anti-HLA-A24 (13,5 %). Slijede anti-HLA-A23, anti-HLA-A25 i anti-HLA-A69 s učestalošću od 12,2% te anti HLA-A11 i anti-HLA-A68 s učestalošću od 10,8 % uz $p < 0,05$ (Tablica 1). Kao što se može vidjeti iz Tablice 2, među protutijelima anti-HLA-B najzastupljenija su anti-HLA-B15 (67,6 %) i anti-HLA-B40 (20,3 %). S učestalošću u ispitivanoj populaciji većoj od 10 % utvrđena su protutijela anti-HLA na antigene specifičnosti B57 (18,9 %), B58 (17,6 %), B59 (14,9 %), B13, B38, B49 i B51 (svaka s po 13,5%), B14, B27, B37, B52, B53 i B56 (svaka s po 12,2 %). Najčešće protutijelo anti-HLA-C bilo je anti-HLA-Cw3 sa 12,2 % učestalosti (Tablica 3. $p < 0,05$). Učestalosti specifičnih protutijela anti-HLA u ispitivanoj populaciji uspoređene su s učestalostima alela koji kodiraju antigen svih ispitivanih lokusa HLA u hrvatskoj populaciji [58] Istraživanje Maskalan i sur. [58] napravljeno je na uzorku od 10000 ispitanika mogućih davatelja krvotvornih matičnih stanica iz registra davatelja.

Tablica 1. Prikaz učestalosti specifičnosti protutijela anti-HLA-A u ispitivanoj populaciji na listi čekanja za transplantaciju bubrega KBC Rijeka

Antigen HLA-A	Broj ispitanika sa specifičnim protutijelom anti-HLA	Učestalost specifičnog protutijela anti-HLA u ispitivanoj populaciji	Učestalost alela koji kodiraju antigen u populaciji Hrvatske [58]	Usporedba (p-vrijednost)
A1	5	6,8 %	13,18 %	0,1031
A2	11	14,9 %	30,26 %	0,0040
A3	5	6,8 %	11,48 %	0,2041
A11	8	10,8 %	7,21 %	0,2340
A23	9	12,2 %	2,30 %	< 0,00001
A24	10	13,5 %	11,79 %	0,6455
A25	9	12,2 %	2,87 %	< 0,00001
A26	6	8,1 %	4,98 %	0,2187
A29	4	5,4 %	0,75 %	< 0,00001
A30	5	6,8 %	1,69 %	0,0009
A31	6	8,1 %	2,16 %	0,0005
A32	9	12,2 %	4,29 %	0,0009
A33	4	5,4 %	2,06 %	0,0444
A34	6	8,1 %	0,02 %	< 0,00001
A36	5	6,8 %	0,00 %	Np*
A43	6	8,1 %	0,00 %	Np*
A66	6	8,1 %	0,40 %	< 0,00001
A68	8	10,8 %	4,46 %	0,0088
A69	9	12,2 %	0,07 %	< 0,00001
A74	4	5,4 %	0,01 %	< 0,00001
A80	4	5,4 %	0,07 %	< 0,00001

* Usporedba učestalosti specifičnog protutijela anti-HLA u ispitivanoj populaciji i učestalosti alela koji kodiraju antigen u populaciji Hrvatske napravljena je primjenom Fisherovog egzaktnog testa, s jednim stupnjem slobode, statistička značajnost $p < 0,05$. Np – nije pronađeno. [58]: uzorak od 10000 ispitanika.

Tablica 2. Prikaz učestalosti specifičnosti protutijela anti-HLA-B u ispitivanoj populaciji na listi čekanja za transplantaciju bubrega KBC Rijeka

Antigen HLA-B	Broj ispitanika sa specifičnim protutijelom anti-HLA	Učestalost specifičnog protutijela anti-HLA u ispitivanoj populaciji	Učestalost alela koji kodiraju antigen u populaciji Hrvatske [58]	Usporedba (p-vrijednost)
B7	7	9,5 %	7,31 %	0,4777
B8	5	6,8 %	8,06 %	0,6818
B13	10	13,5 %	3,38 %	< 0,00001
B14	9	12,2 %	2,71 %	< 0,00001
B15	50	67,6 %	4,88 %	< 0,00001
B18	4	5,4 %	8,67 %	0,3173
B27	9	12,2 %	6,30 %	0,0394
B35	5	6,8 %	13,42 %	0,0930
B37	9	12,2 %	0,91 %	< 0,00001
B38	10	13,5 %	4,66 %	0,0003
B39	6	8,1 %	2,96 %	0,0096
B40	15	20,3 %	3,85 %	< 0,00001
B41	5	6,8 %	1,02 %	< 0,00001
B42	6	8,1 %	0,00 %	Np*
B44	8	10,8 %	9,73 %	0,7566
B45	4	5,4 %	0,18 %	0,0209
B46	4	5,4 %	0,01 %	< 0,00001
B47	8	10,8 %	0,14 %	< 0,00001
B48	4	5,4 %	0,16 %	0,0099
B49	10	13,5 %	1,74 %	< 0,00001
B50	6	8,1 %	1,26 %	< 0,00001
B51	10	13,5 %	10,63 %	0,4237
B52	9	12,2 %	1,45 %	< 0,00001
B53	9	12,2 %	0,40 %	< 0,00001
B54	6	8,1 %	0,03 %	< 0,00001
B55	6	8,1 %	1,35 %	< 0,00001
B56	9	12,2 %	1,11 %	< 0,00001
B57	14	18,9 %	2,54 %	< 0,00001
B58	13	17,6 %	1,16 %	< 0,00001
B59	11	14,9 %	0,00 %	Np*
B67	6	8,1 %	0,00 %	Np*
B73	6	8,1 %	0,05 %	< 0,00001
B78	7	9,5 %	0,00 %	Np*
B81	5	6,8 %	0,00 %	Np*
B82	4	5,4 %	0,00 %	Np*

* Usporedba učestalosti specifičnog protutijela anti-HLA u ispitivanoj populaciji i učestalosti alela koji kodiraju antigen u populaciji Hrvatske napravljena je primjenom Fisherovog egzaktnog testa, s jednim stupnjem slobode, statistička značajnost $p < 0,05$. Np – nije pronađeno. [58]: uzorak od 10000 ispitanika.

Tablica 3. Prikaz učestalosti specifičnosti protutijela anti-HLA-C u ispitivanoj populaciji na listi čekanja za transplantaciju bubrega KBC Rijeka

Antigen HLA-C	Broj ispitanika sa specifičnim protutijelom anti-HLA	Učestalost specifičnog protutijela anti-HLA u ispitivanoj populaciji	Učestalost alela koji kodiraju antigen u populaciji Hrvatske [58]	Usporedba (p-vrijednost)
Cw1	4	5,4 %	4,83 %	0,8181
Cw2	2	2,7 %	9,19 %	0,0536
Cw3	9	12,2 %	7,52 %	0,1310
Cw4	4	5,4 %	14,87 %	0,0226
Cw5	1	1,4 %	4,11 %	0,2340
Cw6	3	4,1 %	8,59 %	0,1645
Cw7	5	6,8 %	25,65 %	0,0002
Cw8	4	5,4 %	2,83 %	0,1835
Cw12	5	6,8 %	13,54 %	0,0891
Cw14	3	4,1 %	2,41 %	0,3576
Cw15	4	5,4 %	3,86 %	0,4902
Cw16	3	4,1 %	1,71 %	0,1236
Cw17	2	2,7 %	0,88 %	0,0969
Cw18	2	2,7 %	0,05 %	< 0,00001

* Usporedba učestalosti specifičnog protutijela anti-HLA u ispitivanoj populaciji i učestalosti alela koji kodiraju antigen u populaciji Hrvatske napravljena je primjenom Fisherovog egzaktnog testa, s jednim stupnjem slobode, statistička značajnost $p < 0,05$. [58]: uzorak od 10000 ispitanika.

Antigenske specifičnosti utvrđenih protutijela anti-HLA razreda II u serumima ispitanika pozitivnih na probirnom testu prikazane su u Tablicama 4 i 5. Rezultat za HLA-DR3 prikazan je u obliku *broad* antigena (za antigene DR17 i DR18). Najčešće protutijelo anti-HLA-DR bilo je anti-HLA-DR15 s učestalosti od 10,8 % (Tablica 4). Na razini $p < 0,05$ značajne su razlike između učestalosti specifičnog protutijela anti-HLA u ispitivanoj populaciji i učestalosti alela koji kodiraju antigen HLA-DR utvrđene za HLA-DR9, -DR12, -DR11 i -DR8. Kao što se može vidjeti iz Tablice 5, među protutijelima anti-HLA-DQ najzastupljenija su bila anti-HLA-DQ6 i anti-HLA-DQ8 (svaki sa po 10,8 %). Na razini $p < 0,05$ značajne su razlike između učestalosti specifičnog protutijela anti-HLA u ispitivanoj populaciji i učestalosti alela koji kodiraju antigen HLA-DQ utvrđene za sve antigene HLA-DQ osim antigena DQ8.

Tablica 4. Prikaz učestalosti specifičnosti protutijela anti-HLA-DR u ispitivanoj populaciji na listi čekanja za transplantaciju bubrega KBC Rijeka

Antigen HLA-DR	Broj ispitanika sa specifičnim protutijelom anti-HLA	Učestalost specifičnog protutijela anti-HLA u ispitivanoj populaciji	Učestalost alela koji kodiraju antigen u populaciji Hrvatske [58]	Usporedba (p-vrijednost)
DR1	6	8,1 %	10,92 %	0,4413
DR3	5	6,8 %	10,61 %	0,2846
DR4	3	4,1 %	9,34 %	0,1188
DR7	6	8,1 %	8,96 %	0,7949
DR8	6	8,1 %	3,37 %	0,0251
DR9	4	5,4 %	0,24 %	< 0,00001
DR10	2	2,7 %	0,96 %	0,1285
DR11	5	6,8 %	17,42 %	0,0160
DR12	4	5,4 %	1,56 %	0,0083
DR13	6	8,1 %	11,84 %	0,3222
DR14	5	6,8 %	3,89 %	0,2041
DR15	8	10,8 %	10,19 %	0,9045
DR16	7	9,5 %	10,74 %	0,7263
DR51	6	8,1 %	0,00 %	Np*
DR52	5	6,8 %	0,00 %	Np*

* Usporedba učestalosti specifičnog protutijela anti-HLA u ispitivanoj populaciji i učestalosti alela koji kodiraju antigen u populaciji Hrvatske napravljena je primjenom Fisherovog egzaktnog testa, s jednim stupnjem slobode, statistička značajnost $p < 0,05$. Np – nije pronađeno. [58]: uzorak od 10000 ispitanika.

Tablica 5. Prikaz učestalosti specifičnosti protutijela anti-HLA-DQ u ispitivanoj populaciji na listi čekanja za transplantaciju bubrega KBC Rijeka

Antigen HLA-DQ	Broj ispitanika sa specifičnim protutijelom anti-HLA	Učestalost specifičnog protutijela anti-HLA u ispitivanoj populaciji	Učestalost alela koji kodiraju antigen u populaciji Hrvatske [59]	Usporedba (p-vrijednost)
DQ2	1	1,4 %	15,7 %	0,0011
DQ4	7	9,5 %	3,6 %	0,0615
DQ5	5	6,8 %	28,5 %	0,0001
DQ6	8	10,8 %	22,4 %	0,0300
DQ7	4	5,4 %	22,1 %	0,0014
DQ8	8	10,8 %	4,8 %	0,0658
DQ9	7	9,5 %	2,9 %	0,0193

* Usporedba učestalosti specifičnog protutijela anti-HLA u ispitivanoj populaciji i učestalosti alela koji kodiraju antigen u populaciji Hrvatske napravljena je primjenom Fisherovog egzaktnog testa, s jednim stupnjem slobode, statistička značajnost $p < 0,05$.

4.4. Određivanje IgG protutijela non-HLA

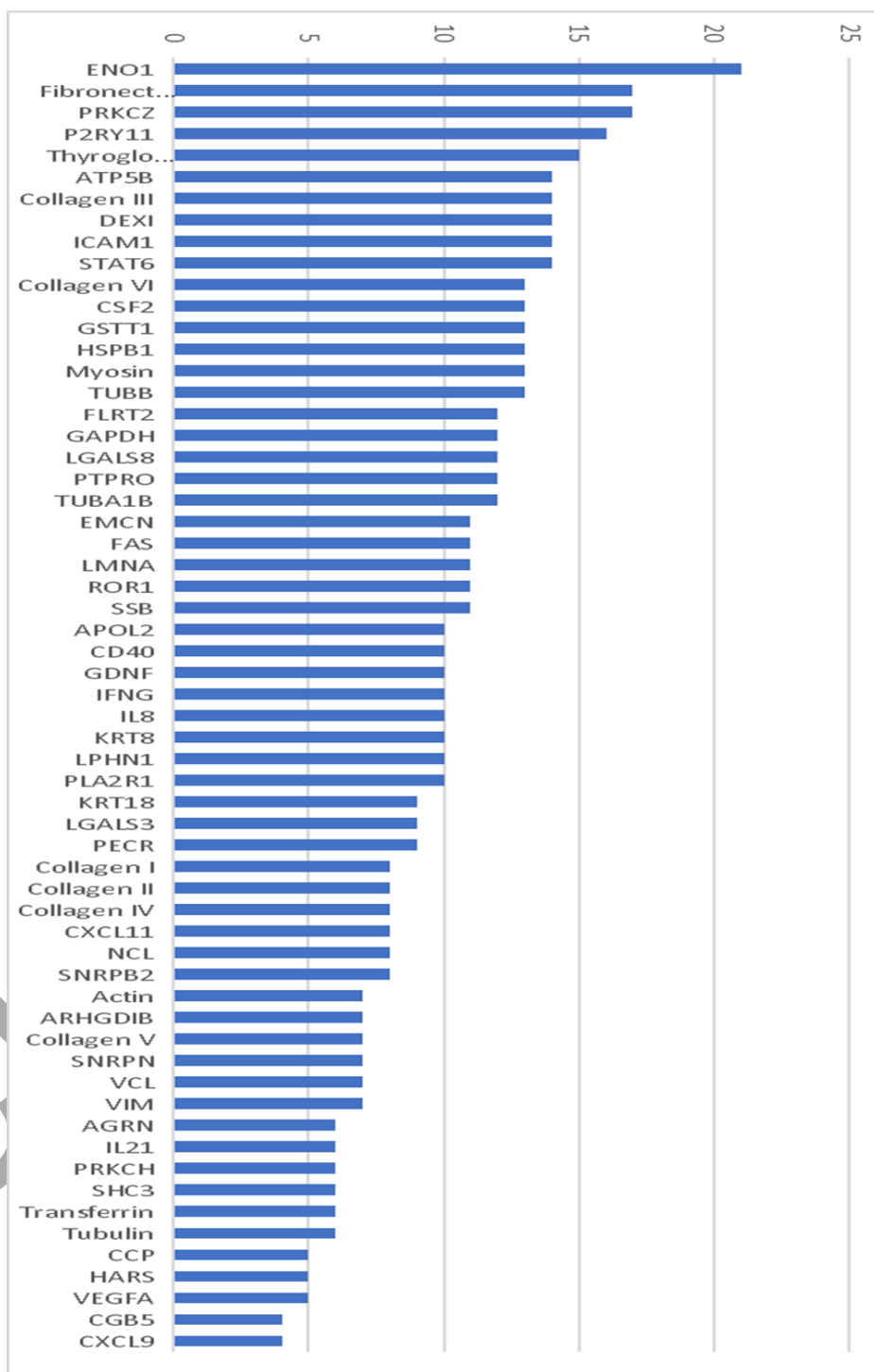
Na Slici 11. grafički je prikazana apsolutna frekvencija cjelokupnog panela od 60 IgG protutijela non-HLA u serumima ispitanika.

IgG protutijela non-HLA utvrđena su u serumima 68 (91,9 %) ispitanika, dok u 6 (8,1 %) seruma nije utvrđena reaktivnost niti na jedan od testiranih 60 antigena non-HLA.

Na svaki od 60 antigena non-HLA u istraživanom panelu bilo je stvoreno IgG protutijelo u ispitivanim serumima. Protutijelo na svaku specifičnost non-HLA bilo je dokazano u najmanje četiri seruma ispitanika. Najveću učestalost među protutijelima imalo je protutijelo anti-ENO1, čija prisutnost je dokazana u serumima 21 (28,4 %) ispitanika. U serumima 17 (23,0 %) ispitanika dokazana su protutijela anti-fibronektin 1, a s jednakom učestalošću određena je i prisutnost anti-PRKCZ. Protutijelo anti-P2RY11 dokazano je u 16 (21,6 %), a anti-tiroglobulin u 15 (20,2 %) seruma ispitanika.

Promatramo li rezultate testiranja IgG protutijela non-HLA za pojedine setove mikrosfera u čitavoj ispitivanoj populaciji, ukupno je dobiveno 4440 podataka (74 ispitanika * 60 antigena non-HLA u panelu). Od svih setova mikrosfera, njih 605 (13,6 %) bilo je pozitivno za IgG protutijelo na konjugirani antigen non-HLA na toj mikrosferi, dok je 3835 (86,4 %) bilo negativno.

Raspodjela broja različitih specifičnosti Ig protutijela non-HLA u pojedinog ispitanika u ovom istraživanju prikazana je u Tablici 6. U ispitivanoj populaciji najmanji broj različitih specifičnosti protutijela non-HLA bio je 0, a najveći 59 (98,3 %), sa srednjom vrijednošću 8,2 i medijanom 3. U najvećem broju ispitanika (43/74, 58,1 %) utvrđene su između dvije do deset različitih specifičnosti na antigene non-HLA.



Slika 11. Apsolutna frekvencija IgG protutijela non-HLA stvorenih na svaki od 60 antigena u panelu u ispitivanoj populaciji (N = 74).

Tablica 6. Prikaz broja različitih specifičnosti IgG protutijela non-HLA u pojedinog ispitanika

Broj različitih specifičnosti	0	1	2 – 10	11 – 30	31 – 50	51 – 60	Ukupno
IgG protutijela non-HLA							
Broj ispitanika	6	10	43	10	2	3	74
Učestalost (%)	8,1	13,5	58,1	13,5	2,7	4,1	100,0
95% interval pouzdanosti							
* (%)	3,0 – 16,8	6,7 – 23,5	46,1 – 69,5	6,7 – 23,5	0,3 – 9,4	0,8 – 11,3	-
Minimum	0			Srednja vrijednost			8,2
Maksimum	59			Medijan			3

* 95%-tni interval pouzdanosti proporcije određen binomnom aproksimacijom.

4.5. Komplement-vezujuća protutijela non-HLA

Kako bi se utvrdilo koja su od utvrđenih IgG protutijela non-HLA komplement-vezujuća, svi uzorci seruma ispitanika uključenih u istraživanje, a koji su testirani na protutijela non-HLA testirani su i na non-HLA s dodatkom konjugata anti-C3d+fikoeritrin (LNHLA+C3d). S obzirom na činjenicu da nisu poznate granične vrijednosti za primijenjeni test kao i da nisu u objavljenoj literaturi dostupni podaci s kojima bi se ovim istraživanjem dobiveni podaci mogli usporediti, određene su granične vrijednosti u testu za određivanje komplement-vezujućih protutijela non-HLA. Zbog toga je napravljena usporedba u matrici konfuzije s rezultatima testova LNHLA (za IgG protutijela non-HLA) i LNHLA+C3d (za komplement-vezujuća protutijela non-HLA) za svaku od mogućih graničnih vrijednosti dobivenih statističkom obradom rezultata MFI u testu LNHLA+C3d. Nakon odabira najbolje granične vrijednosti, one s maksimalnim koeficijentom MCC_{adj} , dobiveni rezultati omogućili su podjelu specifičnosti non-HLA iz ispitivanog panela u ovom istraživanju u sljedeće skupine: C3d-negativni (23/60, 38,3 %), C3d-diskutabilni (14/60, 23,3%) i C3d-pozitivni (23/60, 38,3 %).

U skupinu C3d-negativnih specifičnosti non-HLA uključeni su oni antigeni za koje je najveća prilagođena vrijednost MCC (MCC_{adj}) bila manja od 0,7 (Tablica 7.). Za ovu skupinu antigena non-HLA graničnu vrijednost nije bilo moguće odrediti, bilo zbog toga što ona uistinu ne postoji, odnosno, antigen zaista nema sposobnost stvaranja IgG protutijela koja vežu

komplement, ili zbog toga što je nije bilo moguće odrediti u konkretnoj ispitivanoj populaciji zbog nedostatka ispitanika koji bi stvorili komplement-vezujuće protutijelo na određeni antigen non-HLA.

Tablica 7. Prikaz antigena non-HLA iz ispitivanog panela koji nisu pokazali sposobnost stvaranja IgG protutijela koja vežu komplement.

Redni broj	Specifičnost protutijela non-HLA	Prilagođen MCC* (MCC _{adj})*
1	Aktin	0,17
2	Apolipoprotein L,2 (APOL2)	0,39
3	Ciklički citrulinski peptid (CCP)	0,20
4	Molekula CD40 (CD40)	0,29
5	Korionski gonadotropin, beta polipeptid 5 (CGB5)	0,69
6	Kolagen I	0,23
7	Kolagen II	0,57
8	Kemokin (CXCL11)	0,30
9	Kemokin (CXCL9)	0,14
10	Fas receptor (FAS)	0,29
11	Neurotrofni čimbenik izveden iz glija stanica (GDNF)	0,29
12	Histidin tRNA sintetaza (HARS)	*nu
13	Interferon Gama (IFNG)	0,26
14	Interleukin 21 (IL21)	*nu
15	Latrophilin 1 (LPHN1)	0,25
16	Nukleolin (NCL)	0,36
17	Fosfolipaza A2 receptor (PLA2R1)	0,39
18	Protein tirozin fosfataza tipa receptora (PTPRO)	0,29
19	Transferin	0,22
20	Tubulin alfa 1b (TUBA1B)	0,70
21	Tubulin	0,18
22	Vinkulin (VCL)	0,49
23	Vaskularni endotelni faktor rasta A (VEGFA)	0,15

*MCC = Matthewsov koeficijent korelacije; *MCC_{adj} = prilagođen Matthewsov koeficijent korelacije; *nu = nije utvrđeno

U skupinu C3d-diskutabilnih specifičnosti non-HLA uključeni su oni antigeni za koje, unutar ispitivane populacije, nije bilo moguće pouzdano odrediti postoji li granična vrijednost ili ne (Tablica 8). Za sve antigene ove kategorije vrijedilo je $0,7 > \max(\text{MCC}_{\text{adj}}) \geq 1$. Razlozi

zbog kojih nije bilo moguće pouzdano odrediti graničnu vrijednost uključuju: mali razmak između najviše vrijednosti MFI za C3d IgG-negativnog ispitanika i najniže vrijednosti MFI za C3d IgG-pozitivnog ispitanika (uobičajeno < 30 %), iznimno niske vrijednosti MFI za C3d IgG-pozitivnih ispitanika (uobičajeno < 200 MFI) bez prisutne određene izrazito visoke vrijednosti MFI za C3d preostalih IgG-pozitivnih ispitanika, normalna raspodjela zajedničke distribucije vrijednosti MFI za C3d IgG-pozitivnih i IgG-negativnih ispitanika bez formiranja dviju zasebnih skupina podataka.

Tablica 8. Prikaz antigena non-HLA iz ispitivanog panela za koje nije bilo moguće pouzdano utvrditi njihovu sposobnost stvaranja IgG protutijela koja vežu komplement.

Redni broj	Specifičnost protutijela non-HLA
1	Inhibitor disocijacije gvanozin nukleotida (ARHGDIB)
2	Enolaza 1 (ENO1)
3	Transmembranski protein bogat leucinom (FLRT2)
4	Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH)
5	Galectin 8 (LGALS8)
6	Gen je koji kodira protein nazvan P2Y (P2RY11)
7	Peroksisomalna trans-2-enoil-CoA reduktaza (PECR)
8	Mali nuklearni ribonukleoprotein polipeptid B (SNRNPB2)
9	Sjögrenov sindrom antigen B (SSB)
10	Agrin (AGRN)
11	Čimbenik stimulacije kolonija 2 (CSF2)
12	Endomucin (EMCN)
13	Citokeratin 18 (KRT18)
14	Tubulin (TUBB)

U skupinu C3d-pozitivnih specifičnosti non-HLA uključeni su oni antigeni za koje je najveća prilagođena vrijednost koeficijenta MCC bila 1. Za ovu skupinu antigena non-HLA statistički je određena granična vrijednost, odnosno, u najvećem broju slučajeva, raspon

vrijednosti MFI unutar kojeg se ona nalazi (Tablica 9). U serumima ispitanika najveću učestalost pokazivala su protutijela anti-PRKCZ u 9 seruma (12,2 %), anti-DEXI u 6 seruma (8,1 %) te anti-STAT6 u 4 seruma (5,4 %). Učestalost ostalih protutijela bila je manja od 5 %.

Tablica 9. Prikaz antigena non-HLA iz ispitivanog panela za koje je unutar ispitivane populacije nedvojbeno pokazana sposobnost stvaranja IgG protutijela koja vežu komplement.

Redni broj	Antigen	Statistički definiran raspon unutar kojeg se, prema izračunu, nalazi granična vrijednost		Učestalost ispitanika s komplement-vezujućim IgG protutijelom non-HLA, N (%)
		minimum (MFI)	maksimum (MFI)	
1	ATP5B	1690,58	2628,13	1 (1,4 %)
2	Kolagen III	502,93	2218,52	1 (1,4 %)
3	Kolagen IV	405,72	514,37	1 (1,4 %)
4	Kolagen V	415,00	448,86	1 (1,4 %)
5	Kolagen VI	218,08	272,99	1 (1,4 %)
6	DEXI	227,00	236,00	6 (8,1 %)
7	Fibronektin 1	416,68	948,96	1 (1,4 %)
8	GSTT1	56,00	252,00	3 (4,1 %)
9	HSPB1	4999,90	4999,90	1 (1,4 %)
10	ICAM1	50,50	328,26	1 (1,4 %)
11	IL8	568,77	4111,27	3 (4,1 %)
12	KRT8	178,21	178,21	1 (1,4 %)
13	LGALS3	3111,17	3111,17	1 (1,4 %)
14	LMNA	150,26	150,26	2 (2,7 %)
15	Miozin	638,10	5866,20	1 (1,4 %)
16	PRKCH	890,00	993,00	2 (2,7 %)
17	PRKCZ	6639,11	8517,86	9 (12,2 %)
18	ROR1	661,02	837,88	2 (2,7 %)
19	SHC3	2072,61	2072,61	1 (1,4 %)
20	SNRPN	474,22	678,59	1 (1,4 %)
21	STAT6	3902,90	3992,29	4 (5,4 %)
22	Tireoglobulin	828,82	925,73	1 (1,4 %)
23	VIM	1287,29	5747,55	1 (1,4 %)
			UKUPNO	46 C3d-pozitivnih mikrosfera

Sposobnost stvaranja IgG protutijela non-HLA koja vežu komplement utvrđena je u serumima 34 (45,9 %) ispitanika, dok u 25 (33,8 %) nije utvrđena sposobnost stvaranja IgG protutijela non-HLA koja vežu komplement niti na jedan od 60 ispitivanih antigena non-HLA. Za dodatnih 15 (20,3 %) seruma ispitanika, upotrebljavanim algoritmom za određivanje graničnih vrijednosti, nije bilo moguće jednoznačno odrediti vežu li stvorena IgG protutijela non-HLA komplement ili ne.

4.6. Usporedba rezultata testiranja IgG protutijela non-HLA i komplement vezujućih protutijela non-HLA

Usporedni prikaz rezultata testiranja IgG protutijela non-HLA i komplement vezujućih protutijela non-HLA prikazan je u Tablici 10. Prema ranije navedenom, 68 (91,9 %) ispitanika bilo je pozitivno na IgG protutijela non-HLA, dok je njih 6 (8,1 %) bilo negativno. Ukupno su 34 (45,9 %) ispitanika pokazala sposobnost stvaranja IgG protutijela non-HLA koja vežu komplement, dok za dodatnih 15 (20,3 %) ispitanika to nije bilo moguće jednoznačno odrediti. U ispitivanoj populaciji za 25 (33,8 %) ispitanika nije utvrđena sposobnost stvaranja IgG protutijela non-HLA koja vežu komplement niti na jedan od 60 antigena non-HLA iz testiranog panela. Usporedni rezultati svih ispitanika u ovom istraživanju za stvaranje IgG protutijela non-HLA i njihove sposobnosti da vežu komplement prikazani su u Prilogu 3.

Tablica 10. Povezanost rezultata testiranja IgG protutijela non-HLA i komplement vezujućih protutijela non-HLA u ispitivanoj populaciji.

Ispitanici (N = 74)	Rezultat C3d-negativan	Rezultat C3d- diskutabilan	Rezultat C3d-pozitivan	Ukupno, N (%)
Rezultat IgG-negativan	5 (6,8 %)	1 (1,4 %)	0 (0,0 %)	6 (8,1 %)
Rezultat IgG-pozitivan	20 (27,0 %)	14 (18,9 %)	34 (45,9 %)	68 (91,9 %)
Ukupno, N (%)	25 (33,8 %)	15 (20,3 %)	34 (45,9 %)	74 (100,0 %)

Prema rezultatima prikazanim u Tablici 11, ukupno je 4350 (98,0 %) setova mikrosfera bilo ispod odabrane granične vrijednosti za sposobnost stvaranja IgG protutijela koja vežu komplement (C3d-negativno), 46 (1,0 %) mikrosfera bilo je iznad odabrane granične vrijednosti (C3d-pozitivno), a 44 (1,0 %) mikrosfera bilo je C3d-diskutabilno. Od 44 diskutabilne mikrosfere, njih 19 (0,4 %) bilo je IgG-negativno, te je njihov mogući rezultat u testu određivanja komplement vezujućih protutijela non-HLA, ovisno o odabranoj graničnoj vrijednosti, stvarno negativan ili lažno pozitivan. Preostalih 25 (0,6 %) mikrosfera bilo je IgG-pozitivno, pa je njihov mogući rezultat u testu određivanja komplement vezujućih protutijela non-HLA, ovisno o odabranoj graničnoj vrijednosti, stvarno pozitivan ili lažno negativan. Tablica 11. Raspodjela reaktivnosti pojedinih setova mikrosfera u testu određivanja komplement vezujućih protutijela non-HLA u ispitivanoj populaciji.

Setovi mikrosfera (N = 4440)	Rezultat C3d-negativan	Rezultat C3d-diskutabilan		Rezultat C3d-pozitivan	Ukupno, N (%)
		Mogući rezultat stvarno pozitivan ili lažno negativan	Mogući rezultat stvarno negativan ili lažno pozitivan		
Rezultat IgG-negativan	3816 (86,0 %)	Np*	19 (0,4 %)	0 (0,0 %)	3835 (86,4 %)
Rezultat IgG-pozitivan	534 (12,0 %)	25 (0,6 %)	Np*	46 (1,0 %)	605 (13,6 %)
Ukupno, N (%)	4350 (98,0 %)	25 (0,6 %)	19 (0,4 %)	46 (1,0 %)	4440 (100,0 %)

*Np - nije primjenjivo

4.7. Povezanost rezultata testiranja IgG protutijela anti-HLA, IgG protutijela non-HLA i komplement-vezujućih protutijela non-HLA

Usporedbom rezultata testiranja IgG protutijela anti-HLA i IgG protutijela non-HLA u serumima najvećeg broja ispitanika (52,7 %) dokazana su IgG protutijela non-HLA, a nisu dokazana protutijela anti-HLA. U 4,1 % seruma ispitanika nisu utvrđena protutijela niti na antigene HLA ni non-HLA (Tablica 12).

Tablica 12. Povezanost rezultata testiranja IgG protutijela anti-HLA i protutijela non-HLA u ispitivanoj populaciji.

Ispitanici (N = 74)	Rezultat non-HLA					Ukupno N, %
	IgG- negativan	IgG-pozitivan			Ukupno IgG-pozitivan	
		Nema komplement- vezujućih protutijela non-HLA	Komplement- vezujuća protutijela non-HLA diskutabilna	Dokazana komplement- vezujuća protutijela non-HLA		
Rezultat anti-HLA negativan	3 4,1 %	13 17,6 %	5 6,8 %	21 28,4 %	39 52,7 %	42 56,8 %
Rezultat anti-HLA pozitivan	3 4,1 %	7 9,5 %	9 12,2 %	13 17,6 %	29 39,2 %	32 43,2 %
Ukupno N, %	6 8,1 %	20 27,0 %	14 18,9 %	34 45,9 %	68 91,9 %	74 100,0 %

Napravljena je usporedba između broja specifičnosti pojedinih protutijela anti HLA, IgG protutijela non-HLA i komplement-vezujućih protutijela non-HLA u svrhu dobivanja korelacije između svake dvije od triju skupina protutijela iz ovog istraživanja (Tablica 13). Usporedbom skupina primjenom Mann-Whitney U testa utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0,001$) između skupina anti-HLA razreda I i II i IgG protutijela non-HLA.

Tablica 13. Prikaz korelacije između broja specifičnosti pojedinih protutijela anti-HLA, IgG protutijela non-HLA i komplement-vezujućih protutijela non-HLA.

Skupine protutijela (anti-HLA, IgG non-HLA, komplement-vezujuća non-HLA)		Usporedba skupina primjenom Mann- Whitney U testa		Korelacija skupina primjenom Spearmanova koeficijenta	
		Testna statistika	P vrijednost*	Spearmanov koeficijent korelacije rangova	P vrijednost*
Anti-HLA razred I	IgG protutijela non-HLA	4,39	p < 0,001	-0,04	p > 0,05
Anti-HLA razred I	Komplement- vezujuća protutijela non- HLA	0,30	p > 0,05	-0,03	p > 0,05
Anti-HLA razred II	IgG protutijela non-HLA	6,68	p < 0,001	0,00	p > 0,05
Anti-HLA razred II	Komplement- vezujuća protutijela non- HLA	1,22	p > 0,05	0,01	p > 0,05
IgG protutijela non-HLA	Komplement- vezujuća protutijela non- HLA	Nije testirano	Nije testirano	0,28	p > 0,05

*Statistička značajnost p < 0,05.

4.8. Povezanost protutijela non-HLA sa osnovnom bolesti, prethodnim imunizirajućim događajima, metodom i vremenskim periodom dijalitičkog liječenja

U ispitivanoj populaciji određeno je ukupno 605 IgG protutijela specifičnih na antigene non-HLA. Raspodjela određenih IgG protutijela non-HLA prema skupinama dijagnoza ispitanika pokazala je sljedeće:

- imunološke – u ovih ispitanika ukupno je određeno 50 (8,3%) IgG protutijela specifičnih na antigene non-HLA,
- neimunološke – u ovih ispitanika ukupno je određeno 432 (71,4%) IgG protutijela specifičnih na antigene non-HLA,

- upalne – u ovih ispitanika ukupno je određeno 123 (20,3%) IgG protutijela specifičnih na antigene non-HLA.

Velika većina ispitanika, 55/74 (74,3%), u anamnezi ima zabilježen barem jedan imunizirajući događaj, pri čemu transfuzija krvnih pripravaka ima najveći udio, 49/74 (66,2%). Jednaki broj ispitanika, po 18/74 (24,3 %) bio je izložen imunizirajućem događaju putem trudnoće i putem prethodne transplantacije bubrega. Ujedno je 14/74 (18,9 %) ispitanica, uz trudnoću, primilo i transfuzije krvnih pripravaka.

Detaljna stratifikacija IgG protutijela specifičnih na pojedine antigene non-HLA prema određenoj skupini dijagnoza ispitanika prikazana je u Tablici 14.

Unutar skupine ispitanika s imunološkim dijagnozama najčešća specifičnost non-HLA na koju su bila razvijena IgG protutijela bila je PRKCZ u 4 (5,4 %) ispitanika.

Unutar skupine ispitanika s neimunološkim dijagnozama najčešća specifičnost non-HLA na koju su bila razvijena IgG protutijela bila je ENO1 u 14 (18,9 %) ispitanika. Značajne specifičnosti non-HLA u ovoj skupini ispitanika s brojem ispitanika jednakim i većim od 10 bile su specifičnosti za ATP5B i kolagen III (po 12 ispitanika), fibronektin 1, P2RY11 i tireoglobulin (11 ispitanika) te DEXI, FLRT2, LGALS8, miozin i STAT6 (10 ispitanika).

Unutar skupine ispitanika s upalnim dijagnozama najčešće specifičnosti non-HLA na koju su bila razvijena IgG protutijela bile su ENO1, P2RY11 i PRKCZ, svaka u serumima 5 (6,8 %) ispitanika.

Tablica 14. Pregled povezanosti IgG protutijela specifičnih na pojedine antigene non-HLA i određene skupine dijagnoza ispitanika.

Dijagnoze ispitanika	Specifičnosti protutijela non-HLA									
	ACT	AGRN	APOL2	ARHGDIB	ATP5B	CCP	CD40	CGB5	COL I	COL II
Imunološke	1	0	1	2	0	0	0	0	0	1
Neimunološke	5	4	8	4	12	5	7	4	4	6
Upalne	1	2	1	1	2	0	3	0	4	1
Ukupno ispitanika	7	6	10	7	14	5	10	4	8	8
	COL III	COL IV	COL V	COL VI	CSF2	CXCL11	CXCL9	DEXI	EMCN	ENO1
Imunološke	1	0	0	1	2	1	0	0	1	2
Neimunološke	12	7	4	8	7	6	4	10	9	14
Upalne	1	1	3	4	4	1	0	4	1	5
Ukupno ispitanika	14	8	7	13	13	8	4	14	11	21
	FAS	FIBR 1	FLRT2	GAPDH	GDNF	GSTT1	HARS	HSPB1	ICAM1	IFNG
Imunološke	1	2	0	3	0	1	0	2	1	1
Neimunološke	7	11	10	7	8	9	4	9	9	8
Upalne	3	4	2	2	2	3	1	2	4	1
Ukupno ispitanika	11	17	12	12	10	13	5	13	14	10
	IL21	IL8	KRT18	KRT8	LGALS3	LGALS8	LMNA	LPHN1	MYO	NCL
Imunološke	0	1	2	1	1	1	1	1	1	0
Neimunološke	5	5	5	6	7	10	9	9	10	7
Upalne	1	4	2	3	1	1	1	0	2	1
Ukupno ispitanika	6	10	9	10	9	12	11	10	13	8
	P2RY11	PECR	PLA2R1	PRKCH	PRKCZ	PTPRO	ROR1	SHC3	SNRPB2	SNRPN
Imunološke	0	0	0	0	4	1	0	0	1	1
Neimunološke	11	7	7	3	8	7	8	5	6	6
Upalne	5	2	3	3	5	4	3	1	1	0
Ukupno ispitanika	16	9	10	6	17	12	11	6	8	7
	SSB	STAT6	THYRO	TRANSF	TUBA1B	TUBB	TUB	VCL	VEGFA	VIM
Imunološke	2	2	2	1	0	1	0	1	0	1
Neimunološke	6	10	11	5	8	8	6	5	5	5
Upalne	3	2	2	0	4	4	0	1	0	1
Ukupno ispitanika	11	14	15	6	12	13	6	7	5	7

Podjela ispitanika prema izloženosti imunizirajućim događajima prikazana je u Tablici 15. Napravljena je podjela prema stvorenim protutijelima anti-HLA, IgG non-HLA i komplement-vezujućim protutijelima non-HLA.

Tablica 15. Podjela svih ispitanika uključenih u istraživanje (N = 74) prema izloženosti imunizirajućim događajima.

Skupine ispitanika ovisno o izloženosti imunizirajućim događajima	IgG anti-HLA pozitivni serumi, N = 32	IgG anti-HLA negativni serumi, N = 42	IgG non-HLA pozitivni serumi, N = 68	IgG non-HLA negativni serumi, N = 6	Serumi s komplement-vezujućim protutijelima non-HLA N = 34	Serumi bez komplement-vezujućih protutijela non-HLA N = 26	Serumi s nerazjašnjenom sposobnosti vezanja komplementa protutijela non-HLA N = 14
Skupina ispitanika koja nije bila izložena ni jednom od imunizirajućih događaja (N = 19)	2 (10,5 %)	17 (89,5 %)	18 (94,7 %)	1 (5,3 %)	9 (47,4 %)	7 (36,8 %)	3 (15,8 %)
	P < 0,00001		P < 0,00001		P = 0,50932		Np*
Skupina ispitanika koji su bili izloženi imunizirajućim događajima putem transfuzije (N = 49)	25 (51,0 %)	24 (49,0%)	44 (89,8 %)	5 (10,2%)	22 (44,9 %)	18 (36,7%)	9 (18,4%)
	P = 0,8415		P < 0,00001		P = 0,4122		Np*
Skupina ispitanika koje su bile izložene imunizirajućim događajima putem trudnoće (N = 18)	13 (72,2 %)	5 (27,8 %)	16 (88,9 %)	2 (11,1 %)	7 (38,9 %)	4 (22,2 %)	7 (38,9 %)
	P = 0,0076		P < 0,00001		P = 0,2757		Np*
Skupina ispitanika koje su bile izložene imunizirajućim događajima putem i transfuzije i trudnoće (N = 14)	10 (71,4 %)	4 (28,6 %)	12 (85,7 %)	2 (14,3 %)	6 (42,9 %)	4 (28,6 %)	4 (28,6 %)
	P = 0,0232		P = 0,0002		P = 0,4295		Np*
Skupina ispitanika koji su bili izloženi imunizirajućim događajima putem prethodne transplantacije bubrega, odnosno antigenima HLA (N = 18)	16 (88,9 %)	2 (11,1 %)	16 (88,9 %)	2 (11,1 %)	9 (50,0 %)	5 (27,8 %)	4 (22,2 %)
	P < 0,00001		P < 0,00001		P = 0,1707		Np*

* Np = nije primjenjivo. Usporedba je napravljena primjenom Fisherovog egzaktnog testa, s jednim stupnjem slobode, statistička značajnost $p < 0,05$

S obzirom na anamnestičke podatke vezane za primljene transfuzije krvnih pripravaka nađeno je da je 49 (66,2 %) ispitanika primilo transfuziju krvnih pripravaka, dok njih 25 (33,8%) nije. Usporedbom ovih dviju skupina nije utvrđena statistička značajnost (Tablica 16.).

Tablica 16. Srednja vrijednost, medijan, minimum i maksimum broja IgG protutijela na različite specifičnosti non-HLA u skupinama ispitanika u ovisnosti o tome jesu li primili transfuziju krvnih pripravaka.

Transfuzija krvnih pripravaka u anamnezi ispitanika	Da	Ne
Broj ispitanika	49 (66,2 %)	25 (33,8 %)
Srednja vrijednost različitih specifičnosti protutijela non-HLA	8,80	6,96
Medijan različitih specifičnosti protutijela non-HLA	3	3
Minimum	0	0
Maksimum	59	57
Usporedba dviju skupina ispitanika*	p = 0,683	

*Usporedba je napravljena primjenom Mann-Whitney U testa, statistička značajnost $p < 0,05$, $N = 74$.

Usporedbom skupina ispitanica s obzirom na to jesu li imale trudnoću ili ne nađeno je da ih je 18 bilo trudno (75,0 %), a 6 nije (25,0 %). Nije utvrđena statistička značajnost (Tablica 17.) u srednjim vrijednostima različitih specifičnosti protutijela non-HLA i različitim specifičnostima protutijela non-HLA (Tablica 17.).

Tablica 17. Srednja vrijednost, medijan, minimum i maksimum broja IgG protutijela na različite specifičnosti non-HLA u skupinama ispitanica ($N = 24$) koje su imale trudnoću i onih koje nisu.

Trudnoća u anamnezi ispitanica	Da	Ne
Broj ispitanica	18 (75,0 %)	6 (25,0 %)
Srednja vrijednost različitih specifičnosti protutijela non-HLA	7,89	19,71
Medijan različitih specifičnosti protutijela non-HLA	2,5	15
Minimum	0	2
Maksimum	58	57
Usporedba dviju skupina ispitanika *	p = 0,083	

*Usporedba je napravljena primjenom Mann-Whitney U testa, statistička značajnost $p < 0,05$, $N = 24$.

Statističkom analizom broja specifičnosti protutijela non-HLA sa svakim od imunizirajućih događaja, koje pojedini ispitanik ima evidentirane u svojoj anamnezi, određen je point-biserijalni koeficijent korelacije. Na osnovi vrijednosti koeficijenata i razine značajnosti za svaki od imunizirajućih događaja nije utvrđena korelacija između broja specifičnosti protutijela non-HLA i imunizirajućih događaja u ispitivanoj populaciji. (Tablica 18.).

Tablica 18. Korelacija broja specifičnosti protutijela non-HLA i imunizirajućih događaja.

Imunizirajući događaj	Koeficijent korelacije* i razina značajnosti
Trudnoća	0.01, $p > 0,05$
Transfuzija	-0.07, $p > 0,05$
Transplantacija	0.011, $p > 0,05$

* Point-biserijalni koeficijent korelacije izračunat je na temelju broja specifičnosti protutijela non-HLA u serumu pojedinog ispitanika.

U ispitivanoj populaciji 60 (81,1 %) ispitanika je liječeno postupkom dijalize. Od njih, 15 ispitanika liječeno je peritonejskom dijalizom (25,0 %), a 45 ispitanika hemodijalizom (75,0 %). Nije utvrđena statistički značajna razlika u usporedbi broja IgG protutijela non-HLA u serumima ispitanika koji nisu započeli dijalitičko liječenje i bilo koje promatrane vrste dijalitičkog liječenja (Tablica 19.).

Tablica 19. Srednja vrijednost, medijan, minimum i maksimum broja IgG protutijela na različite specifičnosti non-HLA u skupinama ispitanika (N = 74) prema vrsti dijalitičkog liječenja.

Dijalitički postupak u anamnezi ispitanika	Bez dijalitičkog liječenja	Peritonejska dijaliza	Hemodijaliza
Broj ispitanika	14 (18,9 %)	15 (20,3 %)	45 (60,8 %)
Srednja vrijednost različitih specifičnosti protutijela non-HLA	10,4	12,2	6,2
Medijan različitih specifičnosti protutijela non-HLA	4,5	3	3
Minimum	0	0	0
Maksimum	59	57	58
Usporedba skupina ispitanika bez dijalitičkog liječenja i na peritonejskoj dijalizi		p = 0,965	
Usporedba skupina ispitanika bez dijalitičkog liječenja i na hemodijalizi		p = 0,306	
Usporedba skupina ispitanika na peritonejskoj dijalizi i hemodijalizi		p = 0,326	
Usporedba svih triju skupina ispitanika		p = 0,445	

*Usporedba je napravljena primjenom testa Kruskal-Wallis, statistička značajnost $p < 0,05$, N = 74.

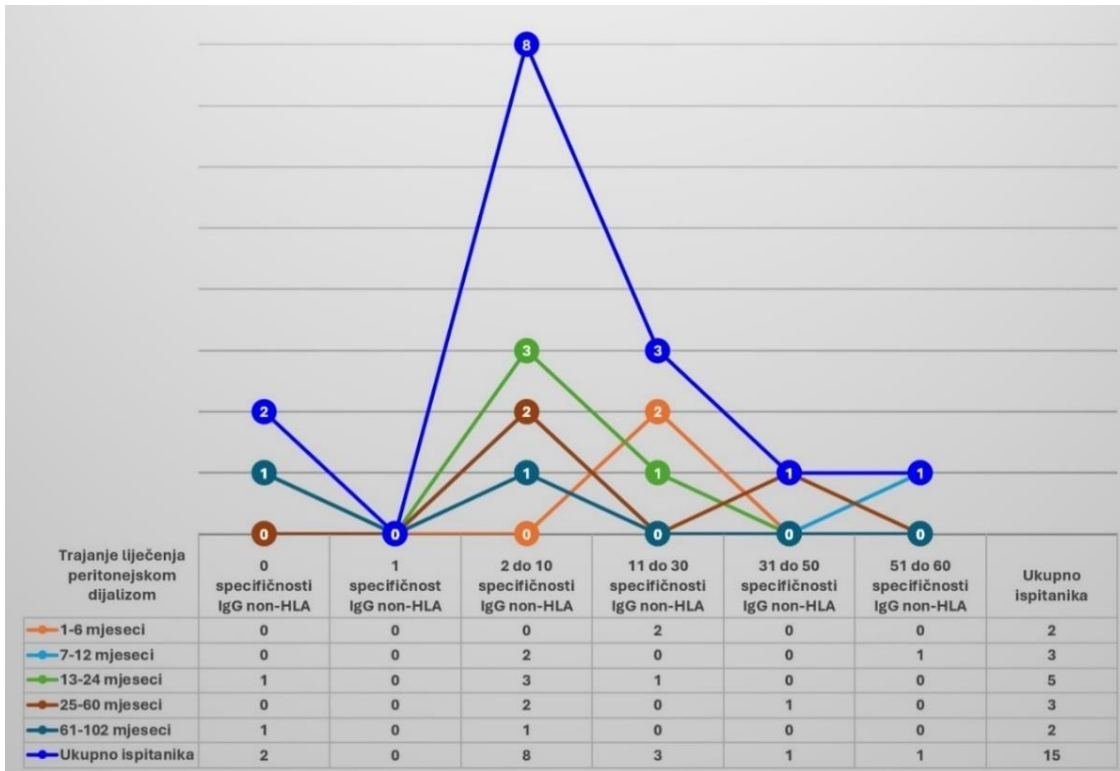
Raspodjela duljine trajanja dijalitičkog liječenja do prikupljanja seruma pojedinog ispitanika prikazana je u Tablici 20. Najveći broj ispitanika na peritonejskoj dijalizi liječen je između 13 i 24 mjeseca (8,3 %) uz medijan 19 mjeseci, dok je najveći broj ispitanika na hemodijalizi liječen između 25 i 60 mjeseci (38,3 %) uz medijan 34 mjeseca. Od svih ispitanika na dijalizi, najveći broj ispitanika liječen je između 25 i 60 mjeseci (38,3 %) uz medijan 30 mjeseci.

Tablica 20. Duljina trajanja dijalitičkog liječenja u skupinama ispitanika (N = 60) koji su bili liječeni peritonejskom dijalizom i hemodijalizom.

Duljina trajanja dijalitičkog liječenja (u mjesecima)	1 – 6	7 – 12	13 – 24	25 – 60	61 – 102	Ukupno	Srednja vrijednost (mjeseci)	Medijan (mjeseci)	Minimum (mjeseci)	Maksimum (mjeseci)
Ispitanici liječeni peritonejskom dijalizom	2 3,3 %	3 5,0 %	5 8,3 %	3 5,0 %	2 3,3 %	15 25,0 %	27,1	19	5	1
Ispitanici liječeni hemodijalizom	5 8,3 %	2 3,3 %	8 13,3 %	23 38,3 %	7 11,7 %	45 75,0 %	38,1	34	79	102
Broj ispitanika ukupno	7	5	13	26	9	60	35,4	30	1	102
Učestalost (%)	11,7	8,3	21,7	43,3	15,0	100,0				
95% interval pouzdanosti (%) *	4,8 – 22,6	2,8 – 18,4	12,1 – 34,2	30,6 – 56,8	7,1 – 26,6	-				

* 95%-tni interval pouzdanosti proporcije određen binomnom aproksimacijom.

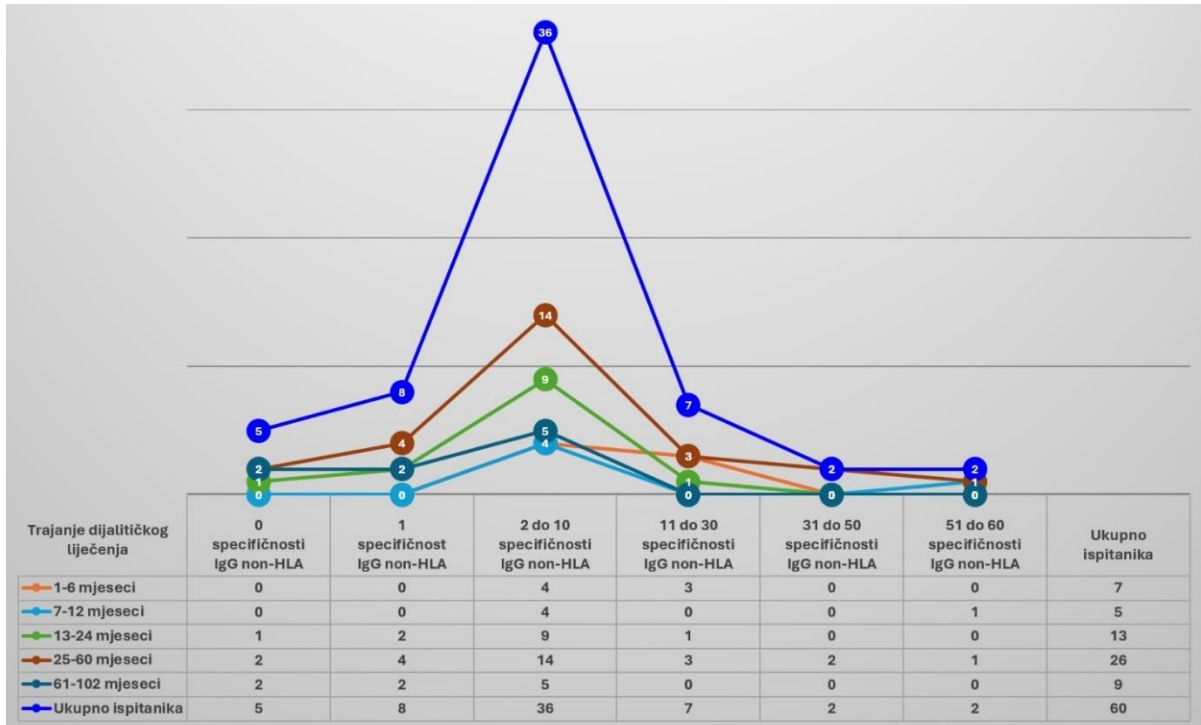
U nastavku je prikazana korelacija duljine trajanja dijalitičkog liječenja i broja različitih specifičnosti IgG protutijela non-HLA u serumima ispitanika liječenih peritonejskom dijalizom (N = 15, Slika 12.), hemodijalizom (N = 45, Slika 13.) te ukupno za sve ispitanike na dijalitičkom liječenju (N = 60, Slika 14).



Slika 12. Korelacija duljine trajanja dijalitičkog liječenja i broja različitih specifičnosti IgG protutijela non-HLA u serumima ispitanika liječenih peritonejskom dijalizom (N = 15).



Slika 13. Korelacija duljine trajanja dijalitičkog liječenja i broja različitih specifičnosti IgG protutijela non-HLA u serumima ispitanika liječenih hemodijalizom (N = 45).



Slika 14. Korelacija duljine trajanja dijalitičkog liječenja i broja različitih specifičnosti IgG protutijela non-HLA u serumima svih ispitanika na dijalitičkom liječenju (N = 60).

U Tablici 21. prikazan je broj različitih specifičnosti IgG protutijela non-HLA u serumima ispitanika koji nisu započeli s dijalitičkim liječenjem do trenutka uzimanja uzorka seruma. Naposljetku, Tablica 22. prikazuje usporedbu broja različitih specifičnosti IgG protutijela non-HLA u serumima ispitanika koji su započeli s dijalitičkim liječenjem (N = 60) i onih koji nisu (N = 14) do trenutka uzimanja uzorka seruma. Za ispitivanu populaciju nije utvrđena statistički značajna razlika u usporedbi broja različitih specifičnosti IgG protutijela non-HLA u serumima ispitanika koji su započeli s dijalitičkim liječenjem i onih koji nisu ($p > 0,05$).

Tablica 21. Broj različitih specifičnosti IgG protutijela non-HLA u serumima ispitanika koji nisu započeli s dijalitičkim liječenjem (N = 14) do trenutka uzimanja uzorka seruma.

Ispitanici koji nisu započeli s dijalitičkim liječenjem		Broj ispitanika
Broj različitih specifičnosti IgG protutijela non-HLA	0	1
	1	2
	2 – 10	7
	11 – 30	3
	31 – 50	0
	51 – 60	1
Ukupno		14

Tablica 22. Usporedba broja različitih specifičnosti IgG protutijela non-HLA u serumima ispitanika koji su započeli s dijalitičkim liječenjem (N = 60) i onih koji nisu (N = 14) do trenutka uzimanja uzorka seruma.

p*	Duljina trajanja dijalitičkog liječenja (u mjesecima)	1 – 6	7 – 12	13 – 24	25 – 60	61 – 102	Svi ispitanici
		mjeseci	mjeseci	mjeseci	mjeseci	mjeseci	
Vrsta dijalitičkog liječenja	Hemodijaliza (N = 45)	1,000	1,000	0,598	0,983	0,782	0,602
	Peritonejska dijaliza (N = 15)	0,417	0,718	1,000	0,532	0,567	0,830
	Svi ispitanici na dijalitičkom liječenju (N = 60)	0,855	0,745	0,851	0,944	0,576	0,827

* Usporedba je napravljena primjenom Fisherovog egzaktnog testa, uz 5 stupnjeva slobode, statistička značajnost $p < 0,05$.

5. RASPRAVA

Kronična bubrežna bolest dovodi postupno do terminalnog stadija bolesti i potrebe za nadomještanjem bubrežne funkcije dijalizom ili, što je bolje za kvalitetu života bolesnika, transplantacijom bubrega [60]. Transplantacija se smatra zlatnim standardom u liječenju završnog stadija zatajenja organa. Zbog imunizacije oboljele osobe imaju smanjenu priliku za pronalaženje podudarnog davatelja, a ujedno je i povećan imunološki rizik, što rezultira lošijim ishodima transplantacije [88, 94-98]. Za sprječavanje akutnog ili kroničnog odbacivanja presatka nakon transplantacije važno je svesti na minimum nepodudarnosti između primatelja i davatelja organa te odrediti specifičnosti neprihvatljivih antigena redovitim praćenjem pacijenta na listi čekanja za transplantaciju, a što se uobičajeno čini određivanjem postotka panel reaktivnih protutijela (PRA) usmjerenih na ljudske leukocitne antigene (HLA). Visoki postotak PRA velika je prepreka pri transplantaciji organa, dok specifična imunizacija ukazuje na potpunu neprihvatljivost organa [78]. U posljednjih nekoliko godina objavljena su istraživanja na transplantiranim bolesnicima kod kojih je dokazano da je odbacivanje presatka posredovanog protutijelima bez dokazanog prisustva protutijela anti-HLA, što ukazuje na činjenicu da na ishod preživljavanja presatka važnu ulogu mogu imati i protutijela na molekule izvan sustava HLA tzv. protutijela non-HLA [100-102].

U ovo istraživanje bila su uključena 74 ispitanika prosječne starosti od 56,1 godine koji su oboljeli od kronične bubrežne bolesti u terminalnom stadiju. Svi ispitanici su se tijekom 2022. godine nalazili na listi čekanja za transplantaciju u KBC-u Rijeka. Prema anamnestičkim podacima ispitanici su bili podijeljeni u tri kategorije dijagnoza: imunološke (17,6 % ispitanika), neimunološke (59,5% ispitanika) i upalne bolesti (23,0 % ispitanika). Na osnovu anamnestičkih podataka utvrđeno je da su transfuzije krvnih pripravaka bile imunizirajući događaj u 66,2 % ispitanika, od kojih su većina bili muški ispitanici. Trudnoća se smatra uzrokom imunizacije u 75,0 % ispitanica, a kombinacija transfuzije i trudnoće u 54,2 % ispitanica. Prethodno opisani imunizirajući događaji mogu rezultirati stvaranjem protutijela anti-HLA. Istraživanja na različitim populacijama bolesnika koji se nalaze na listama čekanja za transplantaciju organa pokazala su da oko 60% tih bolesnika imaju prisutna protutijela anti-HLA [89,90].

5.1. Karakterizacija protutijela anti-HLA

Protutijela usmjerena na nepodudarne antigene HLA mogu uzrokovati skraćeno vrijeme preživljavanja presađenog bubrega, različite oblike odbacivanja presatka, poremećaj funkcije te veću učestalost nuspojava na imunosupresivnu terapiju. Ona se stvaraju kao posljedica izloženosti primatelja stranim antigenima HLA tijekom prethodnih transplantacija ili drugih imunizirajućih događaja, premda su dokazani i kod osoba bez poznatog imunizirajućeg događaja [6, 61].

Testiranje seruma metodom CDC određena su protutijela anti-HLA u serumima 28,4 % ispitanika, što upućuje na potencijalni imunosni rizik. Probirnim testom Luminex tehnologije utvrđen je značajno veći broj ispitanika pozitivnih za razred I i/ili II, njih 52,7 %, što je potvrđeno i usporedbom dviju proporcija gdje je utvrđena statistički značajna razlika u dobivenim rezultatima ($p = 0,003$). Razlika u većem broju pozitivnih rezultata testiranja potvrdila je puno veću osjetljivost i specifičnost Luminex tehnologije u odnosu na metodu CDC što je sukladno podacima iz literature [61]

U serumima 35,1 % ispitanika utvrđena je specifičnost protutijela anti-HLA razreda I, a u 28,4 % ispitanika specifičnost protutijela anti-HLA razreda II. Antigeni HLA-B70, Cw11, Cw13 i DR53 jedine su iznimke u ispitivanoj populaciji koje za koje nisu u ovom istraživanju utvrđena protutijela anti-HLA. Do sada su objavljena četiri istraživanja vezana za određivanje učestalosti alela HLA i haplotipova u kojima se oni nalaze na populacijama ispitanika koji žive u Republici Hrvatskoj [58,59,91,92]. Usporedbom rezultata tih istraživanja s učestalostima specifičnih protutijela anti-HLA u ispitivanoj populaciji uočeno je da najveću učestalost u ispitivanoj populaciji je imalo protutijelo anti-HLA-A2 (14,9 %) dok aleli koji kodiraju antigen HLA-A2 imaju najveću učestalost u populaciji Hrvatske (30,3 %) [58]. Nađena je statistički značajna razlika u usporedbi ovih dviju učestalosti ($p=0,004$). Nadalje, i za ostale najučestalije alele u Hrvatskoj vrijedi da je učestalost tih alela u pravilu veća od dobivene učestalosti specifičnog protutijela anti-HLA na produkte tih alela u ispitivanoj populaciji, bez obzira na statistički značaj te razlike. S druge strane, aleli lokusa HLA-A s najmanjom učestalosti u Hrvatskoj, manjom od 0,1 % (HLA-A*34, A*69, A*74 i A*80) kodiraju za antigene koji potiču stvaranje protutijela anti-HLA sa relativno većom učestalosti u ovom istraživanju (5,4 % do 12,2 %, Tablica 1). Dobiveni rezultati mogu se objasniti činjenicom da upravo zato što su česti u populaciji manja je vjerojatnost za pojavu nepodudarnosti antigena HLA između primatelja i

davatelja pa stoga i manje bolesnika stvara aloprotutijela na produkte tih alela nakon imunizirajućeg događaja. Jednako tako, ukazuju i na moguću veću imunogenost produkata rijetkih alela te time i češći imunosni odgovor. Slične rezultati o omjerima učestalosti alela HLA i specifičnih protutijela anti-HLA opisani su i u ranijim istraživanjima [104,105].

U ovom istraživanju najveća učestalost protutijela anti-HLA utvrđena je za anti-HLA-B15 (67,6 %, Tablica 2.). Radi se o *broad* antigenu koji obuhvaća više antigena lokusa HLA-B. Zbog preciznijeg praćenja učestalosti s učestalosti alela sva protutijela u serumima ispitanika stvorena na antigene HLA-B62, B63, B71, B72, B75, B76 i B77 objedinjena su pod antigenisku specifičnost HLA-B15 kodiranom alelima iz alelne skupine HLA-B*15. Nažalost, to je za posljedicu imalo porast te učestalosti jer su pojedini ispitanici stvorili jedno ili više specifičnih protutijela anti-HLA iz skupine B15. Za neke druge *broad* antigene postoji zasebna alelna skupina za svaki antigen kao što je (na primjer HLA-B12 koji uključuje antigene HLA-B44 i B45 kodirane alelima HLA-B*44 i -B*45 [58]. Antigeni ostalih ispitivanih lokusa HLA pokazuju slične pravilnosti. Od antigena HLA-Cw najveću učestalost u populaciji Hrvatske pokazuju aleli odgovorni za ekspresiju antigena Cw4, Cw7 i Cw12, dok su učestalosti specifičnog protutijela anti-HLA u ispitivanoj populaciji redovito manje i s, u pravilu, statistički značajnom razlikom (za Cw4 $p=0,0226$; za Cw7 $p=0,0002$ i za Cw12 $p<0,00001$). Analogni rezultati su dobiveni za antigene HLA-DR, konkretnije za HLA-DR11 i DR13. Kao i na primjeru antigenske specifičnosti HLA-A2, i u slučaju DQ2 pokazana je statistički značajna razlika u učestalosti alela koji ga kodira u populaciji Hrvatske i učestalosti specifičnog protutijela anti-HLA u ispitivanoj populaciji ($p=0,0011$). Protutijelo anti-HLA-DQ2 nađeno je u 1,4 % seruma, dok je učestalost alela koji kodiraju antigen HLA-DQ2 15,7 % [59]. Također, i za najčešće antigene HLA-DQ vrijedi da je učestalost specifičnog protutijela anti-HLA u ispitivanoj populaciji značajno manja ($p < 0,05$).

U Hrvatskoj postoje dva međunarodno akreditirana imunogenetička laboratorija, u KBC-u Zagreb, kao referentni centar i u KBC-u Rijeka koji su dio sustava Eurotransplanta. Svaki centar unutar Eurotransplanta ima vlastitu listu čekanja za transplantaciju bubrega i drugih solidnih organa. Za pacijente na listi čekanja u KBC-u Zagreb napravljeno je istraživanje o raspodjeli gena HLA i imunizaciji, odnosno stvaranju protutijela anti-HLA [106]. U navedenom istraživanju najveća učestalost protutijela anti-HLA stvorenih na antigene ispitivanih lokusa (HLA-A, -B, -C i -DRB1) nađena je za anti-HLA-A24 (9,09 %), anti-HLA-A23 (7,93 %), anti-HLA-A25 (7,16 %), anti-HLA-B27 (4,71 %), anti-HLA-B44 (3,40 %), anti-

HLA-Cw5 (12,24 %), anti-HLA-Cw2, Cw7 i Cw17 (svako sa po 9,18 %), anti-HLA-DR1, DR4, DR9 i DR15 (svako sa po 8,55 %), anti-HLA-DQ9 (16,31 %) te anti-HLA-DQ8 (15,80 %) [106]. Rezultati ovog istraživanja vrlo su slični po redoslijedu učestalosti za antigenske specifičnosti HLA-A s rezultatima prethodno spomenutog istraživanja. U ispitivanoj populaciji najveća učestalost bila je za anti-HLA-A2, dok su sljedeća najučestalija protutijela bila upravo anti-HLA-A24, A25 i A23 (uz A32 i A69 jednake učestalosti). Za razliku od rezultata dobivenih na lokusu A, usporedbom dobivenih rezultata studije na ispitanicima s liste čekanja KBC Zagreb i rezultata ove studije nije nađena podudarnost u učestalosti protutijela anti-HLA-B [106]. Nadalje, učestalost protutijela anti-HLA-Cw5 bila je najmanja (1,4%), a i preostala protutijela na antigene lokusa HLA-C s najvećom učestalošću u Zagrebu imala su, u pravilu, najmanju učestalost u ovom istraživanju. Jednako kao i u Zagrebu, protutijela anti-HLA-DR15 (10,8 %) i DR1 (8,1 %) imala su najveću učestalost i u ovom istraživanju, međutim, u ovom istraživanju anti-HLA-DR4 i DR9 nisu utvrđena s velikom učestalošću u serumu ispitanika.

5.2. Specifičnosti IgG protutijela non-HLA u ispitivanoj populaciji

Posebno važan aspekt ovog istraživanja bilo je određivanje IgG protutijela prema antigenima non-HLA. Iako odbacivanje alogenog presatka uobičajeno uzrokuju HLA-DSA (ABMR), patološke promjene nastaju i u situacijama kad ne postoji prisutnost cirkulirajućih HLA-DSA u bolesnika, što upućuje na antigene izvan sustava HLA kao potencijalne čimbenke koji mogu doprinijeti odbacivanju presatka [9, 62,63,]. Iako se posljednjih desetak godina protutijela non-HLA intenzivno proučavaju, još uvijek nije u potpunosti istražen mehanizam njihova razvoja i djelovanja pri oštećenju presatka [64-66]. Isto tako, na kliničku važnost protutijela non-HLA stvorenih na modificirani aloantigen koja uzorkuju aloimuni odgovor i posljedično odbacivanje presatka bubrega ukazuju nedavno objavljena istraživanja [71-73]. Rezultati nedavnih istraživanja ukazuju na mogući sinergistički učinak HLA-DSA i protutijela non-HLA, koji ima za posljedicu skraćeno vrijeme preživljenja presatka [69,70]. Najviše se je do sada istraživao AT1R, a u posljednje vrijeme istražuje se i sve veći broj drugih antigena non-HLA, poput miozina, tubulina, agrina, vimentina, ARHGDIB i drugih [67-69]. Za AT1R ne postoji konsenzus oko kliničke važnosti budući da sama prisutnost tog protutijela nije uvijek dovoljna za odbacivanje presatka.

Rezultati određivanja specifičnost protutijela non-HLA u ispitivanoj populaciji bolesnika u okviru ovog istraživanja pokazali su da je čak 91,9 % ispitanika razvilo IgG-

protutijela non-HLA, što je usporedivo s rezultatima dobivenim u istraživanju Shin i sur. koje je uključivalo bolesnike oboljele od terminalne bubrežne bolesti ,a prije transplantacije bubrega [72]. Shin i sur. pokazali su da je od 32 antigena non-HLA iz ispitivanog panela u pojedinog ispitanika bilo prisutno od 0,4 % do 97,1 % protutijela na te antigene. U ovom istraživanju testiranje je napravljeno na panelu od 60 antigena non-HLA. U ispitivanoj populaciji protutijelo na svaki testirani antigen non-HLA dokazano je u serumima minimalno četiriju ispitanika. Od svih testiranih antigena non-HLA 13,6 % bilo je pozitivno za IgG-protutijelo. U 58,1 % ispitanika utvrđene su višestruke specifičnosti (2–10) protutijela non-HLA. Ovaj rezultat također se podudara s istraživanjem Shin i sur., u kojem je također najveći broj ispitanika stvorio između dviju i deset specifičnosti protutijela non-HLA [74]. Moguće je da je višestrukom specifičnosti povećana imunogena sposobnost ukupnih protutijela non-HLA za posttransplantacijski aloimuni odgovor.

5.3. Određivanje komplement-vezujućih protutijela non-HLA

Nepodudarnost u sustavima krvnih grupa ABO i antigena HLA glavni su izvor imunskog rizika kod alogene transplantacije. Prirodna protutijela na antigene sustava ABO uključena su u humoralni imunski odgovor na presatke. Ona su primarno IgM razreda, koji su jaki aktivatori komplementa [75,76]. Protutijela anti-HLA stvaraju se u bolesnika s HLA-nepodudarnim presatkom, a posebno u već imuniziranih, kao što su višerotkinje ili višestruko transfundirani bolesnici, a što može dovesti do hiperakutnog ili akutnog ABMR te gubitka presatka [77]. Početni je korak vezanje već postojećih ili novostvorenih nakon transplantacije HLA-DSA za epitop(e) na antigenu HLA i pokretanje puta aktivacije komplementa preko proteina C1q [78]. S obzirom na značaj komplementa u transplantaciji te vezanju IgG protutijela, u ovom istraživanju određene su specifičnosti i svojstva aktivacije komplementa za IgG protutijela non-HLA. Kako u literaturi do sada nisu opisane granične vrijednosti, jedan od zadataka bio je odrediti granične vrijednosti u testu LNHLA+C3d za razlučivanje komplement-vezujuća IgG protutijela non-HLA (C3d-pozitivni uzorci) od onih koja ne vežu komplement (C3d-negativni uzorci) u uzorcima seruma ispitanika. To je bilo posebno važno budući da ne postoje drugi klinički podaci za istraživanu skupinu ispitanikakoji bi mogli upućivati na točan rezultat testiranja. Iz tog razloga su se u prvoj fazi istraživanja nakon dobivenih vrijednosti MFI u testu LNHLA+C3d, odredile granične vrijednosti na način analogan testovima čvrste faze s mikrosferama za IgG protutijela anti-HLA i komplement-vezujuća

protutijela anti-HLA. U testu za određivanje specifičnosti protutijela anti-HLA granična vrijednost je određena, ne isključivo vrijednošću MFI, već i omjerom vrijednosti MFI i najniže vrijednosti MFI za antigen istog lokusa HLA (koja u ovom kontekstu „simulira“ pozadinski šum). U testu za određivanje komplement-vezujućih protutijela anti-HLA granična vrijednost određena je kao trostruka vrijednost pozadinskog šuma mikrosfere za svaku specifičnost HLA. Oba pristupa su prvobitno primijenjena na rezultate ovog istraživanja (vrijednosti MFI u testu LNHLA+C3d), međutim, dobivene vrijednosti nisu bile ujednačene. Zbog toga takav istovjetan pristup nije bio primjenjiv za rezultate MFI u testu LNHLA+C3d. Pozadinski šum bilo bi moguće odrediti usporednim višestrukim testiranjem C3d-negativnih uzoraka ispitanika.

Statističkom analizom određena je struktura raspodjele rezultata MFI u testu LNHLA+C3d u IgG-negativnih i IgG-pozitivnih ispitanika. Upotrebom prilagođenog Matthewsovog koeficijenta korelacije (MCC_{adj}) završno su se definirale granične vrijednosti. Koeficijent MCC_{adj} definiran je zato što u kontekstu ovog istraživanja, vrijednost FN u matrici konfuzije ne predstavlja pogrešnu klasifikaciju, već točnu identifikaciju IgG-pozitivnih ispitanika sa stvorenim IgG protutijelima non-HLA koja ne vežu komplement, odnosno biološki C3d-negativnih. Zbog toga je u formuli za koeficijent MCC_{adj} , definiranoj u poglavlju 3.3.2.3, varijabla FN zanemarena kako ne bi utjecala na konačnu vrijednost koeficijenta MCC_{adj} . Drugim riječima, prilagođene vrijednosti koeficijenta MCC (MCC_{adj}) za svaki antigen u ispitivanom panelu izračunate su uz pretpostavku da rezultati FN ne umanjuju izvedbu testa. Granične vrijednosti s koeficijentom $MCC_{adj} = 1$ pokazuju savršenu učinkovitost klasifikacije bez razmatranja varijable FN kao pogreške. Što je niža vrijednost MCC_{adj} , niža je učinkovitost klasifikacije samo na temelju varijabli TP, TN i FP. Teoretski raspon za koeficijent MCC_{adj} je od 0 do 1, pri čemu 0 znači da nema prediktivnu važnost osim slučajnosti (svi uzorci su predviđeno pozitivni ili negativni), dok 1 označava savršenu izvedbu klasifikacije [56,57].

U kontekstu ovog istraživanja s prikladno definiranim koeficijentom MCC_{adj} , viša vrijednost tog koeficijenta značila je da su i osjetljivost i specifičnost visoke, a stopa lažno pozitivnih rezultata niska. Visoka vrijednost MCC_{adj} ukazuje na činjenicu da je korišteni test bio prikladan za identifikaciju uzoraka koji su doista C3d-pozitivni, odnosno onih koji stvarno vežu komplement [103]. Nadalje, visoka vrijednost koeficijenta MCC_{adj} sugerira da je u istraživanju upotrebljavan test s kojim je moguće pouzdano identificirati uzorke koji su doista C3d-negativni, što, uz IgG-negativne uključuje i one IgG-pozitivne ispitanike čija IgG protutijela non-HLA uistinu ne vežu komplement. Veća vrijednost koeficijenta MCC_{adj} ukazuje

na snažno slaganje između predviđanja analize i stvarnog statusa uzoraka, odnosno analizu s visokom dijagnostičkom točnošću za specifičnu svrhu identifikacije IgG protutijela non-HLA koja vežu komplement u odnosu na ona koja ne vežu komplement. To znači da je upotrijebljeni test vrlo pouzdan u razlikovanju C3d-pozitivnih od C3d-negativnih (uključujući i IgG-pozitivne ispitanike čija IgG protutijela non-HLA ne vežu komplement), što je bilo od kritične važnosti za ovo istraživanje. Na temelju iznesenog, određene su tri kategorije u koje su svrstani pojedini antigeni non-HLA: C3d-pozitivni (s graničnom vrijednosti $MCC_{adj} = 1$), C3d-negativni (granična vrijednost nije određena; $MCC_{adj} < 0,7$) te C3d-diskutabilni (nije bilo moguće pouzdano odrediti postoji li granična vrijednost ili ne; $0,7 > MCC_{adj} \geq 1$).

Za određenu skupinu antigena non-HLA u ispitivanom panelu (23/60, 38,3 %) granična vrijednost MFI za C3d nije određena te oni nisu pokazali sposobnost stvaranja IgG protutijela koja vežu komplement. Serumi svih ispitanika su bili definitivno C3d-negativni za svaki od antigena non-HLA iz te skupine. Razlozi nemogućnosti definiranja granične vrijednosti mogu biti dvojaki. Moguće je da u ispitivanoj populaciji nije postojao ispitanik koji u serumu ima IgG protutijelo koje veže komplement iako bi ona teoretski trebala postojati u toj situaciji. U tim slučajevima granična vrijednost bila bi definitivno veća od najveće vrijednosti MFI za pojedini antigen u testu LNHLA+C3d određene za IgG-negativnog ispitanika. Jednako tako, druga je mogućnost da ti antigeni uopće nemaju sposobnost stvaranja IgG protutijela koja vežu komplement (Tablica 7.). Za njih su potrebna dodatna istraživanja na većem broju uzoraka kako bi se s puno većom preciznošću mogle potvrditi ili opovrgnuti iznesene pretpostavke za objašnjenje rezultata dobivenih u ovom istraživanju.

Antigeni non-HLA (14/60, 23,3 %), prikazani u Tablici 8., pripadaju skupini C3d-diskutabilnih, budući da, unutar ispitivane populacije, nije bilo moguće pouzdano odrediti postoji li granična vrijednost ili ne. Razlozi zbog kojih nije bilo moguće pouzdano odrediti graničnu vrijednost uključuju: mali razmak između najviše vrijednosti MFI za C3d IgG-negativnog ispitanika i najniže vrijednosti MFI za C3d IgG-pozitivnog ispitanika (uobičajeno < 30 %), iznimno niske vrijednosti MFI za C3d IgG-pozitivnih ispitanika (uobičajeno < 200 MFI) bez prisutne određene izrazito visoke vrijednosti MFI za C3d preostalih IgG-pozitivnih ispitanika, normalna raspodjela zajedničke distribucije vrijednosti MFI za C3d IgG-pozitivnih i IgG-negativnih ispitanika bez formiranja dviju zasebnih skupina podataka.

Što se tiče dobivenih C3d-pozitivnih rezultata (23/60 antigena, u 34/74 ispitanika), rezultati ovog istraživanja definitivno potvrđuju sposobnost vezanja komplementa IgG

protutijela stvorenih na te antigene (Tablica 9). Određivanje protutijela stvorena na brojne antigene izvan sustava HLA u različitim bolestima i stanjima zaokuplja interes stručne i znanstvene zajednice u protekla gotovo dva desetljeća [101,102]. Za mnogobrojne antigene non-HLA utvrđena je imunogenost koja za posljedicu može imati i odbacivanje presatka. Međutim, sam mehanizam djelovanja pojedinih protutijela non-HLA nije definitivno razjašnjen. Osim vezanja komplementa, IgG protutijela mogu djelovati i kroz druge imunosne procese, poput opsonizacije i neutralizacije antigena, što omogućuje razvoj djelotvornog imunosnog odgovora [107]. Svojim Fc krajem, IgG protutijela vežu se i prenose signal na Fc receptore koji su prisutni na mnogobrojnim stanicama imunosnog sustava (limfociti B, plazma stanice, makrofazi, NK stanice) i drugih stanica u krvi (eozinofili, neutrofil, trombociti) [107]. O tome ovisi i mehanizam imunomodulatornog efekta IgG protutijela, koja tako mogu potaknuti ili suzbiti upalne i imunosne odgovore.

U ovom istraživanju najveću učestalost u serumima ispitanika imala su protutijela anti-PRKCZ (12,2 %), anti-DEXI (8,1 %) te anti-STAT6 (5,4 %). Sva ostala protutijela imala su učestalost manju od 5 %. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na sposobnost vezanja komplementa protutijela anti-PRKCZ. Protein PRKCZ je tip protein-kinaze C koji ima važnu ulogu u upalnim procesima. Istraživanjem Sutherlanda i sur. pokazano je da bi protutijela anti-PRKCZ mogla biti povezana s odbacivanjem i gubitkom presatka, no da nema dovoljno podataka za definitivnu potvrdu njihove aktivne uloge u odbacivanju presatka [108]. Suprotno tome, Nadalje, za protutijelo anti-DEXI dokazana je sposobnost za vezanje komplementa. Sličan rezultat dobiven je i u multicentričnom istraživanju populacije odraslih primatelja presatka srca gdje je utvrđena statistički značajna povezanost s odbacivanjem presatka [109]. Ovim istraživanjem potvrđena je njegova sposobnost vezanja komplementa u serumima šest ispitanika na listi čekanja za transplantaciju bubrega, četvero uvrštenih u skupinu neimunoloških, a dvoje u skupinu upalnih dijagnoza. Pregledom anamnestičkih podataka utvrđeno je da su zajednički patološki pokazatelji kod ispitanika bili povezani s krvožilnim sustavom, poput hipertenzije i anemije. Protutijelo anti-STAT6 povezano je s ABMR u odsutnosti HLA-DSA [113]. U ovom istraživanju komplement-vezujuće protutijelo anti-STAT6 utvrđeno je u serumima četiriju ispitanika, troje ispitanika bilo je u imunološkoj skupini dijagnoza, a jedno u neimunološkoj. Za ispitanike u imunološkoj skupini zajednička dijagnoza bila je IgA nefropatija. Troje ispitanika je razvilo protutijela anti-HLA, od kojih dvoje imaju imunizirajući događaj u anamnezi, dok je treći ispitanik muškog spola koji je stvorio protutijela

anti-HLA nepoznate etiologije. Jedan ispitanik nema protutijela anti-HLA u serumu, iako i u njegovoj anamnezi postoji imunizirajući događaj (transplantacija). S obzirom na rezultate istraživanja Seneva i sur. [110], kao i rezultate ovog istraživanja, prisutnost komplement-vezujućeg protutijela anti-STAT6 u serumu ovog ispitanika moglo bi biti uzrokom odbacivanja presatka nakon iduće transplantacije.

U nedavno objavljenim studijama opisani su načini djelovanja protutijela stvorenih na pojedine antigene non-HLA, a koji su bili prisutni i u panelu iz ovog istraživanja. Isto tako, opisani su i antigeni H-Y, MICA, perlekan kao antigeni koji mogu potaknuti stvaranje komplement-vezujućih protutijela, a AT1R i ETAR kao antigeni čiji je mehanizam djelovanja neovisan o komplementu [44,69,79-82]. Autori Sorohan i sur. napravili su 2022. godine preglednu analizu u kojoj spominju mehanizam aktivacije komplementa koju potiču različiti antigeni non-HLA, od kojih su neki bili ispitivani i u ovom istraživanju [38]. Vimentin je u ranijim istraživanjima pokazao rezultate podudarne s rezultatima ovog istraživanja [115]. U ranijim je istraživanjima mehanizam djelovanja definiran kao ovisan o komplementu, dok je u ovom istraživanju unutar ispitivane populacije nedvojbeno pokazana sposobnost stvaranja IgG protutijela koja vežu komplement. Za ovaj antigen uobičajeno je da potiče stvaranje IgG i IgM protutijela, ponajprije kod kandidata za transplantaciju srca dok su IgG protutijela najčešća su kod bubrežnih bolesnika [42]. Za kolagen I u navedenim ranijim istraživanjima nije definiran mehanizam djelovanja ovisan o komplementu (112,114) što je potvrđeno i ovim istraživanjem. Za antigene non-HLA, ARHGDIB, agrin i PECCR, u ranijim istraživanjima mehanizam djelovanja definiran je kao ovisan o komplementu (116), dok u ovom istraživanju za te antigene nije bilo moguće pouzdano utvrditi njihovu sposobnost stvaranja IgG protutijela koja vežu komplement. Za granične vrijednosti MFI za C3d određene u ovom istraživanju za te antigene, najveća vrijednost MCCadj bila je u rasponu 0,7 do 1, te su, prema kriterijima, ti antigeni svrstani u skupinu C3d-diskutabilnih. Budući da je u ovom istraživanju doista statistički određena granična vrijednost za ove antigene, vjerojatno je da bi u populaciji s većim brojem ispitanika bilo moguće utvrditi ispitanike koji stvaraju komplement-vezujuća protutijela, čiji rezultati bi bili izvjesni. Ovim istraživanjem je za razliku od rezultata prethodno objavljenih istraživanja (113) za antigene PRKCZ, kolagen III, kolagen IV i fibronektin utvrđena sposobnost stvaranja IgG protutijela koja vežu komplement.

Ispitanici s najvećim brojem specifičnosti IgG protutijela non-HLA posebno su bili zanimljivi za sveobuhvatnu analizu podataka dobivenih ovim istraživanjem. U skupini

ispitanika s 51 do 60 specifičnosti IgG protutijela non-HLA u ovom istraživanju bila su tri ispitanika, dvije žene i jedan muškarac. Njihova zajednička obilježja bila su: neprisutnost protutijela anti-HL., Iz anamnestičkih podataka vidljivo je da spadaju u skupinu neimunoloških dijagnoza te da do uzimanja uzorka seruma nisu bili liječeni transplantacijom. Jedna ispitanica (A) nije imala evidentiran imunizirajući događaj, druga ispitanica (B) imala je trudnoću i transfuziju krvnih pripravaka, dok je preostali ispitanik (C) primao transfuziju krvnih pripravaka. Što se tiče dijalitičkog liječenja, jedna ispitanica je liječena 12 mjeseci peritonejskom dijalizom, a druga 34 mjeseca hemodijalizom, dok preostali ispitanik u trenutku uzimanja uzorka seruma nije bio na dijalitičkom liječenju.

Od testiranih specifičnosti protutijela non-HLA, u serumu ispitanice A dokazano je 57 specifičnosti IgG protutijela non-HLA (sve osim kolagena I i kolagena II te PRKCZ). U serumu ispitanice B određeno je 59 specifičnosti IgG protutijela non-HLA (sve osim kolagena I), a u serumu ispitanika C određeno je 58 specifičnosti IgG protutijela non-HLA (sve osim kolagena I i kolagena V). Zanimljivo je da je specifičnost kolagen I bila negativna u sva tri ispitanika s ukupno pojedinačno najvećim brojem različitih IgG protutijela non-HLA. Svojstvo vezanja komplementa dokazano je u ispitanice B za anti-PRKCH te u ispitanika C za anti-LMNA, dok u ispitanice A nije utvrđeno ni za jednu antigensku specifičnost non-HLA iz panela. Zanimljiv je i podatak da u serumu ispitanice A, u kojem je utvrđena prisutnost 57 specifičnosti IgG protutijela non-HLA, nije određeno protutijelo anti-PRKCZ. To protutijelo je u ovom istraživanju određeno u serumima 17 ispitanika, te u njih 9 pokazalo i sposobnost vezanja komplementa, što predstavlja najveću učestalost pojedinog protutijela sa dokazanom sposobnošću vezanja komplementa u ispitivanoj populaciji (12,2 %).

5.4. Korelacija između IgG protutijela non-HLA i komplement vezujućih protutijela non-HLA

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je 91,9 % (68/74) ispitanika stvorilo IgG protutijela na istraživane antigene non-HLA, što je svojevrsan kuriozitet. Prema dobivenim rezultatima i upotrebljavanom algoritmu, u 45,9 % ispitanika (34/74) dokazana su IgG protutijela non-HLA koja imaju sposobnost vezanja komplementa. U više od četvrtine ispitanika, 20/74 (27,0 %), dokazana su IgG protutijela non-HLA koja nisu imala sposobnost vezanja komplementa.

U ispitivanoj populaciji za svaki antigen iz testiranog panela postojala su barem četiri ispitanika koji su stvorili IgG protutijelo non-HLA. Ujedno su kod određenog broja ispitanika svi antigeni u panelu pokazivali nesposobnost vezanja komplementa, odnosno za svaki antigen u panelu, barem neki ispitanici bili su C3d-negativni. To znači da svaki od 60 antigena non-HLA u testiranom panelu, barem kod nekih bolesnika, neće potaknuti imunosni odgovor aktivacijom komplementa. Obrnuto, za 23 antigena kod kojih je pokazana sposobnost iniciranja imunosnog odgovora IgG protutijelima non-HLA koji vežu komplement, ujedno je utvrđeno da takav imunosni odgovor nije bio prisutan u svim ispitanicima koji su stvorili IgG protutijelo na taj antigen non-HLA. Rezultati ovog istraživanja nedvojbeno pokazuju i da ni za jedan antigen non-HLA koji potiče stvaranje IgG protutijela, ona neće u 100 % slučajeva vezati komplement. To ukazuje da je potrebno provoditi testiranja na komplement-vezujuća protutijela non-HLA kako bi se u konkretnom slučaju kod konkretnog bolesnika utvrdila priroda imunosnog odgovora, odnosno vežu li ta IgG protutijela komplement ili ne.

5.5. Korelacija između IgG protutijela anti-HLA i protutijela non-HLA

U ovom istraživanju su u 32 (43,2 %) ispitanika utvrđene specifičnosti IgG protutijela anti-HLA na gotovo sve poznate antigene HLA, osim HLA-B70, Cw11, Cw13 i DR53. Zbog njihove iznimne raspršenosti i raznolikosti u pojedinim ispitanika, te posljedično malog broja ispitanika sa dokazanom pojedinom specifičnošću protutijela anti-HLA, iz dobivenih podataka nije bilo moguće izvući relevantne zaključke o povezanosti pojedinih specifičnosti protutijela anti-HLA i protutijela non-HLA.

Gledajući ukupnu ispitivanu populaciju, 3/74 (4,1 %) ispitanika nisu stvorila niti protutijela anti-HLA, a ni protutijela non-HLA. Od njih jedan nije imalo nikakav evidentirani imunizirajući događaj, dok su u dvoje ispitanika zabilježeni podaci o imunizirajućim događajima (transfuzija krvnih pripravaka za oba ispitanika i trudnoća za jednu ispitanicu). Moguće je da konkretni ispitanici nemaju sposobnost imunosnog odgovora protutijelima (engl. *non-responders*). Jednaki broj ispitanika, 3/74 (4,1 %) stvorio je samo protutijela anti-HLA, a ne i non-HLA. U toj skupini za jednog ispitanika evidentirani su podaci o tri imunizirajuća događaja (transfuzija krvnih pripravaka, trudnoća i prethodna transplantacija), za jednog ispitanika o dva imunizirajuća događaja (transfuzija krvnih pripravaka i prethodna transplantacija), a za jednog ispitanika o jednom imunizirajućem događaju (transfuzija krvnih pripravaka).

U ovom istraživanju sudjelovala su dvojica ispitanika koji nisu imali evidentirani podatak niti o jednome imunizirajućem događaju, a stvorili su protutijela anti-HLA i non-HLA, što je posebno zanimljivo, budući da se radi o bolesnicima muškog spola. Postoje istraživanja koja potvrđuju stvaranje protutijela anti-HLA u muškaraca koji nisu primili transfuziju krvnog pripravka niti su bili prethodno transplantirani [83,84]. Testom za određivanje specifičnosti protutijela anti-HLA seruma jednog ispitanika dobiven je rezultat slabo, iako nedvojbeno, pozitivnog protutijela na specifičnost HLA-A3, koje pripada u isti CREG (1C, u koji spadaju antigeni HLA-A1, A3, A11, A23, A24, A29, A30, A31, A36 i A80) [85]. Zanimljivo da istraživanje Morales-Buenrostro i sur., provedeno na meksičkoj populaciji, navodi upravo specifičnosti HLA iz tog CREG-a kao najčešće kod muškaraca bez imunizirajućih događaja u anamnezi [83]. U serumu tog ispitanika određeno je 14 različitih specifičnosti IgG protutijela non-HLA, međutim niti jedno protutijelo ne veže komplement. Drugom ispitaniku je u serumu određena specifičnosti protutijela anti-HLA DR52 te, već ranije spomenuto, anti-STAT6, koji je bio jedino određeno IgG protutijelo non-HLA, a ujedno i komplement-vezujuće. Ova prirodna protutijela anti-HLA najvjerojatnije nastaju kao posljedica križne reakcije epitopa antigena HLA s antigenima iz okoline, poput hrane ili mikroorganizama [86,87].

Nadalje, unutar skupine od 68/74 (91,9 %) ispitanika, koji su stvorili IgG protutijela non-HLA, njih 29 (39,2%) je dodatno razvilo i protutijela anti-HLA, dok je njih 39 (52,7 %) bilo negativno na prisutnost protutijela anti-HLA. Od ukupno 39,2% ispitanika s protutijelima anti-HLA i non-HLA, u njih 13 (17,6 %) dokazana je sposobnost IgG protutijela non-HLA za vezanje komplementa. To ima za posljedicu i moguće kliničke implikacije, koje je potrebno u budućnosti utvrditi za svaki antigen non-HLA posebno. Međutim, već je dosadašnjim istraživanjima ustanovljen sinergistički učinak protutijela anti-HLA i non-HLA pri mogućem riziku od odbacivanja presatka [69,70]. Zbog toga je važno ovo imati na umu tijekom posttransplantacijskog praćenje bolesnika. Zatim, unutar skupine anti-HLA negativnih ispitanika s dokazanim IgG protutijelima non-HLA u serumu (52,7%), najveća pojedinačna podskupina, u kojoj je bio 21 ispitanik, bila je ona s dokazanom sposobnosti vezanja komplementa IgG protutijela non-HLA. . Prema rezultatima dosadašnjih istraživanja, poput onoga provedenog od Seneva i sur. [110], i za te bolesnike utvrđen je određeni rizik od odbacivanja presatka nakon transplantacije. Ti rezultati zajedno s utvrđenom sposobnosti vezanja komplementa IgG protutijela non-HLA u serumima tih ispitanika upućuju na dodatan oprez pri praćenju bolesnika, kako prije transplantacije tako i nakon nje, zbog eventualne

prilagodbe primjene imunosupresivnog liječenja. Rezultati ovog istraživanja podudarni su s istraživanjem Zhang i sur., koje zaključuje da su protutijela usmjerena na antigene izvan sustava HLA dio ukupnog imunskog odgovora pri disfunkciji presatka [42]. Ona se najčešće se utvrđuju baš u bolesnika sa supsektivnim odbacivanjem posredovanim protutijelima u odsutnosti HLA-DSA. Autori zaključuju da postoji potreba za određivanjem protutijela non-HLA u bolesnika s visokim rizikom od odbacivanja.

Za potrebe kvantifikacije imunizacije odnosno sposobnosti stvaranja protutijela (engl. *responder*) pojedinog ispitanika napravljena je korelacija između broja specifičnosti pojedinih protutijela anti-HLA, IgG protutijela non-HLA i komplement-vezujućih protutijela non-HLA (Tablica 13.) pomoću Mann-Whitney U testa i Spearmanov koeficijenta korelacije rangova. Mann-Whitney U testom bilo je omogućeno testiranje razlika medijana broja stvorenih specifičnosti pojedine grupe protutijela. Tim testom utvrđena je statistički značajna razlika između broja stvorenih specifičnosti IgG protutijela non-HLA i protutijela anti-HLA i razreda I i II ($p < 0,001$). Pri usporedbi broja stvorenih specifičnosti komplement-vezujućih protutijela non-HLA i protutijela anti-HLA i razreda I i II nije utvrđena statistička značajnost ($p > 0,05$). Moguće je da u toj situaciji nije postignuta statistička značajnost u ispitivanoj populaciji zbog malog broja ispitanika kojima je utvrđena sposobnost vezanja komplementa za pojedinu specifičnost non-HLA, što ukazuje na potrebu povećanja broja ispitanika kako bi se dobili statistički značajniji rezultati Spearmanov koeficijent korelacije rangova određuje korelaciju između pojedinih skupina. U ovom istraživanju na konkretnoj ispitivanoj populaciji nije utvrđena statistička značajnost pri usporedbi niti jednog para skupina protutijela. I za ovaj izračun vrijedi da je moguć utjecaj malog broja ispitanik ukupno, kao i u pojedinim skupinama, na značajnost rezultata.

5.6. Povezanost protutijela non-HLA sa osnovnom bolesti, prethodnim imunizirajućim događajima i metodom dijalitičkog liječenja

Prema dijagnozama ispitanici su bili raspodijeljeni u tri skupine: imunološke, neimunološke i upalne. Ukupno je u ispitivanoj populaciji utvrđeno 605 IgG protutijela specifičnih na antigene non-HLA. Najveći udio imala je skupina neimunoloških dijagnoza 71,4%.

Usporedbom učestalosti ispitanika s protutijelima anti-HLA i bez razvijenih protutijela anti-HLA uočena je statistički značajna razlika između te dvije skupine bez obzira na

imunizirajući događaj kojem su bili izloženi ($p < 0,00001$), osim za ispitanike koji su bili izloženi transfuziji krvnih pripravaka. Već su ranije opisana dvojica ispitanika (10,5 %) koji nisu bili izloženi ni jednom od imunizirajućih događaja, a imala su razvijena protutijela anti-HLA. Taj fenomen je opisan i u prethodnim istraživanjima [86,87,112]. Iz dobivenih rezultata proizlazi da trudnoća, kao zaseban imunizirajući događaj ili zajedno u kombinaciji s transfuzijom krvnih pripravaka, te prethodna transplantacija su čimbenici u poticanju imunskog odgovora protutijelima anti-HLA.

Usporedbom učestalosti ispitanika s protutijelima non-HLA i bez razvijenih protutijela non-HLA uočena je statistički značajna razlika ($p < 0,00001$) između te dvije skupine bez obzira na imunizirajući događaj kojemu su ispitanici bili izloženi. Jedno od ograničenja statističkog izračuna bila je skupina negativnih IgG non-HLA seruma u samo 6 ispitanika. Posebno je zanimljivo što i u skupini ispitanika koji nisu bili izloženi ni jednom od imunizirajućih događaja, njih 94,7 % ima razvijena protutijela IgG non-HLA. Djelomično se ta činjenica može objasniti podatkom da je znatan broj protutijela non-HLA porijeklom autoprotutijelo [79,81]. Zbog toga, razlozi koji su doveli do takve situacije u tih ispitanika mogu biti ili da su ovim istraživanjem određena moguća autoprotutijela non-HLA ili jednostavno podatak o imunizirajućem događaju nije bio evidentiran u anamnezi.

Usporedbom učestalosti ispitanika sa sposobnosti razvijenih IgG protutijela non-HLA da vežu komplement ili ne, nije utvrđena statistički značajna razlika između te dvije skupine bez obzira na imunizirajući događaj kojemu su ispitanici bili izloženi. Taj podatak ide u prilog i ukazuje na važnost testiranja sposobnosti protutijela non-HLA za vezanje komplementa. Naime, prema dobivenim rezultatima ni za jedan od imunizirajućih događaja ne postoji statistički značajna razlika između broja ispitanika sa ili bez komplement-vezujućih protutijela non-HLA.

Iz rezultata ovog istraživanja može se uočiti da u ispitivanoj populaciji ne postoji statistički značajna razlika između broja IgG protutijela na različite specifičnosti non-HLA u skupinama ispitanika koji su primili transfuziju krvnih pripravaka i onih koji je nisu primili ($p = 0,683$). Jednako tako, u usporedbi ispitanica koje su imale trudnoću i onih koje nisu nije utvrđena statistička značajnost u razlici između broja specifičnosti IgG protutijela non-HLA ($p = 0,083$). Međutim, zbog malog broja ispitanica ($N = 24$), a pogotovo onih koje nisu imale trudnoću ($N = 6$), moguće je da nije bilo moguće odrediti statistički značajnu razliku između tih dviju skupina, a koja bi se mogla odrediti u istraživanju s većom skupinom ispitanica. Iz istog

je razloga moguće da je u ovom istraživanju broj različitih specifičnosti protutijela non-HLA veći (srednja vrijednost 19,71) od onih koje su imale trudnoću (srednja vrijednost 7,89).

Na temelju rezultata o broju specifičnosti protutijela non-HLA pri svakome od imunizirajućih događaja koje pojedini ispitanik ima evidentirane u svojoj anamnezi, statističkom je analizom određen point-biserijalni koeficijent korelacije. U ispitivanoj populaciji, ne samo da nije utvrđena statistička značajnost ni za jedan od imunizirajućih događaja (tudnoća, transfuzija krvnih pripravaka, transplantacija), već vrijednost koeficijenta korelacije upućuje na potpuni izostanak korelacije između broja specifičnosti protutijela non-HLA i imunizirajućih događaja (Tablica 18.).

Vezano za vrste dijalitičkog liječenja, nije utvrđena statistički značajna razlika u broju različitih specifičnosti IgG protutijela non-HLA koji su stvorili ispitanici koji još uvijek nisu na dijalitičkom liječenju i onih koji jesu, bez obzira radi li se o peritonejskoj dijalizi ili hemodijalizi. Jednako tako, nije utvrđena niti statistički značajna razlika u usporedbi broja različitih specifičnosti IgG protutijela non-HLA koji su stvorili ispitanici na peritonejskoj dijalizi i na hemodijalizi, kao niti u usporedbi svih triju skupina ispitanika (Tablica 19). Primjećeni nedostatak korelacije za sve praćene imunizirajuće događaje u ispitivanoj populaciji sugerira da na nastanak protutijela non-HLA mogu utjecati i individualni parametri imunosnog odgovora i genomske karakteristike, a ne samo izloženost imunizirajućim događajima ili vrsta i trajanje dijalitičkog liječenja.

Jedan od praćenih parametara dijalitičkog liječenja ispitanika bila je duljina njegova trajanja do trenutka uzimanja uzorka seruma (Tablica 20.). Ispitanici liječeni hemodijalizom najčešće su bili na liječenju 25 do 60 mjeseci (23 od 45 ispitanika), s medijanom 34 mjeseca, dok su ispitanici liječeni peritonejskom dijalizom najčešće bili na liječenju 13 do 24 mjeseca (5 od 15 ispitanika), s medijanom 19 mjeseci. Usporedbom duljine trajanja dijalitičkog liječenja i broja različitih specifičnosti IgG protutijela non-HLA u serumima ispitanika liječenih peritonejskom dijalizom (N = 15, Slika 12.), hemodijalizom (N = 45, Slika 13.) te ukupno za sve ispitanike na dijalitičkom liječenju (N = 60, Slika 14) nađeno je da kod većine ispitanika, neovisno o duljini trajanja i vrsti dijalitičkog liječenja, broj utvrđenih različitih specifičnosti IgG protutijela non-HLA bio između dviju i deset. Uočen je i rast broja ispitanika od skupina ni sa jednom ili jednom specifičnosti IgG protutijela non-HLA do skupine s dvije do deset specifičnosti za sve ispitanike na dijalitičkom liječenju te za skupinu ispitanika na liječenju hemodijalizom, neovisno o duljini

trajanja liječenja. U tim skupinama ispitanika nakon toga slijedi drastičan pad broja ispitanika kroz skupine sa 11 ili više specifičnosti IgG protutijela non-HLA, a također neovisno o duljini trajanja liječenja. Taj rezultat podudara se s ranije navedenim rezultatima istraživanja Shin i sur. [74]. Moguće objašnjenje za takav rezultat leži u činjenici da je manje vjerojatno pronaći veći broj ispitanika s brojem specifičnosti HLA većim od 10, te da se takva pravilnost uočava bez obzira na trajanje dijalitičkog liječenja. Vjerojatnost da je pojedini ispitanik dulje na dijalitičkom liječenju također pada s protokom vremena, budući da će određeni broj ipak biti podvrgnut transplantaciji u nekom vremenskom razdoblju od početka dijalitičkog liječenja. Zbog tih razloga nije neočekivano da je ukupan broj ispitanika s tim karakteristikama trajanja liječenja i broja različitih specifičnosti non-HLA iznimno malen. Za ispitanike u skupini koja se liječila peritonejskom analizom takva pravilnost nije uočena, štoviše, grafički prikazi su vrlo nepravilni jer za pojedine duljine trajanja liječenja pokazuju naizmjenice trendove pada i rasta broja ispitanika kako raste broj različitih specifičnosti IgG protutijela non-HLA. Takav rezultat moguća je posljedica malog broja ispitanika u pojedinim skupinama. Naime, u skupini ispitanika liječenih peritonejskom dijalizom, maksimalni broj ispitanika bio je 3, i to u skupini s određenih dvije do deset specifičnosti protutijela non-HLA i duljinom trajanja liječenja od 13 do 24 mjeseca.

5.7. Ograničenja istraživanja

Ovo istraživanje uključivalo je cjelokupnu populaciju bolesnika na listi čekanja za transplantaciju KBC-u Rijeka koji su zadovoljili uključne kriterije, a ne samo uzorak iz te populacije. Broj tih bolesnika nije bio velik u apsolutnom iznosu, stoga nisu bile očekivane visoke brojke bolesnika čija bi protutijela non-HLA pokazivala sposobnost vezanja komplementa (C3d-pozitivnih). U ovom istraživanju, protutijela stvorena na 23/60 (38,3 %) antigena non-HLA pokazivala su sposobnost vezanja komplementa. Međutim, broj ispitanika s komplement-vezujućim IgG protutijelom pojedine specifičnosti non-HLA najčešće je bio 1, i to u 15/23 specifičnosti. Upravo je to bio najveći izazov pri preciznijem definiranju same granične vrijednosti ili statistički definirano raspona u kojem se nalazi. Naime, veći broj C3d-pozitivnih ispitanika u ispitivanoj populaciji ujedno bi značio bolju definiciju graničnih vrijednosti.

5.7. Buduća istraživanja

U kontekstu posebnosti ovog istraživanja potrebno je napomenuti da je jedan od ciljeva bio odrediti granične vrijednosti MFI za C3d budući da trenutno ne postoje definirane vrijednosti, a ne postoji ni zlatni standard s kojim bi se testiranje napravljeno u ovom istraživanju moglo direktno usporediti. Ne postoje niti drugi klinički podaci za istraživanu skupinu pacijenata koji bi mogli upućivati na točan rezultat testiranja za sposobnost vezanja komplementa. S obzirom da nema dostupnih objavljenih podataka vezanih za granične vrijednosti, ovo istraživanje daje početne rezultate s preliminarno statistički određenim graničnim vrijednostima, kao početnu točku za njihovo buduće preciziranje. U sljedećoj fazi ispitivanja graničnih vrijednosti, bilo bi uputno napraviti odgovarajući algoritam koji ne bi trebao nužno biti vezan za vrijednosti MFI za C3d, već moguće i za pozadinski šum pojedine mikrosfere ili vrijednosti MFI negativnog kontrolnog seruma, ili slično.

Nadalje, ovim istraživanjem dobiveni su podaci koji omogućavaju dublje razumijevanje dinamike procesa razvoja protutijela non-HLA kao i sposobnosti pojedinih za vezanje komplementa. Dokazana je sposobnost velikog broja (23) antigena non-HLA za vezanje komplementa u sklopu njihovog imunogenog odgovora. Dobiveni rezultati ujedno ukazuju i na potrebu daljnjih analiza i istraživanja na većem broju ispitanika, kako bi se dobili još pouzdaniji podaci o graničnim vrijednostima za pojedine specifičnosti non-HLA, sposobnosti vezanja komplementa te povezanosti s osnovnim bolestima i imunološkim statusom ispitanika.

Unatoč prethodno navedenim ograničenjima, rezultati ovog istraživanja dobar su temelj za sveobuhvatnije testiranje protutijela non-HLA i opis postupka za testiranje njihove sposobnosti vezanja komplementa. Ovo istraživanje upućuje i na potrebu dodatnih istraživanja kliničke važnosti testiranja protutijela non-HLA u bolesnika koji čekaju na transplantaciju solidnih organa.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata provedenog istraživanja procjene imunološkog rizika od odbacivanja bubrežnog presatka određivanjem i karakterizacije protutijela non-HLA i HLA u bolesnika s terminalnom bubrežnom bolesti na listi čekanja za transplantaciju može se zaključiti:

1. Bolesnici s terminalnom bubrežnom bolesti razvili su IgG protutijela specifična za antigene non-HLA, od kojih je gotovo polovina sposobna aktivirati komplement.
2. U ispitivanoj populaciji najučestalija su IgG protutijela non-HLA, anti-PRKCZ , anti-DEXI i anti-STAT6, koja su pokazala sposobnost vezanja komplementa.
3. Više od polovice ispitanika razvilo je protutijela anti-HLA različite specifičnosti od kojih su najčešće specifičnosti HLA-A2 , HLA-B15 , HLA-Cw3 , HLA-DR15 te HLA-DQ6 i HLA-DQ8 .
4. Postoji značajna razlika između broja specifičnosti IgG protutijela non-HLA i protutijela anti-HLA razreda I i II koja ukazuje na kompleksnost imunskog odgovora kod ovih ispitanika te na važnost detaljne imunodne procjene u kontekstu pripreme za transplantaciju bubrega.
5. Najveća učestalost svih IgG protutijela non-HLA prisutna je u skupini ispitanika s neimunološkim dijagnozama. Imunološke dijagnoze su u manjem broju povezane s IgG protutijelima specifičnim za antigene non-HLA, dok su upalne dijagnoze povezane u nešto većem broju.
6. Više od polovine ispitanika ima zabilježen barem jedan imunizirajući događaj, a najčešći je bila transfuzija krvnih pripravaka. Veći dio ženskih ispitanika bio je izložen imunizirajućim događajima – trudnoći i transfuziji krvnih pripravaka.
7. Nedostatak statistički značajne razlike u broju različitih specifičnosti IgG protutijela non-HLA među skupinama ispitanika prema vrsti dijalitičkog liječenja sugerira da metoda dijalize nije bila značajan faktor u stvaranju protutijela non-HLA u serumima u ispitivanoj populaciji.
8. Nedostatak korelacije za sve praćene imunizirajuće događaje u ispitivanoj populaciji sugerira da na nastanak protutijela non-HLA mogu utjecati i individualni parametri

imunskog odgovora i genomske karakteristike, a ne samo izloženost imunizirajućim događajima ili vrsta i trajanje dijalitičkog liječenja.

9. Otkriće visokog postotka pacijenata s protutijelima koja vežu komplement ukazuje na potencijalnu ulogu tih protutijela u mehanizmima odbacivanja transplantata koji nisu povezani sa sustavom HLA.
10. Ovim istraživanjem dan je doprinos razumijevanju dinamike razvoja i djelovanja protutijela non-HLA te njihove sposobnosti za vezanje komplementa što može pružiti nove uvide u mehanizme odbacivanja transplantata te unaprijediti pristup liječenju bolesnika na čekanju za transplantaciju bubrega.

7. LITERATURA

1. Živčić Ćosić S, Trobonjača Z. Imunobiologija transplantacije bubrega i mehanizmi djelovanja imunosupresivnih lijekova. *Medicina Fluminensis: Medicina Fluminensis*. 2020;56(4):418-30. doi: 10.21860/medflum2020_245217.
2. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Gečević D, Lukinović-Škunder V, Marušić M, et al. *Imunologija 7*. Medicinska naklada; 2010.
3. Bašić Jukić N, Kaštelan Ž, i suradnici. *Transplantacija bubrega*. Medicinska naklada; 2016. p. 37-51. ISBN: 978-953-176-722-4.
4. Varadé J, Magadán S, González-Fernández Á. Human immunology and immunotherapy: main achievements and challenges. *Cell Mol Immunol*. 2021 Apr;18(4):805-28. doi: 10.1038/s41423-020-00530-6. Epub 2020 Sep 2. PMID: 32879472; PMCID: PMC7463107.
5. Xu W, Banchereau J. The antigen presenting cells instruct plasma cell differentiation. *Front Immunol*. 2014;4:504. doi: 10.3389/fimmu.2013.00504.
6. Schroeder HW Jr, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl 2):S41-52.
7. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th ed. New York, USA: Garland Science; 2001.
8. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol*. 2015 Jun 2;6:262. doi: 10.3389/fimmu.2015.00262. PMID: 26082779; PMCID: PMC4451739.
9. Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement system part II: role in immunity. *Front Immunol*. 2015 May 26;6:257. doi: 10.3389/fimmu.2015.00257. PMID: 26074922; PMCID: PMC4443744.
10. Farrar CA, Kupiec-Weglinski JW, Sacks SH. The innate immune system and transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013 Oct 1;3(10):a015479.
11. Zakharova MYu, et al. The contribution of major histocompatibility complex class II genes to an association with autoimmune diseases. *Acta Naturae (англоязычная версия)*. 2019;11(4)(43):4-12.
12. Lobashevsky AL. Methodological aspects of anti-human leukocyte antigen antibody analysis in solid organ transplantation. *World J Transplant*. 2014;4(3):153-67.
13. Momburg F, Hämmerling GJ. Generation and TAP-mediated transport of peptides for major histocompatibility complex class I molecules. *Adv Immunol*. 1998;68:191-256.

14. Williams A, Peh CA, Elliott T. The cell biology of MHC class I antigen presentation. *Tissue Antigens*. 2002 Jan;59(1):3-17.
15. Nakagawa TY, Rudensky AY. The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunol Rev*. 1999 Dec;172:121-9.
16. Zakharova, M. Yu, et al. "The contribution of major histocompatibility complex class II genes to an association with autoimmune diseases." *Acta Naturae (англоязычная версия)* 11.4 (43) (2019): 4-12.
17. Sladoje-Martinović B, Orlić L, Živčić-Ćosić S, Vuksanović-Mikuličić S. Priprema bolesnika za transplantaciju bubrega. *Medicina Fluminensis: Medicina Fluminensis*. 2010;46(4):508-12.
18. Briscoe DM, Alexander SI, Lichtman AH. Interactions between T lymphocytes and endothelial cells in allograft rejection. *Curr Opin Immunol*. 1998 Oct;10(5):525-31.
19. Lees JR, Azimzadeh AM, Ding Y, Webb TJ, Bromberg JS. Cells of the immune system. In: Xian CL, Jevnikar AM, editors. *Transplantation Immunology*. UK: Wiley Blackwell; 2016. p. 25-47.
20. Wood KJ, Zaitse M, Goto R. Cell mediated rejection. *Methods Mol Biol*. 2013;1034:71-83. doi: 10.1007/978-1-62703-493-7_3. PMID: 23775731.
21. Clatworthy MR. Targeting B cells and antibody in transplantation. *Am J Transplant*. 2011 Jul;11(7):1359-67.
22. Baldwin WM, Pruitt SK, Brauer RB, Daha MR, Sanfilippo F. Complement in organ transplantation. Contributions to inflammation, injury, and rejection. *Transplantation*. 1995;59(6):797-808.
23. Le Moine A, Goldman M, Abramowicz D. Multiple pathways to allograft rejection. *Transplantation*. 2002 May 15;73(9):1373-81.
24. Farrar CA, Zhou W, Lin T, Sacks SH. Local extravascular pool of C3 is a determinant of postischemic acute renal failure. *FASEB J*. 2006 Feb;20(2):217-26.
25. Zhou W, Medof ME, Heeger PS, Sacks S. Graft-derived complement as a mediator of transplant injury. *Curr Opin Immunol*. 2007;19(5):569-76.
26. Naesens M, Li L, Ying L, et al. Expression of complement components differs between kidney allografts from living and deceased donors. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Aug;20(8):1839-51.
27. Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vázquez LA, Lee J-H, El-Awar N, Alberú J. "Natural" Human Leukocyte Antigen Antibodies Found in Nonalloimmunized Healthy Males. *Transplantation*. 2008;86(8):1111-1115.

28. El-Awar N, Terasaki PI, Nguyen A, et al. Epitopes of human leukocyte antigen class I antibodies found in sera of normal healthy males and cord blood. *Hum Immunol.* 2009;70(10):844-853.
29. Argani H. Anti-HLA Antibody: The Role of Epitopes in Organ Transplantation. *Exp Clin Transplant.* 2019;17(1):38-42.
30. Lim WH, Wong G, Heidt S, Claas FHJ. Novel aspects of epitope matching and practical application in kidney transplantation. *Kidney Int.* 2018;93(2):314-324.
31. Aileen C. Johnson, Joan Zhang, H. Cliff Sullivan, Chris Wiebe, Robert Bray, Howard Gebel, Christian P. Larsen. hlaR: A rapid and reproducible tool to identify eplet mismatches between transplant donors and recipients. *Human Immunology.* 2022;83(3):248-255. doi: 10.1016/j.humimm.2022.01.007.
32. Geneugelijk K, Wissing J, Koppelaar D, Niemann M, Spierings E. Computational Approaches to Facilitate Epitope-Based HLA Matching in Solid Organ Transplantation. *J Immunol Res.* 2017;2017:9130879. doi: 10.1155/2017/9130879. Epub 2017 Feb 12. PMID: 28286782; PMCID: PMC5329668.
33. Lachmann N, Niemann M, Reinke P, et al. Donor-Recipient Matching Based on Predicted Indirectly Recognizable HLA Epitopes Independently Predicts the Incidence of De Novo Donor-Specific HLA Antibodies Following Renal Transplantation. *Am J Transplant.* 2017;17(12):3076-3086.
34. Lefaucheur C, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, Nochy D, Andrade J, Antoine C, et al. Clinical Relevance of Preformed HLA Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplantation. *American Journal of Transplantation.* 2008;8:324-331. doi:10.1111/j.1600-6143.2007.02072.x
35. Morath C, Döhler B, Kälble F, Pego da Silva L, Echterdiek F, Schwenger V, et al. Pre-transplant HLA Antibodies and Delayed Graft Function in the Current Era of Kidney Transplantation. *Front Immunol.* 2020;11:1886. doi: 10.3389/fimmu.2020.01886.
36. Ciciarelli J, Helstab K, Mendez R. Flow cytometry PRA, a new test that is highly correlated with graft survival. *Clin Transplant.* 1992;6(3 Suppl 1):159-64.
37. Lichtenstein B, Zheng Y, Gjertson D, Ferbas KG, Rimoin AW, Yang OO, Aldrovandi GM, Schaenman JM, Reed EF, Fulcher JA. Vascular and Non-HLA autoantibody profiles in hospitalized patients with COVID-19. *Front Immunol.* 2023;14:1197326. doi: 10.3389/fimmu.2023.1197326.
38. Sorohan BM, Baston C, Tacu D, Bucşa C, Țincu C, Vizireanu P, Sinescu I, Constantinescu I. Non-HLA Antibodies in Kidney Transplantation: Immunity and Genetic Insights. *Biomedicines.* 2022 Jun 25;10(7):1506. doi: 10.3390/biomedicines10071506. PMID: 35884811; PMCID: PMC9312985.

39. Lammerts RGM, Altulea D, Hepkema BG, Sanders JS, van den Born J, Berger SP. Antigen and Cell-Based Assays for the Detection of Non-HLA Antibodies. *Front Immunol.* 2022 May 6;13:864671. doi: 10.3389/fimmu.2022.864671. PMID: 35603145; PMCID: PMC9122123.
40. Kardol-Hoefnagel T, Otten HG. A Comprehensive Overview of the Clinical Relevance and Treatment Options for Antibody-mediated Rejection Associated With Non-HLA Antibodies. *Transplantation.* 2021 Jul 1;105(7):1459-1470. doi: 10.1097/TP.0000000000003551. PMID: 33208690; PMCID: PMC8221725.
41. Fichtner A, Süsal C, Höcker B, et al. Association of non-HLA antibodies against endothelial targets and donor-specific HLA antibodies with antibody-mediated rejection and graft function in pediatric kidney transplant recipients. *Pediatr Nephrol.* 2021;36:2473–2484. doi:10.1007/s00467-021-04969-1
42. Zhang X, Reinsmoen NL. Impact of Non-Human Leukocyte Antigen-Specific Antibodies in Kidney and Heart Transplantation. *Front Immunol.* 2017;8:434. doi: 10.3389/fimmu.2017.00434.
43. Michielsen LA, van Zuilen AD, Krebber MM, Verhaar MC, Otten HG. Clinical value of non-HLA antibodies in kidney transplantation: Still an enigma? *Transplant Rev (Orlando).* 2016 Oct;30(4):195-202. doi: 10.1016/j.trre.2016.06.001. Epub 2016 Jun 7. PMID: 27395083.
44. Kamburova EG, Kardol-Hoefnagel T, Wisse BW, Joosten I, Allebes WA, van der Meer A, et al. Development and Validation of a Multiplex Non-HLA Antibody Assay for the Screening of Kidney Transplant Recipients. *Front Immunol.* 2018 Dec 19;9:3002. doi: 10.3389/fimmu.2018.03002. PMID: 30631326; PMCID: PMC6315148.
45. SANCHEZ-MAZAS Alicia, et al. Common and well-documented HLA alleles over all of Europe and within European sub-regions: a catalogue from the European Federation for Immunogenetics. *Hla.* 2017;89(2):104-113.
46. Žunec R. Imunobiologija transplantacije. In: Bašić Jukić N, Kaštelan Ž, i sur., editors. *Transplantacija bubrega.* Zagreb: Medicinska naklada; 2016. p. 21-35.
47. Senev A, Ray B, Lerut E, Hariharan J, Heylen C, Kuypers D, et al. The Pre-Transplant Non-HLA Antibody Burden Associates With the Development of Histology of Antibody-Mediated Rejection After Kidney Transplantation. *Front Immunol.* 2022;13:809059. doi: 10.3389/fimmu.2022.809059. PMID: 35250981; PMCID: PMC8888449.

48. Bantis LE, Tsimikas JV. On optimal biomarker cutoffs accounting for misclassification costs in diagnostic trilemmas with applications to pancreatic cancer. *Stat Med.* 2022;41(18):3527-46. doi: 10.1002/sim.9432.
49. Scott D. On optimal and data-based histograms. *Biometrika.* 1979;66(3):605-10. doi: 10.1093/biomet/66.3.605.
50. Silverman BW. *Density Estimation for Statistics and Data Analysis.* London: Chapman & Hall/CRC; 1986. p. 45. ISBN 978-0-412-24620-3.
51. Akaike H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Automat Contr.* 1974;19(6):716-23.
52. Schwarz G. Estimating the dimension of a model. *Ann Stat.* 1978;6(2):461-4.
53. Shapiro SS, Wilk MB. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika.* 1965;52(3/4):591-611.
54. Mann HB, Whitney DR. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *Ann Math Statist.* 1947;18(1):50-60.
55. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer.* 1950;3(1):32-35.
56. Matthews BW. Comparison of the predicted and observed secondary structure of T4 phage lysozyme. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct.* 1975;405(2):442-51.
57. Powers, D.M.W. (2011). Evaluation: From Precision, Recall and F-Measure to ROC, Informedness, Markedness & Correlation. *Journal of Machine Learning Technologies,* 2(1), 37-63.
58. Maskalan M. Raznolikost alela i haplotipova HLA u Hrvatskoj i utjecaj na odabir davatelja u transplantaciji krvotvornih matičnih stanica [Disertacija]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet; 2020 [pristupljeno 02.03.2024]. Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:345817>
59. Grubić Z, Zunec R, Cecuk-Jelčić E, Kerhin-Brkljacić V, Kastelan A. Polymorphism of HLA-A, -B, -DRB1, -DQA1, and -DQB1 haplotypes in a Croatian population. *Eur J Immunogenet.* 2000 Feb;27(1):47-51. doi: 10.1046/j.1365-2370.2000.00193.x. PMID: 10651851.
60. Santarsiero D, Aiello S. The Complement System in Kidney Transplantation. *Cells.* 2023;12(5):791. <https://doi.org/10.3390/cells12050791>
61. Katalinic N, Marčetić T, Balen S. Praćenje protutijela HLA prije transplantacije bubrega Luminex tehnikom Pre-transplant monitoring of HLA antibodies performed by Luminex-based assays. *Medicina Fluminensis.* 2020;56:490-497. doi: 10.21860/medflum2020_245221.

62. Senev A, Coemans M, Lerut E, Van Sandt V, Daniëls L, Kuypers D, et al. Histological Picture of Antibody-Mediated Rejection Without Donor-Specific Anti-HLA Antibodies: Clinical Presentation and Implications for Outcome. *Am J Transplant*. 2019;19:763–80. doi: 10.1111/ajt.15074
63. Delville M, Lamarthee B, Pagie S, See SB, Rabant M, Burger C, et al. Early Acute Microvascular Kidney Transplant Rejection in the Absence of Anti HLA Antibodies Is Associated With Preformed IgG Antibodies Against Diverse Glomerular Endothelial Cell Antigens. *J Am Soc Nephrol*. 2019;30(4):692–709. doi: 10.1681/ASN.2018080868
64. Reindl-Schwaighofer R, Heinzl A, Gualdoni GA, Mesnard L, Claas FHJ, Oberbauer R. Novel Insights Into Non-HLA Alloimmunity in Kidney Transplantation. *Transplant Int*. 2020;33:5–17. doi: 10.1111/tri.13546
65. Filippone EJ, Farber JL. Histologic Antibody-Mediated Kidney Allograft Rejection in the Absence of Donor-Specific HLA Antibodies. *Transplantation*. 2021;105:E181–90. doi: 10.1097/TP.0000000000003797
66. Callemeyn J, Lamarthee B, Koenig A, Koshy P, Thauat O, Naesens M. Allorecognition and the Spectrum of Kidney Transplant Rejection. *Kidney Int*. 2021. doi: 10.1016/j.kint.2021.11.029
67. Dragun D, Catar R, Philippe A. Non-HLA Antibodies Against Endothelial Targets Bridging Allo- and Autoimmunity. *Kidney Int*. 2016;90:280–8. doi: 10.1016/j.kint.2016.03.019
68. Michielsen LA, van Zuilen AD, Krebber MM, Verhaar MC, Otten HG. Clinical Value of Non-HLA Antibodies in Kidney Transplantation: Still an Enigma? *Transplant Rev*. 2016;30:195–202. doi: 10.1016/j.ttre.2016.06.001
69. Senev A, Senev A, Otten HG, Kamburova EG, Callemeyn J, Lerut E, et al. Antibodies Against ARHGDIB and ARHGDIB Gene Expression Associate With Kidney Allograft Outcome. *Transplantation*. 2020;104:1462–71. doi: 10.1097/TP.0000000000003005.
70. Lefaucheur C, Viglietti D, Bouatou Y, Philippe A, Pievani D, Aubert O, et al. Non-HLA Agonistic Anti-Angiotensin II Type 1 Receptor Antibodies Induce a Distinctive Phenotype of Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplant Recipients. *Kidney Int*. 2019;96(1):189–201. doi: 10.1016/j.kint.2019.01.030.
71. Steers NJ, Li Y, Drace Z, D'Addario JA, Fischman C, Liu L, et al. Genomic Mismatch at LIMS1 Locus and Kidney Allograft Rejection. *N Engl J Med*. 2019;380:1918–28. doi: 10.1056/NEJMoa1803731.

72. Pineda S, Sigdel TK, Chen J, Jackson AM, Sirota M, Sarwal MM. Novel Non Histocompatibility Antigen Mismatched Variants Improve the Ability to Predict Antibody-Mediated Rejection Risk in Kidney Transplant. *Front Immunol.* 2017;8:1687. doi: 10.3389/fimmu.2017.01687.
73. Reindl-Schwaighofer R, Heinzl A, Kainz A, van Setten J, Jelencsics K, Hu K, et al. Contribution of Non-HLA Incompatibility Between Donor and Recipient to Kidney Allograft Survival: Genome-Wide Analysis in a Prospective Cohort. *Lancet.* 2019;393:910–7. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32473-5.
74. Shin K, Lee HJ, Kim IY, Choi BH, Kim H. Establishment of Reference Values for Non-HLA Antibodies in Patients With End-stage Renal Disease. *Ann Lab Med.* 2023;43:214-216. <https://doi.org/10.3343/alm.2023.43.2.214>.
75. Biglarnia AR, Huber-Lang M, Mohlin C, Ekdahl KN, Nilsson B. The multifaceted role of complement in kidney transplantation. *Nat Rev Nephrol.* 2018;14:767–781.
76. Ugurlar D, Howes SC, de Kreuk BJ, Koning RI, de Jong RN, Beurskens FJ, Schuurman J, Koster AJ, Sharp TH, Parren PW. Structures of C1-IgG1 provide insights into how danger pattern recognition activates complement. *Science.* 2018;359:794–797.
77. Bentall A, Cornell LD, Gloor JM, Park WD, Gandhi MJ, Winters JL, Chedid MF, Dean PG, Stegall MD. Five-Year Outcomes in Living Donor Kidney Transplants With a Positive Crossmatch. *Am J Transplant.* 2012;13:76–85.
78. Qi R, Qin W. Role of Complement System in Kidney Transplantation: Stepping From Animal Models to Clinical Application. *Front Immunol.* 2022;13:811696.
79. Sorohan BM, Ismail G, Leca N, Tacu D, Obriscă B, Constantinescu I, Baston C, Sinescu I. Angiotensin II type 1 receptor antibodies in kidney transplantation: An evidence-based comprehensive review. *Transplant Rev.* 2020;34:100573. [CrossRef]
80. Lefaucheur C, Louis K, Philippe A, Loupy A, Coates PT. The emerging field of non-human leukocyte antigen antibodies in transplant medicine and beyond. *Kidney Int.* 2021;100:787–798. [CrossRef] [PubMed]
81. Cardinal H, Dieudé M, Hébert MJ. The Emerging Importance of Non-HLA Autoantibodies in Kidney Transplant Complications. *J Am Soc Nephrol.* 2016;28:400–406. [CrossRef] [PubMed]
82. Reindl-Schwaighofer R, Heinzl A, Gualdoni GA, Mesnard L, Claas FH, Oberbauer R. Novel insights into non-HLA alloimmunity in kidney transplantation. *Transpl Int.* 2019;33:5–17.

83. Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vázquez LA, Lee JH, El-Awar N, Alberú J. "Natural" human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. *Transplantation*. 2008 Oct 27;86(8):1111-5. doi: 10.1097/TP.0b013e318186d87b. PMID: 18946350.
84. Nakamura J, Nakajima F, Kamada H, Tadokoro K, Nagai T, Satake M. Males without apparent alloimmunization could have HLA antibodies that recognize target HLA specificities expressed on cells. *HLA*. 2017 May;89(5):285-292. doi: 10.1111/tan.13000. Epub 2017 Mar 2. PMID: 28256086.
85. Rodey GE, Fuller TC. Public epitopes and the antigenic structure of the HLA molecules. *Crit Rev Immunol*. 1987;7:229-67.
86. Fernandez MM, Guan R, Swaminathan CP, et al. Crystal structure of staphylococcal enterotoxin I (SEI) in complex with a human major histocompatibility complex class II molecule. *J Biol Chem*. 2006;281:25356.
87. Sriskandan S, Faulkner L, Hopkins P. Streptococcus pyogenes: Insight into the function of the streptococcal superantigens. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39:12.
88. Anwar IJ, Jackson AM, Locke JE, Kwun J. Editorial: Sensitization and Desensitization in Organ Transplantation. *Front Immunol*. 2021 Oct 14;12:784472. doi: 10.3389/fimmu.2021.784472. PMID: 34721444; PMCID: PMC8551692.
89. Kumar S, Doss SA, Jacob S, Valson AT, Alexander S, David VG, Varughese S, Daniel D. Association of prior sensitizing events with anti-human leukocyte antigen antibodies: An analysis of renal transplant recipients in a tertiary care centre in South India. *Transfus Apher Sci*. 2020 Aug;59(4):102808. doi: 10.1016/j.transci.2020.102808.
90. Pandey P, Pande A, Mandal S, Devra AK, Sinha VK, Bhatt AP, Mishra S. Effects of different sensitization events on HLA alloimmunization in renal transplant cases; a retrospective observation in 1066 cases. *Transpl Immunol*. 2022 Dec;75:101680. doi: 10.1016/j.trim.2022.101680. Epub 2022 Jul 29. PMID: 35908630.
91. Grubić Z, Maskalan M, Štingl Janković K, Burek Kamenarić M, Žunec R. Mapping the Human Leukocyte Antigen diversity among Croatian regions - implication in transplantation. *J Immunol Res*. 2021;2021:6670960. doi: 10.1155/2021/6670960.
92. Grubic Z. HLA allele and haplotype diversity in the Croatian population: State of the art. *HLA*. 2018;92:51-56. doi: 10.1111/tan.13401.
93. Novotný M, Kment M, Viklický O. Antibody-mediated rejection of renal allografts: diagnostic pitfalls and challenges. *Physiol Res*. 2021 Dec 30;70(Suppl4):S551-S565. doi: 10.33549/physiolres.934801.

94. Heidt S, Haasnoot GW, van der Linden-van Oevelen MJH, Claas FHJ. Highly Sensitized Patients Are Well Served by Receiving a Compatible Organ Offer Based on Acceptable Mismatches. *Front Immunol.* 2021;12:687254. doi: 10.3389/fimmu.2021.687254.
95. Bray RA, Nickerson PW, Kerman RH, Gebel HM. Evolution of HLA antibody detection: Technology emulating biology. *Immunol Res.* 2004;29:41–54.
96. Trpkov K, Campbell P, Pazderka F, Cockfield S, Solez K, Halloran PF. Pathologic features of acute renal allograft rejection associated with donor-specific antibody: Analysis using the Banff grading schema. *Transplantation.* 1996;61:1586–1592.
97. Karuppan SS, Ohlman S, Möller E. The occurrence of cytotoxic and non-complement-fixing antibodies in the crossmatch serum of patients with early acute rejection episodes. *Transplantation.* 1992;54:839–844.
98. Karpinski M, Rush D, Jeffery J, Exner M, Regele H, Dancea S, Pochinco D, Birk P, Nickerson P. Flow cytometric crossmatching in primary renal transplant recipients with a negative anti-human globulin enhanced cytotoxicity crossmatch. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12:2807–2814.
99. Keith DS, Vranic GM. Approach to the Highly Sensitized Kidney Transplant Candidate. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016;11(4):684–93. doi: 10.2215/CJN.05930615.
100. Reinsmoen NL, Lai C-H, Heidecke H, et al. Anti-angiotensin type 1 receptor antibodies associated with antibody mediated rejection in donor HLA antibody negative patients. *Transplantation.* 2010;90(12):1473-1477. doi:10.1097/TP.0b013e3181fd97f1.
101. Graff CA, Cornell LD, Gloor JM, et al. Antibody-mediated rejection following transplantation from an HLA-identical sibling. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(1):307-310. doi:10.1093/ndt/gfp526.
102. Opelz G, Study CT. Non-HLA transplantation immunity revealed by lymphocytotoxic antibodies. *Lancet.* 2005;365(9470):1570-1576. doi:10.1016/S0140-6736(05)66458-6.
103. Suresh Babu N. Various performance measures in binary classification – An overview of ROC study. *Int J Innov Sci Eng Technol.* 2015;2(9):596–605.
104. Idica A, Sasaki N, Hardy S, Terasaki P. Unexpected frequencies of HLA antibody specificities present in sera of multitransfused patients. *Clinical Transplantation.* 2006:139-159.

105. Fu Q, Wang C, Zeng W, Liu L. The correlation of HLA allele frequencies and HLA antibodies in sensitized kidney transplantation candidates. *Transplantation Proceedings*. 2012;44(1):217–221.
106. Kljajić J. Raspodjela gena HLA i senzibilizacija HLA kod bolesnika na listi čekanja za kadaveričnu transplantaciju bubrega [Diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet; 2018 [pristupljeno 02.03.2024]. Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:278482>.
107. Fernández-Cruz E, Alecsandru D, Sánchez Ramón S. Mechanisms of action of immune globulin. *Clin Exp Immunol*. 2009 Sep;157 Suppl 1(Suppl 1):1-2. doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.03955.x. Erratum in: *Clin Exp Immunol*. 2009 Sep;157(3):446.
108. Sutherland SM, et al. Protein microarrays identify antibodies to protein kinase Czeta that are associated with a greater risk of allograft loss in pediatric renal transplant recipients. *Kidney Int*. 2009;76(12):1277-1283.
109. Butler CL, et al. Discovery of non-HLA antibodies associated with cardiac allograft rejection and development and validation of a non-HLA antigen multiplex panel: From bench to bedside. *Am J Transplant*. 2020;20(10):2768-2780.
110. Senev A, Ray B, Lerut E, Hariharan J, Heylen C, Kuypers D, Sprangers B, Emonds MP, Naesens M. The Pre-Transplant Non-HLA Antibody Burden Associates With the Development of Histology of Antibody-Mediated Rejection After Kidney Transplantation. *Front Immunol*. 2022 Feb 16;13:809059. doi: 10.3389/fimmu.2022.809059. PMID: 35250981; PMCID: PMC8888449.
111. Gammill HS, Nelson JL. Naturally acquired microchimerism. *Int J Dev Biol*. 2010;54:531-543.
112. Simtong P, Sudwilai Y, Cheunta S, Leelayuwat C, Romphruk A. Prevalence of leucocyte antibodies in non-transfused male and female platelet apheresis donors. *Transfusion Medicine*. 2021;31(3):186-192. <https://doi.org/10.1111/tme.12781>
113. Angaswamy N, et al. Immune responses to collagen-IV and fibronectin in renal transplant recipients with transplant glomerulopathy. *Am J Transplant*. 2014;14(3):685-693.
114. Sutherland SM, et al. Protein microarrays identify antibodies to protein kinase Czeta that are associated with a greater risk of allograft loss in pediatric renal transplant recipients. *Kidney Int*. 2009;76(12):1277-1283.
115. Nath DS, et al. A role for antibodies to human leukocyte antigens, collagen-V, and K-alpha1-Tubulin in antibody-mediated rejection and cardiac allograft vasculopathy. *Transplantation*. 2011;91(9):1036-1043.

116. Jurcevic S, et al. Antivimentin antibodies are an independent predictor of transplant-associated coronary artery disease after cardiac transplantation. *Transplantation*. 2001;71(7):886-892.
117. Kardol-Hoefnagel T, van Logtestijn SALM, Otten HG. A Review on the Function and Regulation of ARHGDIB/RhoGDI2 Expression Including the Hypothetical Role of ARHGDIB/RhoGDI2 Autoantibodies in Kidney Transplantation. *Transplant Direct*. 2020 Apr 9;6(5):e548. doi: 10.1097/TXD.0000000000000993. PMID: 32548242; PMCID: PMC7213606.

Ocjena radu
u tileku

8. SAŽETAK

Uvod: Kronična bubrežna insuficijencija završnog stadija najčešće se liječi transplantacijom bubrega za čiji uspjeh je izrazito značajna imunogenetička podudarnost između davatelja i primatelja organa. Uz probir seruma na prisutnost i specifičnosti protutijela anti-HLA, dokazivanje prisutnosti i karakterizacija protutijela usmjerenih na antigene izvan sustava HLA (protutijela non-HLA) od velikog je značaja za imunosnu procjenu i obradu bolesnika na listi čekanja za transplantaciju.

Ciljevi ovog istraživanja bili su: (1) ispitati specifičnosti i svojstava aktivacije komplementa protutijela non-HLA, kao i protutijela HLA u oboljelih od terminalne bubrežne bolesti koji se nalaze na listi čekanja za transplantaciju bubrega; (2) odrediti korelaciju između protutijela non-HLA i komplement vezujućih protutijela non-HLA; (3) odrediti korelaciju između određenih specifičnosti anti-HLA i protutijela non-HLA; (4) odrediti korelaciju protutijela non-HLA sa osnovnom bolesti, prethodnim imunizirajućim događajima, metodom i vremenskim periodom dijalitičkog liječenja.

Metode: U istraživanje su bila uključena 74 ispitanika prosječne starosti od 56,1 godine koji su oboljeli od terminalne bubrežne bolesti i nalazili se na listi čekanja za transplantaciju bubrega u KBC Rijeka. Probir seruma na protutijela anti-HLA usporedno se vršio metodom limfocitotoksičnosti ovisne o komplementu (CDC) i Luminex tehnologijom. Korištenjem Luminex tehnologije analizirane su specifičnosti protutijela anti-HLA razreda I i II kao i za određivanje prisutnosti i specifičnosti IgG protutijela non-HLA te za određivanje sposobnosti IgG protutijela non-HLA da vežu komplement. Dobiveni rezultati obrađeni su primjerenim statističkim metodama.

Rezultati: Metodom CDC određena su protutijela anti-HLA u serumima 28,4 % ispitanika, dok je probirnim testom Luminex tehnologije utvrđeno da je 52,7 % ispitanika pozitivnih za razred I i/ili II. Većina ispitanika (91,9 %) razvila je IgG protutijela non-HLA. Za 45,9 % tih protutijela nađeno je da vežu komplement. Nadalje, 43,2 % ispitanika razvilo je protutijela anti-HLA. Najčešće specifičnosti protutijela anti-HLA po ispitivanom lokusu HLA bile su HLA-A2 (u 14,9 %), *broad* B15 (67,6 %), *broad* Cw3 (12,2 %), DR15 (10,8 %) te DQ6 i DQ8 (s po 10,8%). Najveća učestalost među IgG protutijelima non-HLA koja su pokazala sposobnost vezanja komplementa nađena je za anti-PRKCZ (12,2 %), anti-DEXI (8,1 %) i anti-STAT6 (5,4 %). U

serumima 28,4 % ispitanika utvrđena su protutijela non-HLA koja vežu komplement, ali nisu utvrđena protutijela anti-HLA. Obje vrste protutijela, anti-HLA i komplement-vezujuća non-HLA, određena su u serumima 17,6 % ispitanika. Nije utvrđena korelacija između IgG protutijela non-HLA i komplement-vezujućih protutijela non-HLA na temelju broja specifičnosti protutijela u ispitivanoj populaciji kao i između broja različitih IgG protutijela non-HLA i prethodnih imunizirajućih događaja (transfuzije krvnih pripravaka i trudnoća) te vrsta dijalitičkog liječenja. Određene su granične vrijednosti za većinu testiranih skupina antigena non-HLA kao i struktura raspodjele rezultata MFI u testu LNHLA+C3d u IgG-negativnih i IgG-pozitivnih ispitanika.

Zaključak: Rezultati ovog istraživanja ističu važnost praćenja protutijela usmjerenih na antigene non-HLA u bolesnika na listi čekanja za transplantaciju bubrega. Otkriće visokog postotka pacijenata s protutijelima koja vežu komplement sugerira potencijalnu ulogu tih protutijela u mehanizmima odbacivanja transplantata koji nisu povezani sa sustavom HLA. Ova spoznaja otvara put daljnjim istraživanjima koja bi mogla dovesti do razvoja novih strategija u pretransplantacijskoj obradi i posttransplantacijskom praćenju, s konačnim ciljem poboljšanja ishoda transplantacije. Primjećeni nedostatak korelacije za sve praćene imunizirajuće događaje u ispitivanoj populaciji sugerira da na nastanak protutijela non-HLA mogu utjecati i individualni parametri imunskog odgovora i genomske karakteristike, a ne samo izloženost imunizirajućim događajima ili vrsta i trajanje dijalitičkog liječenja. Razumijevanje dinamike razvoja i djelovanja protutijela non-HLA te njihove sposobnosti za vezanje komplementa može pružiti nove uvide u mehanizme odbacivanja transplantata, što će unaprijediti pristup liječenju bolesnika na čekanju za transplantaciju bubrega.

Glavne riječi: protutijela non-HLA, specifičnosti IgG protutijela non-HLA, komplement-vezujuća protutijela non-HLA, protutijela anti-HLA, kronična bubrežna insuficijencija, transplantacija

9. SUMMARY

Introduction: Chronic end-stage renal failure is most commonly treated with kidney transplantation, the success of which is extremely important for immunogenetic compatibility between organ donor and recipient. In addition to serum screening for the presence and specificity of anti-HLA antibodies, the detection and characterization of antibodies directed against antigens outside the HLA system (non-HLA antibodies) is of great importance for the immunological assessment and treatment of patients on the transplant waiting list.

The aims of this study were: (1) To investigate the specificities and characteristics of complement activation of non-HLA antibodies as well as HLA antibodies in patients with end-stage renal disease who are on the waiting list for kidney transplantation; (2) To determine the correlation between non-HLA antibodies and complement-binding non-HLA antibodies; (3) To determine the correlation between certain specificities of anti-HLA and non-HLA antibodies; (4) To determine the correlation of non-HLA antibodies with underlying disease, previous immunization events, method and period of dialysis treatment.

Methods: The study involved 74 subjects with a mean age of 56.1 years who had end-stage renal disease and were on the waiting list for kidney transplantation at KBC Rijeka. Screening of serum for anti-HLA antibodies was performed comparatively using the complement-dependent lymphocytotoxicity (CDC) method and Luminex technology. Luminex technology was used to analyze the specificities of anti-HLA class I and II antibodies as well as the presence and specificity of non-HLA IgG antibodies and the ability of non-HLA IgG antibodies to bind complement. The results obtained were analyzed using appropriate statistical methods.

Results: Using the CDC method, anti-HLA antibodies were determined in the sera of 28.4% of subjects, while the screening test using Luminex technology was positive for class I and/or II in 52.7% of subjects. The majority of subjects (91.9%) developed non-HLA IgG antibodies. 45.9% of these antibodies were found to bind complement. In addition, 43.2% of the subjects developed anti-HLA antibodies. The most frequent specificities of the anti-HLA antibodies according to the HLA locus examined were HLA-A2 (at 14.9%), broad B15 (67.6%), broad Cw3 (12.2%), DR15 (10.8%) as well as DQ6 and DQ8 (at 10.8% each). The highest frequency among non-HLA-IgG antibodies that showed the ability to bind complement was found for anti-PRKCZ (12.2%), anti-DEXI (8.1%) and anti-STAT6 (5.4%). Complement-binding non-HLA

antibodies, but not anti-HLA antibodies, were detected in the sera of 28.4% of the subjects. Both types of antibodies, anti-HLA and complement-binding non-HLA, were detected in the sera of 17.6% of the subjects. No correlation was found between non-HLA IgG antibodies and complement-binding non-HLA antibodies based on the number of antibody specificities in the population tested and between the number of different non-HLA IgG antibodies and previous immunizing events (transfusions of blood products and pregnancy) and the type of dialysis treatment. Cut-off values were determined for most of the tested groups of non-HLA antigens, as well as the structure of the distribution of MFI results in the LNHLA+C3d test in IgG-negative and IgG-positive subjects.

Conclusion: The results of this study show the importance of monitoring antibodies against non-HLA antigens in patients on the waiting list for kidney transplantation. The finding of a high percentage of patients with complement-binding antibodies suggests a possible role for these antibodies in mechanisms of transplant rejection that are not related to the HLA system. These findings pave the way for further research that could lead to the development of new strategies for pre-transplant treatment and post-transplant monitoring, with the ultimate goal of improving transplant outcomes. The observed lack of correlation for all monitored immunizing events in the population studied suggests that the development of non-HLA antibodies may be influenced by individual immune response parameters and genomic characteristics and not only by exposure to immunizing events or the type and duration of dialysis treatment. Understanding the dynamics of the development and action of non-HLA antibodies and their ability to bind complement may provide new insights into the mechanisms of graft rejection that will improve the treatment approach for patients awaiting kidney transplantation.

Keywords: non-HLA antibodies, specificities of IgG non-HLA antibodies, complement-binding non-HLA antibodies, anti-HLA antibodies, chronic renal failure, transplantation

10. PRILOZI

Prilog 1. Najučestalije dijagnoze ispitanika podijeljene prema skupinama

NEIMUNOLOŠKE	IMUNOLOŠKE	UPALNE
Policistični bubreg	IgA nefropatija	Segmentalni mezangioproliferativni glomerulonefritis
Esencijalna hipertenzija	Poliklonska hipergamaglobulinemija	Hidronefroza
Bilateralna nefrolitiazia		Tubulointersticijski nefritis
Adenom prostate		Difuzni glomerulonefritis s polumjesecima (crescent)
Sekundarni hiperparatireoidizam		Kalkulozni pijelonefritis
Sekundarna anemija		Meningitis sa komplikacijama
Dijabetes		
Arterijska hipertenzija		
Nefroangioskleroza		

Prilog 2. Tablica s popisom svih 60 ispitivanih antigena non-HLA i opisom djelovanja protutijela usmjerenih na te antigene (1/16)

Naziv antigena non-HLA (kratica)	Opis
Aktin	Aktin je strukturni protein ključan u većini staničnih funkcija poput pokretljivosti stanica, održavanja strukture i međustanične signalizacije. <i>Istraživanja su pokazala povezanost anti-aktinskih protutijela sa odbacivanjem srčanog presatka.</i>
Agrin	Agrin je veliki proteoglikan važan u razvoju neuromuskularnog spoja tijekom embriogeneze. Može imati potencijalnu ulogu u liječenju neuroloških poremećaja i ozljeda leđne moždine. <i>Protutijela protiv agrina glomerularne bazalne membrane povezuju se s razvojem glomerulopatije bubrežnog presatka.</i>
Apolipoprotein L,2 - APOL2	Apolipoprotein L dio je lipoproteina visoke gustoće koji se nalazi u citoplazmi i ima središnju ulogu u metabolizmu i transportu lipida. <i>Antilipoproteinska protutijela dio su panela cirkulirajućih protutijela čije određivanje prije transplantacije može ukazivati na povećani rizik povrata fokalne segmentne glomeruloskleroze (FSGS) u bubrežni presadak.</i>
Inhibitor disocijacije gvanozin nukleotida (engl <i>Rho GDP-dissociation inhibitor 2</i> .- ARHGDIB)	G-proteini poznati su kao guanin-vezujući nukleotidi koji predstavljaju skupinu signalnih proteina odgovornih za regulaciju i koordinaciju različitih staničnih aktivnosti, uključujući staničnu signalizaciju, proliferaciju, i dr. ARHGDIB je jedan od čimbenika koji sudjeluje u regulaciji ciklusa između aktivnih i neaktivnih formi. <i>Autoantitijela protiv ARHGDIB značajno su povezana s gubitkom presatka kod primatelja bubrega od preminulog davatelja.</i>

Prilog 2. Tablica s popisom svih 60 ispitivanih antigena non-HLA i opisom djelovanja protutijela usmjerenih na te antigene (2/16)

Naziv antigena non-HLA (kratica)	Opis
ATP sintaza, H ⁺ transport, mitohondrijski F1 kompleks, beta polipeptid - ATP5B	ATP sintaza, H ⁺ transport, mitohondrijski F1 kompleks i beta polipeptid su svi dijelovi mitohondrijske membrane. ATP sintaza je enzim koji katalizira sintezu ATP-a. H ⁺ transport se odnosi na prijenos protona preko membrane. Mitohondrijski F1 kompleks je jedan od pet dijelova kompleksa ATP sintaze 3,a beta polipeptid je jedan od tri polipeptida koji čine F1 kompleks. Protutijela ATP5B mogu biti biljekom razvoja glomerulonefritisa.
Ciklički citrulinski peptid - CCP	Ciklički citrulinirani protein (CCP) je protein u kojoj je postupkom citrulinacije aminokiselina arginin promjenjena u citrulin što dovodi do promjene antigenskih svojstava vlastitih proteina. Posljedično se razvijaju autprotutijela na citrulinirane peptide čije se prisustvo povezuje sa predispozicijom za razvoj reumatoidnog artritisa (RA). <i>Postojanje anti CCP protutijela prije transplantacije pluća povezuje se sa mogućim oštećenjem i odbacivanjem presatka.</i>
Molekula CD40	Molekula CD40 je član superobitelji TNF-receptora, prisutana je na membrani antigen predočnih stanica kao receptor bitan u posredovanju širokog spektra imunoloških i upalnih odgovora. <i>Protutijela CD40 dio su panela protutijela čije određivanje prije transplantacije može ukazivati na povećani rizik povrata fokalne segmentne glomeruloskleroze (FSGS) u bubrežni presadak.</i>

Prilog 2. Tablica s popisom svih 60 ispitivanih antigena non-HLA i opisom djelovanja protutijela usmjerenih na te antigene (3/16)

Naziv antigena non-HLA (kratica)	Opis
Korionski gonadotropin, beta polipeptid 5 (engl. chorionic gonadotropin, beta polypeptide 5 - CGB5)	Korionski gonadotropin je heterodimer koji se sastoji od alfa i beta podjedinice koja mu daje biološku specifičnost. Hormon proizvode stanice trofoblasta posteljice i važan je za održavanje trudnoće. <i>Protutijela CGB5 dio su panela protutijela čije određivanje prije transplantacije može ukazivati na povećani rizik povrata fokalne segmentne glomeruloskleroze (FSGS) u bubrežni presadak.</i>
Kolagen tip I	Kolagen tip I je fibrilarni protein koji se nalazi u većini vezivnih tkiva i ima ga u izobilju u kostima, rožnici, dermisu i tetivama. <i>Post-transplantacijska protutijela na kolagen tip I su potencijalni novi biljeg odbacivanja bubrežnog presatka posredovanog protutijelima. Post-transplantacijska protutijela na kolagen tip II su potencijalni novi biljeg odbacivanja bubrežnog presatka posredovanog protutijelima.</i>
Kolagen tip II	Fibrilarni protein koji se nalazi u hrskavici i staklastom tijelu oka.
Kolagen tip III	Fibrilarni protein koji se nalazi u tkivima kao što su koža, pluća, crijevna stijenka i stijenke krvnih žila, u kostima, hrskavici, dentinu i drugim vezivnim tkivima. <i>Post-transplantacijska protutijela na kolagen tip III su potencijalni novi biljeg odbacivanja bubrežnog presatka posredovanog protutijelima.</i>

Prilog 2. Tablica s popisom svih 60 ispitivanih antigena non-HLA i opisom djelovanja protutijela usmjerenih na te antigene (4/16)

Naziv antigena non-HLA (kratica)	Opis
Kolagen tip IV	Glavna je strukturna komponenta bazalnih membrana, sudjeluje u staničnoj adheziji, migraciji, proliferaciji i diferencijaciji. <i>Protutijela na kolagen tip IV identificirana su u bolesnika sa glomerulopatijom presatka.</i>
Kolagen tip V	Molekule fibrilarnog kolegena nalaze se u tkivima koja sadrže kolagen tipa I i pretpostavlja se da regulira formiranje heterotipskih vlakana sastavljenih od kolagena tipa I i tipa V. <i>Protutijela na kolagen tip V su čimbenik rizika oštećenja plućnog presatka.</i>
Kolagen tip VI	Kolagen VI je glavna strukturna komponenta mikrofibrila. <i>U patološkim stanjima poput kronične bubrežne bolesti, njegovo aktivno taloženje u bubrezima je znatno povećano. Tijekom sinteze kolagena tip VI, oslobađa se dio molekule (C5 domena α3 lanca) iz neposrednog pericelularnog matriksa koji se istražuje kao neinvazivni rani biomarker fibroze bubrega.</i>
Čimbenik stimulacije kolonija 2 (engl. <i>Colony stimulating factor -2 - CSF2</i>)	Citokin koji kontrolira proizvodnju, diferencijaciju i funkciju granulocita i makrofaga. <i>CSF2-protutijela korisna su u dijagnostici kronične bolesti bubrega povezane sa aterosklerozom.</i>

Prilog 2. Tablica s popisom svih 60 ispitivanih antigena non-HLA i opisom djelovanja protutijela usmjerenih na te antigene (5/16)

Naziv antigena non-HLA (kratica)	Opis
Kemokin (engl.chemokine (C-X-C motif) ligand 11 – CXCL11)	Kemokini imaju temeljne uloge u razvoju, homeostazi i funkciji imunološkog sustava, te imaju učinke na stanice središnjeg živčanog sustava kao i na endotelne stanice uključene u angiogenezu ili angiostazu. Dije se u 2 velike podobitelji, CXC i CC. <i>Praćenje ekspresije gena CXCL11 i CXCL13 mogla bi imati ulogu za neinvazivno imunološkog statusa i odbacivanje alografta.</i>
Kemokin 9- CXCL9	<i>Kemokin 9 je proteinska signalna molekula koji pripada obitelji kemokina. Naziva se još i monokinom induciranom gama interferonom. Ima važnu ulogu u privlačenju i aktivaciji imunoloških stanica, kao što su citotoksični limfociti, NK stanice, i makrofagi. Kemokinski ligandi CXCL9 ima ključnu ulogu u inicijaciji i razvoju odbacivanja presadka. Visoke razine protutijela na CXCL9 prije transplantacije povezuju se s oštećenjem presatka, te se praćenje njihove razine istražuje kao mogući biomarkeri za predviđanje kroničnog odbacivanja.</i>
Deksametazon inducirana transkripcija (engl.dexamethasoneinduced transcript – DEXI)	DEXI predstavlja gen koji kodira protein GILZ (glukokortikoid inducirani leucin zipper protein). Kada se deksametazon veže za glukokortikoidni receptor (GR) u stanicama, aktivira se DEXI gen. GILZ protein ima ulogu u regulaciji upalnih procesa i imunološkog odgovora u tijelu.
Endomucin - EMCN	Endomucin je integralni membranski glikoprotein tipa I koji se eksprimira u endotelnim stanicama vena i kapilara Identificiran je kao antiadhezijska molekula i marker endotelne stanice. Ima ulogu u biološkim procesima kao što su interakcija stanica, molekularna stanična signalizacija, angiogeneza i stanična migracija.

Prilog 2. Tablica s popisom svih 60 ispitivanih antigena non-HLA i opisom djelovanja protutijela usmjerenih na te antigene (6/16)

Naziv antigena non-HLA (kratica)	Opis
Enolaza 1 - ENO1	Poznatija kao alfa-enolaza, je glikolitički enzim izražen u većini tkiva, jedan od izoenzima enolaze. Multifunkcionalni enzim koji ima uloga u glikolizi, Stimulira proizvodnju imunoglobulina. U mnogim slučajevima predstavljaju specifične markere koji se koriste u kliničkoj praksi. <i>Pokazalo se da α-enolaza inducira imunološki odgovor kod transplantacije srca.</i>
Fas receptor (engl.Fas cell surface death receptor – FAS)	FAS receptor (CD95) je protein koji se nalazi na površini stanica i ima ulogu u regulaciji procesa apoptoze. Kada se FAS receptor veže na svoj ligand, FAS ligand (FasL), pokreće se signalna kaskada koja dovodi do aktivacije enzima kaspaza i na kraju do apoptoze stanice. FAS receptor ima važnu ulogu u regulaciji periferne imunotolerancije. <i>Osим štete uloge u uništavanju tkiva presatka, Fas/FasL interakcije mogu imati korisnu ulogu u transplantaciji, ali isto tako niz izvješća pokazuje da prekomjerna ekspresija FasL-a može dovesti do pojačanog imunološkog odgovora i odbacivanja presatka.</i>
Fibronectin 1 - FN1	Gen je koji kodira protein fibronektin. Bolesti povezane s FN1 uključuju spondilometaphyseal displaziju i glomerulopatiju s naslagama fibronektina 2. Uključen u staničnu adheziju i procese migracije, embriogenezu, zacjeljivanje rana, koagulaciju krvi, obranu domaćina i metastaze. <i>Predstavlja aktivni element u procesu aktivacije T stanica u imunološkoj kaskadi potaknutoj transplantacijom organa.</i>

Prilog 2. Tablica s popisom svih 60 ispitivanih antigena non-HLA i opisom djelovanja protutijela usmjerenih na te antigene (7/16)

Naziv antigena non-HLA (kratica)	Opis
Transmembranski protein bogat leucinom (engl. <i>Leucine-rich repeat transmembrane protein - FLRT2</i>)	Gen je koji kodira člana obitelji transmembranskih proteina bogatih fibronektinom leucinom (FLRT).
Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (engl. <i>Glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase – GAPDH</i>)	GAPDH je enzim koji katalizira šesti korak glikolize, procesa razgradnje glukoze radi oslobađanja energije. Također je uključen u druge metaboličke procese, kao što su apoptoza, autofagija i stanični rast. Ima važnu ulogu u mnogim biološkim procesima, uključujući i transplantaciju. <i>Može koristiti kao biomarker za procjenu kvalitete presatka nakon transplantacije, te se također može koristiti kao ciljna molekula za terapiju protiv odbacivanja presatka.</i>
Neurotrofni čimbenik izveden iz glija stanica (engl. <i>glial cell derived neurotrophic factor - GDNF</i>)	GDNF je protein koji se prirodno proizvodi u mozgu i podržava preživljavanje mnogih vrsta stanica u mozgu, uključujući stanice koje se gube kod Parkinsonove bolesti. <i>Istraživanja pokazuju da gen GDNF poboljšava sposobnost bubrežne mikrocirkulacije putem signalnog puta i nakon toga inhibira proces i bubrežnu fibrogenezu, što bi trebalo imati veliki utjecaj u dizajniranju budućih lijekova i liječenju kronične bubrežne bolesti.</i>

Prilog 2. Tablica s popisom svih 60 ispitivanih antigena non-HLA i opisom djelovanja protutijela usmjerenih na te antigene (8/16)

Naziv antigena non-HLA (kratica)	Opis
<p>Glutation S- Transferaza theta-1 - GSTT1</p>	<p>GSTT1 je protein koji pripada skupini enzima zvanim glutathione S-transferaze. Ovaj protein katalizira konjugaciju smanjene glutathione s različitim elektrofilnim i hidrofobnim spojevima. <i>Protutijela protiv enzima Glutation S-transferaze T1 (GSTT1) pojavljuju se u primatelja bez gena GSTT1 koji prime transplantat od GSTT1-pozitivnog donora. Postoji povezanosti između pojave kroničnog odbacivanja bubrežnog presatka posredovanog protutijelima i pojave de novo proizvodnje anti-GSTT1 antitijela, u nedostatku anti-HLA protutijela specifičnih za davatelja. Ova činjenica sugerira potencijalnu ulogu GSTT1 sustava u odbacivanju bubrežnog presatka. Mehanizmi kojima GST genotipovi utječu na razvoj poremećaja u transplantiranih pacijenata razlikuju se od poremećaja do poremećaja: oni mogu sudjelovati na način da smanjuju metabolizam lijekova koji se daju transplantiranim pacijentima, a zatim ih izlažu većoj toksičnosti</i></p>
<p>Histidin tRNA sintetaza - HARS</p>	<p>Histidin-tRNA sintetaza (HARS), također poznata kao histidin-tRNA ligaza, je enzim koji u ljudima kodira gen HARS. HARS je citoplazmatski enzim koji pripada klasi II obitelji aminoacil tRNA sintetaza i odgovoran je za sintezu histidil-transfer RNA, koja je neophodna za ugradnju histidina u proteine. Jo-1 je autoantitijelo koje se povezuje s polimiozitisom, upalnom mišićnom bolešću koja uzrokuje slabost mišića i bol. <i>HARS je identificiran kao potencijalni biomarker za akutno odbacivanje bubrega, te se pokazalo da su razine HARS-a u urinu bile značajno više u bolesnika s akutnim odbacivanjem u usporedbi s onima bez odbacivanja.</i></p>

Prilog 2. Tablica s popisom svih 60 ispitivanih antigena non-HLA i opisom djelovanja protutijela usmjerenih na te antigene (9/16)

Naziv antigena non-HLA (kratica)	Opis
<p>Protein toplinskog šoka beta-1 (engl. Heat shock protein beta-1 - HSPB1)</p>	<p>Protein koji se proizvodi u stanicama kao odgovor na stresne uvjete, uključujući toplinu, oksidativni stres i upalu. HSPB1 se može naći u mnogim tkivima, uključujući mišiće, srce, mozak i kožu. Ima važnu ulogu u zaštiti stanica od oštećenja, regulaciji apoptoze i upalnih procesa. <i>U transplantaciji, HSPB1 se može koristiti kao biomarker za procjenu kvalitete presatka i predviđanje uspješnosti transplantacije.</i></p>
<p>Intracelularna adhezijska molekula 1 (engl. Intracellular Adhesion Molecule 1 - ICAM1)</p>	<p>Protein koji se nalazi na površini stanica i služi kao molekula za adheziju stanica. ICAM-1 se nalazi na površini mnogih stanica, uključujući stanice imunološkog sustava, endotelne stanice i druge. Ima važnu ulogu u upalnom odgovoru i imunološkom sustavu. <i>Protutijela anti-ICAM-1, usmjerena protiv polimorfnih ostataka, mogla biti jedna komponenta antiendotelnih protutijela pronađenih nakon transplantacije srca.</i></p>
<p>Interferon Gamma - IFNG</p>	<p>Citokin koji se proizvodi u stanicama kao odgovor na stresne uvjete, uključujući toplinski šok. IFN-γ ima važnu ulogu u zaštiti stanica od oštećenja i smrti, te u održavanju homeostaze stanica. <i>Upala posredovana hladnom pohranom presatka i transplantacije bubrega donora, može doprinijeti zatajenju presađenog organa. Ekspresija gena IFN-γ kao i amplifikacija inducibilne sintaze dušikovog oksida značajno su povećani nakon hladne pohrane + ponovnog zagrijavanja.</i></p>
<p>Interleukin 21 - IL21</p>	<p>Citokin koji ima snažne regulatorne učinke na stanice imunološkog sustava, uključujući prirodne ubojice (NK) stanice i citotoksične T stanice. Inducira proliferaciju u svojim ciljnim stanicama, te se izražava u aktiviranim ljudskim CD4 + T stanicama i NK T stanicama koje reguliraju funkciju tih stanica. <i>Povećane razine IL-21 u slezeni izazivaju proliferaciju CD4+ T stanica i CD19+ B stanica što upućuje na kritičnu funkciju IL-21 u transplantaciji bubrega i potencijalnu uključenost puta IL-21/IL-21R u liječenju akutnog odbacivanja.</i></p>

Prilog 2. Tablica s popisom svih 60 ispitivanih antigena non-HLA i opisom djelovanja protutijela usmjerenih na te antigene (10/16)

Naziv antigena non-HLA (kratica)	Opis
Interleukin 8, CXCL8 - IL8	Član CXC obitelji kemokina. Jedan je od glavnih medijatora upalnog odgovora, te izlučuje nekoliko vrsta stanica. Djeluje kao kemoatraktant, a također je i snažan angiogenetski faktor. To je kemotaktički faktor koji privlači neutrofile, bazofile i T-stanice, ali ne i monocite. Također je uključen u aktivaciju neutrofila. <i>Visok sadržaj IL-8 u urinu uzorkovanom prvog dana nakon transplantacije bubrega nepovoljan pokazatelj rane i dugoročne (višegodišnje) funkcije presatka.</i>
Citokeratin 18 - KRT18	Keratin 18, zajedno sa svojim filamentnim partnerom keratinom 8, možda su najčešće pronađeni članovi obitelji intermedijarnih filamentnih gena. Izraženi su u jednoslojnom epitelnom tkivu. Mutacije u ovom genu povezane su s kriptogenom cirozom. Za ovaj gen pronađene su dvije varijante transkripta koje kodiraju isti protein.
Citokeratin 8 - KRT8	Protein koji pripada keratinima tipa II i kodira ga KRT8 gen. CK8 se obično uparuje s keratinom 18 da bi formirao intermedijarne filamente u jednostavnim jednoslojnim epitelnim stanicama. Smatra se korisnim u identificiranju mikroskopskih metastaza karcinoma dojke u limfnim čvorovima i u razlikovanju Pagetove bolesti od zloćudnog melanoma.
Galektin 3-Lektin specifičan za galaktozu - LGALS3	Lektin specifičan za galaktozu koji veže IgE. Ovaj protein igra ulogu u brojnim staničnim funkcijama uključujući apoptozu, urođenu imunost, staničnu adheziju i regulaciju T-stanica. <i>Gal-3 se koristi za otkrivanje imunološkog statusa donora i potencijalnog primatelja protiv niza klinički značajnih infektivnih organizama, uključujući viruse poput HIV-a, citomegalovirusa (CMV) i Epstein-Barr virusa (EBV), čime se određuje potencijal za ponovnu infekciju ili reaktivaciju infekcije nakon imunosupresije.</i>

Prilog 2. Tablica s popisom svih 60 ispitivanih antigena non-HLA i opisom djelovanja protutijela usmjerenih na te antigene (11/16)

Naziv antigena non-HLA (kratica)	Opis
Galektin 8- LGALS8	Galectin 8 je protein koji pripada obitelji beta-galaktozidnih proteina i igra važnu ulogu u adheziji stanica, interakcijama stanica i matrice, aktivaciji makrofaga, angiogenezi, metastazama i apoptozi. Često se koristi kao marker za određivanje stanja raka, što može biti korisno u procjeni zdravlja donora i primatelja
Lamin – LMNA	Lamini su komponente jezgrene lamine, vlaknastog sloja na nukleoplazmatskoj strani unutarnje jezgrene membrane. Mutacije u LMNA genu povezane su s nekoliko bolesti, uključujući Hutchinson-Gilfordov sindrom, mišićnu distrofiju, kongenitalnu lipodistrofiju i Charcot-Marie-Toothovu bolest.
Latrofilin 1 - LPHN1	Član obitelji latrofilina G protein-spregnutih receptora (GPCR). Latrofilini mogu djelovati i na staničnu adheziju i na transdukciju signala.
Miozin	Miozin je heksamerni protein koji sadrži 2 podjedinice teškog lanca, 2 alkalne podjedinice lakog lanca i 2 regulacijske podjedinice lakog lanca. Mutacije u ovom genu povezane su s obiteljskom hipertrofičnom kardiomiopatijom, miopatijom skladištenja miozina, dilatacijskom kardiomiopatijom i Laingovom distalnom miopatijom s ranim početkom. Srčani miozin je autologni kontraktilni protein kojeg prepoznaju i T i B stanice tijekom odbacivanja presatka.
Nukleolin - NCL	Glavni nukleolarni protein rastućih eukariotskih stanica. Utvrđeno je da je povezan s intranukleolarnim kromatinom i pre-ribosomalnim česticama. Inducira dekondukciju kromatina vezanjem na histon H1. Protutijela protiv nukleolina inhibiraju i proizvode apoptozu proliferirajućih endotelnih stanica. Ta su antitijela pronađena kod pacijenata s transplantiranim organima i čini se da su povezana s odbacivanjem presatka bubrega i s bolešću koronarne arterije kod primatelja transplantiranog srca.

Prilog 2. Tablica s popisom svih 60 ispitivanih antigena non-HLA i opisom djelovanja protutijela usmjerenih na te antigene (12/16)

Naziv antigena non-HLA (kratica)	Opis
<p>Gen je koji kodira protein nazvan P2Y (engl.Purinergic receptor P2Y, G- protein coupled, 11 - P2RY11)</p>	<p>Gen je koji kodira protein nazvan P2Y11 koji pripada obitelji G-protein spregnutih receptora. Izražen je u različitim tkivima i organima, te je povezan sa imunološkim odgovorima i upalnim procesima. <i>Mogu imati ulogu u imunološkim odgovorima povezanim s odbacivanjem presađenih organa.</i></p>
<p>Peroksisomalna trans-2-enoil-CoA reduktaza (engl.Peroxisomal trans-2-enoil- CoA Reductase – PECR)</p>	<p>Enzim koji sudjeluje u beta-oksidaciji masnih kiselina.Zbog uloge u metabolizmu masnih kiselina važan je za održavanje energetske ravnoteže u tijelu i povezan je sa različitim metaboličkim stanjima i bolestima. <i>Protutijela protiv PECR-a povezana su s akutnim i kroničnim odbacivanjem posredovanim protutijelima, neovisno o donor specifičnim protutijelima. U transplantaciji pluća, anti-PECR protutijela u snažnoj su korelaciji s pojavom kronične disfunkcije presatka pluća .</i></p>
<p>Receptor za fosfolipazu A2 (engl.phospholipase A2 receptor 1 - PLA2R1)</p>	<p>Ovaj gen predstavlja receptor za fosfolipazu A2. Transmembranski receptor može igrati ulogu u uklanjanju fosfolipaze A2, čime inhibira njezino djelovanje. Polimorfizmi na ovom lokusu povezani su s osjetljivošću na idiopatsku membransku nefropatiju. <i>Visoke razine PLA2R protutijela povezane su s aktivnom bolešću i većim rizikom od pada bubrežne funkcije.</i></p>
<p>Protein Kinase C Eta (engl.Protein kinase C, eta – PRKCH)</p>	<p>Članova je PKC obitelji proteina. Aktivnost protein kinaze C neovisna o kalciju, uključena u regulaciju stanične diferencijacije u keratinocitima i pre-B staničnom receptoru, posreduje u regulaciji integriteta tijesnog spoja epitela. <i>Visoki titar anti-PKCzeta ukazuje da je on marker ozbiljne ozljede presatka, a ne da je sam po sebi patogen. Vjerojatno kritična ozljeda bubrega i upala povezana s ovim podtipom odbacivanja dovode do imunološke izloženosti PKCzeta s posljedičnim stvaranjem protutijela.</i></p>

Prilog 2. Tablica s popisom svih 60 ispitivanih antigena non-HLA i opisom djelovanja protutijela usmjerenih na te antigene (13/16)

Naziv antigena non-HLA (kratica)	Opis
<p>Protein kinaza C zeta (engl.<i>protein kinase C, zeta – PRKCZ</i>)</p>	<p>Član PKC obitelji serin/treonin kinaza koje su uključene u razne stanične procese kao što su proliferacija, diferencijacija i sekrecija. Za razliku od klasičnih PKC izoenzima koji su ovisni o kalciju, PKC zeta pokazuje aktivnost kinaze koja je neovisna o kalciju i diacilglicerolu, ali ne i o fosfatidilserinu. Izražava se u mozgu i igra važnu ulogu u dugoročnoj memoriji. <i>Visoki titar anti-PRKCzeta ukazuje da je on marker ozbiljne ozljede presatka, a ne da je sam po sebi patogen. Vjerojatno kritična ozljeda bubrega i upala povezana s ovim podtipom odbacivanja dovode do imunološke izloženosti PKCzeta s posljedičnim stvaranjem protutijela.</i></p>
<p>Receptor tipa tirozin fosfataza (engl.<i>Receptor-type Tyrosine-protein Phosphatase U – PTPRO</i>)</p>	<p>Ovaj gen kodira člana obitelji podtipa R3 proteinskih tirozin fosfataza tipa receptora. Ti su proteini lokalizirani na apikalnoj površini polariziranih stanica i mogu imati funkcije specifične za tkivo putem aktivacije kinaza obitelji Src. <i>PTPRO aktivira (engl.Nuclear Factor Kappa B - NF-κB) na način pozitivne povratne sprege i igra dvostruku ulogu u ozljedi reperfuzijske ishemije jetre.</i></p>
<p>Receptor tirozin kinaze poput Orphan Receptora (engl.<i>Receptor Tyrosine KinaseLike Orphan Receptor 1 - ROR1</i>)</p>	<p>Kodirani protein je glikozilirani membranski protein tipa I koji pripada podobitelji ROR receptora stanične površine. To je pseudokinaza kojoj nedostaje katalitička aktivnost i može stupiti u interakciju s nekanonskim Wnt signalnim putem. Povećana ekspresija ovog gena povezana je s B-staničnom kroničnom limfocitnom leukemijom. <i>Mogao bi biti biomarker za B-staničnu limfocitnu leukemiju i rak bubrega. Cirkulirajuće (izvanstanične vezikule – EV) vrlo su obećavajući biomarker za karakterizaciju odbacivanja srčanog presatka.</i></p>
<p>Adapterski protein 3 (engl.<i>Transforming Protein 3 - SHC3</i>)</p>	<p>Signalni adapter koji povezuje aktivirane receptore faktora rasta sa signalnim putem u neuronima. Uključen u puteve prijenosa signala Trk receptora aktiviranih neurotrofinom u kortikalnim neuronima.</p>

Prilog 2. Tablica s popisom svih 60 ispitivanih antigena non-HLA i opisom djelovanja protutijela usmjerenih na te antigene (14/16)

Naziv antigena non-HLA (kratica)	Opis
Mali nuklearni ribonukleoprotein polipeptid B (engl. <i>small nuclear ribonucleoprotein polypeptide B</i> - SNRPB2)	Protein kodiran ovim genom povezuje se s matičnom petljom IV ribonukleoproteina male jezgre u prisutnosti snRNP-A'. Autoantitijela pacijenata sa sistemskim eritemskim lupusom često prepoznaju epitope na kodiranom proteinu. <i>Mogu imati ulogu u imunološkim odgovorima povezanim s odbacivanjem presađenih organa.</i>
Mali nuklearni ribonukleoprotein polipeptid N (jezgrena sekvenca smithovog antigena) - (engl.Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N (smith antigen core sequence) – SNRPN)	Protein koji kodira gen SNRPN. Ovaj protein je jedan polipeptid malog nuklearnog ribonukleoproteinskog kompleksa i pripada snRNP SMB/SMN obitelji. Ovaj protein igra ulogu u procesiranju pre-mRNK, a moguće i u alternativnom spajanju tkiva.
Sjogrenov sindrom antigen B (engl.Sjogren syndrome antigen B (autoantigen La) – SSB)	Protein kodiran ovim genom uključen je u različite aspekte metabolizma RNK, uključujući vezanje i zaštitu poli(U) krajeva novonastalih transkripata RNK polimeraze III od probave egzonukleazom,, djelujući kao RNA pratilac i vezne virusne RNA povezane s virusom hepatitisa C. Autoantitijela koja reagiraju s ovim proteinom nalaze se u serumima bolesnika sa Sjogrenovim sindromom i sistemskim eritemskim lupusom. Alternativna uporaba promotora rezultira u dvije različite varijante transkripta koje kodiraju isti protein. <i>Ova protutijela mogu biti biomarker kod primatelje srčanog presatka kod kojih postoji rizik od odbacivanja.</i>
Pretvornik signala i aktivator transkripcije 6 - (engl.Signal Transducer And Activator Of Transcription 6 - STAT6)	Ovaj protein prenosi signale od receptora do jezgre stanice i aktivira ekspresiju gena. STAT6 utječe na izražavanje gena vezanih uz upalu, alergijske reakcije i imunološki odgovor. <i>Prema studijama eritropoetin (EPO) ima renoprotektivni učinak kod ishemijske/reperfuzijske ozljede nakon transplantacije bubrega putem STAT6/MAPK/NF-κB puta.</i>

Prilog 2. Tablica s popisom svih 60 ispitivanih antigena non-HLA i opisom djelovanja protutijela usmjerenih na te antigene (15/16)

Naziv antigena non-HLA (kratica)	Opis
Tireoglobulin	Tireoglobulin je protein koji nastaje u štitnjači i neophodan je za sintezu hormona štitnjače. Koristi se kao tumorski marker i za procjenu učinkovitosti liječenja raka štitnjače. <i>Thymoglobulin je poliklonско protutijelo koje se koristi u području transplantacije. Danas se koristi u prevenciji i liječenju odbacivanja nakon transplantacije bubrega.</i>
Transferin	Funkcija ovog proteina je transport željeza iz crijeva, retikuloendotelnog sustava i stanica jetrenog parenhima do svih proliferirajućih stanica u tijelu. Također može imati fiziološku ulogu kao protein koji veže granulocite uključen u uklanjanje određenih organskih tvari i alergena iz seruma. <i>Pokazalo se da anti-TfR monoklonско protutijelo (mAb) produljuje preživljavanje presatka mijenjanjem odgovora T stanica heterotopnom neovaskulariziranom modelu srčanog presatka.</i>
Tubulin alfa 1b - (engl.tubulin, alpha 1b - TUBA1B)	Tubulin je glavni sastojak mikrotubula. Veže dva mola GTP-a, jedan na izmjenjivom mjestu u beta lancu i jedan na neizmjenjivom mjestu u alfa lancu.
Tubulin beta razred I - TUBB	Tubulin je glavni sastojak mikrotubula. Veže dva mola GTP-a, jedan na izmjenjivom mjestu u beta lancu i jedan na neizmjenjivom mjestu u alfa lancu.
Tubulin	Tubulin je glavni sastojak mikrotubula. Veže dva mola GTP-a, jedan na izmjenjivom mjestu u beta lancu i jedan na neizmjenjivom mjestu u alfa lancu.
Vinkulin – VCL	Protein koji veže aktinski filament (F-aktin) uključen u adheziju između stanica i matrice te se smatra da funkcionira kao jedan od nekoliko proteina koji sudjeluju u pričvršćivanju F-aktina na membranu.

Prilog 2. Tablica s popisom svih 60 ispitivanih antigena non-HLA i opisom djelovanja protutijela usmjerenih na te antigene (16/16)

Naziv antigena non-HLA (kratica)	Opis
Vaskularni endotelni faktor rasta A (engl. Vascular endothelial growth factor A – VEGFA)	Signalni je protein koji se proizvodi u tijelu i igra važnu ulogu u angiogenezi, odnosno stvaranju novih krvnih žila. Ovaj protein se proizvodi u različitim oblicima, a svaki oblik ima specifičnu funkciju. Važan je za rast i razvoj krvnih žila u embrionalnom razvoju, kao i za stvaranje novih krvnih žila nakon ozljeda.
Vimentin - VIM	Član obitelji intermedijarnih filamenata. Intermedijarni filamenti, zajedno s mikrotubulima i mikrofilamentima aktina, čine citoskelet. Uključen je u imunološki odgovor i kontrolira transport kolesterola izvedenog iz lipoproteina niske gustoće od lizosoma do mjesta esterifikacije. Djeluje kao organizator niza kritičnih proteina uključenih u pričvršćivanje, migraciju i staničnu signalizaciju. Dokazalo se da vimentin regulira imunološki odgovor T stanica u reakciji na transplantaciju koštane srži.

Prilog 3. Usporedni rezultati svih ispitanika u ovom istraživanju za stvaranje IgG protutijela non-HLA i njihove sposobnosti da vežu komplement.

Redni broj ispitanika	Rezultat IgG non-HLA	Rezultat C3d non-HLA	Redni broj ispitanika	Rezultat IgG non-HLA	Rezultat C3d non-HLA	Redni broj ispitanika	Rezultat IgG non-HLA	Rezultat C3d non-HLA	
1	POZ	NEG	26	POZ	POZ	51	POZ	POZ	
2	POZ	NEG	27	POZ	POZ	52	POZ	NEG	
3	POZ	POZ	28	POZ	DIS	53	POZ	POZ	
4	POZ	DIS	29	POZ	NEG	54	POZ	POZ	
5	POZ	NEG	30	POZ	POZ	55	POZ	NEG	
6	POZ	NEG	31	POZ	POZ	56	POZ	NEG	
7	POZ	NEG	32	POZ	POZ	57	POZ	POZ	
8	NEG	NEG	33	POZ	POZ	58	POZ	POZ	
9	POZ	POZ	34	POZ	NEG	59	POZ	DIS	
10	POZ	POZ	35	POZ	POZ	60	POZ	NEG	
11	POZ	DIS	36	POZ	NEG	61	POZ	NEG	
12	POZ	DIS	37	POZ	POZ	62	POZ	NEG	
13	NEG	NEG	38	NEG	NEG	63	POZ	POZ	
14	POZ	NEG	39	POZ	NEG	64	POZ	DIS	
15	POZ	NEG	40	POZ	DIS	65	POZ	POZ	
16	NEG	NEG	41	POZ	POZ	66	POZ	DIS	
17	POZ	DIS	42	POZ	DIS	67	POZ	POZ	
18	POZ	POZ	43	POZ	NEG	68	POZ	DIS	
19	POZ	POZ	44	POZ	POZ	69	POZ	DIS	
20	POZ	POZ	45	POZ	DIS	70	POZ	POZ	
21	POZ	POZ	46	POZ	POZ	71	POZ	NEG	
22	POZ	NEG	47	POZ	POZ	72	NEG	DIS	
23	POZ	POZ	48	POZ	POZ	73	POZ	POZ	
24	NEG	NEG	49	POZ	POZ	74	POZ	POZ	
25	POZ	POZ	50	POZ	DIS	UKUPNO POZ	68 (91,9 %)	34 (45,9 %)	
							UKUPNO NEG	6 (8,1 %)	25 (33,8 %)
							UKUPNO DIS	0 (0,0 %)	15 (20,3 %)

POZ = pozitivan rezultat testa, NEG = negativan rezultat testa, DIS = diskutabilan rezultat testa

11. ŽIVOTOPIS

Aida Mujić Franić rođena je 28.07.1981. godine u Bihaću, Bosna i Hercegovina. Osnovnu, te srednju Medicinsku školu završava u Rijeci. Na Medicinskom fakultetu u Rijeci 2007. godine završava preddiplomski Sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike.

2010. godine završava diplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Fakultetu zdravstvenih studija Univerziteta u Sarajevu, Bosna i Hercegovina.

2012.godine upisuje Poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku.

Od 2007. do 2008. godine radila je kao Medicinsko laboratorijski inženjer u Dom Zdravlja Primorsko- Goranske Županije, Rijeka.

Od 2008. godine do danas radi kao inženjer medicinsko laboratorijske dijagnostike u Kliničkom bolničkom centru Rijeka, Klinički zavod za transfuzijsku medicinu, Laboratorij za tipizaciju tkiva.

ČLANSTVO U STRUKOVNIM UDRUGAMA

1. Europsko udruženje za imunogenetiku
(European Federation for Immunogenetics, EFI)
2. Hrvatska komora zdravstvenih radnika, HKZR
3. Hrvatski liječnički zbor, HLZ

Popis objavljenih publikacija:

1. Franic, A., Katalinic, N., Duhovic, M., Susanj, I. S., Milojevic, T., Susnjar, S. S., Balen, S. (2020, April). "Effect of pregnancy on hla alloimmunization in kidney transplantation candidates." In hla (vol. 95, no. 4, pp. 354-354). 111 river st, hoboken 07030-5774, NJ USA: Wiley
2. Katalinić, Nataša ; Franić, **Aida Mujić** ; Duhović, Marijana ; Šever Šušnjar, Sandra ; Šimac Sušanj, Ines ; Milojević, Tamara ; Balen, Sanja. "Pre-transplant blood transfusions and their influence on HLA alloimmunization in kidney transplant recipients" // Tissue antigens. 2019. str. 316-317 doi: 10.1111/tan.13518
3. Katalinić, Nataša; Crnić, Tajana; Fućak, Marina; Kurtović, Helena; **Mujić, Aida**; Ćurković, Milena; Duhović, Milena; Balen, Sanja. "Monitoring of donor-specific antibody in kidney transplantation" // Tissue Antigens / McCluskey, J (ur.).Oxford, UK : Blackwell Publishing Ltd., 2015. 410-410
4. Katalinić, Nataša ; Živčić-Ćosić, Stela ; Fućak, Marina ; Starčević, Alma ; Crnić, Tajana ; Kurtović, Helena ; **Mujić, Aida** ; Ćurković, Milena ; Duhović, Marijana ; Balen, Sanja. "Donor-specific antibody monitoring and clinical outcome in kidney transplantation" // Bantao 12th Diatransplant 2015. Opatija, Hrvatska, 15.10.2015-18.10.2015
5. Crnić, Tajana, Ćurković, Milena; Katalinić, Nataša; Fućak, Marina; Kurtović, Helena; **Mujić, Aida**; Balen, Sanja. "HLA B 27 typing in diagnosis of spondyloarthropathies" // Tissue Antigens / McCluskey, J (ur.).Oxford, UK : Blackwell Publishing Ltd., 2014. 150-150
6. Katalinić, N; Caser, L; Vukelić- Damiani, N; Ivanković, Edita; Fućak, Marina; Kurtović, Helena; **Mujić, Aida**; Crnić, Tajana, Ćurković, Milena; Balen, Sanja. "HLA sensitization from transfusions in patients with red blood cell alloimmunization" // Tissue Antigens / McCluskey, J (ur.).Oxford, UK : Blackwell Publishing Ltd., 2014. 114-114
7. Crnić, Tajana; Ćurković, Milena; Katalinić, Nataša; Fućak, Marina; Kurtović, Helena; **Mujić, Aida**; Balen, Sanja. "Dokazivanje HLA-B27 u pacijenata Primorsko-goranske, Istarske i Ličko-senjske županije" // Liječnički vjesnik.161-161
8. Katalinić, Nataša; Caser, Linda; Vukelić-Damijani, Nada; Ivanković, Edita; Fućak, Marina; Kurtović, Helena; **Mujić, Aida**; Crnić, Tajana; Ćurković, Milena; Balen, Sanja. "HLA aloimunizacija u pacijenata s antieritrocitnim antitijelima" // Liječnički vjesnik. 2014.99-99
9. Katalinić, Nataša; Caser, Linda; Vukelić-Damijani, Nada; Ivanković, Edita; Fućak, Marina; Kurtović, Helena; **Mujić, Aida**; Crnić, Tajana; Ćurković, Milena; Balen, Sanja. "Transfusions as the cause of the HLA sensitization in patients with red blood cell alloimmunization" // Acta Medica Croatica. 2014. 287-287

10. Kurtović, Helena; Katalinić, Nataša; Fućak, Marina; Ćurković, Milena; **Mujić, Aida**; Crnić, Tajana; Balen, Sanja. "HLA sensitization caused by blood transfusions in organ waiting list patients" // Acta Medica Croatica. 2014. 286-286
11. Kurtovic, H., **Mujic, A.**, Fucak, M., Katalinic, N., Balen, S. (2013, May). "Implementation of Luminex technology in anti-HLA antibody screening in comparison to CDC method." In Tissue Antigens (Vol. 81, No. 5, Pp. 337-337). 111 River St, Hoboken 07030-5774, Nj Usa: Wiley-Blackwell.
12. Katalinić, Nataša; Fućak, Marina; Kurtović, Helena; **Franić, Aida**; Crnić, Tajana; Ćurković, Milena; Duhović, Marijana; Balen, Sanja. "Allosensitisation to leukocyte and erythrocyte antigens in transfused patients on the waiting list for kidney transplantation." Tissue Antigens / McCluskey, J (ur.). - Oxford, UK : Blackwell Publishing Ltd. , 2016. 87-87.ISSN:0001-2815
13. Mihailović M, Uskoković A, Arambašić-Jovanović J, Grdović N, Dinić S, Poznanović G, **Franić A**, Đorđević M, Vidaković M. "Treatment of streptozotocin-induced diabetic rats with Castanea sativa and Lactarius deterrimus extracts decreases liver damage by initiating activation of the Akt prosurvival kinase." Arch Biol Sci. 2020;72(2):233-42.22.
14. Živković, J., Zeković, Z., Mujić, I., Gođevac, D., Mojović, M., **Mujić, A.**, i Spasojević, I. (2009): "EPR Spin-Trapping and Spin-Probing Spectroscopy in Assessing Antioxidant Properties: Example on Extracts of Catkin, Leaves, and Spiny Burs of Castanea sativa." Food Biophysics, 4(2):126-133. CC Accession Number: 2009-444VE-0008, ISSN: 1557-1858
15. Senka S. Vidović, Ibrahim O. Mujić, Zoran P. Zeković, Žika D. Lepojević, Vesna T. Tumbas, **Aida I. Mujić**. "Antioxidant Properties of Selected Boletus Mushrooms." Food Biophysics 5, 49–58 (2010). DOI : 10.1007 /s11483-009-9143-6
16. **Aida Mujić**, Nevena Grdović, Ibrahim Mujić, Mirjana Mihailović, Jelena Živković, Goran Poznanović, Melita Vidaković; "Antioxidative effects of phenolic extracts from chestnut leaves, catkins, and spiny burs in streptozotocin-treated rat pancreatic β -cells" Food Chemistry(2010) ISSN: 0308-8146
17. Nevena Grdović, Svetlana Dinić, Jelena Arambašić, Mirjana Mihailović, Aleksandra Uskoković, Jelena Marković, Goran Poznanović, Senka Vidović, Zoran Zeković, **Aida Mujić**, Ibrahim Mujić and Melita Vidaković; "The protective effect of a mix of Lactarius deterrimus and Castanea sativa extracts on streptozotocin-induced oxidative stress and pancreatic β -cell death" British Journal of Nutrition, 2011. DOI: 10.1017/S0007114511006702
18. Živković, J., Mujić, I., Zeković, Z., Nikolić G., Vidović, S., **Mujić, A.** (2008): "Capacity of Extracts of Sweet Chestnut Concerning to Remove Lipid Peroxidation" Journal of Central European Agriculture, 9(3), 353-362. Accession number: 20083327021

19. Živković, J., Zeković, Z., Mujić, I., Vidović, S., **Mujić, A.**, and Jokić, S. (2009): "Radical scavenging, Antimicrobial Activity and Phenolic Content of Castanea sativa Extracts" *Journal of Central European Agriculture*, 10 (2), 175-182. ISSN 1332-9049
20. Živković J., Mujić I., Zeković Z., Nikolić G., Vidović S., **Mujić A.**: "Extraction and Analysis of Condensed Tannins in Castanea sativa Mill." *Journal of Central European Agriculture*, 10 (3), 283-288 (2009)