

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO  
BIOMEDICINOS MOKSLŲ INSTITUTO  
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR  
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

**Aloantikūnų prieš žmogaus leukocitų antigenus (ŽLA) nustatymas  
sensitizuotų inkstų recipientų kraujo serume naudojant mikrosferų srauto  
analizės metodą**

Magistrantė BRIGITA BARTKUTĖ \_\_\_\_\_  
(parašas)

Darbo vadovas  
dr., L. G. Jurgauskienė \_\_\_\_\_  
(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir  
laboratorinės medicinos katedros vedėja  
doc., dr. D. Karčiauskaitė

leidžiama ginti \_\_\_\_\_  
(parašas)

Darbo įteikimo data \_\_\_\_\_

Registracijos Nr. \_\_\_\_\_

2018 m., Vilnius

# Turinys

SUTRUMPINIMAI IR SANTRUMPOS .....	3
ĮVADAS .....	4
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	5
1.1. Inkstų transplantacija .....	5
1.2. Su imunine sistema susijusios suderinamumo problemos bei iššūkiai .....	6
1.2.1. Žmogaus leukocitų antigenai .....	6
1.2.2. Žmogaus leukocitų antigenų atpažinimas .....	8
1.2.3. Transplantato atmetimo reakcijos imunologiniai etapai .....	10
1.2.4. Transplantato atmetimo reakcijos .....	11
1.2.5. Recipientų sensitizacija .....	13
1.2.6. Natūralūs ŽLA ir ne-ŽLA antikūnai .....	14
1.3. Imuninė tolerancija .....	15
1.4. Žmogaus leukocitų antigenų nustatymo metodai .....	17
2. NAUDOTOS MEDŽIAGOS IR METODAI .....	23
2.1. Tiriamoji medžiaga .....	23
2.2. Metodai .....	23
2.2.1. Mikrosferų srauto analizės metodas .....	23
2.2.2. Nuo komplemento priklausomas limfocitotoksinis tyrimas .....	25
2.2.3. Statistinė analizė .....	26
3. REZULTATAI IR JŲ APŽVALGA .....	27
3.1. Antikūnų prieš žmogaus leukocitų antigenus nustatymas .....	27
3.2. Antikūnų prieš žmogaus leukocitų antigenus pasiskirstymas pagal ABO kraujo grupę .....	29
3.3. Sensitizacijos stiprumo pasiskirstymas pagal recipiento lytį .....	31
3.4. Sensitizacijos stiprumo pasiskirstymas pagal žmogaus leukocitų antigenų klases ir rūšį ....	33
IŠVADOS .....	35
REKOMENDACIJA .....	36
SANTRAUKA .....	37
SUMMARY .....	38
LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	39
Priedai .....	44

## SUTRUMPINIMAI IR SANTRUMPOS

Ak – antikūnas.

APL – antigeną pateikianti ląstelė.

CD (angl. cluster of differentiation) – leukocitų diferenciacijos antigenai.

LCT – nuo komplemento priklausomas limfocitotoksinis tyrimas.

DNR – deoksiribonukleorūgštis.

DSA – donorui specifiniai antikūnai.

EGF – epidermio augimo faktorius.

ICAM – tarpląstelinė adhezijos molekulė.

Ig – imunoglobulinas.

IL – interleukinas.

INF- $\gamma$  – interferonas gama.

IP-10 – interferono gama indukuotas baltymas 10.

MCP-1 – monocitų chemotaktinis baltymas 1.

MFI – vidutinis fluorescencinis intensyvumas.

MHC – audinių suderinamumo kompleksas.

MICA – audinių suderinamumo komplekso I klasės A grandinė.

MICB – audinių suderinamumo komplekso I klasės B grandinė.

mTOR – žinduolių rapamicino kinazės taikyns.

NK – natūralios žudikės ląstelės.

PDGF – trombocitų išskiriamas augimo faktorius.

PRA – panelei reaktyvūs antikūnai.

TCR – T ląstelių receptoriai.

TGF- $\beta$  – navikų augimo faktorius beta.

TNF – navikų nekrozės faktorius.

ŽIV – žmogaus imunodeficito virusas.

ŽLA – žmogaus leukocitų antigenai.

$\chi^2$  – Chi kvadratas.

## ĮVADAS

Inkstų transplantacija – tai viena iš dažniausiai atliekamų transplantacijų visame pasaulyje [2]. Tačiau, vis dar kelianti problemų dėl po transplantacijos galinčios įvykti atmetimo reakcijos bei sudėtingo tinkamo recipiento ir donoro suderinamumo. Imunologiniu požiūriu šios problemos yra susiję su žmogaus leukocitų antigenais (ŽLA). Tai baltyminės molekulės, kurias žmogaus imuninė sistema panaudoja kaip įrankį atpažinti, kurios ląstelės yra savos t.y. priklauso organizmui, o kurios yra svetimos ir turi būti sunaikintos [19]. Kuomet organizmas susiduria su svetimais ŽLA antigenais, prasideda antikūnų gamyba prieš juos. Vyksta sensitizacijos procesas ŽLA antigenams. Inkstų recipientai, kurie jau yra sensitizuoti, arba nėra pilnai suderinti su donoru, po transplantacijos turi padidintą riziką įvykti atmetimo reakcijai [7]. Todėl atsiranda poreikis labai tiksliai nustatyti, ar yra susidarę, ir prieš kokius ŽLA antigenus, antikūnai. Šiam tikslui įgyvendinti klinikinės imunologijos laboratorijoje yra naudojami tiek auksiniu standartu laikomo nuo komplemento priklausomo limfocitotoksinio tyrimo, tiek labai dideliu jautrumu ir specifiškumu pasižyminčio mikrosferų srauto analizės metodai.

Šiame analizinio pobūdžio darbe buvo panaudoti mikrosferų srauto analizės metodu Vilniaus universiteto, Santaros klinikų, Klinikinės imunologijos ir kraujo perpylimo laboratorijoje nustatytų antikūnų prieš ŽLA antigenus duomenys. Įvertinant jų dažnumą pagal sensitizuoto inkstų recipiento ABO sistemos kraujo grupę, lytį ir sensitizacijos stiprumą, siekta išvelgti tendencijas, kuriomis remiantis galima būtų toliau tęsti didesnės apimties tyrimus, padėsiančius geriau prognozuoti transplantato atmetimo reakcijas.

**Darbo tikslas:** Nustatyti ir įvertinti antikūnus prieš žmogaus leukocitų antigenus sensitizuotų inkstų recipientų kraujo serume.

### **Darbo uždaviniai:**

1. Nustatyti ir įvertinti antikūnų prieš ŽLA sistemos antigenus dažnį pagal jų rūšį.
2. Nustatyti ir įvertinti antikūnų prieš ŽLA dažnį sensitizuotų inkstų recipientų ABO sistemos kraujo grupėse atsižvelgiant į ŽLA sistemos klasę ir rūšį.
3. Nustatyti ir įvertinti sensitizacijos ŽLA antigenams stiprumo pasiskirstymą pagal sensitizuotų inkstų recipientų lytį.
4. Nustatyti ir įvertinti sensitizacijos ŽLA antigenams stiprumo pasiskirstymą pagal ŽLA sistemos antigenų klasę ir rūšį.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Inkstų transplantacija

Tiek Lietuvoje, tiek visame pasaulyje nacionalinio transplantacijos biuro duomenimis šimtai žmonių, tarp jų ir maži vaikai, laukia tol, kol jų gyvenimas palengvės ir jiems bus persodintas tinkamai funkcionuojantis inkstas [45]. Inkstų transplantacija – tai inksto pakaitinė terapija pacientams, kuriems įprasti gydymo būdai kaip vaistai ar dializė jau nėra veiksmingi [26]. Dažniausiai transplantacija atliekama, kuomet pacientui nustatytas galutinės stadijos inkstų nepakankamumas, kurį sukelia susirgimai kaip diabetas, hipertenzija ar glomerulonefritas [48]. Taip pat transplantacija atliekama, kai yra prarandami abu inkstai dėl įgimtų ar įgytų aplinkybių arba išsivysto inkstų navikas [48]. Po sėkmingos inkstų persodinimo operacijos, paciento gyvenimo kokybė pagerėja, nebereikalinga dializė, tačiau tam, kad būtų, kuo ilgesnį laiką išvengta inksto atmetimo reakcijos, reikalinga kiekvieną dieną vartoti medikamentus, kurie, deja, negarantuoja, kad vėliau neįvyks taip nepageidaujama reakcija [38].

**Imunosupresantai.** Imuninė sistema visuomet stengiasi atpažinti tai, kas yra svetimam organizmui ir tą svetimkūnį sunaikinti. Ne išimtis ir transplantacijos metu persodintas donoro organas, todėl recipientai vartoja medikamentus – imunosupresantus, kurie slopina imuninę sistemą ir taip yra stabdoma transplantuoto organo atmetimo reakcija [51]. Imunosupresantai skirstomi į keturias pagrindines klases: kalcineurino slopikliai, antiproliferaciniai agentai, mTOR slopikliai bei steroidai [17]. Plačiausiai vartojami po inkstų transplantacijos yra kalcineurino slopiklių bei antiproliferacinių agentų klasėms priklausantys imunosupresantai [17]. Kalcineurino slopikliams priklausančių ciklosporino ir takrolino taikinyse yra nuo kalcio priklausančios fosfatazės. Šie metabolitai blokuoja fosfatazės susijungimą su kalmodulinu ir neleidžia aktyvinti transkripcijos faktoriaus, kuris atsakingas už IL-2, IL-4, TNF ir INF- $\gamma$  genų transkripciją [68]. Taip yra užkertamas kelias T efektorinių limfocitų susidarymui ir slopinama transplantato atmetimo reakcija. Tačiau šie imunosupresantai gali sukelti šalutinį poveikį kaip kepenų bei inkstų funkcijos sutrikimai ar naviko išsivystymas [67,17]. Antimetabolitas azatioprinas yra išimtinai naudojamas tik po inkstų bei kepenų transplantacijų. Šis preparatas įsijungia į DNR molekulę ir stabdo T limfocitų aktyvinimui reikalingų genų transkripciją [17]. Taip yra slopinamas T limfocitų atsakas. Šis metabolitas pasižymi toksiniu poveikiu kaulų čiulpams, slopindamas jų funkciją, todėl labai padidėja rizika išsivystyti leukopenijai ir trombocitopenijai, o tuo pačiu ir limfomai [17].

**Desensitizacija.** Šiuo metu inkstų transplantacijos laukiantiems recipientams, kurie turi susiformavusių antikūnų prieš daugelį žmogaus leukocitų antigenų (ŽLA), ir kuriems bus persodintas gyvo donoro organas, yra atliekama desensitizacija [51]. Tai naujai taikomas metodas, kuriuo siekiama išvengti nepageidaujamos transplantuojamo organo atmetimo reakcijos [42]. Desensitizacijos metu, remiantis šiam metodui pritaikytais protokolais, yra pašalinami antikūnai prieš ŽLA, kurie cirkuliuoja recipiento kraujyje. Šis procesas trunka apie dvi savaites, todėl negyvo donoro organas šiuo atveju nėra tinkamas [25]. Tačiau ne visada šis metodas padeda recipientams ir, deja, tenka toliau vartoti imunosupresantus tam, kad būtų išvengta atmetimo reakcijos. Taip pat dar nėra iki galo ištirta, ar taikant šį metodą nėra paveikiami ir kitų, organizme cirkuliuojančių ir jam svarbių antikūnų, titrai [42]. Todėl mokslininkai rekomenduoja desensitizaciją atlikti tik pacientams, kuriems ypač sunku greitai metu surasti tinkamą donorą [60].

## **1.2. Su imunine sistema susijusios suderinamumo problemos bei iššūkiai**

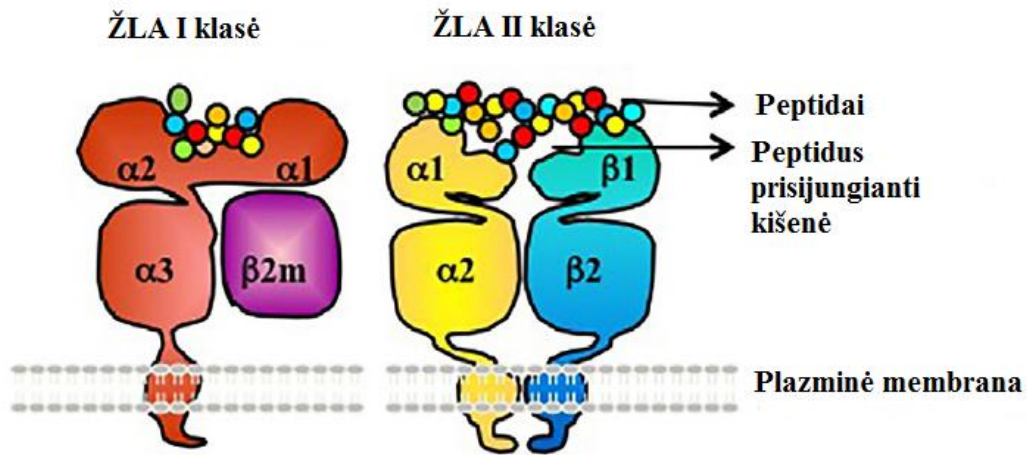
Transplantologijoje problemų kelia ne tik atmetimo reakcijos, bet ir recipiento su donoru suderinamumas. Tiek tinkamo donoro parinkimas, tiek atmetimo reakcijos yra glaudžiai susiję. Kuo imunologiniu požiūriu donoras panašesnis į recipientą, tuo mažesnė tikimybė, kad įvyks atmetimo reakcija [7]. Tačiau atrasti tinkamą donorą ypač sunku. Problemų kelia tiek žmogaus leukocitų antigenai, tiek prieš juos susidarę antikūnai, kurie sukelia padidėjusį sensitizacijos lygį recipiento organizme [29]. Šiuo metu nustatomi ir natūraliai susidarę ŽLA bei ne-ŽLA antikūnai, kurie taip pat kelia nemažus iššūkius imunologams.

### **1.2.1. Žmogaus leukocitų antigenai**

1958 metais tiriant skirtingų individų baltuosius kraujo kūnelius pirmą kartą Žanas Dosė aprašė šių ląstelių paviršiuje išsidėsčiusias baltymines molekules – žmogaus leukocitų antigenus (ŽLA) [9]. Tai kituose organizmuose randamo audinių suderinamumo komplekso (MHC) analogai žmogaus organizme. Žmogaus leukocitų antigenus organizmo imuninė sistema panaudoja kaip įrankį atpažinti, kurios ląstelės yra savos t.y. priklauso organizmui, o kurios yra svetimos ir turi būti sunaikintos, bei kaip įrankį pateikti imuninės sistemos ląstelėms svetimas organizmui daleles [19]. Kiekvienas žmogus pusę visų ŽLA antigenų paveldi iš motinos, o kitą pusę iš tėvo. Pagal antigenų dažnumą organizmuose šios molekulės

išskiriamos į penkias pagrindines grupes bei dvi klases: ŽLA–A, –B, –C grupės (I klasė) ir –DR, –DQ grupė (II klasė) [19]. ŽLA I klasės antigenai yra ekspresuojami ant visų branduolį turinčių ląstelių paviršiaus, o ŽLA II klasės – ant dendritinių ląstelių, makrofagų ir B limfocitų paviršiaus [33]. ŽLA I klasės molekulės pateikia antigenus citotoksiškiems CD8<sup>+</sup> T limfocitams ir yra ligandai NK ląstelių receptoriams, o ŽLA II klasės molekulės svetimus antigenus pateikia pagalbiniais CD4<sup>+</sup> T limfocitams [19]. Kai kurie žmogaus leukocitų antigenai yra susiję su tam tikromis autoimuninėmis ligomis. Esant ŽLA–DR4 antigenui organizmo ląstelių paviršiuje, žmogus turi padidintą riziką susirgti reumatoidiniu artritu [12]. O kuomet ląstelių paviršiuje randami ŽLA–DR3 bei –DR4 antigenai, padidėja rizika susirgti I tipo cukriniu diabetu [46].

**ŽLA genai ir baltymų struktūra.** ŽLA kompleksą koduojantys genai yra išsidėstę 6 žmogaus chromosomoje, trumpojo peties 21.3 padėtyje [21] ir koduoja ŽLA I klasės genus (ŽLA–A, –B ir –C), ŽLA II klasės genus (ŽLA–DR, –DQ ir –DP), neklasikinius I klasės genus (ŽLA–E, –F ir –G) ir panašius į I klasę genus (MICA ir MICB) [21]. ŽLA molekulės yra glikoproteino heterodimerai, kurie pateikia svetimus peptidinius antigenus imuninės sistemos ląstelėms [19]. Pagal 1 paveikslėlyje pateiktas ŽLA klasių struktūras matyti, kad I klasės molekulę sudaro viena glikoproteino sunkioji β grandinė, kuri nekovalentiniais ryšiais ląstelės paviršiuje yra susijungusi su konservatyvaus baltymo β<sub>2</sub>–mikroglobulino (β<sub>2m</sub>) lengvąja grandine. ŽLA II klasės molekulė yra sudaryta iš dviejų transmembraninių glikoproteino grandinių – α ir β [19]. Visose II klasės molekulėse esanti α grandinė yra gana konservatyvi ir, manoma, nedalyvauja imuniniame atsake esant svetimais ŽLA. ŽLA I ir II klasės molekulių globuliniai domenai suformuoja kišenę, kurioje atpažįstami ir prisijungiami peptidiniai antigenai, kurie vėliau yra pateikiami T ląstelių receptoriams [19]. Žymus I ir II klasės ŽLA molekulių polimorfizmas bei kodominantinė ŽLA genų produktų raiška leidžia pateikti T limfocitams gana platų spektrą antigenų. ŽLA molekulės yra apibrėžiamos kaip antigenai atsižvelgiant į aukštos arba į žemos raiškos nomenklatūrą. Aukšta rezoliucija aprašo ŽLA antigenus iki alelių lygio, o žema rezoliucija – baltymų lygyje. Baltymų lygyje išskiriama apie 20 ŽLA–A, 50 ŽLA–B, 18 ŽLA–DR ir 7 ŽLA–DQ grupių antigenų. Aleliniame lygyje šie skaičiai žymiai išauga, skaičiuojama tūkstančiais kiekvienos ŽLA klasės antigenų [19].



**1 pav.** Žmogaus leukocitų antigenų I ir II klasės baltyminė struktūra kartu su prisijungusiais svetimais peptidais [19].

### 1.2.2. Žmogaus leukocitų antigenų atpažinimas

Organizme, kuomet į jį patenka svetimkūnis, vyksta to antigeno atpažinimas, kurį vykdo imuninės sistemos ląstelės. Transplantato atveju yra atpažįstami donoro ŽLA, esantys transplantuoto organo paviršiuje [24]. Šiuo metu mokslininkai išskiria tris galimus ŽLA aloatpažinimo mechanizmus vykstančius žmogaus organizme.

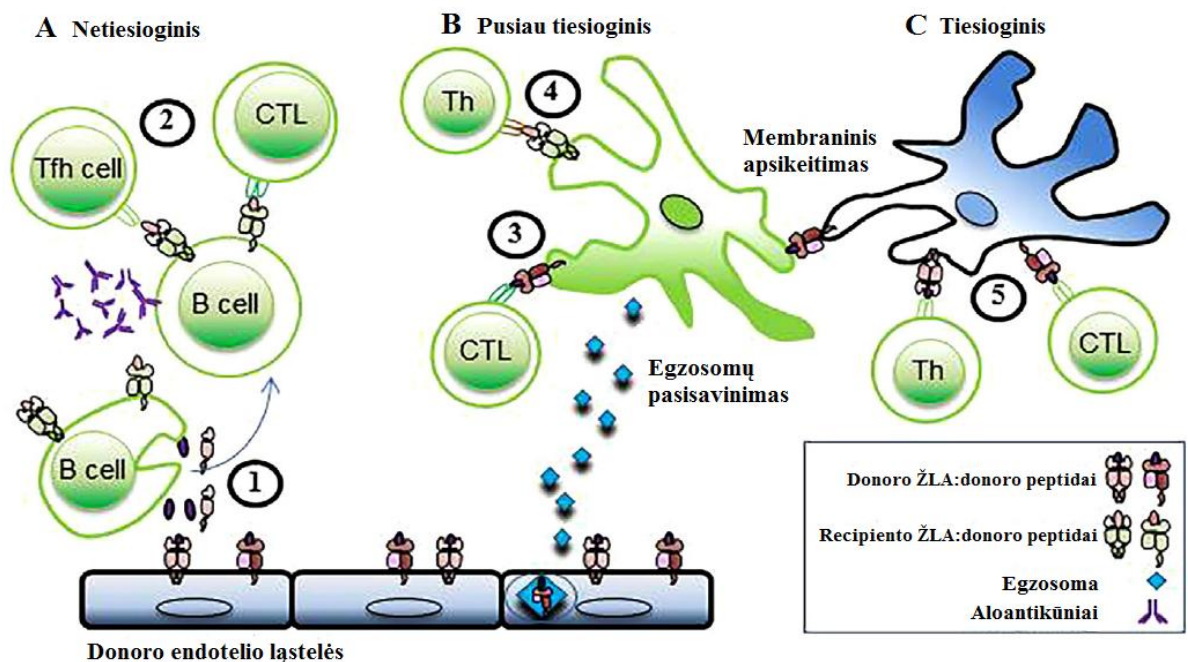
**Netiesioginis aloatpažinimas.** Šis atpažinimas vyksta kaip įprasta imuninė reakcija prieš svetimkūnį. 2 paveikslėlyje pateiktos schemas antru numeriu pažymėto proceso metu yra aktyvinamos recipiento  $CD4^+$  T ląstelės, kurioms B ląstelės pateikia donoro ŽLA antigenus [19]. Atpažinimo metu yra aktyvinamos ne tik  $CD4^+$  T ląstelės, bet ir citotoksinės  $CD8^+$  T ląstelės bei antikūnus gaminančios plazminės ląstelės, kurios visos kartu vykdo imuninį atsaką prieš svetimkūnį [19]. Šiuo netiesioginiu svetimkūnių aloatpažinimu yra paremta lėtinė transplantato atmetimo reakcija [22].

**Tiesioginis aloatpažinimas.** Šio atpažinimo metu, kuris iliustruotas 2 paveikslėlio C dalyje, dalyvauja kartu su transplantatu patekusios donoro dendritinės ląstelės, kurios pateikia donoro ŽLA antigenus recipiento  $CD4^+$  T limfocitams ir juos aktyvina [22]. Dėl uždegiminių procesų, kurie prasideda, kuomet yra transplantuojamas organas, donoro dendritinės ląstelės keliauja į antrinius limfinius mazgus, kur aktyvina recipiento  $CD4^+$  T limfocitus bei citotoksinės  $CD8^+$  T ląsteles [24]. Imuninio atsako stiprumas tiesiogiai koreliuoja su aktyvintų T limfocitų skaičiumi. Tiesioginio aloatpažinimo metu yra sukeliama ūmi atmetimo reakcija.



Šiame procese nedalyvauja B ląstelės, todėl antikūnai, nukreipti prieš donoro dendritinių ląstelių ŽLA, nėra sintetinami [24].

**Pusiau tiesioginis aloatpažinimas.** Šis atpažinimo modelis, kuris pavaizduotas 2 paveikslėlyje B dalyje, buvo sukurtas norint paaiškinti vykstančius procesus, kurie apima tiek netiesioginį, tiek tiesioginį aloatpažinimą. Pusiau tiesioginio atpažinimo metu dalyvauja daugiau imuninės sistemos ląstelių, nei prieš tai aptartuose atpažinimo keliuose [19]. Netiesioginio aloatpažinimo metu B ląstelių aktyvinti pagalbiniai  $CD4^+$  T limfocitai kartu su recipiento II klasės ŽLA paskatina recipiento dendritines ląsteles pateikti donoro antigenus ir aktyvinti citotoksines  $CD8^+$  T ląsteles [24]. Manoma, kad po transplantacijos recipiento dendritinės ląstelės įgyja donoro I klasės ŽLA antigenus iš donoro dendritinių ląstelių kontaktuojant ląstelei-ląstelei arba vykstant membraninių baltymų apsikeitimui [19]. Taip pat manoma, kad donoro I klasės ŽLA įgyjamos ir recipiento dendritinėms ląstelėms pasisavinant egzosomas su antigenais, kurios atsiskiria nuo transplantuoto organo audinio [19]. Todėl recipiento dendritinės ląstelės, turinčios donoro ŽLA I klasės antigenus ir recipiento ŽLA II klasės antigenus, gali aktyvinti tiek  $CD4^+$ , tiek  $CD8^+$  T limfocitus [19].



**2 pav.** ŽLA antigenų aloatpažinimo mechanizmai žmogaus organizme po transplantacijos. **A** – netiesioginis aloatpažinimas, 1 – B ląstelių vykdomas donoro ŽLA atpažinimas, 2 – atpažintų ŽLA molekulių pateikimas B limfocitams ir antikūnų sintezė. **B** – pusiau tiesioginis atpažinimas, 3 – recipiento dendritinės ląstelės pateikia donoro ŽLA citotoksiniams ląstelėms po membraninio apsikeitimo, 4 – recipiento dendritinės ląstelės pateikia recipiento ŽLA T ląstelėms pagalbininkėms. **C** – tiesioginis atpažinimas, 5 – donoro dendritinės ląstelės pateikia donoro ŽLA recipiento T limfocitams [19].

### 1.2.3. Transplantato atmetimo reakcijos imunologiniai etapai

Labai dažnai po transplantacijų įvykstančios atmetimo reakcijos molekulinio ir imunologinio požiūriu yra labai sudėtingas procesas, kuris apima daug įvairiausių sintetinamų molekulių, imuninės sistemos ląstelių bei ląstelinių procesų [38]. Šiuo metu galima išskirti tris pagrindinius molekulinis–imunologinius etapus, kurie vyksta organizme po atliktos organo transplantacijos.

**Sensitizacijos etapas.** Persodinto organo paviršiuje esančias ŽLA molekules atpažįsta  $CD4^+$  ir  $CD8^+$  T limfocitai per T ląstelių receptorius [38]. Atpažinimui reikalingi du signalai: 1) T ląstelių receptoriaus susijungimo su ŽLA ir 2) T limfocito kostimuliacinio receptoriaus CD28 susijungimas su antigeną pateikiančios ląstelės (APL) kostimuliaciniais baltymais CD80 ar CD86 [38]. Po T limfocitų aktyvinimo prasideda įvairių citokininų sintezė ir tolimesnis ŽLA pateikimas B limfocitams.

**Efektorinis etapas.** Transplantacijos metu įvykęs kraujagyslės pažeidimas sukelia nespecifinę uždegimo reakciją, kurios metu padažnėja antigeno pateikimas T limfocitams. Kartu padidėja įvairių citokininų, chemokininų, adhezijos molekulių sintezė [69].  $CD4^+$  T ląstelių aktyvinimas pateikiant antigeną, paskatina B limfocitų diferenciaciją į plazmines ląsteles, kurios pradeda gaminti antikūnus. Chemokininų kaip IP-10 ir MCP-1 sintezė paskatina intensyvesnę makrofagų infiltraciją į transplantatą [38]. Įvairių augimo faktorių sintezė sukelia kraujagyslės lygiųjų raumenų intensyvesnį dalinimąsi, intimos plonėjimą bei fibrozę. Citotoksinų  $CD8^+$  T ląstelių reguliuojamos citotoksiškumo reakcijos paskatina ląstelių apoptozę [69]. Su šiuo etapu prasideda transplantato atmetimo reakcija.

**Apoptozės indukavimo etapas.** Tai paskutinis procesas, kuris vyksta esant citotoksiniam atsakui į svetimkūnį. Kuomet yra aktyvinamos citotoksinės  $CD8^+$  T ląstelės, jos savo viduje suformuoja granules, turinčias fermentų perforino ir granzimo [38]. Kai šios efektorinės ląstelės atpažįsta taikinį, susiformavusios granulės susilieja su taikinio citoplazmine membrana ir jų turinys pasklinda į imunologinę sinapsę [38]. Pro šią sinapsę fermentai granzimas ir perforinas patenka į taikinio ląstelės citoplazmą ir ten aktyvina ląstelių apoptozėje dalyvaujančius baltymus prokaspazę 3 arba prokaspazę 9. Sukeliama apoptozė, o tuo pačiu ir transplantato atmetimo reakcijos tolimesnis progresavimas [69].

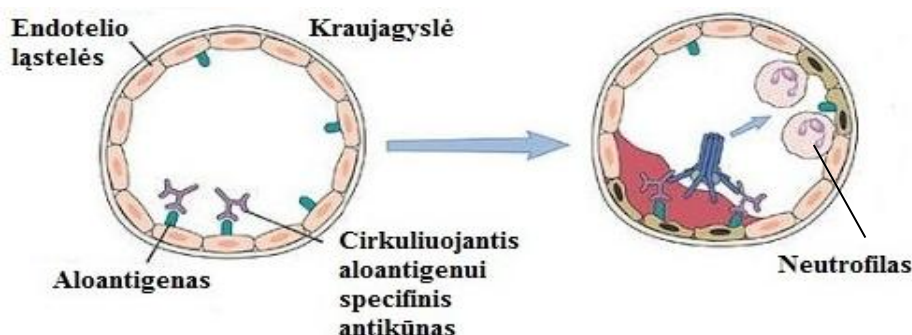
**NK ląstelių poveikio etapas.** Transplantacijoje šios ląstelės taip pat yra labai svarbios dėl savo gebėjimo atskirti svetimas ląsteles, indukuoti citotoksinį atsaką bei veikti nepriklausomai nuo T limfocitų [38]. Pagrindinis kelias, kuris aktyvina NK ląsteles, prasideda kaip atsakas į ŽLA I klasės molekulių nebuvimą ląstelių paviršiuje. Toks aktyvinimas prasideda, kai NK ląstelių slopinimo receptoriai jungiasi su specifinėmis ŽLA I klasės

antigenų dalimis. Jeigu, toks susijungimas negalimas, NK ląstelės toliau nebe slopinamos ir vyksta jų aktyvinimas [6]. Taip pat NK ląstelės aktyvinamos, kuomet jų stimuliaciniai receptoriai aptinka svetimus antigenus. Šis mechanizmas panašus į T limfocitų atsaką. NK ląstelės po aktyvinimo į aplinką paskleidžia citokinus ir paskatina citotoksinį procesą, o kartu su juo ir ląstelių apoptozę [38]. Šiuo metu NK ląstelės, kaip manoma, aktyviai dalyvauja tiek ūmioje, tiek lėtinėje atmetimo reakcijose. Nors ir daugelio organų transplantacijų atveju imunosupresantais įmanoma slopinti šias ląsteles, tačiau inkstų transplantacijos atveju, deja, imunosupresantai nevisada padeda išvengti NK ląstelių atsako į svetimkūnį [69].

#### 1.2.4. Transplantato atmetimo reakcijos

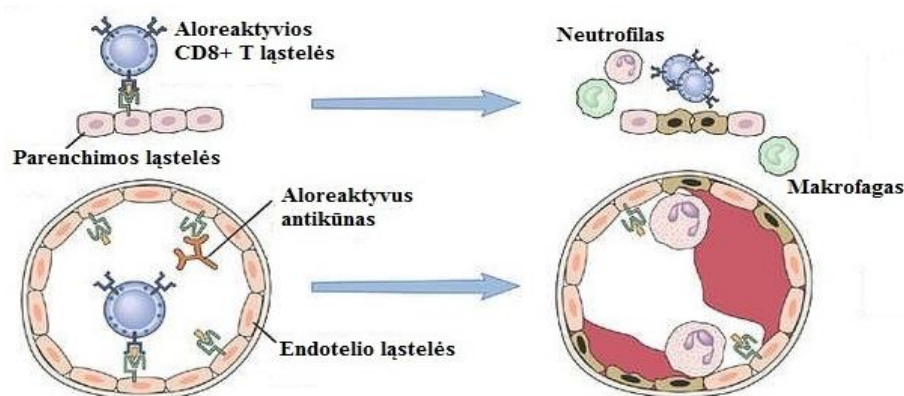
Po transplantacijos galinčios įvykti atmetimo reakcijos atsižvelgiant į tai, kaip greitai jos įvyksta ir kokie požymiai pasireiškia organizme, išskiriamos į tris pagrindines reakcijas: hiperūmi, ūmi bei lėtinė [2].

**Hiperūmi atmetimo reakcija.** Šią atmetimo reakciją gali sukelti IgM klasės antikūnai nukreipti prieš ABO sistemos kraujo antigenus, kuomet yra šios sistemos kraujo grupių konfliktas tarp recipiento ir donoro. Tačiau šiuo metu tokių atvejų pasitaiko ypatingai retai, nes donoras yra parenkamas tos pačios ABO sistemos kraujo grupės kaip ir recipientas [2]. Pagal 3 paveikslėlyje pateiktą mechanizmą matyti, kad hiperūmi atmetimo reakcija pasireiškia transplantato kraujagyslių tromboze, kuri įvyksta tuomet, kai yra sujungiamos recipiento ir transplantuojamo organo kraujagyslės. Šių trombų susidarymo priežastis gali būti ne tik prieš tai aptarti IgM klasės antikūnai, bet ir recipiento kraujyje cirkuliuojantys sensitizacijos metu susidarę IgG klasės antikūnai prieš ŽLA [2]. Visi šie antikūnai reaguoja su transplantato kraujagyslių endoteliumu ir aktyvina komplemento sistemą. Aktyvintas komplementas pažeidžia endotelio ląsteles. Kaip atsaką į pažeidimą, kraujagyslių endotelis pradeda sekretuoti Vilebrando faktorių, kuris paskatina trombocitų adheziją ir agregaciją, tuo pačiu aktyvinamas krešėjimas, susidaro trombas [2].



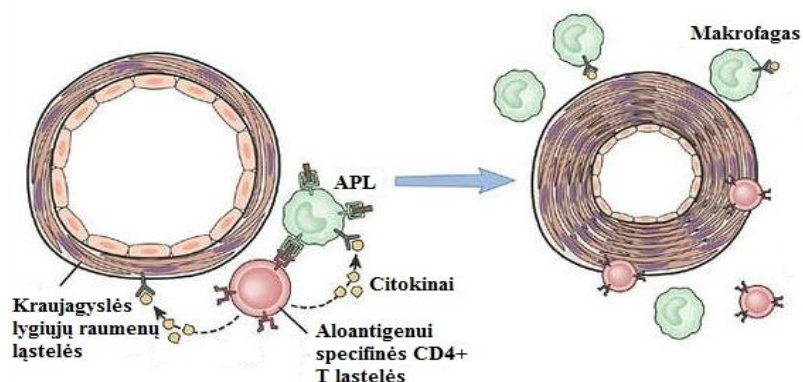
3 pav. Hiperūmios atmetimo reakcijos metu vykstantys procesai kraujagyslėje [1].

**Ūmi atmetimo reakcija.** Ši atmetimo reakcija prasideda praėjus maždaug savaitei, kartais mėnesiui po transplantacijos ir tai yra pirminis specifiškas imuninis atsakas į transplantatą. Pagal 4 paveikslėlyje pateiktą mechanizmą matyti, kad ūmios atmetimo reakcijos metu yra pažeidžiamas kraujagyslių endotelis bei parenchimos ląstelės [2]. Pažeidimas įvyksta dėl komplekto, kurį aktyvina plazminių ląstelių sintetinamų IgG klasės antikūnų sąveika su ŽLA molekulėmis, esančiomis transplantuoto organo endotelio paviršiuje. Taip pat endotelį gali pažeisti ir T limfocitai, kurie reaguodami su ŽLA antigenais, sukelia endotelio lizę ir išskiria citokinus, kurie pritraukia uždegimą skatinančias ląsteles kaip neutrofilus ir makrofagus, vystosi nekrozė [2].



4 pav. Ūmios atmetimo reakcijos metu vykstantys procesai kraujagyslėje [1].

**Lėtinė atmetimo reakcija.** Ši reakcija prasideda po pusės ar net kelių metų po transplantacijos. Išvengti lėtinės atmetimo reakcijos yra gana sunku. Įvairūs veiksniai kaip diabetas, hipertenzija, netinkamas imunosupresantų vartojimas, potransplantacinės infekcijos padidina riziką pasireikšti lėtinei atmetimo reakcijai [2]. Šios atmetimo reakcijos metu vyksta kraujagyslių fibrozė, vystosi išemija bei normalios persodinto organo struktūros praradimas. Pagal 5 paveikslėlyje pateiktą mechanizmą matyti, kad fibrozė gali išsivystyti dėl T limfocitų aktyvintų makrofagų, kurie kaip ir trombocitai išskiria augimo faktorių PDGF, kuris atsakingas už kraujagyslių formavimąsi ir proliferaciją [2].



5 pav. Lėtinės atmetimo reakcijos metu vykstantys procesai kraujagyslėje [1].

### 1.2.5. Recipientų sensitizacija

Prieš atliekant transplantaciją pirmiausiai yra įvertinamas recipiento ir donoro suderinamumas. Atsižvelgiama į tokias indikacijas kaip kūno sudėjimas (svoris, ūgis ir kt.), ABO sistemos kraujo grupė bei žmogaus leukocitų antigenai. Didžiausią iššūkį kelia ŽLA suderinamumas. Kiekvienas žmogus turi tik jam būdingus leukocitų antigenus ir kai tik organizmas susiduria su svetimais ŽLA, pradeda gamintis specifiniai prieš ŽLA antikūnai, vyksta sensitizacijos procesas [19]. Šis reiškinys ypač nepageidaujamas ir labai apsunkina tinkamo donoro parinkimą transplantacijai, bei sukelia transplantato atmetimo reakciją [23]. Mokslininkai ištyrė, kad sensitizaciją ŽLA molekulėms sukelia labai įvairūs veiksniai.

**Transfuzija.** Pacientams sergantiems lėtinėmis inkstų ligomis labai dažnai išsivysto anemija [23], todėl jiems atliekamos kraujo transfuzijos [54]. Atlikti tyrimai parodė, kad tokie asmenys, kuriems prieš transplantaciją buvo atlikta transfuzija, turi didesnę sensitizaciją ŽLA antigenams nei asmenys, kuriems nebuvo atlikta transfuzija [19]. Tai kelia daug nepatogumų atliekant inkstų transplantacijos suderinamumo tyrimus, o ir sensitizuotų asmenų išgyvenamumas po transplantacijos labai sumažėja [47]. Tam, kad įvyktų sensitizacija ŽLA antigenams, transfuzijas reikia atlikti arba keletą kartų, arba perpilti didelius kraujo kiekius, nes transfuzija pati savaime yra laikoma kaip mažai imunogeniška procedūra [54]. Tačiau, jei suderinus recipientą su donoru, vėl recipientui yra atliekama transfuzija bent vieną kartą, šio faktoriaus negalima atmesti ir reikėtų dar kartą atlikti suderinamumo tyrimus [19].

**Nėštumas.** Moterys recipientės, kurios prieš transplantaciją buvo nėščios arba kurioms įvyko persileidimas, yra neišvengiamai sensitizuotos prieš ŽLA antigenus [4]. Vaisiaus ląstelių paviršiuje esantiems iš tėvo paveldėtiems antigenams specifiniai antikūnai moters organizme pradeda gamintis apie 28 nėštumo savaitę. Antikūnai yra gaminami tiek prieš I klasės, tiek prieš II klasės ŽLA molekules. Taip pat yra duomenų, kad moterys, kurios po organo transplantacijos nori susilaukti vaiko, turi didesnę tikimybę, kad joms įvyks transplantato atmetimo reakcija [20]. Atlikti tyrimai rodo, kad nėštumo metu prieš vaisių pasigaminę ŽLA antikūnai gali reaguoti su transplantatu ir iššaukti atmetimo reakciją t.y. įvyksta potransplantacinė sensitizacija [37].

**Transplantacija.** Transplantacija pati savaime yra laikoma imunogenišku procesu. Pacientai, kuriems atlikta transplantacija, *de novo* gamina donorui specifinius antikūnus (DSA) prieš ŽLA [54]. Po atliktos transplantektomikos, dėl atmesto inksto transplantato, padidėja cirkuliuojančių DSA koncentracija kraujyje [19]. Pakartotinai atliekant transplantaciją yra svarbu atsižvelgti į sensitizacijos metu atsiradusių donorui specifinių antikūnų ryšį su potencialaus donoro antigenais, norint išvengti pasikartojančių nesutapimų

(angl. „repeat mismatches“) [54]. Donorui specifiniai antikūnai, cirkuliuojantys recipiento kraujyje neigiamai veikia transplantuoto inksto gyvybingumą, atsiranda didelė rizika įvykti atmetimo reakcijai [19].

#### 1.2.6. Natūralūs ŽLA ir ne-ŽLA antikūnai

Įprasta manyti, kad pagrindiniai veiksniai, kurie paskatina gamintis antikūnus prieš ŽLA yra prieš tai aprašytos transfuzijos, nėštumas ar transplantacija. Tačiau atliekami ŽLA antikūnų tyrimai jautriais metodais leido aptikti ir natūraliai prieš ŽLA bei prieš ne-ŽLA susiformavusius antikūnus, kurie taip pat sukelia transplantato atmetimo reakcijas inkstų recipientams.

**Natūralūs antikūnai.** Jau 1985 metais buvo pastebėtas natūraliai prieš ŽLA pasigaminusių antikūnų fenomenas [65], tačiau tik neseniai atsiradę jautresni metodai paskatino mokslininkus daugiau tyrinėti natūraliai atsirandančius antikūnus. Tiriant sveikus vyrus, kuriems nebuvo atlikta nei transplantacija, nei transfuzija, pastebėta, kad jų kraujo serumuose aptinkami antikūnai susidarę prieš ŽLA [43]. Šiuo metu yra iškelta hipotezė, kad galbūt sensitizaciją ŽLA antigenams sukelia reakcijos su įvairiais patogenais, ypač virusais, su kuriais kovoja T limfocitai [8]. Kadangi T limfocitai yra virusams specifinės atminties ląstelės, manoma, jos ir paskatina antikūnų prieš ŽLA gamybą. Pastebėta, kad antikūnai, kurie yra nukreipti prieš ŽIV-1 virusą, taip pat gali atpažinti ir ŽLA. Atlikti kiti tyrimai rodo, kad po imunizacijos hepatito B viruso vakcina taip pat yra stebimos susidariusių antikūnų teigiamos reakcijos su ŽLA [8]. Yra atlikta tyrimų, kurie atskleidė, kad antikūnai prieš ne klasikinius ŽLA-E antigenus, taip pat kryžmiškai reaguoja su ŽLA I klasės antigenais [53]. Pastebėta ir įvairių mikroorganizmų sąveika su ŽLA I ir II klasės antigenais, kuri aktyvina T limfocitus, o tuo pačiu ir antikūnų gamybą. ŽLA-B27 antigenas reaguoja su *Klebsiella pneumoniae*, ŽLA-DR8 antigenas kryžmiškai reaguoja su *Streptococcus mutants*, o *Escherichia coli* lipopolisacharidai reaguoja net su 17 ŽLA antigenų [43].

Šiuo metu yra žinoma, kad neimunizuotų asmenų kraujo serume dažniausiai galime rasti antikūnų prieš ŽLA-DR4, ŽLA-A30 ir 31, ŽLA-B76 ir B\*82:01 antigenus [18]. Vykdomi ir tolimesni tyrimai, nustatant galimą homologiją tarp mikroorganizmų polipeptidų ir ŽLA antigenų epitopų, kuri galimai galėtų sukelti antikūnų gamybą [43].

**Ne-ŽLA antikūnai.** Ilgą laiką ne prieš ŽLA susidarantys antikūnai neturėjo ypatingos reikšmės transplantato atmetimo reakcijose. Tačiau šiuo metu vis dažniau jiems suteikiama didesnė reikšmė ir jie netgi laikomi tokio pačio svarbumo kaip ir antikūnai prieš ŽLA [70]. Ne-ŽLA antikūnai – tai žmogaus organizme susiformavę antikūnai prieš audiniui specifinius

antigenus: vimentiną, kardiomioziną, kolageną V, angiotenzino II receptorių, ICAM-4, EGF pasikartojimus [10]. Visi šie antigenai yra sintetinami transplantuojamo organo endotelio ir epitelio ląstelių paviršiuje [39]. Šiems antigenams yra sintetinami specifiniai ŽLA MICA ir MICB antikūnai, kurie sukelia tokį patį citotoksinį poveikį kaip ir atpažįstant ŽLA antigenus. Dėl šios priežasties gali būti sukeltos tiek ūmi, tiek lėtinė atmetimo reakcijos [11]. Šiuo metu yra žinoma, kad šių autoantikūnų susidarymas apima keletą mechanizmų. Mokslininkų teigimų vienas iš galimų mechanizmų yra donorui specifinių ekstraląstelinųjų pūslelių ir po apoptozės likusių ląstelės komponentų pateikimas recipiento imuninės sistemos ląstelėms [70].

### 1.3. Imuninė tolerancija

Organizmo imuninė sistema, kuomet susiduria su svetimkūniu, o T bei B limfocitai atpažįsta jį, toliau vykdo du galimus atsako kelius: arba aktyvinami limfocitai, arba įgyjama imuninė tolerancija t.y. limfocitų neaktyvumas arba žūtis dėl pateikto antigeno. Šis procesas yra labai svarbus, kuomet vyksta savų antigenų atpažinimas. Jei tolerancija nėra pakankama, išsivysto įvairios autoimuninės ligos. Todėl šiuo metu mokslininkai intensyviai tyrinėja įvairius tolerancijos sukėlimo būdus žmogaus organizme ne tik autoimuninių ligų gydymui, bet ir siekiant sumažinti transplantuoto organo atmetimo reakciją, taip sumažinat imunosupresantų vartojimą [2]. Nors vis dar imuninės tolerancijos procesas yra iššūkis mokslininkams, tačiau jau dabar yra žinomi keli tolerancijos sukėlimo mechanizmai bei galimos strategijos pacientų gydymui po transplantacijos.

**Centrinės tolerancijos mechanizmas.** Vaikų kaulų čiulpuose pagaminti ir nesubrendę T limfocitai keliauja į užkrūčio liauką, kur vyksta centrinė tolerancija – autoreaktyvių T limfocitų naikinimas [2]. Nesubrendusiems T limfocitams yra pateikiamas nuosavas peptidų ir ŽLA kompleksas, esantis užkrūčio liaukos epitelinių ląstelių paviršiuje. Prieš pateikiant peptido ir ŽLA kompleksą tiek  $CD4^+$ , tiek  $CD8^+$  T limfocitai savo paviršiuje būna sutelkę skirtingus T ląstelių receptorius (TCR), kurie yra atsakingi už pateikto komplekso atpažinimą [2]. Toliau galima teigiama ir neigiama atranka. Teigiamos atrankos metu yra užtikrinama, kad tik T limfocitų klonai, turintys TCR ir vidutinį giminingumą savoms ŽLA molekulėms, išliktų [41]. Neigiamos atrankos metu vykdoma apoptozė netinkamų T limfocitų, kurie neturi funkcionalių TCR ar turi per žemą arba per aukštą giminingumą peptido ir ŽLA kompleksui. Po atrankos tinkamai subrendę T limfocitai palieka užkrūčio liauką ir toliau cirkuliuoja kraujotakoje [41]. Šiuo metu nėra iki galo išaiškinta kaip suaugusio žmogaus organizme yra



vykdoma T limfocitų klonų atranka, tačiau manoma, kad tolerancijos procesui užtikrinti pakanka likusios užkrūčio liaukos dalies [2].

**Periferinės tolerancijos mechanizmas.** Dalis nesubrendusių T limfocitų išvengia užkrūčio liaukoje vykstančios klonų atrankos dėl antigenų nebuvimo arba per mažų jų kiekių epitelinų ląstelių paviršiuje. Tačiau pasitelkiant tam tikrus periferinės tolerancijos mechanizmus yra užtikrinamas atrankos išvengusių T limfocitų tinkamas subrendimas [2]. T limfocitai gali būti atrenkami sukeldami jų žūtį apoptozės būdu dėl per didelio aktyvumo. Apoptozė prasideda tuomet, kai T limfocitai nuolat būna aktyvinti dėl didelių autoantigenų koncentracijų arba yra aktyvinti, kuomet imuninis atsakas jau nėra reikalingas [57]. Šią apoptozę sąlygoja subrendusių ir aktyvintų T limfocitų paviršiuje ekspresuojami Fas baltymas bei FasL ligandas, kurių sąveika ir sukelia apoptozę [2]. Transplantacijoje donorui reaktyvių limfocitų apoptozė galėtų būti vienas iš tolerancijos paskatinimo mechanizmų. Jei žūtų visi donorui specifiniai limfocitai, tuomet imuninis atsakas į transplantatą nebūtų sukeltas [2]. T limfocitams tam, kad taptų aktyviais ir diferencijuotusi reikalingi du signalai: ŽLA ir antigeno atpažinimo TCR receptoriais bei kostimuliacinės CD28 molekulės, kurios yra ekspresuojamos antigeną pateikiančių ląstelių. Kuomet T limfocitai negauna kostimuliacinio signalo, išsivysto klonų anergija, T limfocitai negali reaguoti į ŽLA ir peptido kompleksą [56]. Šis tolerancijos mechanizmas taip pat galėtų būti kaip viena iš strategijų, kuomet blokuojant CD28 molekules išvengiama transplantato atmetimo reakcijos [56]. Tokie sėkmingi bandymai su gyvūnais jau buvo atlikti mokslininko Rigby su kolegomis, tačiau vis dar išlieka klausimas kaip pasireikštų šis tolerancijos mechanizmas žmogaus organizme [56]. Dar vienas iš galimų periferinės tolerancijos mechanizmų yra reguliacinių kitaip slopinančių T ląstelių (Treg) blokuojamas klonui specifinis T ląstelių aktyvumas [58]. Tyrimai parodė, kad Treg yra specifiniai antigenui ir tolerancija reguliuoja gamindami slopinančius citokinus kaip IL-10 bei TGF-β. Taip pat atliekant bandymus su gyvūnais pastebėta, kad perkėlus donoro Treg recipientui ar paskatinus Treg *ex vivo* išsivystymą iš recipiento T limfocitų, išsivysto imuninė tolerancija. Tačiau ši strategija nėra išbandyta žmogaus organizme, reikalingi išsamesni tyrimai, kurie leistų tai pritaikyti kliniškai [58].

**Klinikinio pritaikymo strategijos.** Nors ir šiuo metu nėra plačiai kliniškai taikomos tolerancijos strategijos norint išvengti atmetimo reakcijų, tačiau intensyvūs tyrimai vyksta siekiant sužinoti, kuo daugiau žinių apie tolerancijos mechanizmą. Mokslininkai šiuo metu išskiria dvi galimas tolerancijos strategijas – pilna bei dalinė [41]. Pilnos tolerancijos metu tinkamai funkcionuojantis transplantuotas organas išgyvena ilgą laiką ir recipientui nereikia vartoti imunosupresantų. Taip pat išsaugomas normalus imuniteto funkcionavimas bei nepasireiškia šalutinis vaistų poveikis kaip infekcijos, navikai ir kita. Pilna tolerancija



pasiekama taikant mieloablacinę terapiją prieš transplantaciją, kuri apima viso kūno spindulinę terapiją, kartu su indukuotu donoro chimerizmo įgijimu persodinant kaulų čiulpus bei visiškai suderinus ŽLA [41]. Šis tolerancijos būdas jau buvo pritaikytas kliniškai, tačiau tikėtasis rezultatas nebuvo pilnai pasiektas. Pacientams vis tiek prirėikė normalaus imunosupresantų vartojimo, transplantato išgyvenamumas pailgėjo tik 70 % [28]. Dalinės tolerancijos metu imunosupresantų vartojimas yra sumažinamas iki minimumo, o kartu ir įvairių infekcijų bei kitų galimų komplikacijų tikimybė [41]. Ši tolerancijos strategija paremta tuo, kad pacientams po transplantacijos yra taikoma monoterapija vartojant tik vienus imunosupresantus. Po taikymo kiekvienai pacientų grupei skirtingus imunosupresantus, tinkamai funkcionuojančio transplantato išgyvenamumas buvo beveik lygiai toks pats kaip ir taikant pilną toleranciją [41].

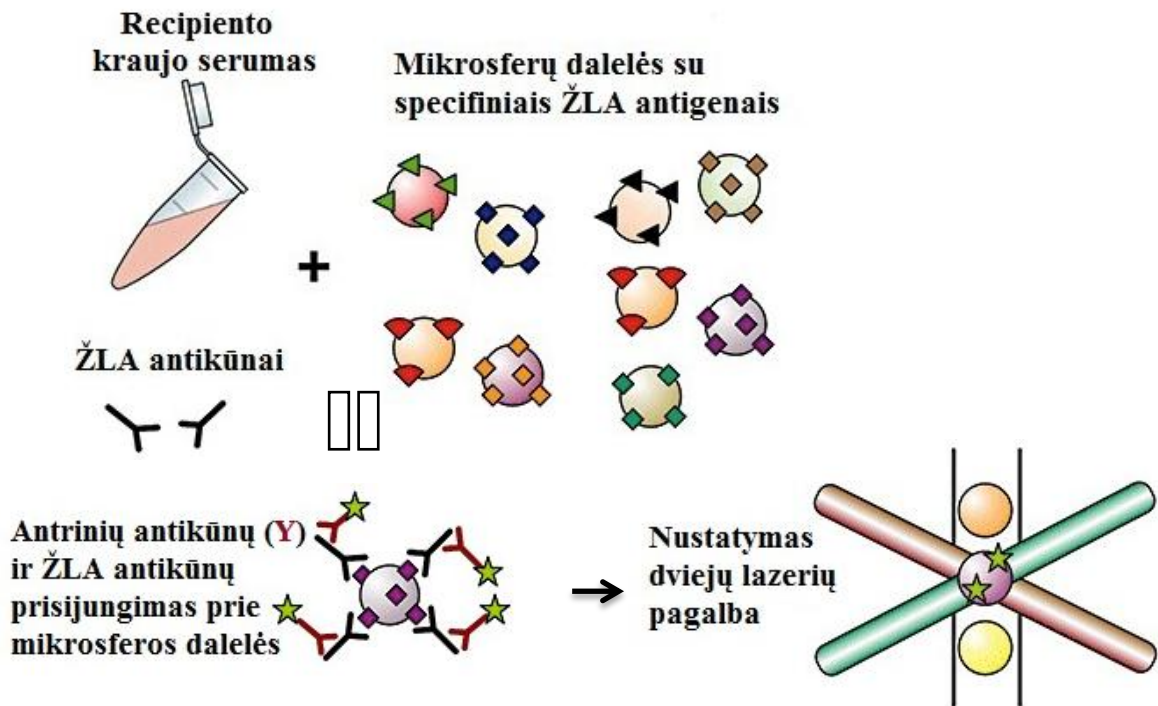
Nors ir tolerancijos mechanizmo taikymas transplantacijoje yra daug žadantis, tačiau vis dar nėra aiškių rezultatų galinčių patvirtinti ar paneigti jos naudą. Taip pat nėra analizės metodų, kurie padėtų tiksliai nustatyti tolerancijos išsivystymą [57]. Nereikėtų atmesti ir to, kad žmogus visada susiduria su patogenais esančiais aplinkoje, kurie gali paskatinti sensitizaciją ar generuoti savaime atsinaujinančius T limfocitus ir taip sutrikdyti toleranciją antigenams [41].

#### 1.4. Žmogaus leukocitų antigenų nustatymo metodai

Šiuo metu pagrindinė problema transplantacijoje yra recipiento ir donoro suderinamumas pagal ŽLA. Atsižvelgiant į tai, stengiamasi tobulinti metodus, kurie padėtų su didžiausiu jautrumu ir specifiskumu aptikti recipiento organizme susidariusius ŽLA antikūnus, taip pat atliktų tikslų ŽLA antigenų tipavimą, taip užkertant kelią transplantato atmetimo reakcijai. Transplantacijoje taip pat svarbus ir recipiento tolimesnis stebėjimas po operacijos, kuris leidžia nustatyti ŽLA antikūnų pokyčius ir prognozuoti lėtinę atmetimo reakciją [27]. Nors ir nėra labai daug metodų, kurie leistų atlikti visus šiuos diagnostinius tyrimus, tačiau kiekvienas iš naudojamų klinikinėje laboratorijoje pasižymi jam būdingomis savybėmis, kurios bendrai leidžia pasiekti gana tikslus rezultatus.

**Mikrosferų srauto analizės metodas.** Tai nauja technologija sukėlusi revoliuciją klinikinėje diagnostikoje leisdama per trumpą laiką ir tiksliai atlikti imunologinius, genetinius, farmakogenetinius bei infekcinių ligų diagnostinius tyrimus [36]. Ši technologija ypač palanki atliekant suderinamumo tyrimus transplantologijoje. Mikrosferų srauto analizės metode tiek mėginio paruošimas, tiek pati analizė yra gana paprasti ir mažai laiko reikalaujantys procesai. Pagal 6 paveikslėlyje pateiktą schemą matyti, kad šios analizės

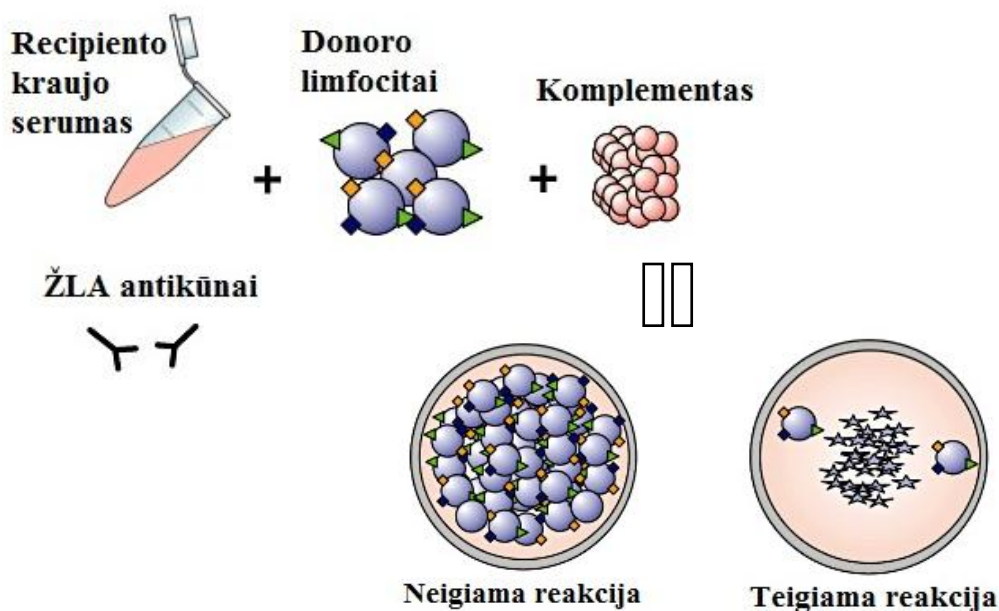
principas antikūnų nustatyme yra paremtas ELISA sumuštinio tipo antigeno ir antikūnų išsidėstymu kartu su tėkmės citometrija. Tyrimui paruoštas mėginys tam tikrą laiką inkubuojamas mikroplokštelėje su skirtingą fluorescencinę žymę turinčiomis mikrosferų dalelėmis. Šių dalelių paviršiuje, antikūnų tyrimo atveju, yra jiems specifiniai antigenai [32]. Tuomet į mėginį įdedami fluorescencinę žymę turintys antriniai antikūnai prieš žmogaus IgG [32]. Mikrosferų srauto analizės metode naudojamas Luminex aparatas. Pirmiausiai šiame aparate esantis lazeris sužadina ir detektoriaus pagalba nustato mikrosferų daleles, norint įsitikinti pakankamu jų kiekiu. Tuomet pradedama analizė. Sekantis lazeris sužadina ir detektoriaus pagalba nustato susijungusius ir sužadintus, fluorescencinę žymę turinčius, antikūnus. Pagal švytėjimo intensyvumą yra nustatomas jų kiekis, o tuo pačiu atitinkamai antikūnų kiekis, kuris yra lyginamas su neigiama kontrole ir nustatoma, kokia buvo gauta reakcija – teigiama ar neigiama [62]. Dėl didelio šio metodo jautrumo ir specifiškumo galima greitai ir tiksliai nustatyti tiriamąją analizę kraujo serume. Palyginus su kitais metodais mikrosferų srauto analizė išsiskiria tuo, kad tyrimams nėra reikalingi dideli mėginio tūriai, o tai ypač aktualu, kai tyrimai atliekami su limituoto tūrio ėminiais. Taip pat naudojant šią analizę yra išvengiama nespecifinio susijungimo dėl mažesnio nei įprastai mikrosferų dalelių paviršiaus ploto [62]. Dar vienas iš privalumų yra tai, kad tyrimas atliekamas gana greitai ir galima iširti iki 100 mėginių vienu metu, o tai savo ruožtu mažina tiek laboratorijos išlaidas, tiek tyrimo atlikimo laiką [30]. Negalima atmesti ir to, kad galima iširti didelę įvairovę recipiento kraujo serume cirkuliuojančių antikūnų. Taip pat nustatymas vyksta automatizuotai, išvengiant žmogiškojo faktoriaus, kuris labai dažnai lemia klaidingus rezultatus [16]. Tačiau galimos ir klaidingai neigiamos reakcijos dėl prozono efekto, kurį sukelia ypatingai aukštos ŽLA antikūnų koncentracijos [67]. Neišvengiamos ir klaidingai teigiamos reakcijos, kuomet antikūnai prieš ŽLA molekules nespecifiškai jungias su denatūravusiais antigenų epitopais ant mikrosferų dalelių paviršiaus [35].



**6 pav.** Mikrosferų srauto analizės principas pagrįstas ŽLA antikūno, susijungusio su fluorescencinę žymę turinčiu antriniu antikūnu, nustatymu. Šį nustatymą vykdo du lazeriai iš kurių vienas nustato mikrosferų daleles, o kitas fluorescencinį signalą [44].

**Nuo komplemento priklausomas limfocitotoksinis tyrimas (LCT).** Tai vienas iš seniausių ir pirmųjų pradėtų naudoti donoro ir recipiento suderinamumui nustatyti metodų. LCT taip pat gali būti naudojamas antikūnų prieš I arba II ŽLA klasę nustatymui bei recipiento sensitizacijos įvertinimui. Pagal 7 paveikslėlyje pateiktą schemą matyti, kad šis metodas vertinant suderinamumą yra gana paprastas ir paremtas komplemento citotoksiniu poveikiu donoro limfocitams, kurie yra susijungę su recipiento kraujo serume esančiais donorui specifiniais antikūnais [64]. Į mikroplokšteles supylus reakcijai reikalingus komponentus galima stebėti reakciją, kuri rodo, ar vyksta kryžminė reakcija, ar ne. Esant teigiamai reakcijai, mikroplokštelėje pro fluorescencinį mikroskopą matyti raudona spalva švytinčios ląstelės, kurios rodo, kad įvyko kryžminė reakcija, komplementas sureagavo su DSA ir ląstelės žuvo. Esant neigiamai reakcijai – nepakis ląstelių spalva, dažas nebus sureagavęs su ląstelėmis ir kryžminė reakcija taip pat nebus įvykusi [64]. Šis metodas yra paprastas ir pakankamai tikslus, tačiau tik tuomet, kai yra pakankami antikūnų titrai ir ląstelės pilnai žūva esant komplemento poveikiui [27]. Esant mažoms antikūnų koncentracijoms, ar dalinai gyvybingoms ląstelėms, įvykdyti reakcijos nebus galima arba bus gaunami klaidingai teigiami rezultatai [55]. Taip pat iškyla problema nustatant ne nuo komplemento priklausomus ŽLA antikūnus bei norint atmesti IgM antikūnų įtaką. Metodo jautrumui

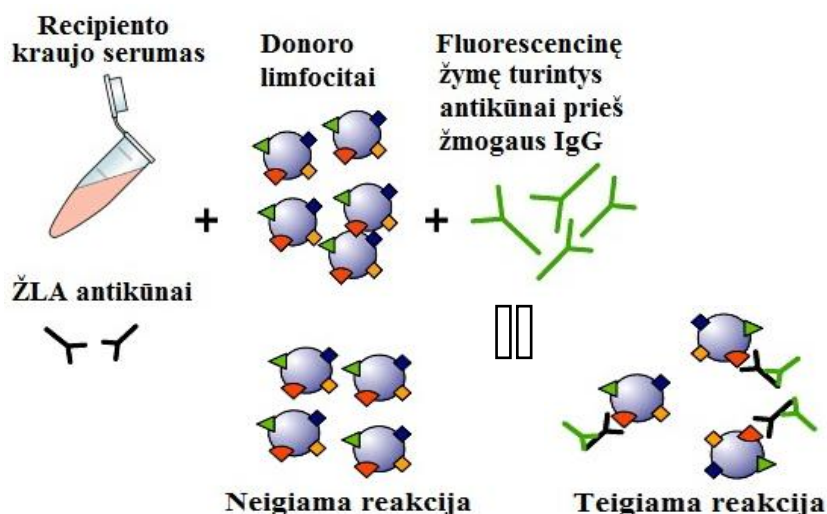
pagerinti reikalinga ilgesnė inkubacija, papildomi etapai mėginio paruošime, kurie lemia pailgėjusį tyrimo laiką bei didesnes išlaidas. Tačiau nepaisant to, šis metodas yra iki šiol taikomas suderinamumo tyrimuose kaip vienas iš geresnių kryžminėms reakcijoms nustatyti metodų [52].



**7 pav.** Nuo komplemento priklausomo limfocitotoksinio tyrimo įvertinimo principas, kuris paremtas ląstelių žūtimi prisijungus komplementui. Teigiamos reakcijos identifikuojamos pagal sulizuotų ląstelių, švytinčių raudona spalva, skaičių [44].

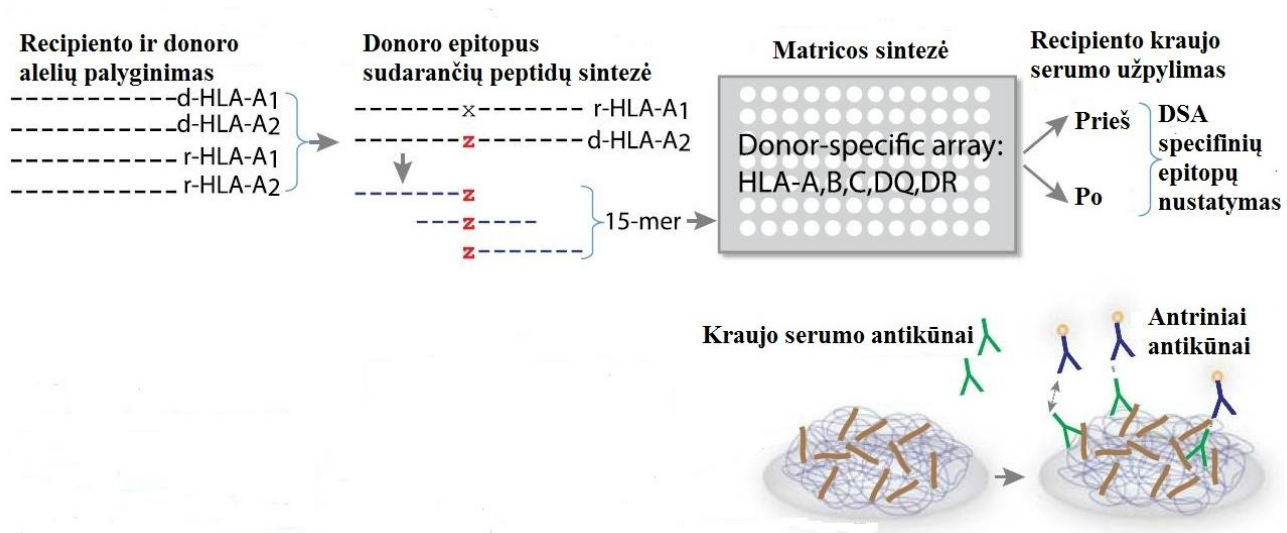
**Tėkmės citometrija.** Tai dar vienas metodas, kuris gali būti naudojamas kryžminėms reakcijoms nustatyti atliekant donoro ir recipiento suderinamumą. Tėkmės citometrija yra žymiai jautresnis nustatymo metodas nei LCT [64]. Kryžminės dermės mėginys yra skirtas citotoksiniams antikūnams recipiento kraujo serume prieš donoro ŽLA antigenus nustatyti. Pagal 8 paveikslėlyje esančią schemą matyti, kad reakcijos principas remiasi tuo, kad donoro limfocitai paveikiami recipiento kraujo serumu. Jeigu kraujo serume yra antikūnų, jie jungiasi prie donoro limfocitų. Reakcija vizualizuojama pridėjus antrinių antikūnų prieš žmogaus imunoglobuliną, prie kurių tiesiogiai pritvirtintas fluorochromas [64]. Lazerio pagalba yra nustatomas fluorescencinis intensyvumas, kuris yra lyginamas su neigiama kontrole. Kuomet fluorescencinis intensyvumas aukštesnis už kontrolinį intensyvumą, gaunama teigiama reakcija, kuri rodo DSA antikūnų buvimą ir teigiamą kryžminę reakciją [52]. Kuomet fluorescencinis intensyvumas žemesnis už kontrolinį intensyvumą, gaunama neigiama reakcija, kuri rodo DSA antikūnų nebuvimą. Vienas iš tėkmės citometrijos pranašumų yra tai, kad galima detektuoti net ir nuo komplemento nepriklausomus antikūnus. Tačiau šis metodas

yra priklausomas nuo ląstelių gyvybingumo kaip ir LCT. Taip pat turint mažus mėginio kiekius, tėkmės citometrijos būdu kryžminių reakcijų nustatymas negali būti atliekamas [52].



**8 pav.** Kryžminių reakcijų nustatymo, panaudojant tėkmės citometrą, principas, kuris paremtas fluorescencinio signalo identifikavimu, jei yra stebima kryžminė reakcija [44].

**Personalizuotos peptidų matricos.** Nors šiuo metu yra sukurtą metodų, pasižyminčių ypatingai dideliu jautrumu ir specifiškumu, tačiau jie turi trūkumų, kurie neleidžia išvengti klaidingų rezultatų ir taip mažina transplantacijos sėkmingumą. Todėl mokslininkai stengiasi tobulinti šiuos metodus ir pašalinti jų trūkumus bei kurti naujus metodus, kurie leistų dar tiksliau nustatyti susidariusius antikūnus [49]. Antikūnai susiformuoja prieš tam tikras ŽLA antigeno epitopų aminorūgštis [63]. Galimybė nustatyti epitopų lygyje *de novo* susidariusius antikūnus bei geriau prognozuoti atmetimo reakciją, atsirado sukūrus vieną iš naujausių metodų – personalizuotų peptidų matricos. Šio metodo principas yra paremtas virusų epitopų nustatymu kuriant vakcinas. 9 paveikslėlyje matyti, kad matrica yra padengiama susintetintomis persidengiančiomis linijinėmis 15 aminorūgščių peptidų sekomis, kurios apima donoro antigenų epitopų sekas, kartu su nesutapimais nustatytais lyginant recipiento ir donoro alelių sekas [34]. Užpilant ant vienos matricos recipiento kraujo serumą prieš, o ant kitos matricos kraujo serumą po transplantacijos bei antrinius antikūnus nustatomi *de novo* antikūnai, o tuo pačiu ir epitopai, prieš kuriuos šie antikūnai susidarė. Tai leidžia nustatyti žymiai tiksliau antikūnus, net ir tokius, kurie nebūna aptinkami kitais metodais [34].



**9 pav.** Personalizuotos peptidų matricos metodo principo schema. Palyginant donoro ir recipiento ŽLA alelių sekas, yra sukuriama matrica, kuri leidžia nustatyti *de novo* susidariusius antikūnus bei epitopus, prieš kuriuos šie antikūnai susidarė [34].

## 2. NAUDOTOS MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1. Tiriamoji medžiaga

Šiame darbe naudoti Vilniaus universiteto, Santaros klinikų, Klinikinės imunologijos ir kraujo perpylimo laboratorijos duomenys gauti tiriant laukiančių transplantacijos sensitizuotų (PRA>10%) inkstų recipientų (n=34) kraujo serumus (n=60), kurie buvo surinkti 2013 – 2017 metų laikotarpyje. Kiekvienas inkstų recipientas tirtas mikrosferų srauto analizės ir nuo komplemento priklausiančio limfocitotoksinio tyrimo metodais. Nustatyti visi recipientų kraujo serume esantys specifiniai antikūnai prieš ŽLA (n=1375) bei sensitizacijos stiprumas.

### 2.2. Metodai

#### 2.2.1. Mikrosferų srauto analizės metodas

Šis metodas šiuo metu yra naudojamas tiek laboratorinėje diagnostikoje, tiek moksliniais tikslais įvairiose srityse kaip genetika, farmakogenetika, imunologija, infekcinės ligos. Dėl didelio jautrumo ir specifiškumo mikrosferų srauto analizės metodas leidžia pakankamai tiksliai atlikti analizę ir teikti gana patikimus rezultatus. Mikrosferų srauto analizės metodo naudojimas transplantologijoje leidžia tiksliai nustatyti tiek kryžmines reakcijas, tiek recipiento kraujyje cirkuliuojančius specifinius antikūnus prieš ŽLA.



**10 pav.** Mikrosferų srauto analizės metodui naudojamas Luminex 200 aparatas [36].

**Principas.** Recipiento antikūnų analizei naudojamas mikrosferų srauto analizės metodo reagentų rinkinys, kurį sudaro mikrosferų dalelės, IgG su fikoeritriu, tirpalai. Tiriamasis kraujo serumas pagal gamintojo protokole nurodytas proporcijas sumaišomas su mikrosferų dalelėmis, kurios savo paviršiuje turi ŽLA molekules išgrynintas iš limfoblastinių ląstelių linijos. Kiekviena mikrosferų dalelė turi po du skirtingo dažnio infraraudonus ir raudonus

fluorochromus, kurie, apšvitinus juos lazerio spinduliu, suteikia dalelei savitą signalą. Mikrosferų dalelės savo paviršiuje gali turėti skirtingą kiekį prijungtų ŽLA molekulių: 1) Daug įvairių I ir II klasės ŽLA molekulių. 2) Daug ŽLA-A, ŽLA-B ir ŽLA-C arba ŽLA-DR ir ŽLA-DQ grupės molekulių. 3) Daug tik vienos rūšies ŽLA molekulių. Šio tyrimo metu naudotos dalelės padengtos vienos rūšies ŽLA molekulėmis. Į mikrosferų dalelių ir kraujo serumo mišinį po inkubacijos įdedama specifinio ŽLA antikūnams žmogaus IgG su fikoeritrinu, kuris prisijungia prie mikrosferos dalelės ir anti-ŽLA antikūno komplekso. Gautas mišinys yra analizuojamas mikrosferų srauto analizės Luminex aparate (10 pav.). Analizė vyksta apjungiant du dalelių nustatymo principus. Pirmiausiai mikrosferų dalelių ir antikūnų kompleksai pereina kanalą, kuriame matuojamas jo poslinkis, susijęs su antikūno prisijungimu prie mikrosferos dalelės. Taip yra įvertinamas tinkamas analizei dalelių kiekis. Tuomet Luminex aparate esantis tēkmės citometras raudonos šviesos lazerio pagalba sužadina fluorochromus esančius ant mikrosferos dalelės, žalios spalvos – fikoeritriną esantį ant IgG. Šie du signalai leidžia specifiškai nustatyti antikūnus ant mikrosferų dalelių. Detektoriaus pagalba nustatytas fikoeritrino fluorescencinio signalo intensyvumas kiekvienai mikrosferos dalelei yra išreiškiamas vidutiniu fluorescenciniu intensyvumu (MFI). MFI toliau yra koreguojamas dėl galimo foninio triukšmo. Kiekviename mikrosferų srauto analizės metodo rinkinyje yra nurodoma jam būdinga foninio MFI reikšmė, kuri priklauso nuo mikrosferų dalelių variacijos tam rinkiniui.

Toliau analizės aparatas apskaičiuoja koreguotą MFI pagal formulę:

$$(iMFI-fMFI) = kMFI$$

iMFI – individualus mikrosferos dalelei vidutinis fluorescencinis intensyvumas.

fMFI – foninis vidutinis fluorescencinis intensyvumas.

kMFI – koreguotas vidutinis fluorescencinis intensyvumas.

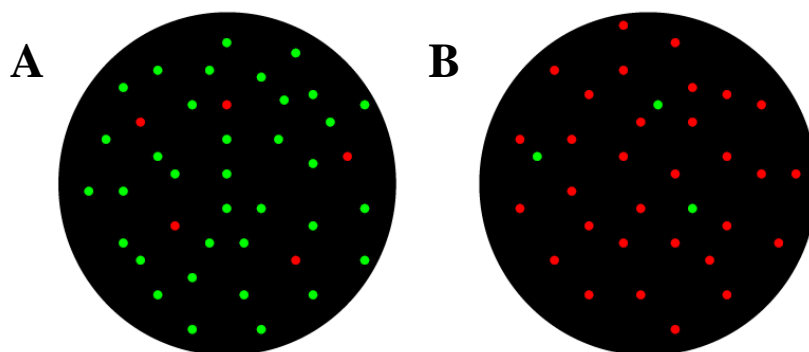
Analizėje taip pat naudojamos teigiama ir neigiama kontrolės. Teigiamai kontrolei naudojamos mikrosferų dalelės padengtos IgG su fikoeritrinu tam, kad būtų patvirtintas fikoeritrino aktyvumas. Esant reikiamam mikrosferų dalelių kiekiui ir susijungimui su ŽLA I ar II klase, teigiama kontrolė laikoma tinkama. Neigiama kontrolė naudojama kaip indikatorius nespecifiniam susijungimui. Esant reikiamam mikrosferų dalelių kiekiui ir nesusijungimui su ŽLA I ir II klase, neigiama kontrolė laikoma tinkama.



### 2.2.2. Nuo komplemento priklausomas limfocitotoksinis tyrimas

Šis metodas nepaisant savo trūkumų yra laikomas auksiniu standartu nustatant kryžmines reakcijas tarp donoro ir recipiento. LCT taip pat gali būti taikomas antikūnų prieš I ir II ŽLA klasę nustatymui bei sensitizacijos stiprumo įvertinimui.

**Principas.** Recipiento antikūnų analizei naudojama plokštelė turinti kiekviename šulinėlyje limfocitus padengtus žinomais ŽLA antigenais. Tyrimui naudojama apie 30 – 40 dažniausių tiriamai populiacijai ŽLA antigenų. Į paruoštą plokštelę yra įpilama tiriamojo recipiento kraujo serumo. Taip pat į kiekvieną plokštelės šulinėlį įpilama iš triušio išgrynintų komplemento komponentų. Jeigu šulinėlyje įvyko susijungimo reakcija tarp antigeno ir antikūno, esančio recipiento kraujo serume, tuomet aktyvintas komplementas pažeis limfocito membraną. Jeigu neįvyks susijungimo reakcija – tuomet limfocito membrana nebus pažeista. Tam, kad įvertinti, kurie limfocitai buvo pažeisti, papildomai įlašinama fluorescencinio dažo eozino. Plokštelė įvertinama fluorescenciniu mikroskopu. Jei kaip 11 paveikslėlyje pavaizduotame tiriamajame šulinėlyje matome raudonai švytinčias ląsteles, teigiame, kad įvyko teigiama reakcija ir recipientas turi antikūnų prieš ŽLA antigenus. Jei tiriamajame šulinėlyje matome žalias ląsteles – reakcija neigiama ir limfocitai nebuvo pažeisti. Raudonai švytinčių limfocitų kiekis vertinamas balais (nuo 2 iki 8) taip nustatant reakcijos stiprumą.



**11 pav.** Nuo komplemento priklausomo limfocitotoksinio tyrimo įvertinimas fluorescenciniu mikroskopu pagal ląstelių švytėjimą. A – neigiama reakcija, T limfocitai nebuvo pažeisti. B – teigiama reakcija, T limfocitai buvo paveikti komplemento [52].

Šio tyrimo metu taip pat įvertinamas recipiento sensitizacijos stiprumas apskaičiuojant plokštelei reaktyvių antikūnų (PRA) procentinę išraišką t.y. įvertinant limfocitotoksinį lygį – teigiamų reakcijų skaičių gautą ištyrus recipiento kraujo serumą su 40 tipuotų donorinių ląstelių:

$PRA = (\text{teigiamų reakcijų skaičius} / \text{visų reakcijų skaičius}) * 100\%$

0 – 9 % silpna sensitizacija, 10 – 49 % vidutinė sensitizacija, 50 – 100 % stipri sensitizacija.

### **2.2.3. Statistinė analizė**

Retrospektyvinio tyrimo duomenys analizuoti naudojant kompiuterinę programą RStudio, versija 1.1.414.

Kokybinių duomenų dažnio pasiskirstymo skirtumams įvertinti taikytas  $\chi^2$  (chi) kvadratas. Mažesnių imčių dažnio pasiskirstymo skirtumams įvertinti taikytas Fišerio kriterijus. Statistiniam reikšmingumui patvirtinti taikyta  $p < 0,05$  reikšmė.

### 3. REZULTATAI IR JŲ APŽVALGA

#### 3.1. Antikūnų prieš žmogaus leukocitų antigenus nustatymas

Pasitelkiant skyriuje „Metodai“ aprašytą mikrosferų srauto analizės metodą buvo nustatyti ir įvertinti sensitizuotų inkstų recipientų kraujo serume esantys antikūnai prieš žmogaus leukocitų antigenus.

Šis metodas leidžia įvertinti susidariusius antikūnus iki aukštos rezoliucijos t.y. alelių lygio, o tai suteikia galimybę labai specifiskai nustatyti, prieš kokius ŽLA antigenus yra susidarę antikūnai. Atsižvelgiant į mokslininkų rekomendacijas, kurios taikomos tiek įvertinant recipiento sensitizaciją, tiek atliekant suderinamumo tyrimus, buvo nustatyti antikūnai prieš I ir II klasės ŽLA–A, ŽLA–B, ŽLA–DR ir ŽLA–DQ antigenus [3]. Šios antigenų grupės, kaip manoma, yra stipriausiai susiję su transplantato atmetimo reakcija [24].

Panaudojant sensitizuotų inkstų recipientų kraujo serume nustatytų antikūnų rezultatus, gautus Vilniaus universiteto, Santaros klinikų, Klinikinės imunologijos ir kraujo perpylimo laboratorijoje 2013 – 2017 metų laikotarpiu, apskaičiuotas šių antikūnų dažnis. Pirmiausiai buvo apskaičiuota, prieš kurios ŽLA klasės antigenus susidarė dažniau antikūnai. Pagal 1 lentelėje pateiktus rezultatus, matyti, kad dažniausiai tiriamojoje grupėje susidarė antikūnai prieš ŽLA I klasės antigenus.

**1 lentelė.** Antikūnų, susidariusių prieš ŽLA, dažnio pasiskirstymas pagal ŽLA I ir II klasę.

	ŽLA klasė	
	I	II
Dažnis	460	370

Toliau buvo įvertintas antikūnų dažnis kiekvienoje I ir II klasės ŽLA grupėje pagal jų rūšį. Pagal 2 lentelės duomenis matyti, kad dažniausiai antikūnai susidarė prieš ŽLA-A11 antigeną. Rečiau antikūnai analizuojamoje tyrimo grupėje susidarė prieš ŽLA–A74(19) antigeną. Gauti rezultatai buvo palyginti su Vilniaus universiteto Santaros klinikų mokslo darbuotojų analizuotais Lietuvos nacionalinio kaulų čiulpų donorų registro duomenimis [59]. Jų tyrimo metu nustatyti ŽLA antigenų dažniai buvo labai panašūs į šio tyrimo rezultatus. Didžiausiu dažniu pasižymėjo ŽLA–A2 antigenas, tačiau ŽLA–A11 antigenas buvo taip pat vienas iš dažnesnių antigenų. Mažiausiu dažniu pasižymėjo ŽLA–A74(19) antigenas kaip ir šio tyrimo metu [59]. Remiantis bendrais Europos populiacijos tyrimais ŽLA–A11 taip pat yra vienas iš dažniausių ŽLA antigenų [31].

**2 lentelė.** Antikūnų, susidariusių prieš ŽLA, dažnio pasiskirstymas pagal ŽLA–A rūšį.

Anti-ŽLA Ak	Dažnis	Anti-ŽLA Ak	Dažnis	Anti-ŽLA Ak	Dažnis
ŽLA-A1	6	ŽLA-A26(10)	4	ŽLA-A36	5
<b>ŽLA-A11</b>	<b>15</b>	ŽLA-A29(19)	6	ŽLA-A43	3
ŽLA-A2	14	ŽLA-A3	7	ŽLA-A66(10)	10
ŽLA-A203	5	ŽLA-A30(19)	5	ŽLA-A68(28)	8
ŽLA-A23(9)	6	ŽLA-A31(19)	6	ŽLA-A69(28)	3
ŽLA-A24(9)	9	ŽLA-A32(19)	3	ŽLA-A74(19)	2
ŽLA-A2403	8	ŽLA-A33(19)	5	ŽLA-A80	4
ŽLA-A25(10)	5	ŽLA-A34(10)	4		

\***Raudona spalva** pažymėtas didžiausias prieš ŽLA antigeną susidariusių antikūnų dažnis.

Analizuojant ŽLA–B grupės duomenis, iš 3 lentelės matyti, kad dažniausiai antikūnai tiriamojoje grupėje susidarė prieš ŽLA–B35 antigeną. Rečiau antikūnai susidarė prieš ŽLA–B59, –B18, –B38(16), –B3901, –B51(5) antigenus. Kaulų čiulpų registro duomenų analizės metu ŽLA–B35 antigenas taip pat buvo vienas iš dažniausių antigenų [59]. Atsižvelgiant į Europos populiacijos duomenis ŽLA–B35 antigenas taip pat yra vienas iš dažniausių [31].

**3 lentelė.** Antikūnų, susidariusių prieš ŽLA, dažnio pasiskirstymas pagal ŽLA–B rūšį.

Anti-ŽLA Ak	Dažnis	Anti-ŽLA Ak	Dažnis	Anti-ŽLA Ak	Dažnis
ŽLA-B*82:02	10	ŽLA-B48	7	ŽLA-B63(15)	10
ŽLA-B13	11	ŽLA-B49(21)	8	ŽLA-B64(14)	5
ŽLA-B18	4	ŽLA-B50(21)	8	ŽLA-B65(14)	6
ŽLA-B27	12	ŽLA-B51(5)	4	ŽLA-B67	6
ŽLA-B2708	9	ŽLA-B52(5)	7	ŽLA-B7	7
<b>ŽLA-B35</b>	<b>13</b>	ŽLA-B53	6	ŽLA-B703	6
ŽLA-B37	5	ŽLA-B54(22)	10	ŽLA-B71(70)	5
ŽLA-B38(16)	4	ŽLA-B55(22)	8	ŽLA-B72(70)	8
ŽLA-B3901	4	ŽLA-B56(22)	9	ŽLA-B73	7
ŽLA-B41	5	ŽLA-B57(17)	8	ŽLA-B75(15)	6
ŽLA-B42	6	ŽLA-B58(17)	7	ŽLA-B76(15)	7
ŽLA-B44(12)	7	ŽLA-B59	4	ŽLA-B77(15)	5
ŽLA-B45(12)	7	ŽLA-B60(40)	7	ŽLA-B78	6
ŽLA-B46	7	ŽLA-B61(40)	6	ŽLA-B8	8
ŽLA-B47	7	ŽLA-B62(15)	8	ŽLA-B81	7

\***Raudona spalva** pažymėtas didžiausias prieš ŽLA antigeną susidariusių antikūnų dažnis.

Išanalizavus II klasės ŽLA–DR ir ŽLA–DQ grupių duomenis, iš 4 lentelės matyti, kad dažniausiai antikūnai susidarė prieš ŽLA–DQ6(1), ŽLA–DR15(2) ir ŽLA–DR52 antigenus. Mažesniu dažniu tiriamojoje grupėje pasižymėjo antikūnai prieš ŽLA–DQ2 ir ŽLA–DR2

antigenus. Santaros klinikų mokslo darbuotojų gauti ŽLA–DR grupės rezultatai dalinai sutapo su šio tyrimo rezultatais. ŽLA–DR15(2) buvo vienas iš dažniausių antigenų. ŽLA–DQ grupė jų tyrime nebuvo analizuota [59].

**4 lentelė.** Antikūnų, susidariusių prieš ŽLA, dažnio pasiskirstymas pagal ŽLA–DQ ir ŽLA–DR rūšį.

Anti-ŽLA Ak	Dažnis	Anti-ŽLA Ak	Dažnis	Anti-ŽLA Ak	Dažnis
ŽLA-DQ2	11	ŽLA-DR103	6	ŽLA-DR18(3)	7
ŽLA-DQ4	40	ŽLA-DR11(5)	12	ŽLA-DR2	4
ŽLA-DQ5(1)	19	ŽLA-DR12(5)	7	ŽLA-DR4	13
<b>ŽLA-DQ6(1)</b>	<b>43</b>	ŽLA-DR13(6)	14	ŽLA-DR7	11
ŽLA-DQ7(3)	18	ŽLA-DR14(6)	8	ŽLA-DR8	7
ŽLA-DQ8(3)	21	ŽLA-DR1404	7	ŽLA-DR9	13
ŽLA-DQ9(3)	19	<b>ŽLA-DR15(2)</b>	<b>15</b>	ŽLA-DR51	15
ŽLA-DR1	6	ŽLA-DR16(2)	14	<b>ŽLA-DR52</b>	<b>17</b>
ŽLA-DR10	10	ŽLA-DR17(3)	7	ŽLA-DR53	6

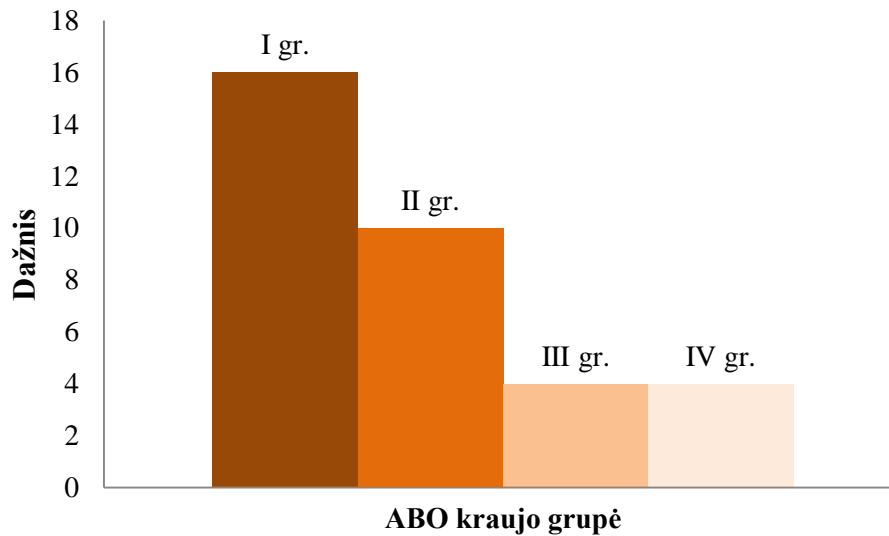
\***Raudona spalva** pažymėtas didžiausias prieš ŽLA antigeną susidariusių antikūnų dažnis.

Buvo apžvelgti ir užsienio mokslininkų atlikti antikūnų prieš ŽLA dažnio tyrimai. Pastebėti panašūs antikūnų prieš ŽLA–A, ŽLA–B, ŽLA–DR ir ŽLA–DQ grupių antigenus dažniai [40].

Lyginant antikūnų prieš ŽLA dažnius geriausia yra atsižvelgti į tos pačios populiacijos individų duomenis. Pakankamas šio tyrimo ir kaulų čiulpų donorų registro tyrimo rezultatų sutapimas galėtų leisti daryti prielaidą apie ŽLA antigenų paplitimą Lietuvos gyventojų populiacijoje. Tačiau dar turėtų būti atlikti išsamesni tyrimai su didesne tyrimo grupe.

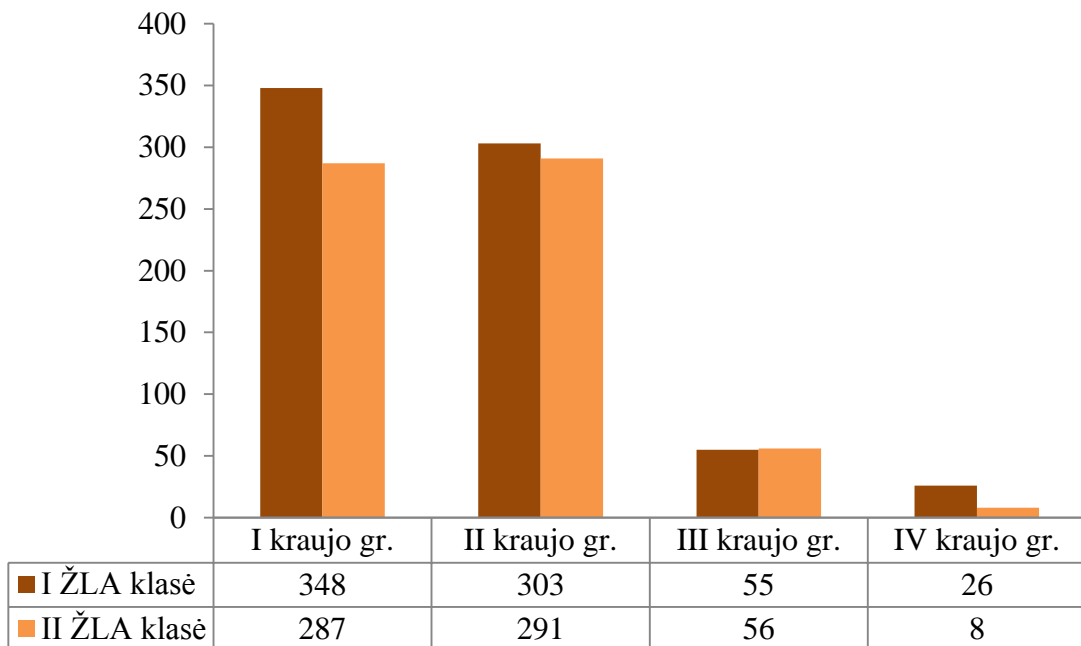
### 3.2. Antikūnų prieš žmogaus leukocitų antigenus pasiskirstymas pagal ABO kraujo grupę

Šiame darbe taip pat buvo norima įvertinti, koks yra antikūnų, susidariusių prieš ŽLA I ir II klasę, pasiskirstymas tarp ABO sistemos kraujo grupių. Pirmiausiai buvo nustatytas ABO sistemos kraujo grupių dažnis tarp sensitizuotų inkstų recipientų. Iš 12 paveikslėlyje pateikto grafiko matyti, kad daugiausiai recipientų turi I ABO sistemos kraujo grupę, kuri lietuvių populiacijoje ir yra dažniausia. Mažiausiai recipientų turi III ir IV ABO sistemos kraujo grupes, kurios lietuvių populiacijoje taip pat yra rečiau aptinkamos tarp individų [31].



**12 pav.** ABO sistemos kraujo grupių dažnio tarp sensitizuotų inkstų recipientų pasiskirstymas.

Antikūnų, susidariusių prieš tam tikrą ŽLA klasę, dažnio pasiskirstymo pagal ABO sistemos kraujo grupę įvertinimui, buvo apskaičiuotas kiekvienos ŽLA klasės dažnis kiekvienai sensitizuotų inkstų recipientų ABO sistemos kraujo grupei. Pagal 13 paveikslėlio duomenis matyti, kad beveik visų kraujo grupių atveju dažniau susidaro antikūnai prieš ŽLA I klasę. III ABO sistemos kraujo grupei nežymiai, bet dažniau susidaro antikūnai prieš ŽLA II klasę.



**13 pav.** Antikūnų, susidariusių prieš I arba II ŽLA klasę, dažnio pasiskirstymas pagal ABO sistemos kraujo grupę.

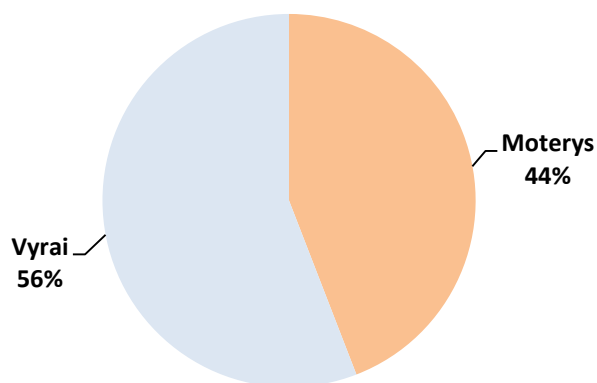
Taip pat buvo įvertinta, kokie antikūnai prieš ŽLA antigenus, yra dažnesni kiekvienoje ABO sistemos kraujo grupėje. 5 lentelėje pateikti apibendrinti duomenys, kurie gauti išanalizavus antikūnų, prieš ŽLA pagal jų rūšį, dažnius kiekvienai ABO sistemos kraujo grupei. Visi antikūnų, prieš ŽLA antigenus, dažniai pateikti prieduose. Pastebėta, kad I ir III ABO sistemos kraujo grupėms dažniausiai pasitaikė antikūnai prieš ŽLA–B27 antigeną, o III ir IV ABO sistemos kraujo grupėms prieš ŽLA–A2. I, III ir IV ABO sistemos kraujo grupėms taip pat dažniausiai nustatyti antikūnai prieš ŽLA–DQ6(1). Panašūs rezultatai gauti ir mokslininko Erikoglu kartu su kolegomis. Jie nustatė, kad jų tiriamojame populiacijoje kiekvienai ABO sistemos kraujo grupei dažniausi antikūnai yra prieš ŽLA-A2, ŽLA-B35, ŽLA-B27, ŽLA-DR11 antigenus [14].

**5 lentelė.** Apibendrinti antikūnų, susidariusių prieš tam tikrą ŽLA antigeno rūšį, ir turėjusių didžiausią dažnį kiekvienoje ABO sistemos kraujo grupėje, duomenys.

	Kraujo gr.			
	I	II	III	IV
ŽLA rūšis	ŽLA-A24(9)	ŽLA-A68(28)	ŽLA-A2	ŽLA-A2
	ŽLA-B27	ŽLA-B35	ŽLA-B27	ŽLA-B*82:02
	ŽLA-DQ6(1)	ŽLA-DQ4	ŽLA-DQ6(1)	ŽLA-B65(14)
	ŽLA-DR4	ŽLA-DR51	ŽLA-DR53	ŽLA-DQ6(1)

### 3.3. Sensitizacijos stiprumo pasiskirstymas pagal recipientų lytį

Šiame darbe buvo įvertintas ir nuo antikūnų prieš ŽLA priklausomo sensitizacijos stiprumo pasiskirstymas pagal sensitizuotų inkstų recipientų lytį. Pirmiausiai buvo nustatytas lyčių pasiskirstymas tarp sensitizuotų inkstų recipientų. Iš 14 paveikslėlyje pateikto grafiko matyti, kad daugiausiai (56 %) yra vyriškos lyties sensitizuotų inkstų recipientų (n=19). Mažiau (44 %) yra moteriškos lyties sensitizuotų inkstų recipientų (n=15).



**14 pav.** Tiriamosios sensitizuotų inkstų recipientų grupės lyties pasiskirstymas pagal dažnį.

Sensitizacijos stiprumo pasiskirstymui pagal sensitizuotų inkstų recipientų lytį įvertinti, buvo panaudoti sensitizacijos rezultatai gauti tiek nuo komplemento priklausomo limfocitotoksinio (LCT), tiek mikrosferų srauto analizės metodais. Kadangi ilgą laiką Santaros klinikų, Klinikinės imunologijos ir kraujo perpylimo laboratorijoje yra naudojamas auksiniu standartu laikomas LCT metodas, norėta įvertinti, ar ir šiuo metodu gaunami panašūs rezultatai kaip ir mikrosferų srauto analizės metodu. LCT metodo atveju sensitizaciją nurodantis PRA procentas buvo susiskirstytas į dvi tiriamas grupes: 10 – 49 % vidutinė sensitizacija ir 50 – 100 % stipri sensitizacija. Mikrosferų srauto analizės metode sensitizaciją nurodantis MFI, remiantis moksliniais tyrimais, buvo susiskirstytas į tris grupes: mažiau už 3000 MFI silpna sensitizacija, 3001 – 10000 MFI vidutinė sensitizacija bei 10001 ir daugiau MFI – stipri sensitizacija [61]. Šiuo metu nėra nustatytų ribų pagal kurias galima būtų skirstyti sensitizaciją pagal MFI į grupes. Tai sukelia problemų lyginant gautus rezultatus, nes kiekviena laboratorija gali nusistatyti savo ribas, o tai keičia rezultatus. Vienos laboratorijos silpną sensitizaciją apibrėžia iki 500 MFI, kitos iki 1000 MFI [61].

Buvo apskaičiuotas kiekvienos sensitizacijos stiprumo grupės pagal PRA dažnis inkstų recipientų lyčiai. Pagal 6 lentelės duomenis matyti, kad moteriškos lyties recipientams dažniau būdingesnė stipri sensitizacija, o vyriškos lyties – vidutinė sensitizacija. Mokslininko Pichhadze kartu su kolegomis atliktuose tyrimuose vertinant sensitizaciją pagal PRA taip pat pastebėta, kad moterims būdingesnė stipri sensitizacija [50].

**6 lentelė.** Sensitizacijos stiprumo pagal PRA pasiskirstymo dažniai atsižvelgiant į tai, kokia yra sensitizuotų inkstų recipientų lytis.

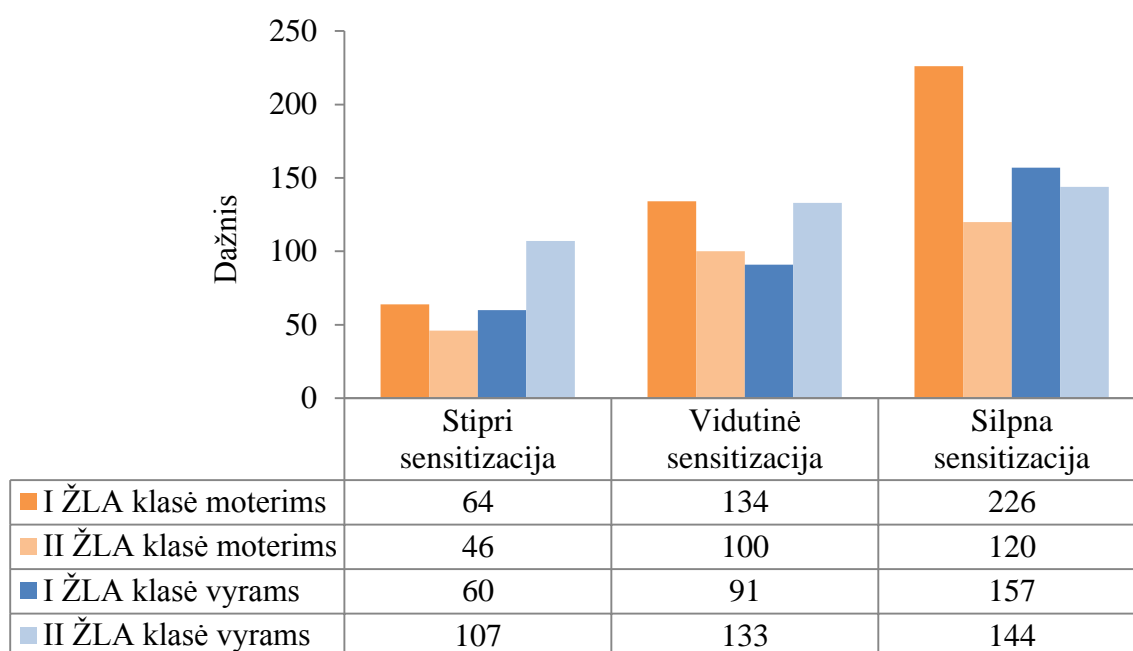
Sensitizacija pagal PRA %	Lytis	
	Moteris	Vyras
Stipri (50 – 100)	9	7
Vidutinė (10 – 49)	6	12

Atsižvelgiant į tai, kad teoriškai moterys turi didesnes galimybes nei vyrai susidurti su daugiau veiksmų, kurie paskatina sensitizaciją [5], naudojant  $\chi^2$  kvadratą buvo įvertintas galimas ryšys tarp sensitizacijos stiprumo pagal PRA ir sensitizuotų inkstų recipientų lyties. Tačiau šioje tyrimo grupėje nuo antikūnų prieš ŽLA priklausantis sensitizacijos stiprumas pagal PRA nepriklauso nuo inkstų recipientų lyties ( $p = 0,1792$ ).

Mikrosferų srauto analizės metodas leidžia sensitizacijos stiprumą įvertinti atskirai kiekvienam antikūnui, susidariusiam prieš vienos rūšies ŽLA, kitaip nei LCT metodo atveju, kuris rodo bendrą sensitizaciją tiriamajam asmeniui [13]. Todėl buvo apskaičiuotas



sensitizacijos stiprumo pagal MFI grupių dažnis kiekvienai sensitizuotų inkstų recipientų lyčiai priklausomai nuo to, prieš kurią ŽLA klasę susidarė antikūnai. Pagal 15 paveikslėlio duomenis matyti, kad tiek moterims, tiek vyrams dažniausiai antikūnai prieš I ir II ŽLA klasę susidarė esant silpnai sensitizacijai. Tokie sensitizacijos rezultatai vyrų tarpe pastebėti ir Kanados mokslininko Pichhadze kartu su kolegomis atliktuose tyrimuose, tačiau vertinant sensitizaciją pagal PRA [50]. Esant stipriai ir vidutinei sensitizacijai tiriamosios grupės moterims susidarė dažniau antikūnai prieš ŽLA I klasę, vyrų atveju – prieš ŽLA II klasę. Sensitizacijos stiprumas pagal MFI statistiškai reikšmingai ( $p=8,26 \times 10^{-6}$ ), priešingai nei sensitizacijai pagal PRA, pasiskirsto tarp sensitizuotų inkstų recipientų lyties ir ŽLA klasės. Tačiau, tokiam rezultatui galėjo daryti įtaką vien tik ŽLA klasė, prieš kurią susidarė antikūnai.



**15 pav.** Sensitizacijos stiprumo pagal MFI pasiskirstymo dažniai priklausomai nuo to, kokia yra sensitizuotų inkstų recipientų lytis bei ŽLA klasė prieš kurią susidarė antikūnai.

### 3.4. Sensitizacijos stiprumo pasiskirstymas pagal žmogaus leukocitų antigenų klases ir rūšį

Norint atmesti galimą ŽLA klasės, prieš kurią susidarė antikūnai, įtaką sensitizacijos stiprumui, buvo apskaičiuotas sensitizacijos stiprumo pagal MFI pasiskirstymo dažnis ŽLA klasėms, prieš kurias susidarė antikūnai, neatsižvelgiant į tai, kokia yra inkstų recipientų lytis. Pagal 7 lentelės duomenis matyti, kad tiek ŽLA I klasei, tiek ŽLA II klasei taip pat dažniau nustatyta silpna sensitizacija. Taip pat pastebėta, kad dažniau antikūnai, esant silpnai sensitizacijai, susidarė prieš ŽLA I klasę. Stipria sensitizacija pasižymi dažniau antikūnai

prieš ŽLA II klasės antigenus nei prieš ŽLA I klasę. Nustatytas statistiškai reikšmingas ( $p = 7,084 \times 10^{-5}$ ) pasiskirstymas tarp ŽLA klasių ir sensitizacijos stiprumo. Šių gautų rezultatų sutapimas su 3.3 skyriuje aptartais rezultatais, galėtų leisti daryti prielaidą, kad tiriamojoje grupėje sensitizacijos stiprumas nepriklauso nuo inkstų recipientų lyties.

**7 lentelė.** Sensitizacijos stiprumo pagal MFI pasiskirstymo dažniai priklausomai nuo to, prieš kurią ŽLA klasę susidarė antikūnai.

Sensitizacija pagal MFI	ŽLA klasė	
	I	II
Stipri (10001 ir >)	124	153
Vidutinė (3001 – 10000)	225	225
Silpna (< 3000)	383	264

Kadangi galimai sensitizacijos stiprumas priklauso nuo ŽLA klasės prieš kurią susidarė antikūnai, todėl taip pat buvo įvertinta, kurie antikūnai pagal ŽLA rūšį yra dažnesni skirtingo stiprumo sensitizacijai pagal MFI. 8 lentelėje pateikti apibendrinti duomenys. Visi antikūnų prieš ŽLA antigenus dažniai pagal sensitizacijos stiprumą pateikti **prieduose**. Pastebėta, kad tiek silpnai, tiek vidutinei sensitizacijai būdingesni antikūnai prieš ŽLA–A11 bei ŽLA–B35 antigenus. Antikūnai prieš ŽLA–DQ4 antigeną dažnesni esant vidutinei ir stipriai sensitizacijai. Antikūnų prieš tam tikrą ŽLA rūšį dažnio pasiskirstymas pagal sensitizacijos stiprumą yra statistiškai reikšmingas ( $p = 2,771 \times 10^{-13}$ ).

**8 lentelė.** Apibendrinti antikūnų, susidariusių prieš tam tikrą ŽLA antigeno rūšį, ir turėjusių didžiausią dažnį kiekvienai sensitizacijos stiprumo pagal MFI grupei, duomenys.

	MFI		
	Silpna	Vidutinė	Stipri
ŽLA rūšis	ŽLA-A11	ŽLA-A11	ŽLA-A2
	ŽLA-B35	ŽLA-B35	ŽLA-B7
	ŽLA-DQ8(3)	ŽLA-DQ4	ŽLA-DQ4
	ŽLA-DR16(2)	ŽLA-DR51	ŽLA-DR7

Užsienio mokslininkų atliktų panašių tyrimų rezultatai dalinai sutampa su šio tyrimo rezultatais [15,66]. Tokio tyrimo su Lietuvos populiacijos duomenimis aptikti nepavyko.

## IŠVADOS

1. Mikrosferų srauto analizės metodu nustatyta, kad tiriamojoje grupėje dažniausi antikūnai yra prieš I klasės ŽLA–A11, ŽLA–B35 bei II klasės ŽLA–DR51, ŽLA–DR15(6) ir ŽLA–DQ4 antigenus.
2. Tarp skirtingų ABO sistemos kraujo grupių dažniau nustatyti antikūnai prieš ŽLA I klasę. Didžiausiu dažniu tarp visų ABO sistemos kraujo grupių pasižymėjo antikūnai prieš ŽLA–A24(9), ŽLA–B35, ŽLA–DR4 ir ŽLA–DQ4 antigenus.
3. Nustatyta, kad sensitizacijos stiprumas tiek pagal PRA, tiek pagal MFI nepriklauso nuo sensitizuotų inkstų recipientų lyties.
4. Nustatyta, kad statistiškai reikšmingai sensitizacijos stiprumas pagal MFI pasiskirsto tarp ŽLA klasių, prieš kurias susidarė antikūnai. Tarp visų sensitizacijos stiprumo grupių dažniausiai nustatyti antikūnai prieš ŽLA–A11, ŽLA–A2, ŽLA–B7, ŽLA–B35, ŽLA–DR7, ŽLA–DR51, ŽLA–DR16(2), ŽLA–DQ8(3) ir ŽLA–DQ4 antigenus.

## REKOMENDACIJA

Mikrosferų srauto analizės metodas dėl savo pakankamai didelio jautrumo ir specifiškumo leidžia nustatyti tiek nuo komplemento priklausomus, tiek nepriklausomus IgG, kurie yra specifiški tam tikrai žmogaus leukocitų antigenų rūšiai. Tačiau susiduriama su apribojimais kaip prozono efektas, denatūravusiais antigenų epitopais, esančiais ant mikrosferų dalelių, standartizacijos nustatant MFI ribas nebuvimas. Tai gali lemti galimai klaidingus ir nesutampančius rezultatus tarp kelių tyrimų.

Todėl vertinant ir interpretuojant sensitizuoto inkstų recipiento kraujo serume susidariusių antikūnų tyrimo rezultatus gautus mikrosferų srauto analizės metodu, svarbu atsižvelgti į: rezultatus, gautus kitų antikūnų tyrimų metodų pagalba, į aloimunizuojančius veiksnius (nėštumas, ankstesnės transplantacijos, transfuzijos), rekomenduojama neatmesti antikūnų prieš ŽLA–A2, ŽLA–B7, ŽLA–DR7 ir ŽLA–DQ4 galimybės sukelti stiprią sensitizaciją bei kryžminį reaktyvumą.

Taip pat, atsižvelgus į gautus šio darbo rezultatus, rekomenduojama toliau tęsti didesnės apimties tyrimus, įvertinant galimą antikūnų prieš ŽLA ryšį tarp ABO sistemos kraujo grupių, populiacinio ypatumo ir sensitizacijos stiprumo.

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
MEDICINOS FAKULTETAS  
BIOMEDICINOS MOKSLŲ INSTITUTAS  
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR  
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

Brigita BARTKUTĖ

**Aloantikūnų prieš žmogaus leukocitų antigenus (ŽLA) nustatymas  
sensitizuotų inkstų recipientų kraujo serume naudojant mikrosferų srauto  
analizės metodą**

Magistro darbas

SANTRAUKA

Magistrinio darbo tikslas buvo nustatyti ir įvertinti aloantikūnus prieš žmogaus leukocitų antigenus (ŽLA) sensitizuotų inkstų recipientų kraujo serume panaudojant mikrosferų srauto analizės metodą, kuris yra labai jautrus ir specifiškas. Šiam tikslui įgyvendinti buvo panaudoti 34 recipientų kraujo serumai (n=60). 2013 – 2017 metų laikotarpiu gauti duomenys mikrosferų srauto analizės metodu buvo panaudoti įvertinant antikūnų dažnumą pagal inkstų recipiento lytį, ABO sistemos kraujo grupę ir sensitizacijos stiprumą, nustatytą skirtingais metodais. Atlikus statistinę analizę, nustatyta, kad dažniausiai analizuojamoje tyrimo grupėje susidarė antikūnai prieš ŽLA–A11, ŽLA–B35, ŽLA–DR51, ŽLA–DR15(2) ir ŽLA–DQ4 antigenus. Tarp visų ABO sistemos kraujo grupių dažniausiai buvo nustatyti antikūnai prieš ŽLA–A24(9), ŽLA–B35, ŽLA–DR4 ir ŽLA–DQ4 antigenus. Taip pat nustatyta, kad statistiškai reikšmingai sensitizacijos stiprumas pagal MFI pasiskirsto tarp ŽLA klasių ir rūšių, prieš kurias susidarė antikūnai, tačiau nepriklauso nuo sensitizuoto inkstų recipiento lyties.

VILNIUS UNIVERSITY  
FACULTY OF MEDICINE  
INSTITUTE OF BIOMEDICAL SCIENCES  
DEPARTMENT OF PHYSIOLOGY, BIOCHEMISTRY, MICROBIOLOGY  
AND LABORATORY MEDICINE

Brigita Bartkutė

**Detection of Human Leukocyte Antigens (HLA) Alloantibodies in  
Sensitized Renal Recipients' Blood Serum Using Microsphere-Based  
Luminex Assay**

Master's thesis

SUMMARY

The aim of this research project was to detect and evaluate alloantibodies in sensitized renal recipients' blood serum using microsphere-based Luminex assay, which is very sensitive and specific. To fulfil this aim, we used 34 recipients' blood serum (n=60). The data collected from 2013 until 2017 years with microsphere-based Luminex assay was used for evaluation of antibodies frequency by renal recipient gender, ABO system blood group, and intensity of sensitization evaluated with different methods. After statistical analysis we identify, that the most frequent antibodies in analysis group was against HLA-A11, HLA-B35, HLA-DR51, HLA-DR15(2), and HLA-DQ4 antigens. Between all ABO system blood groups the highest frequency of HLA antibodies was of HLA-A24(9), HLA-B35, HLA-DR4, and HLA-DQ4 antigens. Also, we identify, that intensity of sensitization by MFI statistically significant distribute between HLA classes and types, but do not depend from gender of renal recipient.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abbas Ak, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 6th edition. Philadelphia; Elsevier. 2005.
2. Abbas Ak, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 9th edition. Philadelphia; Elsevier. 2017.
3. Abramowicz D, Cochat P, Claas F, Heemann U, Pascual J, Harden P et al. European renal best practice guideline on kidney donor and recipient evaluation and perioperative care. *Nephrol Dial Transplant*. 2015; 30: 1790 – 97.
4. Ajaimy M, Lubetzky M, Kamal L, Colovai A, de Boccardo G, Akalin E. Pregnancy in sensitized kidney transplant recipients: a single centre experience. *Clin transplant*. 2016; 30: 791 – 95.
5. Akgul SU, Ciftci HS, Temurhan S, Caliskan Y, Bayraktar A, Tefik T et al. Association between HLA antibodies and different sensitization events in renal transplant candidates. *Transplant Proc*. 2017; 49: 425 – 29.
6. Akiyoshi T, Hirohashi T, Alessandrini A et al. Role of complement and NK cells in antibody mediated rejection. *Hum Immunol*. 2012; 73: 1226 – 1232.
7. Basturk B, Kantaroglu B, Kavuzlu M, Sariturk C. The most common HLA alleles and anti-HLA antibodies to know for virtual cross-match. *Exp Clin Transplant*. 2016; 3: 53 – 55.
8. D'Orsogna L, Heuvel H, Kooten C, Heidt S, Class FHJ. Infectious pathogens may trigger specific allo-HLA reactivity via multiple mechanisms. *Immunogenetics*. 2017; 69: 631 – 641.
9. Dausset J. Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol*. 1958; 20: 156 – 166.
10. Davis S, Cooper JE. Acute antibody mediated rejection in kidney transplantation recipients. *Transplant Rev*. 2017; 31: 47 – 54.
11. Delville M, Charreau B, Rabant M, Legendre C, Anglicheau D. Pathogenesis of non-HLA antibodies in solid organ transplantation: where do we stand. *Hum Immunol*. 2016; 77: 1055 – 1062.
12. Dendrou CA, Petersen J, Rossjohn J, Fugger L. HLA variation and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018 01; online.
13. Ellis TM. Interpretation of HLA single antigen bead assays. *Transplant Rev*. 2013; 27: 108 – 111.
14. Erikoglu M, Büyükdogan M, Cora T. The Relationship Between HLA Antigens and Blood Groups. *Eur J Gen Med*. 2011; 8: 65 – 8.

15. Fu Q, Wang C, Zeng W, Liu L. The correlation of HLA allele frequencies and HLA antibodies in sensitized kidney transplantation candidates. *Transplant Proc.* 2012; 44(1): 217 – 221.
16. Gebel HM, Liwski RS, Bray RA. Technical aspects of HLA antibody testing. *Curr Opin Organ Transplant.* 2013; 18: 455 – 462.
17. Ghanta M, Dreier J, Jacob R and Lee I. Overview of immunosuppression in renal transplantation. Chapter 10. In: Rath T. *Current Issues and future direction in kidney transplantation.* London: InTechOpen, 2013.
18. Gombos P, Opelz G, Scherer S, Morath C, Zeier M, Schemmer P et al. Influence of Test Technique on Sensitization Status of Patients in the Kidney Transplant Waiting List. *American Journal of Transplantation* 2013; 13: 7075 – 7082.
19. Hickey MJ, Valenzuela NM, Reed EF. Alloantibody generation and effector function following sensitization to human leukocyte antigen. *Front Immunol.* 2016; 7: 30 – 43.
20. Higgins R, Lowe D, Daga S, Hathaway M, Williams C, Lam FT, Kashi H et al. Pregnancy-induced HLA antibodies respond more vigorously after renal transplantation than antibodies induced by prior transplantation. *Hum Immunol.* 2015; 76: 546 – 552.
21. Howell WM, Carter V, Clark B. The HLA system: immunobiology, HLA typing, antibody screening and crossmatching techniques. *J Clin Pathol.* 2010; 63: 387 – 390.
22. Ingulli E. Mechanism of cellular rejection in transplantation. *Pediatr Nephrol.* 2010; 25: 61 – 74.
23. Yabu JM, Anderson MW, Kim D, Brandbury BD, Lou CD, Petersen J, Rossert J et al. Sensitization from transfusion in patients awaiting primary kidney transplant. *Nephrol Dial Transplant.* 2013; 28: 2908 – 2918.
24. Yang JY, Sarwal MM. Transplant genetics and genomics. *Nat Rev Genet.* 2017; 18: 309 – 326.
25. Jordan SC, Choi J, Vo A. Kidney transplantation in highly sensitized patients. *Br Med Bull.* 2015; 114: 113 – 125.
26. Karmarkar S and Natarajan A. Kidney transplantation. *Anaesth Intensive Care Med.* 2012; 13: 285 – 291.
27. Katalinic N, Fucak M, Crnic T, Curkovic M, Starcevic A, Balen S. Pretransplantation monitoring of HLA antibodies by complement dependent cytotoxicity and Luminex-based assays. *Wien Klin Wochenschr.* 2017; 129: 33 – 37.
28. Kawai T, Sachs DH, Sykes M, Cosimi AB. HLA-mismatches renal transplantation without maintenance immunosuppression. *N Engl J Med.* 2013; 368: 1850 – 52.



29. Kim K, Vo A, Jordan SC. Transplantation in highly HLA-sensitized patients: challenges and solutions. *Dovepress*. 2014; 6: 99 – 107.
30. Konvalinka A and Tinckam K. Utility of HLA antibody testing in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2015; 26: 1489 – 1502.
31. Kučinskis V. Genomo įvairovė: lietuviai Europoje. Pirmas leidimas. Vilnius: Spalvų šalis. 2004.
32. Lachmann N, Todorova K, Schulze H, Schoenemann C. Luminex and its applications for solid organ transplantation, hematopoietic stem cell transplantation and transfusion. *Transfus Med Hemother*. 2013; 40: 182 – 89.
33. Lim WH, Wong G, Heidt S and Claas FHJ. Novel aspects of epitope matching and practical application in kidney transplantation. *Kidney transplantation*. 2018; 93: 314 – 324.
34. Liu P, Souma T, Jin J et al. A novel method for anti-HLA antibody detection using personalized peptide arrays. *Transplant Direct*. 2016; 2: e109.
35. Liwski RS and Gebel HM. Of cells and microparticles: assets and liabilities of HLA antibody detection. *Transplantation*. 2018; 102: S1 – S6.
36. luminexcorp.com [internetinė svetainė]. Texas: Biotechnology engineering company; sukurta 2006 [atnaujinta 2018; cituota 2018 03 24]. Adresas: <https://www.luminexcorp.com/>
37. Ma KK, Petroff MG, Coscia LA, Armenti VT, Waldorf KM. Pregnancy after solid organ transplantation. *Chimerism*. 2013; 4: 71 – 77.
38. Malhotra P. Immunology of transplant rejection. *Medscape* [tęstinis leidinys internete]. 2015 [cituota 2017 11 20]. Adresas: <https://emedicine.medscape.com/article/432209-overview>
39. Michielsen LA, 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.
40. Middleton D, Jones J, Lowe D. Nothing's perfect: The art of defining HLA-specific antibodies. *Transplant Immunology*. 2014; 30(4): 115 – 121.
41. Moffat-Bruce SD. Induction of tolerance. *Medscape* [tęstinis leidinys internete]. 2015 [cituota 2017 11 05]. Adresas: <https://emedicine.medscape.com/article/430449-overview>
42. Montgomery RA, Lonze BE, King KE et al. Desensitization in HLA-incompatible kidney recipients and survival. *N Engl J Med*. 2011; 365: 318 – 326.

43. Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vázquez LA, Lee J, El-Awar N, Alberu J. Natural human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. *Transplant*. 2008; 86: 1111 – 1115.
44. Mulley WR and Kanellis J. Understanding crossmatch testing in organ transplantation: a case-based guide for the general nephrologist. *Nephrology*. 2011; 16: 125 – 133.
45. Nacionalinis transplantacijos biuras prie SAM [internetinė svetainė]. Vilnius: Lietuvos Respublikos vyriausybė. [cituota 2018 03 02]. Adresas: <http://ntb.lrv.lt/>
46. Noble JA and Erlich HA. Genetics of type 1 diabetes. *Cold Spring Harb Persp Med*. 2012; 2(1): a0077732.
47. Obrador GT and Macdougall C. Effect of red cell transfusions in future kidney transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013; 8: 852 – 860.
48. Paul TR, Willicombe M, Hakim N, Taube D, Papalois V. Renal transplantation. *BMJ*. 2011; 343: d7300.
49. Picascia A, Grimaldi V, Napoli C. From HLA Typing to anti-HLA antibody detection and beyond: the road ahead, *Transplant Rev*. 2016.
50. Pichhadze RS, Tinckam KJ, Laupacis A., Logan AG, Beyene J, Kim SJ. Immune Sensitization and Mortality in Wait-Listed Kidney Transplant Candidates. *J Am Soc Nephrol* 2016; 27: 570 – 8.
51. Pratschke J, Dragun D, Hauser IA, Horn S, Mueller TF, Schemmer D, Thaiss F. Immunological risk assessment: the key to individualized immunosuppression after kidney transplantation. *Transplant Rev*. 2016; 30: 77 – 84.
52. Ramparsad N. Establishment of a flow cytometric assay in the setting of renal transplant for T and B cell crossmatching [<https://emedicine.medscape.com/article/430449-overviewertacija>]. Johannesburg: University of the Witwatersrand, 2012.
53. Ravindranath MH, Kaneku H, El-Awar N, Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI. Antibodies to HLA-E in nonalloimmunized males: pattern of HLA-Ia reactivity of anti-HLA-E positive sera. *J Immunol*. 2010; 185: 1935 – 1948.
54. Rees L, Kim JJ. HLA sensitisation: can it be prevented? *Pediatr Nephrol*. 2015; 30: 577 – 587.
55. Reynolds BC, Tinckam KJ. Sensitization assesment before kidney transplantation. *Transplant Rev*. 2016; online.
56. Rigby MR, Trexler AM, Pearsin TC, Larsen CP. CD28/CD154 Blockade Prevents Autoimmune Diabetes by Inducing Nondeletional Tolerance After Effector T-Cell Inhibition and Regulatory T-Cell Expansion. *Diabetes*. 2008; 57: 2672 – 2683.
57. Sachs DH. Transplant tolerance. *Arch Surg*. 2011; 146: 501 – 505.

58. Shaley I, Selzner N, Shyu W, Grant D, Levy G. Role of regulatory T cells in the promotion of transplant tolerance. *Liver Transpl.* 2012; 18: 761 – 770.
59. Stanevičienė A, Vilkevičienė R, Malickaite R. HLA antigen distribution in the Lithuanian National bone marrow registry. *Studentų mokslinės draugijos LX konferencija*; 2008; Vilnius.
60. Susal C and Opelz G. Transplantation: desensitization and survival in kidney transplant recipients. *Nat Rev Nephrol.* 2017; 13: 196 – 198.
61. Susal C, Roelen DL, Fischer G, Campos EF, Gerbase-DeLima M, Honger G, et al. Algorithms for the determination of unacceptable HLA antigen mismatches in kidney transplant recipients. *Tissue Antigens.* 2013; 82: 83 – 92.
62. Tait BD, Hudson F, Brewin G, Cantwell L, Holdsworth R. Solid phase HLA antibody detection technology – challenges in interpretation. *Tissue antigens.* 2010; 76: 87 – 95.
63. Tambur AR and Claas FHJ. HLA epitopes as viewed by antibodies: what is it all about? *A J Transplant.* 2015; 15: 1148 – 1154.
64. Tinckam K. Histocompatibility methods. *Transplant Rev.* 2009; 23: 80 – 93.
65. Tongio MM, Falkenrodt A, Mitsuishi Y, Urlacher A, Bergerat JP, Noth ML, Mayer S. Natural HLA antibodies. *Tissue antigens.* 1985; 26: 271 – 285.
66. Uygun D, Ozbay M, Sallakci N, Kilinc Y, Filiz S, Yegin O. Human leukocyte antigen frequencies in highly sensitized patients. *Turk J Immunol.* 2015; 3: 11 – 14.
67. Wang J, Meade JR, Brown NK, Weidner JG, Marino SR. EDTA is superior to DTT treatment for overcoming the prozone effect in HLA antibody testing. *HLA.* 2017; 89: 82 – 89.
68. Wiseman AC. Immunosuppressive medications. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016; 11: 332 – 343.
69. Wood KJ and Goto R. Mechanisms of rejection: current perspectives. *Transplant.* 2012; 93: 1 – 10.
70. Zhang Q and Reed EF. The importance of non-hla antibodies in transplantation. *Nat Rev Nephrol.* 2016; online.

## Priedai

1 priedas. Antikūnų prieš ŽLA pasiskirstymas kiekvienoje ABO sistemos kraujo grupėje.

ŽLA rūšis	Kraujo gr.			
	I	II	III	IV
ŽLA-A1	5	1	1	0
ŽLA-A11	15	6	2	1
ŽLA-A2	6	3	3	3
ŽLA-A203	2	1	1	1
ŽLA-A23(9)	9	1	0	1
ŽLA-A24(9)	17	2	0	0
ŽLA-A2403	14	1	0	0
ŽLA-A25(10)	2	4	1	0
ŽLA-A26(10)	1	3	1	0
ŽLA-A29(19)	4	3	2	0
ŽLA-A3	6	1	1	0
ŽLA-A30(19)	2	2	1	0
ŽLA-A31(19)	4	3	1	0
ŽLA-A32(19)	1	1	1	0
ŽLA-A33(19)	2	3	2	0
ŽLA-A34(10)	1	4	1	0
ŽLA-A36	4	0	1	0
ŽLA-A43	1	3	1	0
ŽLA-A66(10)	6	5	2	2
ŽLA-A68(28)	2	10	2	0
ŽLA-A69(28)	0	3	1	0
ŽLA-A74(19)	1	0	1	0
ŽLA-A80	3	0	1	0
ŽLA-B*82:02	9	4	1	2
ŽLA-B13	10	2	2	0
ŽLA-B18	1	8	0	0
ŽLA-B27	14	2	3	0
ŽLA-B2708	7	4	2	1
ŽLA-B35	11	16	0	0
ŽLA-B37	2	5	0	1
ŽLA-B38(16)	2	5	0	1
ŽLA-B3901	1	8	0	0
ŽLA-B41	2	7	0	0
ŽLA-B42	6	3	1	1
ŽLA-B44(12)	11	2	0	0
ŽLA-B45(12)	5	4	0	0
ŽLA-B46	3	5	1	1
ŽLA-B47	7	1	1	1
ŽLA-B48	6	2	1	1
ŽLA-B49(21)	5	6	0	1
ŽLA-B50(21)	5	8	0	0
ŽLA-B51(5)	2	5	0	0
ŽLA-B52(5)	4	5	1	0
ŽLA-B53	5	5	0	0
ŽLA-B54(22)	7	8	1	1
ŽLA-B55(22)	6	7	1	1

\*Raudona spalva pažymėtas didžiausias prieš ŽLA antigeną susidariusių antikūnų dažnis. 44

ŽLA rūšis	Kraujo gr.			
	I	II	III	IV
ŽLA-B56(22)	6	8	2	1
ŽLA-B57(17)	7	4	1	1
ŽLA-B58(17)	5	5	1	1
ŽLA-B59	2	4	0	0
ŽLA-B60(40)	7	4	1	0
ŽLA-B61(40)	5	4	1	0
ŽLA-B62(15)	4	8	1	0
ŽLA-B63(15)	8	5	1	0
ŽLA-B64(14)	2	7	0	0
ŽLA-B65(14)	2	4	0	2
ŽLA-B67	5	4	1	0
ŽLA-B7	7	4	1	1
ŽLA-B703	6	3	1	0
ŽLA-B71(70)	3	8	0	0
ŽLA-B72(70)	4	9	0	0
ŽLA-B73	6	2	1	0
ŽLA-B75(15)	4	8	0	0
ŽLA-B76(15)	5	8	0	0
ŽLA-B77(15)	4	5	0	0
ŽLA-B78	3	8	0	0
ŽLA-B8	7	6	0	0
ŽLA-B81	7	3	1	1
ŽLA-DQ2	9	18	3	0
ŽLA-DQ4	17	58	5	0
ŽLA-DQ5(1)	18	13	0	0
ŽLA-DQ6(1)	34	25	7	1
ŽLA-DQ7(3)	17	20	2	0
ŽLA-DQ8(3)	23	23	2	0
ŽLA-DQ9(3)	19	25	2	0
ŽLA-DR1	6	14	0	0
ŽLA-DR10	7	6	5	0
ŽLA-DR103	4	6	0	1
ŽLA-DR11(5)	13	2	1	1
ŽLA-DR12(5)	6	3	1	0
ŽLA-DR13(6)	11	3	2	0
ŽLA-DR14(6)	4	2	4	0
ŽLA-DR1404	4	0	4	0
ŽLA-DR15(2)	12	14	1	0
ŽLA-DR16(2)	14	9	1	1
ŽLA-DR17(3)	3	2	1	1
ŽLA-DR18(3)	6	0	1	0
ŽLA-DR2	0	4	0	0
ŽLA-DR4	17	1	1	0
ŽLA-DR51	13	16	0	0
ŽLA-DR52	11	6	3	1
ŽLA-DR53	3	1	6	0
ŽLA-DR7	4	7	2	1
ŽLA-DR8	4	1	1	1
ŽLA-DR9	8	12	1	0

\*Raudona spalva pažymėtas didžiausias prieš ŽLA antigeną susidariusių antikūnų dažnis.

2 priedas. Antikūnų prieš ŽLA pasiskirstymas pagal sensitizacijos stiprumą pagal MFI.

ŽLA rūšis	Sensitizacija pagal MFI		
	Silpna	Vidutinė	Stipri
ŽLA-A1	4	2	1
ŽLA-A11	12	10	2
ŽLA-A2	9	0	6
ŽLA-A203	1	1	3
ŽLA-A23(9)	4	3	4
ŽLA-A24(9)	7	9	3
ŽLA-A2403	7	6	2
ŽLA-A25(10)	5	0	2
ŽLA-A26(10)	3	0	2
ŽLA-A29(19)	5	1	3
ŽLA-A3	3	4	1
ŽLA-A30(19)	2	1	2
ŽLA-A31(19)	5	2	1
ŽLA-A32(19)	2	0	1
ŽLA-A33(19)	3	2	2
ŽLA-A34(10)	4	0	2
ŽLA-A36	2	3	0
ŽLA-A43	2	1	2
ŽLA-A66(10)	8	3	4
ŽLA-A68(28)	9	1	4
ŽLA-A69(28)	3	0	1
ŽLA-A74(19)	0	1	1
ŽLA-A80	2	0	2
ŽLA-B*82:02	7	5	4
ŽLA-B13	10	4	0
ŽLA-B18	6	2	1
ŽLA-B27	9	6	4
ŽLA-B2708	5	6	3
ŽLA-B35	11	13	3
ŽLA-B37	6	1	1
ŽLA-B38(16)	6	1	0
ŽLA-B3901	6	3	0
ŽLA-B41	7	1	1
ŽLA-B42	2	4	5
ŽLA-B44(12)	7	3	3
ŽLA-B45(12)	6	1	3
ŽLA-B46	4	6	0
ŽLA-B47	3	6	1
ŽLA-B48	9	0	1
ŽLA-B49(21)	6	6	0
ŽLA-B50(21)	7	6	0
ŽLA-B51(5)	2	4	1
ŽLA-B52(5)	5	4	1
ŽLA-B53	4	5	1
ŽLA-B54(22)	8	7	2
ŽLA-B55(22)	7	5	3
ŽLA-B56(22)	8	6	3
ŽLA-B57(17)	7	3	3

\*Raudona spalva pažymėtas didžiausias prieš ŽLA antigeną susidariusių antikūnų dažnis.

ŽLA rūšis	Sensitizacija pagal MFI		
	Silpna	Vidutinė	Stipri
ŽLA-B58(17)	9	1	2
ŽLA-B59	4	1	1
ŽLA-B60(40)	5	5	2
ŽLA-B61(40)	3	6	1
ŽLA-B62(15)	9	4	0
ŽLA-B63(15)	7	5	2
ŽLA-B64(14)	7	1	1
ŽLA-B65(14)	5	2	1
ŽLA-B67	4	3	3
ŽLA-B7	4	3	6
ŽLA-B703	3	3	4
ŽLA-B71(70)	6	5	0
ŽLA-B72(70)	8	5	0
ŽLA-B73	5	4	0
ŽLA-B75(15)	7	4	1
ŽLA-B76(15)	11	1	1
ŽLA-B77(15)	5	4	0
ŽLA-B78	6	4	1
ŽLA-B8	10	2	1
ŽLA-B81	5	4	3
ŽLA-DQ2	2	15	13
ŽLA-DQ4	16	36	28
ŽLA-DQ5(1)	5	11	15
ŽLA-DQ6(1)	12	28	27
ŽLA-DQ7(3)	15	9	15
ŽLA-DQ8(3)	24	13	11
ŽLA-DQ9(3)	15	16	15
ŽLA-DR1	8	12	0
ŽLA-DR10	12	4	2
ŽLA-DR103	5	6	0
ŽLA-DR11(5)	14	0	3
ŽLA-DR12(5)	7	2	1
ŽLA-DR13(6)	9	5	2
ŽLA-DR14(6)	7	1	2
ŽLA-DR1404	7	1	0
ŽLA-DR15(2)	18	8	1
ŽLA-DR16(2)	19	5	1
ŽLA-DR17(3)	4	3	0
ŽLA-DR18(3)	5	1	1
ŽLA-DR2	0	4	0
ŽLA-DR4	16	3	0
ŽLA-DR51	12	15	2
ŽLA-DR52	10	9	2
ŽLA-DR53	2	6	2
ŽLA-DR7	5	4	5
ŽLA-DR8	4	0	3
ŽLA-DR9	11	8	2

\*Raudona spalva pažymėtas didžiausias prieš ŽLA antigeną susidariusių antikūnų dažnis.

## **Padėka**

Nuoširdžiai dėkoju savo vadovei dr. Laimutei Jurgauskienei už suteiktą galimybę atlikti magistro baigiamąjį darbą Vilniaus Universiteto, Santaros klinikų, Klinikinės imunologijos ir kraujo perpylimo laboratorijoje. Taip pat dėkoju už neišsenkančią kantrybę, naudingus patarimus bei suteiktas žinias rengiant magistro baigiamąjį darbą.

Dėkoju Vilniaus Universiteto, Santaros klinikų, Klinikinės imunologijos ir kraujo perpylimo laboratorijos darbuotojams už atliktus tyrimus bei pagalbą įsisavinant naujus metodus.