

# Imunobiologija presađivanja bubrega

## Immunobiology of renal transplantation

Zlatko Trobonjača\*<sup>1</sup>, Stela Živčić-Ćosić<sup>2</sup>, Jasna Lisjak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zavod za fiziologiju i imunologiju,  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

<sup>2</sup>Zavod za nefrologiju i dijalizu,  
Klinika za internu medicinu,  
Klinički bolnički centar Rijeka,  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

Prispjelo: 12. 8. 2010.

Prihvaćeno: 20. 9. 2010.

**Sažetak.** Bubrežni presadak se u pravilu dobiva od genski neidentičnog darivatelja organa, što pobuđuje imunوسي sustav primatelja na razvoj transplantacijske reakcije. Ova reakcija usmjerena je prvenstveno na strane MHC molekule, ali i na druge nepodudarne jake i slabe tkivne antigene. Intenzitet imunosti odgovora određuju čimbenici darivatelja, prvenstveno izražaj nepodudarnih HLA antigena i prisustvo antigen predložnih stanica u presatku, dok je među čimbenicima primatelja najvažnija ranija senzibilizacija i razvoj protutijela na ABO i HLA antigene. U ovom radu opisane su suvremene spoznaje o kliničkim značajkama i temeljnim imunosti mehanizmima transplantacijske reakcije, koje čine osnovu za provođenje imunosti supresivnog liječenja kod presađivanja bubrega.

**Ključne riječi:** HLA sustav, imunobiologija presađivanja, transplantacija bubrega, transplantacijska reakcija

**Abstract.** Renal transplants are usually received from genetically non-identical donors, which induces the recipient's immune system to develop a transplantation reaction. This reaction is primarily directed against foreign MHC molecules, but also to other incompatible strong and weak tissue antigens. The intensity of the immune response depends on donor-dependent factors, primarily the expression of incompatible HLA antigens and the presence of antigen presenting cells in the allograft. Among recipient's factors, the most important is an earlier sensitization and development of antibodies against ABO and HLA antigens. In this paper we summarize the recent knowledge on clinical features and basic immune mechanisms of the transplantation reaction, which represents the basis for immunosuppressive treatment for renal transplantation.

**Key words:** immunobiology of transplantation, kidney transplantation, MHC, transplantation reaction

Adresa za dopisivanje:

\*Prof. dr. sc. Zlatko Trobonjača

Zavod za fiziologiju i imunologiju

Medicinski fakultet

Sveučilište u Rijeci

Braće Branchetta 20

51 000 Rijeka

e-mail: tzlatko@medri.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

## UVOD

Osnovna zadaća imunskog sustava, koji je sastavljen od različitih tipova stanica i mnoštva humoralnih čimbenika, jest obrana od prodora stranih antigena u organizam. Da bi ispunio ovu zaštitnu ulogu, imunski sustav posjeduje mogućnost specifičnog razlikovanja "vlastitog" od "stranog", te pokretanja mehanizama nespecifične i specifične imunodne reakcije, usmjerene prema eliminaciji stranog antigena. Budući da se bubrežni presadak u pravilu uzima od genski neidentičnog darivatelja, pokretanje ovih imunskih mehanizama dovodi do transplantacijske reakcije. Ova reakcija usmjerena je prvenstveno na strane MHC molekule, te na druge nepodudarne tkivne antigene, poput ABO antigena.

## ABO PODUDARNOST

Antigeni ABO krvnih grupa jaki su antigeni koji se nalaze na svim tkivima, pa kod presađivanja bubrega nepodudarne krvne grupe obično dovode do ireverzibilnog hiperakutnog odbacivanja. Stoga se odabire primatelj koji je podudaran po ABO krvnoj grupi, uz poštivanje transfuzijskih načela općeg darivatelja i općeg primatelja krvi. U bolesnika na dijalizi koji su primali transfuzije krvi česta je senzibilizacija na eritrocitne antigene sa stvaranjem iregularnih antieritrocitnih protutijela<sup>1</sup>. Mogućnost nastanka ovih protutijela obično se smanjuje određivanjem fenotipiziranog panela dobrovoljnih darivatelja krvi (određivanje krvnih grupa i podgrupa) i davanjem krvi bolesnicima koja je podudarna u što većem broju eritrocitnih krvnih grupa. Uvođenje liječenja eritropoetinom značajno je poboljšalo rezultate liječenja, budući da se smanjila potreba za transfuzijama krvi, međutim, učinjena su i uspješna presađivanja bubrega ABO nepodudarnih darivatelja, ali uz prethodno odstranjenje primateljnih izoaglutinina krvnih grupa plazmaferezom ili imunoadsorpcijom, a često i uz splenektomiju. Razvoj novijih imunosupresivnih lijekova omogućio je primjenu kombinacije plazmafereze, citomegalovirusnog hiperimunskog globulina (CMVIG), intravenskih imunoglobulina (IVIG) i/ili anti-CD20 protutijela (rituksimab), umjesto splenektomije<sup>1,2</sup>. Izostanak hiperakutnog odbacivanja bubrega u ABO nepo-

dudarnih presađivanja bubrega ispitivao je i G. Opelz u *Collaborative Transplant Study* (CTS) što je pratila više od 300.000 presađivanja organa u transplantacijskim centrima širom svijeta (među njima i u Rijeci i Zagrebu) od 1982. godine. Utvrđeno je da pripadnici bijele rase s krvnom grupom A i podgrupom A<sub>2</sub> (oko 20 %) imaju manju zastupljenost antigena A na endotelu presatka, što omogućuje sigurno presađivanje njihovih bubrega primateljima krvne grupe O ili B s niskim prijeoperacijskim titrom anti-A izoaglutinina<sup>1-6</sup>.

Presađivanje tkivno nepodudarnog bubrežnog presatka u primatelja izaziva pokretanje transplantacijske reakcije usmjerene na odbacivanje presatka. Ovu imunsku reakciju posreduje čitav niz nepodudarnih jakih i slabih tkivnih antigena. Među njima dominantan utjecaj na preživljavanje bubrežnog presatka imaju ABO i HLA podudarnost između primatelja i darivatelja.

## HLA PODUDARNOST

Brojne studije pokazuju da je utjecaj podudarnosti HLA (humani leukocitni antigeni) na preživljavanje bubrežnog presatka dominantan. Neovisno o tome radi li se o presađivanju bubrega od živog ili umrlog darivatelja, učestalost ranih reakcija odbacivanja raste sa svakim dodatnim nepodudarnim HLA antigenom između darivatelja i primatelja<sup>7-10</sup>. Ta spoznaja dovela je do stvaranja nacionalnih lista čekanja s ciljem presađivanja bubrega primatelju koji se najviše podudara. U polimorfnom HLA sustavu prevladavajući utjecaj na ishod presađivanja imaju HLA-DR antigeni, zatim slijede HLA-B antigeni te HLA-A antigeni. Više od 30 godina za određivanje jakih leukocitnih antigena (tipizacija tkiva) koristila se serološka metoda – test mikrocitotoksičnosti koji su 1964. razvili Terasaki i McClelland<sup>11</sup>. Budući da su antiserumi koji se u ovoj metodi koriste kao reaktanti rijetko monospecifični, za precizno HLA tipiziranje potrebno je koristiti nekoliko antiseruma, što dodatno komplicira izvođenje postupka. Zbog toga se danas za određivanje HLA antigena koristi znatno preciznija DNK (DNK = deoksiribonukleinska kiselina) metoda<sup>12</sup>.

## TESTIRANJE PODUDARNOSTI IZMEĐU PRIMATELJA I DARIVATELJA

Prije presađivanja bubrega potrebno je, pored HLA tipizacije primatelja i darivatelja, ispitati postojanje limfocitotoksičnih protutijela protiv leukocitnih antigena u primatelja. Ispitivanje se najčešće izvodi testom limfocitotoksičnosti ovisne o komplementu na panelu limfocita darivatelja krvi dotične populacije stanovništva. Ovom pretragom utvrđena protutijela (engl. *screening*) nazivaju se panel-reaktivna protutijela (PRA, engl. *panel reactive antibodies*). Test se izvodi četiri puta godišnje u svih bolesnika na listi čekanja za presađivanje bubrega. PRA se mogu stvoriti nakon transfuzije krvnih pripravaka, ranijeg presađivanja organa ili tijekom trudnoće. Da bi se izbjegla senzibilizacija na leukocitne antigene, u bolesnika na dijalizi anemiju treba liječiti eritropoetinom, a u slučaju potrebe za transfuzijom primijeniti filtriranu krv iz koje su odstranjeni leukociti. Križna proba, koju je razvio Terasaki, završna je provjera postojanja antidonorskih protutijela u primatelja. Ovaj test izvodi se neposredno prije transplantacije, miješanjem seruma primatelja s limfocitima darivatelja koji su izolirani iz limfnog čvora ili slezene. Prisustvo citotoksičnih IgG anti-HLA protutijela protiv darivatelja kontraindikacija je za presađivanje bubrega<sup>8</sup>.

U planiranju presađivanja bubrega od živog darivatelja, tradicionalno su u evaluaciji podudarnosti parova darivatelj-primatelj korišteni testovi stanicama posredovane limfolize (CML, engl. *cell-mediated lympholysis*) i reakcije pomiješanih limfocita (MLR, engl. *mixed lymphocyte reaction*). U tim testovima stanice darivatelja se inaktiviraju, a zatim pomiješaju s limfocitima primatelja. Aloreaktivnost limfocita primatelja određuje se stupnjem proliferacije stanica. CML test mjeri reaktivnost citotoksičnih limfocita T prema nepodudarnim darivateljevim HLA antigenima razreda I (direktni put prepoznavanja antigena), a MLR test mjeri odgovor primateljelih limfocita na nepodudarne HLA antigene razreda II na leukocitima darivatelja (direktni i indirektni put prepoznavanja antigena). Ovim *in vitro* testovima pokušava se predvidjeti *in vivo* imunosna reakcija koja bi se mogla razviti nakon presađivanja bubrega. No, korisnost ovih te-

stova ograničena je jer često ne koreliraju s kliničkim odbacivanjem<sup>13</sup>.

## TRANSPLANTACIJSKA (IMUNOSNA) REAKCIJA

Transplantacijsku reakciju možemo podijeliti na hiperakutnu, akceleriranu akutnu, akutnu i kroničnu. Hiperakutna reakcija odbacivanja nastaje ubrzo nakon postavljanja vaskularnih anastomoza, a posredovana je citotoksičnim protutijelima IgG protiv HLA molekula razreda I, kao posljedica ranije senzibilizacije primatelja. Ona dovodi do opsežne vaskularne tromboze presatka koji postaje mlohav ili cijanotičan i tvrd, a može i rupturirati. Akcelerirana akutna reakcija odbacivanja javlja se u prvom tjednu, a nakon prvih 24 sata od presađivanja. Ona je najvjerojatnije posljedica odgođenog imunosnog odgovora na raniju senzibilizaciju na HLA antigene, a u reakciji, osim protutijela, sudjeluju i stanični mehanizmi. Hiperakutna i akcelerirana akutna reakcija odbacivanja danas su, zbog rutinskog izvođenja križne probe prije presađivanja te poštivanja ABO podudarnosti, postale rijetkost. Akutna reakcija odbacivanja može biti posredovana stanicama i/ili protutijelima. Stanicama posredovana reakcija javlja se najčešće u prva tri mjeseca, a nakon prvog tjedna od presađivanja, za razliku od protutijelima posredovane reakcije odbacivanja koja se javlja ranije, većinom u prva tri tjedna nakon presađivanja, i to osobito u bolesnika senzibiliziranih na HLA antigene. Umjesto kronične reakcije odbacivanja danas se više govori o kroničnoj nefropatiji presatka, budući da pored imunosnih uključuje i neimunosne čimbenike koji uzrokuju oštećenje presatka<sup>14-16</sup>.

Transplantacijska reakcija je imunosna reakcija, usmjerena prvenstveno prema molekulama glavnog sustava tkivne podudarnosti MHC (engl. *major histocompatibility complex*) i drugim nepodudarnim antigenima presatka. MHC molekule izražene su na površini stanica alogeničnog tkiva i proizvod su gena smještenih na kratkom kraku šestog kromosoma, koji su dio kompleksa glavnog sustava tkivne podudarnosti MHC, u čovjeka nazvan i HLA sustav. Geni koji kodiraju za MHC molekule (MHC antigeni) izražavaju se kodominantno i nasljeđuju prema Mendelovim pravilima. MHC sustav pokazuje dva osnovna obilježja, poligenizam i polimorfizam. Poligenizam se očitu-

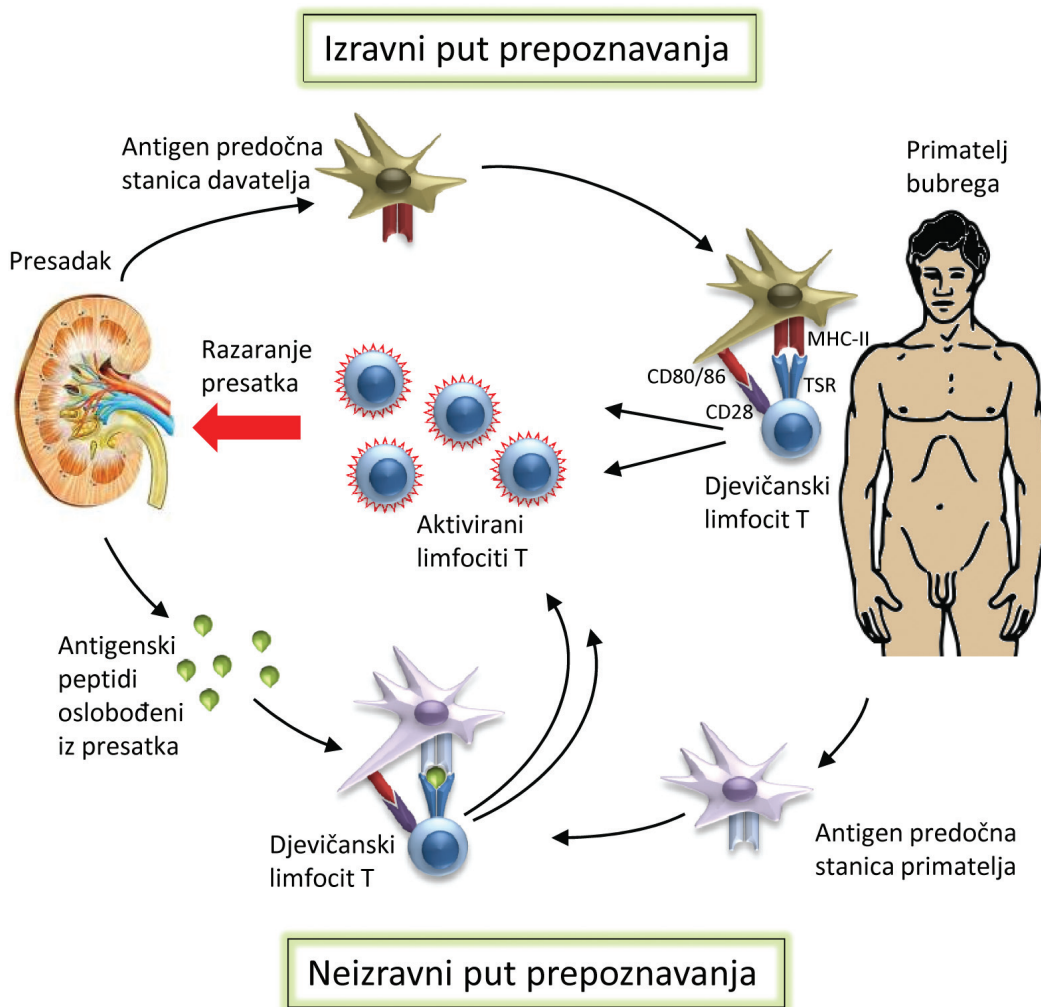
je u činjenici da je MHC genotip određen sa šest različitih genskih lokusa (šest različitih MHC molekula). Postoje MHC molekule razreda I (HLA-A, HLA-B i HLA-C lokusi) i molekule razreda II (HLA-DP, HLA-DQ i HLA-DR lokusi) koje se razlikuju po građi, mjestu izražaja i staničnom odjeljku iz kojeg primaju antigenske peptide (epitope) za predočavanje limfocitima T. MHC molekule razreda I nalazimo na svim stanicama, za razliku od MHC molekula razreda II koje su normalno izražene samo na profesionalnim predočnim stanicama i epitelnim stanicama timusa. Budući da je MHC molekula razreda I građena od jednog teškog lanca ( $\alpha$  lanac), kojemu je pridružen ubikvitarni  $\beta$ 2-mikroglobulin kao sastavni dio svih izoformi ovih molekula, u lokusima koji kodiraju za MHC molekule razreda I (HLA-A, HLA-B i HLA-C) nalazimo po jedan gen koji kodira za teški lanac ovih molekula. Stoga se ukupno može prepisati šest različitih MHC molekula razreda I (tri s očevog i tri s majčinog kromosoma) (slika 1). Za razliku od toga, MHC molekula razreda II građena je od dva lanca ( $\alpha$  i  $\beta$  lanac) pa u HLA-DP, HLA-DQ i HLA-DR lokusima postoje po dva gena za alfa i beta lanac molekule, s time da gen za beta lanac na HLA-DR lokusu može biti udvostručen, čime ovaj lokus može dati dva proizvoda. Prema tome, ukupno se može prepisati osam različitih MHC molekula razreda II (četiri s majčinog i četiri s očevog kromosoma), a ako se uparuju proizvodi gena za alfa i beta lance s različitih kromosoma, tada ukupni broj proizvoda doseže šesnaest (slika 1). Polimorfizam se očituje u činjenici da se na svakom lokusu može pojaviti jedan od većeg broja alela iz populacije. Kada se uzmu u obzir samo proizvodi HLA-A, HLA-B i HLA-DR lokusa, koji se uobičajeno određuju kod presađivanja bubrega, poznato je 88 antigena koji su kodirani s više od 1.000 različitih alela (tablica 1). U modifikaciji izražaja MHC molekula važnu ulogu imaju i citokini. Tijekom imunskog odgovora sve stanice presatka mogu izražavati MHC molekule razreda I, a suputnički leukociti pored njih i MHC molekule razreda II. No, primatelj može reagirati imunskom reakcijom i protiv antigena sporednog sustava tkivne podudarnosti, polimorfnih staničnih bjelančevina koje nisu kodirane u MHC sustavu, stoga je i kod presađivanja organa između MHC podudarnih je-

dinki, a koje nisu jednojajčani blizanci, potrebno imunosupresivno liječenje kako ne bi došlo do odbacivanja presatka<sup>13,17,18</sup>.

Transplantacijska reakcija pokazuje sva svojstva normalne imunosne reakcije, a to su svojstvo specifičnosti, imunosne memorije, generalizirana je i antigenski specifična. Prepoznavanje stranih antigena na presatku od strane primateljelih limfocita ili protutijela dovodi do razaranja presatka. Imunosni odgovor određuju čimbenici darivatelja, prvenstveno izražaj HLA antigena i prisustvo antigen predočnih stanica u presatku, te primatelja u kojih je od izuzetne važnosti ranija senzibilizacija na ABO i HLA antigene. Imunosna aloreakcija izuzetno je snažna i mobilizira veliki broj (do 10 % svih klonova) limfocita T. Razlog tome je prepoznavanje stranih MHC molekula T limfocitnim receptorima pri čemu dolazi do aktivacije limfocita. Strane MHC molekule dovoljno su slične vlastitim da T stanični receptori mogu reagirati s njima, a pritom dovoljno različite da izgledaju kao promijenjene vlastite, tj. da slične vlastitim MHC molekulama pri predočavanju stranog peptida. Stoga aloreakcija posredovana MHC molekulama može biti jača od ksenoreakcije preko ovih molekula, jer T stanični receptori primateljelih limfocita s ksenogeničnim MHC molekulama ne mogu reagirati ili vrlo teško reagiraju. Ipak, u slučaju ksenotransplantacije dolazi do vrlo brzog ili hiperakutnog odbacivanja organa, koje je u tom slučaju posredovano prirodnim protutijelima iz seruma primatelja<sup>19</sup>.

#### **Početni razvoj imunosne reakcije odbacivanja presatka**

Oštećenje presatka tijekom postupka presađivanja dovodi do oslobađanja specifičnih upalnih medijatora kao što su citokini i kemokini. Oni mogu inducirati aktivaciju komplekta lektin-skim putem, međutim njihova puno važnija funkcija je poticanje upalne reakcije i aktivacija endotelih stanica krvnih žila presatka. Ova aktivacija uzrokuje povećanje izražaja adhezijskih molekula na endotelnim stanicama (E-selektin, ICAM-1, ICAM-2) koje se vežu za integrine (LFA-1, sialyl-Lewis) na leukocitima. To dovodi do usporavanja i kotrljanja leukocita duž aktiviranih endotelih stanica. Sekrecija kemokina privlači još više leukocita i uzrokuje njihovo čvrsto vezivanje na povr-



**Slika 1.** Glavni sustav tkivne podudarnosti ili HLA sustav (humani leukocitni antigeni).

**Figure 1.** MHC (major histocompatibility complex)

MHC ili HLA genotip određen je sa šest različitih genskih lokusa na 6. kromosomu, u kojima razlikujemo tri lokusa koji kodiraju za molekule MHC razreda I (HLA-A, HLA-B i HLA-C lokusi) i tri lokusa koji kodiraju za molekule razreda II (HLA-DP, HLA-DQ i HLA-DR lokusi). Sveukupno se može prepisati najviše šest različitih MHC molekula razreda I (tri s očevog i tri s majčinog kromosoma), te osam različitih MHC molekula razreda II (četiri s majčinog i četiri s očevog kromosoma), a ako se upare proizvodi gena za alfa i beta lance s različitih kromosoma, tada ukupni broj proteinskih proizvoda iznosi šesnaest.

šinu endotelnih stanica. Time se stvara preduvjet za dijapedezu i migraciju efektorskih leukocita u upalno promijenjeno tkivo presatka. Izlaganje nekrotičnom tkivu presatka dovodi do daljnje aktivacije infiltrirajućih leukocita koji povećavaju lokalnu proizvodnju upalnih medijatora, uzrokujući dodatno oštećenje presatka. Antigen predočne stanice infiltriraju i fagocitiraju nekrotično alogenično tkivo, prerađuju ga i predočavaju na površini MHC molekula razreda II. Potom ove stanice, koje obuhvaćaju makrofage te dendritične stani-

ce primatelja i darivatelja, migriraju u drenažna sekundarna limfatična tkiva (regionalne limfne čvorove), gdje aktiviraju aloreaktivne djevičanske limfocite T. Aktivirani limfociti T umnožavaju se i sazrijevaju u aloreaktivne zrele limfocite T koji se vraćaju u presadak i posreduju proces odbacivanja organa<sup>17,18,20</sup>.

#### Prepoznavanje aloantigena

Primateljevi djevičanski limfociti T mogu prepoznati prazne (nativne) alogenične MHC molekule

na darivateljevim antigen predočnim stanicama (suputničkim leukocitima), nakon njihove migracije iz presatka u regionalne limfne čvorove. Ovaj mehanizam aktivacije limfocita T nazivamo izravnim prepoznavanjem. S druge strane, prepoznavanje darivateljevih antigena prerađenih u primateljevim antigen predočnim stanicama i predočenih djevičanskim limfocitima T u okviru primateljevih molekula MHC razreda II, nazivamo neizravnim prepoznavanjem. Ovim mehanizmom predočavaju se peptidi presatka, izdvojeni iz slabih tkivnih antigena ili od alogeničnih MHC molekula.

Prvi strani antigeni koji dolaze u dodir s primateljevim limfocitima T su endotelne stanice presatka koje, kada se aktiviraju, mogu pojačano izražavati MHC molekule. Stoga je endotelitis ili vaskulitis jedan od pokazatelja akutnog odbacivanja presatka. Među suputničkim leukocitima koji dolaze s presatkom, najvažnije su antigen predočne stanice, a među njima dendritične stanice, koje snažno izražavaju oba razreda MHC molekula, kao i druge molekule koje su neophodne za aktivaciju limfocita T (kostimulacijske molekule). Budući da prenesene davateljeve predočne stanice nose i MHC molekule razreda II, one mogu davateljeve ili primateljeve prerađene peptide vezati i prenijeti iz presatka u regionalne limfne čvorove. Tamo podražavaju pomoćničke limfocite T (CD4<sup>+</sup>), koji nose komplementarni specifični receptor. Stoga, dendritične stanice mogu stimulirati obje izvršne podvrste limfocita T (pomoćničke i citotoksične stanice), koji infiltriraju presadak. Zbog velikog migracijskog potencijala, mogu se udomljavati u limfatičkim tkivima primatelja, gdje mogu pojačavati imunosni odgovor novačenjem većeg broja specifičnih limfocitnih klonova. Učinak davateljevih suputničkih leukocita je prolazan, jer oni nestaju iz presatka za nekoliko dana. Njihovo odstranjenje prije presađivanja produžava preživljavanje presatka<sup>17,18,21</sup>.

### Aktivacija limfocita T (signal 1)

Transplantacijsku reakciju pokreće međudjelovanje specifičnog receptora limfocita T s peptidnim antigenom predočenim u okviru MHC molekule na membrani antigen predočnih stanica. T stanični receptor je heterodimer koji čine dva polipep-

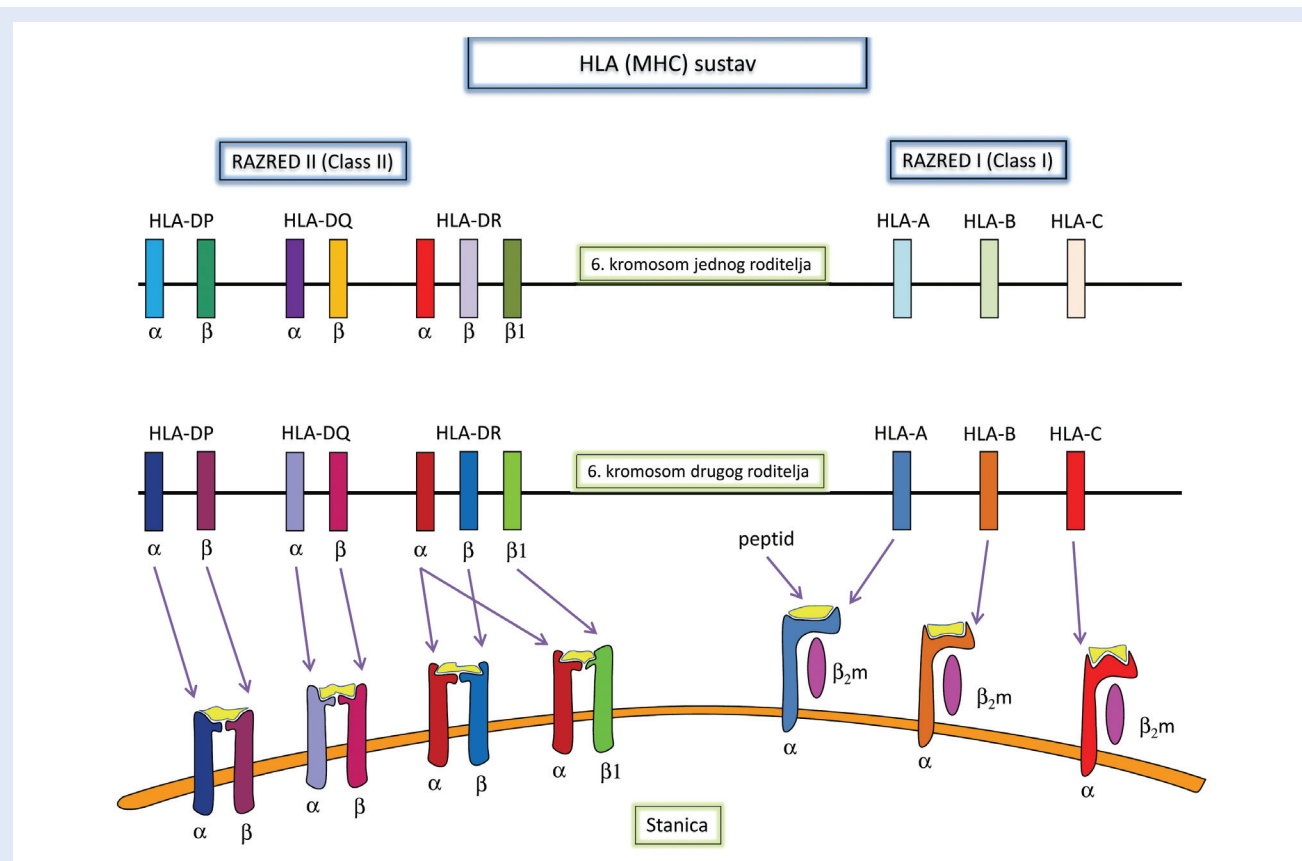
tida lanca,  $\alpha$  i  $\beta$  lanac, koji imaju promjenjive i konstantne domene. T stanični receptori na površini limfocita T povezani su s CD3 kompleksom, sastavljenim od više polipeptidnih lanaca, koji su značajni za stabilnost izražaja T staničnog receptora na membrani limfocita T te za prijenos signala u unutrašnjost stanice. Signali s površine limfocita T prenose se brojnim mehanizmima transmembranskog prijenosa u staničnu jezgru, gdje se modificira izražaj gena koji sudjeluju u regulaciji staničnih funkcija. Aktivacija putem T sta-

Transplantacijsku reakciju možemo podijeliti na hiperakutnu, akceleriranu akutnu, akutnu i kroničnu. Hiperakutna i akcelerirana akutna reakcija odbacivanja razlikuju se po vremenu nastupa po presađivanju, a posredovane su protutijelima na ABO i HLA antigene. Akutna reakcija odbacivanja može biti posredovana stanicama i/ili protutijelima, dok umjesto kronične reakcije odbacivanja danas više govorimo o kroničnoj nefropatiji presatka.

ničnog receptora potiče fosforilaciju receptorskih peptida, kao što su  $\zeta$  lanci i druge adaptorske molekule koje se povezuju s receptorom. Ova fosforilacija aktivira različite stanične biokemijske putove, uključujući kalcineurinski put, put protein kinaze C (PKC) te putove koji uključuju Ras- i Racmitogenom aktivirane protein (MAP) kinaze<sup>22</sup>.

Većina zrelih limfocita T nosi CD4 ili CD8 molekulu na staničnoj membrani. CD4 molekule obilježavaju pomoćničke limfocite T i sudjeluju u reakcijama s MHC molekulama razreda II, dok CD8 molekule obilježavaju citotoksične limfocite T i reagiraju s MHC molekulama razreda I. Ova podjela nije stroga i postoje preklapanja. Iznimno CD4<sup>+</sup> limfociti T mogu pokazivati citolitička svojstva, a CD8<sup>+</sup> limfociti T proizvoditi regulacijske citokine koji su inače svojstveni CD4<sup>+</sup> stanicama. Smatra se da CD4<sup>+</sup> limfociti T posreduju prepoznavanje presatka, pojačavaju i koordiniraju imunosni odgovor te osiguravaju pomoć efektorskim stanicama<sup>21</sup>.

Nakon aktivacije, limfociti T proizvode razne citokine koji reguliraju imunosni odgovor. Uz trajnu antigensku stimulaciju, limfociti T mogu se diferencirati u pomoćničke limfocite T tipa 1 (Th1 sta-



Slika 2. Izravni i neizravni put prepoznavanja aloantigena.

Figure 2. Direct and indirect allorecognition.

Primateljevi dječičanski limfociti T mogu se aktivirati na praznim alogeničnim MHC molekulama izraženim na davateljevim antigen predočnim stanicama, što nazivamo izravnim prepoznavanjem antigena davatelja. Nasuprot tome, prepoznavanje davateljevih antigenskih peptida, izdvojenih iz slabih tkivnih antigena ili alogeničnih MHC molekula te prerađenih u primateljevim antigen predočnim stanicama, nazivamo neizravnim prepoznavanjem. U oba slučaja nastaju aktivirani limfociti T koji migriraju u presadak i uzrokuju njegovo oštećenje.

Tablica 1. Polimorfizam sustava HLA (humanih leukocitnih antigena).

Table 1. Polymorphism of the major histocompatibility complex (MHC).

Genski lokus	MHC razred I			MHC razred II					
	A	B	C	DR-A	DR-B	DQ-A	DQ-B	DP-A	DP-B
Broj alela u populaciji	1193	1800	829	3	902	35	112	28	141

Legenda za tablicu 1: Budući da se radi o dobro evolucijski konzerviranoj genskoj regiji 6. kromosoma, do sada je u cijeloj ljudskoj populaciji otkriven relativno mali broj alela koji se javljaju u genskim lokusima koji kodiraju za molekule MHC razreda I i II. Svaka osoba od navedenog broja nosi po dva, najčešće različita alela naslijeđena od oca i majke<sup>24</sup>.

nice, prema engl. *T helper*) ili tipa 2 (Th2 stanice). Pomoćnički limfociti T tipa 1 izlučuju citokine kao što su interleukin 2 (IL-2), interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) i čimbenik tumorske nekroze alfa (TNF- $\alpha$ ). U začetku ovog tipa odgovora sudjeluje i IL-12, koji se ubraja u Th1 profil iako nije limfocitni citokin, nego ga proizvode antigen predočne stanice

(dendritične stanice i makrofagi). Nabrojani citokini potiču reakcije odgođenog odgovora preosjetljivosti i citotoksičnu aktivnost, što spada u reakcije stanične imunosti. S druge strane, pomoćnički limfociti T tipa 2, lučeći citokine IL-4, IL-5, IL-10 i IL-13, potiču humoralni imunski odgovor, koji obuhvaća proizvodnju opsonizirajućih i

komplement vežućih protutijela IgG te aktivaciju eozinofila, proizvodnju i lučenje protutijela razreda IgE<sup>17,18,20,21</sup>.

### Kostimulacija limfocita T (signal 2)

Drugi neophodni signal za aktivaciju limfocita T je međudjelovanje kostimulacijskih receptora limfocita T s kostimulacijskim ligandima na površini antigen predočne stanice. Ovo međudjelovanje pojačava vezivanje limfocita T za antigen predočnu stanicu. Među adhezijskim molekulama koje sudjeluju u aktivaciji limfocita T, važnu ulogu u stabilizaciji međustanične veze igraju integrini, osobito LFA-1 na limfocitima T, koji se veže za molekule ICAM na antigen predočnim stanicama. Dodatno učvršćenje staničnih veza s kombinacijama adhezijskih molekulskih parova, kao što su ICAM1-VLA4 ili CD2-CD48/CD59, te drugih akcesornih molekula, dovodi do stvaranja tzv. imunodne sinapse.

Otkriveno je više načina kostimulacije limfocita T, među kojima je najvažnije međudjelovanje T limfocitnog CD28 s ligandima na antigen predočnoj stanici CD80 (B7-1) ili CD86 (B7-2). Izražaj ovih liganda pojačava aktivacija antigen predočnih stanica brojnim upalnim poticajima, uključujući infekciju i citokine. Nastanak anergije limfocita T i apoptozu, koja može nastupiti kada postoji samo prvi signal preko specifičnog receptora limfocita T i CD3 kompleksa, sprječava upravo signal preko CD28 molekule.

Osim ovog kostimulacijskog ili aktivacijskog signala, vrlo je značajan inhibicijski signal koji nastaje međudjelovanjem antigena citotoksičnih limfocita T 4 (CTLA4, prema engl. *cytotoxic T lymphocyte antigen 4*) s ligandima CD80 (B7-1) i CD86 (B7-2). Za razliku od CD28 koji izražavaju djevičanski limfociti T i koji pridonosi aktivaciji, CTLA4 je izražen na površini aktiviranih stanica i njegovo vezivanje izaziva inhibiciju, stoga je taj signal važan za ograničavanje imunskog odgovora kojim se ne dozvoljava istovremena aktivacija jednog limfocita s dva ili više različitih antigena.

Kostimulacijska molekula CD40 na antigen predočnoj stanici i njezin ligand CD154 (CD40L) na limfocitu T također imaju značajnu ulogu u imunskom odgovoru na presadak. CD154 (CD40L) izražava se rano po aktivaciji limfocita T i njegovo

vezivanje s kostimulacijskom molekulom CD40 na predočnim stanicama neophodno je za aktivaciju limfocita B, dendritičnih stanica i monocita, a značajno pojačava izražaj CD80/86 (B7) molekula<sup>17,18,20</sup>.

### Limfociti B

Važnost limfocita B i protutijela u odbacivanju presatka najočitija je kod hiperakutnog odbacivanja koje nastaje unutar 24 sata od presađivanja u bolesnika koji su ranije senzibilizirani na alogene HLA molekule. Uloga limfocita B u akutnom odbacivanju posredovanom stanicama još nije potpuno razjašnjena. Neke epizode akutnog odbacivanja imaju i humoralnu komponentu, što se može dokazati bojanjem C4d komponente komplementa u biopatu.

Svaki klon djevičanskih limfocita B izražava jedinstveni antigen-specifični B stanični receptor. Tijekom aktivacije limfocita B, ovi receptori prepoznaju antigene alogeničnog presatka, internaliziraju ih, prerađuju i konačno predočavaju putem MHC molekula razreda II na svojoj površini. Pored toga, za razvoj B-limfocitnog odgovora potrebno je međudjelovanje limfocita B i prethodno aktiviranih CD4<sup>+</sup> pomoćničkih limfocita T podvrste Th2, koji prepoznaju kompleks antigen/MHC molekula razreda II i luče citokine potrebne za sazrijevanje i proliferaciju limfocita B<sup>17,18,20,23</sup>.

### Klonalna ekspanzija i dozrijevanje limfocita

Potpuna aktivacija limfocita (signal 1 i 2) manifestira se izražajem IL-2R i lučenjem IL-2, što je neophodno za ulazak limfocita u stanični diobeni ciklus. Potom slijedi klonalna ekspanzija limfocita T koju, pored ostalih čimbenika rasta i diferencijacije, prvenstveno vodi IL-2. Dozrijevanjem odgovora limfocita T postavljene su osnove za stanično odbacivanje presatka. S druge strane, limfociti B nakon aktivacije i proliferacije sazrijevaju u plazma stanice koje proizvode aloreaktivna protutijela, koja reagiraju s površinskim molekulama alogeničnih endotelinih stanica<sup>14,17,18,20</sup>.

### Efektorski mehanizmi

CD4<sup>+</sup> stanice nakon prepoznavanja stranih MHC molekula razreda II igraju važnu ulogu u regulaciji efektorskih mehanizama. Početni upalni odgovor



koji nastaje zbog oštećenja tkiva tijekom postupka presađivanja, pripada prirodnoj imunosti i nije ovisan o antigenu. Taj odgovor posreduju neutrofil i stanice monocitnog reda, uključujući makrofage i dendritične stanice. Antigen-specifična aktivacija CD4<sup>+</sup> stanica dovodi do stvaranja efekorskog fenotipa Th1 koji se očituje u izražaju specifičnih molekula na staničnoj površini i proizvodnji citokina, koji potiču monocite/makrofage, stanice prirodni ubojice (NK, prema engl. *natural killer*) i citotoksične limfocite T (CTL). Suradnja između CD4<sup>+</sup> stanica i odgovarajućih efekorskih stanica izaziva odgovor odgođenog tipa preosjetljivosti i igra značajnu ulogu u razaranju presatka<sup>20</sup>.

Akutno stanično odbacivanje presatka je najčešći oblik rane reakcije odbacivanja nakon presađivanja bubrega. Može zahvatiti epitelne stanice tubula ili stanice vaskularnog endotela. Aktivacija CD4<sup>+</sup> stanica Th1 profila i proizvodnja citokina (npr. IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$ ) također potiče aktivaciju i umnažanje citotoksičnih CD8<sup>+</sup> limfocita T i stanica prirodnih ubojica (NK, prema engl. *natural killer*). Aktivirani citotoksični limfociti CD8<sup>+</sup> putuju u presadak i ubrzo ga uništavaju jer prepoznaju davateljeve antigene MHC razreda I. Aktivirani citotoksični limfociti T na površini izražavaju CD178 (fas ligand, Fas-L), koji reagira s CD95 (fas) izraženim na ciljnoj stanici presatka, što dovodi do inducirane apoptoze stanice. Pored toga, citotoksične efekorske stanice otpuštaju citolitičke bjelancevine kao što je perforin, koji se veže na površinu membrane ciljne stanice. Djelovanje perforina omogućuje prolazak serin proteaza, poput granzima B, u citoplazmu ciljnih stanica, koji nakon internalizacije aktivira mehanizme apoptoze<sup>20</sup>.

Akutno humoralno odbacivanje započinje vezivanjem specifičnog antigena od strane receptora limfocita B (membranskog imunoglobulina), nakon čega dolazi do umnažanja limfocita B i dozrijevanja u plazma stanice. Za ovaj proces neophodni su citokini koje proizvode CD4<sup>+</sup> stanice Th2 profila i koji stimuliraju limfocite B. Diferencijacijom i proliferacijom limfocita B nastaju plazma stanice, koje proizvode topljive imunoglobuline, protutijela koja se mogu vezati za endotel alogeničnih stanica. Izlučena protutijela mogu uzrokovati oštećenje stanica pomoću nekoliko različitih izvršnih mehanizama. Jedan od najvažnijih meha-

nizama je izravna aktivacija komplementa, koja uslijedi nakon što specifična protutijela protiv tkiva darivatelja opsoniraju endotelne stanice. Tada se pokreće klasični put aktivacije komplementa u kojem se prve aktiviraju katalitičke podjedinice C1 kompleksa. One potiču lančanu aktivaciju sljedećih komponenti komplementa, uključujući C4b, koji je kovalentno vezan za površinu stanične membrane. Nakon inaktivacije C4b, zaostaje C4d na površini endotelne stanice, što se može dokazati imunohistokemijski, a označava aktivno akutno humoralno odbacivanje. Kaskadni aktivacijski slijed tijekom humoralnog odbacivanja završava stvaranjem citotoksičnog kompleksa koji napada membranu (MAC, engl. *membrane attacking complex*), i izaziva smrt endotelnih stanica apoptozom. Usto, protutijela mogu oštetiti ciljna tkiva i posredstvom reakcije stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima (ADCC, engl. *antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*). Ovu citotoksičnost ovisnu o protutijelima prvenstveno posreduju stanice NK<sup>14,17,18,20,23</sup>.

## ZAKLJUČAK

Ove znanstvene spoznaje o transplantacijskoj reakciji omogućavaju uvođenje i primjenu novih lijekova i suvremenih terapijskih postupaka radi unapređenja kvalitete imunosupresivnog liječenja, tj. smanjenja neželjenih učinaka i komplikacija liječenja s ciljem poboljšanja preživljavanja presatka i bolesnika.

## LITERATURA

1. Vujaklija-Stipanović K. Transplantacija bubrega: dodatni impuls riječkoj medicini. *Acta Fac Med Flum* 1994;19:79-82.
2. Montgomery RA. ABO incompatible, positive crossmatch, and paired kidney exchange transplantation. *Medscape Transplantation* 2004;5:1-7. Available at [http://cme.medscape.com/viewarticle/470687\\_2](http://cme.medscape.com/viewarticle/470687_2). Accessed June 30th, 2010.
3. Tanabe K, Takahashi K, Sonda K, Tokumoto T, Ishikawa N, Kawai T et al. Long-term results of ABO-incompatible living kidney transplantation: a single center experience. *Transplantation* 1998;65:224-8.
4. Slapak M, Evans P, Tricket L, Harris KR, Gordon P, Matini A et al. Can ABO-incompatible donors be used in renal transplantation? *Transplant Proc* 1984;16:75-9.
5. Opelz G. A Collaborative Transplant Study. *Newsletter* 2. 1988. Available at <http://www.ctstransplant.org/public/newsletters/1988/gif/1988-2.html?ts=806714295316713>. Accessed June 30th, 2010.

6. Nelson PW, Landreneau MD, Luger AM, Pierce GE, Ross G, Shield CF 3rd et al. Ten-year experience in transplantation of A2 kidneys into B and O recipients. *Transplantation* 1998;65:256-60.
7. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Quantitative studies on tissue transplantation immunity. II. The origin, strength and duration of actively and adoptively acquired immunity. *Proc R Soc B* 1954;143:58-80.
8. Terasaki PI. Histocompatibility. *In: History of Transplantation*. Los Angeles: UCLA, 1991;497-510.
9. Opelz G. HLA matching and cadaver kidney transplantation – Status 1984. *Ulster Med J Suppl* 1985;54:70-5.
10. Opelz G. Correlation of HLA matching with kidney graft survival in patients with or without cyclosporin A treatment. *Transplantation* 1985;40:240-3.
11. Terasaki PI, McClelland JD. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 1964;204:998-1000.
12. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SW. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 1985;314:67-73. Available at <http://www.nature.com/nature/journal/v314/n6006/abs/314067a0.html>. Accessed June 30th, 2010.
13. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Antigen presentation to T lymphocytes. *In: Immunobiology*. New York: Garland Science Publishing, 2005;169-201.
14. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Autoimmunity and transplantation. *In: Immunobiology*. New York: Garland Science Publishing, 2005;557-612.
15. Magee CC, Sayegh MM. Allograft dysfunction: differential diagnosis and management. *In: Malluche HH, Sawaya BP, Hakim RM, Sayegh MH (eds). Clinical nephrology, dialysis and transplantation*. Deisenhofen: Dustri Verlag Dr. Karl Feistle, 2004;1-36.
16. Pham PTT, Pham PCT, Wilkinson AH. Management of the renal transplant recipient. The early management of the recipient. *In: Davison AM, Cameron JS, Grünfeld JP (eds). Oxford textbook of clinical nephrology*. Oxford: Oxford University Press, 2005;2087-101.
17. Suthanthiran M, Strom TB. The immunology of transplantation. *In: Davison A, Cameron JS, Grünfeld JP (eds). Oxford textbook of clinical nephrology*. Oxford: Oxford University Press, 2005;2049-59.
18. Lakkis FG, Saleem S, Pearson TC, Larsen CP. Transplantation Immunobiology. *In: Malluche HH, Sawaya BP, Hakim RM, Sayegh MH (eds). Clinical nephrology, dialysis and transplantation*. Deisenhofen: Dustri Verlag Dr. Karl Feistle, 2004;1-18.
19. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ (eds). Basic concepts in immunology. *In: Immunobiology*. New York: Garland Science Publishing, 2005;1-35.
20. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ (eds). T-cell-mediated immunity. *In: Immunobiology*. New York: Garland Science Publishing, 2005;319-65.
21. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ (eds). Antigen recognition by B-cell and T-cell receptors. *In: Immunobiology*. New York: Garland Science Publishing, 2005;103-134.
22. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M (eds). Signaling through immune system receptors. *In: Immunobiology*. New York: Garland Science Publishing, 2005;203-37.
23. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M (eds). The humoral immune response. *In: Immunobiology*. New York: Garland Science Publishing 2005;319-65.
24. Holdsworth R, Hurley CK, Marsh SGE, Lau M, Noreen HJ, Kempnich JH et al. The HLA dictionary 2008: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens. *Tissue Antigens* 2009;73:95-170.