

# Uloga imunoloških i neimunoloških čimbenika u dugoročnom preživljavanju alogeničkih bubrežnih transplantata

---

**Balen, Sanja**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2001**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:393340>

*Rights / Prava:* [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-23**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET U RIJECI

Sanja Balen-Marunić

**ULOGA IMUNOLOŠKIH I NEIMUNOLOŠKIH  
ČIMBENIKA U DUGOROČNOM  
PREŽIVLJAVANJU ALOGENIČKIH BUBREŽNIH  
TRANSPLANTATA**

DISERTACIJA

SVEUČILIŠNA KNJIŽNICA  
RIJEKA



930044256

Rijeka, 2001.

Rijeka, 2001.

**Mentori rada:** Akademik Daniel Rukavina i prof.dr.sc. Ksenija Vujaklija Stipanović

Disertacija je obranjena dana \_\_\_\_\_ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci,  
pod povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Petar Orlić
2. Prof. dr. sc. Franjo Čohar
3. Prof.dr.sc. Ksenija Vujaklija Stipanović
4. Akademik Daniel Rukavina

Rad ima - 233 -listova

UDK klasifikacija:

## PREDGOVOR

Ovaj je rad nastao pod vodstvom mojih mentora: Akademika Daniela Rukavine i prof.dr.sc. Ksenije Vujaklije-Stipanović, te im se sa poštovanjem iskreno zahvaljujem na stručnim savjetima, pomoći, nesebičnom razumijevanju i toploj ljudskoj podršci.

Želim se posebno zahvaliti mr.sc.dr. Gordani Laškarin na praktičnoj i stručnoj pomoći tijekom izrade ovog rada. Hvala dr. Sotošek i mr.sc.dr.Štrbo. Također se zahvaljujem i čitavom «dream team»-u akademika Rukavine.

Asistentici mr.sc. Žuvić Marti najtoplije se zahvaljujem za statističku obradu i analizu podataka.

Isto tako želim izraziti zahvalnost prof. dr. P. Orliću, prof. dr. Matić-Glažar, prof. dr. F. Čoharu, te svim liječnicima i medicinskim sestrama Odjela za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju KBC-a, na stručnoj pomoći, susretljivosti i pružanju pomoći pri uzimanju kliničkog materijala.

Zahvaljujem se svim zaposlenima na Zavodu za transfuziologiju na svakodnevnoj suradnji, podršci i razumijevanju.

I na kraju jedno veliko HVALA mojoj obitelji, bez čije pomoći i podrške ne bih uspjela.

## S A D R Ž A J

<b>1. UVOD I OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	1
<b>2. OPĆI DIO</b> .....	7
<b>2.1. Transplantacija bubrega kroz povijest</b> .....	7
<b>2.2. Čimbenici koji utječu na preživljavanje transplantata</b> .....	10
2.2.1. <i>Imunološki čimbenici</i> .....	13
2.2.1.1. Otkriće HLA sustava.....	13
2.2.1.2. Uloga antigena tkivne srodnosti u transplantaciji.....	15
2.2.1.3. Antigeni klase I.....	16
2.2.1.4. Antigeni klase II.....	18
2.2.1.5. Citotoksična protutijela na HLA antigene.....	21
<b>2.3. Transplantacijska imunologija</b> .....	23
2.3.1. <i>Klasifikacija mehanizma odbacivanja transplantata</i> .....	25
2.3.2. <i>Imunološke promjene u transplantacijskoj reakciji</i> .....	28
2.3.2.1. Stanične interakcije u transplantacijskoj reakciji.....	28
2.3.2.2. Sudjelovanje imunokompetentnih stanica.....	32
2.3.2.3. Gama/delta limfociti T.....	37
2.3.2.4. NK stanice-veliki granulirani limfociti.....	38
2.3.2.5. Subpopulacije NK stanica.....	41
2.3.2.6. Uloga citokina u razvoju i aktivaciji NK stanica.....	42
<b>2.4. Citolitički mehanizmi stanicama posredovane citotoksičnosti</b> .....	44
2.4.1. <i>Uloga sustava Fas ligand-Fas u mehanizmima citotoksičnosti</i> .....	45
2.4.2. <i>Uloga perforina u mehanizmima citotoksičnosti</i> .....	50
2.4.2.1. Građa perforina.....	50
2.4.2.2. Zastupljenost perforina u stanicama i staničnim linijama.....	52
2.4.2.3. Uloga perforina u citolizi.....	54
2.4.2.4. Perforin u transplantacijskoj reakciji.....	55
2.4.3. <i>Uloga citokina u reakciji odbacivanja i regulaciji ekspresije perforina</i> .....	59
2.4.3.1. Interleukin-2.....	60
2.4.3.2. Interleukin-6.....	63
2.4.3.3. Interleukin-4.....	64
2.4.3.4. Interleukin-10.....	65
2.4.3.5. Interleukin-12.....	67
2.4.3.6. Interleukin-15.....	67

2.4.3.7. Interleukin-7 .....	69
<b>2.5. Neimunološki čimbenici .....</b>	<b>72</b>
2.5.1. Dob davatelja .....	72
2.5.2. Dob primatelja.....	74
2.5.3. Spol primatelja i davatelja .....	75
2.5.4. Trajanje dijalize.....	75
2.5.5. Hladna ishemija bubrega .....	76
2.5.6. Kliničko stanje primatelja .....	77
2.5.7. Odnos veličina bubrega/ tjelesna masa primatelja .....	77
2.5.8. Utjecaj transplantacijskog centra.....	78
<b>2.6. Imunosupresivna terapija u transplantaciji.....</b>	<b>80</b>
2.6.1. Ciklosporin .....	81
2.6.2. Antilimfocitni globulin .....	83
2.6.3. Kortikosteroidi.....	84
2.6.4. Monoklonska protutijela .....	85
2.6.5. Indukcija tolerancije na aloantigen.....	87
2.6.6. Protokoli imunosupresivne terapije .....	88
<b>2.7. Tolerancija na presadak.....</b>	<b>89</b>
<b>3. ISPITANICI I METODE.....</b>	<b>94</b>
<b>3.1. Ispitanici.....</b>	<b>94</b>
<b>3.2. Metode .....</b>	<b>94</b>
3.2.1. Ispitivanje neimunoloških čimbenika.....	94
3.2.2. Ispitivanje imunoloških čimbenika .....	95
3.2.2.1. Kemikalije .....	95
3.2.2.2. Mediji i puferi.....	96
3.2.2.3. Laboratorijsko plastično posuđe .....	98
<b>3.2. Laboratorijske metode.....</b>	<b>98</b>
3.3.1. Dobivanje suspenzije limfocita periferne krvi.....	98
3.3.2. Određivanje staničnih biljega metodom protočne citometrije .....	99
3.3.3. Fiksacija i permeabilizacija stanične membrane .....	99
3.3.4. Obilježavanje perforina metodom indirektno imunofluorescencije.....	100
3.3.5. Obilježavanje površinskih biljega metodom direktne imunofluorescencije.....	100
3.3.6. Testovi stimulacije .....	101

3.3.7. Priprema limfocita periferne krvi za test NK citotoksičnosti .....	101
3.3.8. Određivanje perforina u testu citotoksičnosti .....	102
3.3.9. Test citotoksičnosti uz očitavanje protočnim citometrom .....	102
3.3.10. Protočna citometrija .....	104
3.3.11. Statistička obrada i prikazivanje rezultata .....	104
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>105</b>
<b>4.1. Rezultati retrospektivne analize neimunoloških čimbenika</b> .....	<b>105</b>
4.1.1. Opis uzorka primatelja bubrega .....	106
4.1.1.1. Raspodjela transplantiranih bolesnika u uzorku prema spolu .....	106
4.1.1.2. Raspodjela transplantiranih bolesnika u uzorku prema starosnoj dobi .....	106
4.1.1.3. Raspodjela transplantiranih bolesnika u uzorku prema broju transplantacija .....	108
4.1.1.4. Raspodjela transplantiranih bolesnika u uzorku prema trajanju dijalize prije transplantacije .....	109
4.1.1.5. Raspodjela transplantiranih bolesnika u uzorku prema osnovnoj bolesti .....	110
4.1.2. Opis uzorka davatelja bubrega .....	112
4.1.2.1. Raspodjela davatelja bubrega u uzorku prema spolu .....	112
4.1.2.2. Raspodjela davatelja bubrega u uzorku prema starosnoj dobi .....	113
4.1.2.3. Raspodjela davatelja bubrega u uzorku prema porijeklu bubrega .....	114
4.1.3. Transplantat .....	115
4.1.3.1. Raspodjela transplantiranih bolesnika u uzorku prema trajanju hladne ishemije .....	115
4.1.4. Analiza preživljavanja transplantata .....	118
4.1.5. Uspoređivanje preživljavanja u pojedinim grupama .....	120
4.1.5.1. Analiza preživljavanja transplantata u cijelom uzorku .....	120
4.1.5.2. Analiza preživljavanja transplantata s obzirom na broj transplantacija .....	123
4.1.5.3. Analiza preživljavanja transplantata s obzirom na porijeklo transplantiranog bubrega .....	125
4.1.5.4. Analiza preživljavanja transplantata s obzirom na dob	

primatelja .....	127
4.1.5.5. Analiza preživljavanja transplantata s obzirom na dob davatelja .....	130
4.1.5.6. Analiza preživljavanja transplantata s obzirom na starosnu dob primatelja i davatelja .....	132
4.1.5.7. Analiza preživljavanja transplantata s obzirom na spol primatelja i davatelja .....	134
4.1.5.8. Analiza preživljavanja transplantata s obzirom na trajanje dijalize prije transplantacije .....	139
4.1.5.9. Analiza preživljavanja transplantata s obzirom na trajanje hladne ishemije bubrega .....	142
<b>4.2. Rezultati retrospektivne analize imunoloških čimbenika .....</b>	<b>145</b>
4.2.1. Raspodjela transplantiranih bolesnika u uzorku prema podudarnosti u HLA sustavu .....	145
4.2.2. Raspodjela transplantiranih bolesnika u uzorku prema prisutnosti citotoksičnih protutijela .....	148
4.2.3. Analiza preživljavanja transplantata s obzirom na podudarnost u HLA sustavu .....	150
4.2.4. Analiza preživljavanja transplantata s obzirom na prisutnost citotoksičnih protutijela u serumu .....	154
<b>4.3. Rezultati prospektivne analize imunoloških čimbenika .....</b>	<b>157</b>
4.3.1. Učinak interleukina-2 na ispoljavanje perforina u limfocitima periferne krvi transplantiranih bolesnika .....	157
4.3.2. Učinak interleukina-15 na ispoljavanje perforina u limfocitima periferne krvi transplantiranih i dijaliziranih bolesnika .....	159
4.3.3. Citotoksičnost limfocita periferne krvi u transplantiranih i dijaliziranih bolesnika .....	161
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>163</b>
5.1. Rasprava o utjecaju neimunoloških čimbenika na preživljavanje transplantata .....	163
5.2. Rasprava o utjecaju imunoloških čimbenika na preživljavanje transplantata .....	170
<b>6. ZAKLJUČNI PREGLED .....</b>	<b>184</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>186</b>



## SAŽETAK

Cilj transplantacije je osigurati što duže, po mogućnosti i trajno preživljavanje transplantata. Posljednja tri desetljeća učinjen je velik napredak na području kliničke transplantacije bubrega. Isprva je najčešći uzrok gubitka transplantata bila akutna kriza odbacivanja, no kasnije ona ustupa mjesto kroničnom odbacivanju, ili, sve češće korištenom izrazu kronična disfunkcija transplantata. Danas na pragu trećeg milenija u središtu interesa su čimbenici koji utječu na preživljavanje transplantata, a načelno se mogu podijeliti u nekoliko skupina: neimunološki čimbenici, imunološki čimbenici i čimbenici koji induciraju imunološku toleranciju (prijetransplantacijske transfuzije i imunosupresivna terapija).

Istraživanja koja opisujemo u ovoj tezi dijelom su retrospektivna, a dijelom prospektivna. Retrospektivna istraživanja obuhvaćaju uglavnom analizu neimunoloških čimbenika (tzv. klinički čimbenici) na materijalu Centra za dijalizu i transplantaciju KBC Rijeka, a obuhvaća 226 bolesnika (od 8 do 72 godine), kojima je transplantiran bubreg u razdoblju od 1985. do 1999.g. U prospektivnim istraživanjima su obuhvaćeni transplantirani bolesnici, koji toleriraju presađeni bubreg preko dvije godine; bolesnici koji se redovno hemodijaliziraju kroz više godina i zdravi muškarci i zdrave negravidne žene koji predstavljaju kontrolnu skupinu. Imunološka laboratorijska istraživanja vršena su u laboratorijima Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci.

Cilj istraživanja neimunoloških čimbenika bio je ispitati utjecaj slijedećih parametara na preživljavanje presađenih bubrežnih transplantata: dob primatelja i davatelja organa, spol primatelja i davatelja organa, vrijeme provedeno na dijalizi, prije transplantacije (tzv. "lista čekanja") i vrijeme trajanja hladne ishemije bubrega prije transplantacije.

Cilj retrospektivnih istraživanja imunoloških čimbenika bio je ispitati utjecaj podudarnosti u HLA sustavu (HLA-A, B i DR lokus), kao i utjecaj prisutnosti tzv "panel reaktivnih protutijela" (PRA) u serumu primatelja na preživljavanje presatka.

Retrospektivna istraživanja su obuhvaćena u analizi preživljavanja, te su korištene životne tablice (Life table), s razdiobom frekvencija prema vremenima preživljavanja kategoriziranim u određen broj vremenskih intervala, te Kaplan-Meierova metoda. Uspoređivanje preživljavanja između uzoraka rađeno je neparametrijskim testovima: Gehanovim generaliziranim Wilcoxon testom, odnosno Coxovim F-testom.

Cilj prospektivnih imunoloških istraživanja bio je ispitati promjene u mehanizmu limfocitima (stanicama) posredovane citotoksičnosti (cell-mediated cytotoxicity - CMC ili lymphocyte mediated cytotoxicity angloameričkih autora), posebno na molekularnoj razini. Pored određivanja fenotipa citotoksičnih limfocita, ekspresije citolitičke molekule perforina u ovim stanicama, te sadržaja perforina po stanici (AFI vrijednost) u pojedinim subpopulacijama perforin pozitivnih limfocita periferne krvi (P+LPK) transplantiranih bolesnika, ispitali smo i NK citotoksičnost limfocita periferne krvi transplantiranih bolesnika

*In vitro* smo željeli istražiti i utjecaj pojedinih citokina za koje znamo da se luče lokalno tijekom reakcije odbacivanja presađenih transplantata, stoga smo ispitali fenotipske karakteristike i AFI vrijednost pojedinih subpopulacija perforin pozitivnih limfocita periferne krvi transplantiranih bolesnika, nakon stimulacije *in vitro* s IL-2 kroz 24 sata, te IL-2, IL-15 i ConA kroz 72 sata.

Naša analiza je pokazala značajno bolje četverogodišnje preživljavanje transplantata u starosnoj grupi primatelja od 16 do 50 godina. Također je uočen trend lošijeg preživljavanja ukoliko su primatelj i davatelj stariji od 50 godina. Spol primatelja i davatelja, kao i trajanje dijalize prije transplantacije ne igraju ulogu u preživljavanju transplantata. Iako neki ukazuju na lošije preživljavanje transplantata ukoliko je hladna ishemija bubrega trajala dulje od 24

sata, mi to nismo uočili, a nisu niti veće svjetske studije. Poznata je važnost antigena HLA klase I i II u preživljavanju transplantata, no naša analiza nije to pokazala, što bi se moglo objasniti premalim brojem bolesnika u poređenju s velikim multicentričnim analizama. Podaci iz Eurotransplanta sugeriraju da je podudarnost u HLA sustavu značajna tijekom prve godine, dok se kasnije taj efekt gubi. Isto tako nismo uočili lošije preživljavanje transplantata u senzibiliziranih bolesnika (s visokim postotkom protutijela reaktivnih na stanica panela-PRA), vjerojatno zbog premalog broja senzibiliziranih bolesnika u našem uzorku.

Ispitivanjem učinka IL-2 na ispoljavanje perforina u limfocitima periferne krvi transplantiranih bolesnika vidjeli smo da se postotak perforin pozitivnih limfocita ne mijenja, bez obzira na trajanje stimulacije (6 i 24 sata). Interesantno je da se postotak perforin pozitivnih limfocita prije i nakon stimulacije IL-2 bitno ne razlikuje u zdravih osoba i transplantiranih bolesnika, ali je AFI vrijednost značajno niža u transplantiranih prije stimulacije, što govori u prilog smanjenom citolitičkom potencijalu njihovih stanica. Međutim, već nakon 6-satne stimulacije u transplantiranih značajno se povećava broj molekula po stanici (AFI vrijednost). Prateći učinak stimulacije istom koncentracijom IL-2 na perforin pozitivnim subpopulacijama limfocita periferne krvi, vidjeli smo da se njihov postotak ne mijenja, niti u zdravih, niti u transplantiranih, ali u transplantiranih dolazi do značajnog porasta AFI vrijednosti za perforin: nakon 6-satne stimulacije u CD56+P+ limfocitima i nakon 24-satne stimulacije u CD8+P+ limfocitima. I ovdje je AFI vrijednost za perforin višestruko niža u transplantiranih bolesnika. Izgleda da imunosupresivna terapija koja djeluje inhibitorno na sekreciju IL-2, djeluje ponajprije na gustoću perforinskih molekula po stanici. Naime, dodavanjem egzogenog IL-2 u koncentraciji od 100UI/ml dolazi do porasta AFI vrijednosti za P u P+CD56+ limfocitima nakon 6-satne stimulacije (koji su i prva linija obrane organizma) i P+CD8+ limfocitima nakon 24-satne stimulacije, što govori o postojanju

citolitičkog potencijala ovih stanica, koji je inhibiran imunosupresivnom terapijom, a može se inducirati.

S obzirom da je IL-15 po svojoj biološkoj funkciji sličan IL-2, a u slučaju nedostatka IL-2 preuzima njegovu funkciju, razmotrili smo djelovanje trodnevne stimulacije limfocita periferne krvi transplantiranih bolesnika s IL-15, IL-2 i Concavalinom-A. Interleukin-15 značajno je povećao postotak perforin pozitivnih limfocita periferne krvi, djelujući i na nivou subpopulacija, naime došlo je do porasta postotka CD8<sup>+</sup>P<sup>+</sup> i CD56<sup>+</sup>P<sup>+</sup> limfocita. Interesantno je što je postotak perforin pozitivnih limfocita i njihovih subpopulacija prije stimulacije gotovo jednak u transplantiranih i dijaliziranih bolesnika, ali limfociti transplantiranih bolesnika mogu odgovoriti na stimulaciju IL-15, a dijaliziranih ne. I dok stimulacija IL-2 djeluje ponajprije na gustoću perforinskih molekula po stanici u transplantiranih, IL-15 povećava udio perforin pozitivnih limfocita i njihovih subpopulacija.

Kada je u pitanju direktan učinak IL-2 na citotoksičnost humanih NK stanica periferne krvi vidljiv je snažan citolitički efekt, što potvrđuju i naši rezultati: IL-2 u limfocitima periferne krvi jasno povisuje citotoksičnost tijekom dvosatnog citotoksičnog testa uz značajan gubitak perforina tijekom izlaganja K562 staničnoj liniji. Koncentracija IL-2 od 100UI/ml ostvarila je citotoksični učinak u limfocitima periferne krvi, a isto tako je bila dostatna za značajno induciranje ispoljenosti perforina. To govori u prilog pretpostavci da su limfociti periferne krvi sačuvali potencijal regulacije ekspresije perforina u citotoksičnim limfocitima. Poznato je da imunosupresivna terapija koju dobivaju transplantirani bolesnici smanjuje ili gotovo ukida nespecifični stanični imuni odgovor, koji je uključen kako u reakcije odbacivanja transplantata, tako i u obranu organizma od virusnih infekcija. Jedan od glavnih mehanizama je redukcija proizvodnje limfokina, među ostalima i IL-2. Naši rezultati ukazuju i na mogući dodatni mehanizam: supresiju ekspresije citolitičkog mehanizma. Da li je on

rezultat direktnog učinka imunosupresije i/ili supresije citokina (IL-2) što indirektno smanjuje aktivaciju gena za perforin, teško je reći.

Rezultati ovih istraživanja ukazuju na potrebu za daljnjom analizom imunoloških i neimunoloških čimbenika koji utječu na ishod transplantacije. No, već ovi rezultati pokazuju da je riječki transplantacijski centar na razini transplantacijske medicine u svijetu.

Ključne riječi: *Presadivanje bubrega, Citotoksični limfociti, NK stanice, Limfocitima posredovana citotoksičnost, Perforin, Citokini, Neimunološki čimbenici.*

## SUMMARY

The aim of transplantation is to ensure the longest possible, preferably permanent, graft survival. In the last three decades significant progress has been made in the field of clinical kidney transplantation. While the most common cause of graft loss in the past used to be acute rejection, it has been superseded by chronic rejection, today most frequently referred to as chronic renal dysfunction. Nowadays, on the threshold of the third millennium, the focus of interest has shifted to the factors that affect graft survival. These are generally divided into three groups: non-immunological factors, immunological factors, and tolerance induction factors, including immunosuppressive therapy prior to transplantation transfusion.

The investigations described in this thesis are partly retrospective, and partly prospective. The former consist mainly in the analysis of non-immunological factors (the so-called clinical factors) carried out on the material from the Department of Nephrology, Dialysis and Transplantation of the Clinical Hospital Center in Rijeka, obtained from 226 patients (age range 8 – 72 years) who had undergone kidney transplantation surgery in the period 1985-1999. The prospective investigations involved transplant recipients tolerating the transplanted kidney for over two years and patients on regular hemodialysis for several years, with healthy men and non-pregnant women as controls. Immunological laboratory analyses were carried out in the laboratories of the Department of Physiology and Immunology of the Medical Faculty, University of Rijeka.

The purpose of investigating non-immunological factors was to assess the impact of the following parameters on survival of kidney grafts: the respective age of the recipient and the donor, their gender, the length of period of dialysis prior to transplantation (the 'waiting list'), and the duration of cold kidney ischemia before transplantation.

The aim of retrospective investigation of immunological factors was to assess the impact of compatibility in the HLA system (HLA-A, B and DR locus), as well as the impact of the presence of panel reactive antibodies (PRA) in the recipient's serum on graft survival.

Retrospective investigations were used in the analysis of survival; life tables were used, with division of frequencies according to the length of survival distributed into several time intervals, and Kaplan-Meier's method. Comparison of survival between samples was done using non-parametrical tests: Gehan's generalized Wilcoxon test, and Cox's F-test.

The aim of prospective immunological investigations was to assess the changes in the mechanism of cell-mediated cytotoxicity – CMC, referred to as lymphocyte mediated cytotoxicity by American authors, particularly on the molecular level. In addition to assessing the phenotype of cytotoxic lymphocytes, the expression of cytolytic perforin molecule in these cells, and the average perforin content per cell (AFI value – average fluorescence intensity value) in certain subpopulations of perforin positive lymphocytes in the peripheral blood (P+LPK) of kidney transplant recipients, we assessed as well the NK cytotoxicity of peripheral blood lymphocytes in these patients.

We also wanted to investigate *in vitro* the impact of particular cytokines known to secrete locally during rejection response to transplanted grafts; to this aim we explored the phenotype characteristics and AFI value of a particular subpopulation of perforin positive peripheral blood lymphocytes of transplanted patients for 24 hours following the *in vitro* stimulation, as well as IL-2, IL-15 and ConA during 72 hours.

Our analysis showed a significantly better four-year survival of grafts in the recipients' 16-50 age group. A trend of poor survival was observed in cases when the age of both the donor and the recipient was over 50, however. In contrast, the gender of the recipient or the donor and the duration of dialysis before transplantation have no impact on graft survival. The poorer graft survival in cases of cold ischemia times longer than 24 hours

observed in some studies was not observed in our study, however, which is in line with major world studies. Similarly, the recognized significance of HLA class I and II antigens for graft survival was not confirmed in our study either, which could be explained by the small number of patients in comparison to big multicenter studies. Eurotransplant data suggest that the compatibility in the HLA system is significant in the first year, its effect decreasing over time afterwards. We have not observed poorer graft survival in immunized patients either (those with a high percentage of PRA), probably again due to the small number of these patients in our sample.

Investigation of the effect of IL-2 on perforin expression in peripheral blood lymphocytes of transplantation patients revealed that the percentage of perforin positive lymphocytes remains unchanged, regardless of the duration of stimulation (6 and 24 hours). Interestingly enough, the percentage of perforin positive lymphocytes prior to and following IL-2 stimulation showed no significant difference between the healthy subjects and transplant recipients. The AFI value, on the other hand, was significantly lower in the latter, which points to a decreased cytolytic potential of their cells. However, the number of molecules per cell (AFI value) in the transplants significantly increases already after 6 hours of stimulation. By monitoring the effect of stimulation by the same IL-2 concentration on perforin positive peripheral blood lymphocyte subpopulation, we observed that their percentage remains unchanged, in both the healthy and transplant recipients. On the other hand, the AFI value for perforin significantly increased in the latter group: in CD56+P+ lymphocytes after 6 hours' stimulation, and in CD8+P+ lymphocytes after 24 hours' stimulation, the AFI value for perforin being multifold lower in the transplant recipients. It appears that immunosuppressive therapy which inhibits the IL-2 secretion primarily affects the density of perforin molecules per cell. Namely, addition of exogenous IL-2 into the concentration of 100UI/ml results in an increase of AFI value for P in P+CD56+ lymphocytes (the first line of body defense) after 6



hours' stimulation, and in P+CD8+ lymphocytes after 24 hours' stimulation; this points to the existence of cytolytic potential of these cells, which is inhibited by immunosuppressive therapy, but can be induced.

Since IL-15 resembles IL-2 by its biological function, and takes over its function when IL-2 is lacking, we explored the effect of 3 days' stimulation of peripheral blood lymphocytes of kidney transplant recipients with IL-15, IL-2 and Concanavalin-A. Interleukin-15 significantly increased the percentage of peripheral blood perforin positive lymphocytes, namely CD8+P+ and CD56+ lymphocytes, acting at the level of subpopulations as well. It is interesting to note that while the percentage of perforin positive lymphocytes and their subpopulations before stimulation is practically the same in transplant and hemodialysis patients, the lymphocytes of the former can respond to IL-15 stimulation, while those of the latter cannot. Furthermore, while IL-2 stimulation affects primarily the density of perforin molecules per cell in transplant recipients, IL-15 increases the percentage of perforin positive lymphocytes and their subpopulations.

As regards the direct effect of IL-2 on cytotoxicity of human peripheral blood NK cells, a strong cytolytic effect has been observed, as shown by our results: IL-2 in peripheral blood lymphocytes clearly increased cytotoxicity during two-hour cytotoxic test with significant perforin loss during exposure of K562 to cell borderline. Concentration of IL-2 of 100UI/ml produced a cytotoxic effect in peripheral blood lymphocytes, and was sufficient for significant induction of perforin expression. These facts speak in favor of the hypothesis that peripheral blood lymphocytes have maintained the potential for perforin expression regulation in cytotoxic lymphocytes. It has been noted that immunosuppressive therapy given to transplant patients reduces or almost completely abolishes non-specific cell immune response, which is involved in both graft rejection response and in body defense from virus infections. One of the main mechanisms involved is the reduction of lymphokine production, among

others of IL-2 as well. Our results point to yet another possible mechanism: the suppression of cytolytic mechanism expression. Whether it is a result of a direct effect of immunosuppression and/or cytokine (IL-2) suppression, thus indirectly reducing perforin gene activation, still remains to be established, however.

The results of this investigation point to the need for further analysis of immunological and non-immunological factors affecting the outcome of transplantation. At the same time, however, they clearly demonstrate that the Transplantation Center in Rijeka is at the level of world achievements in transplantation.

*Key words: Kidney transplantation, Cytotoxic lymphocytes, NK cells, Lymphocyte-mediated cytotoxicity, Perforin, Cytokines, Nonimmunological factors.*

## 1 UVOD I OBRAZLOŽENJE TEME

Transplantacija tuđih tkiva i organa, pa tako i bubrega je, kao metoda liječenja bespovratno izgubljene funkcije organa, od davnine privlačila interes liječnika i istraživača. Već se u zapisima iz starog i srednjeg vijeka spominju pokušaji presađivanja tkiva i organa, no povijest transplantacije bubrega počinje u 20 stoljeću, razvojem kirurških tehnika na krvožilju, dijalitičkih metoda i spoznajom da je imunološka reakcija odgovorna za odbacivanje presađenih tuđih organa i tkiva.

Tako se paralelno s razvojem transplantacijske kirurgije povećao i interes za imunološka istraživanja. Jedan od pionira transplantacijske imunologije bio je sir Peter Medawar sa suradnicima (203), koji su prvi pokazali da je transplantacijska reakcija imunološkog karaktera, a kasnije su dokazali centralnu ulogu limfocita T u odbacivanju tuđeg tkiva. Međutim, studije koje su uslijedile, pokazale su da je taj proces mnogo kompleksniji nego se u početku mislilo, te da uključuje elemente i stanične i humoralne imunosti. Spoznaja o složenosti imunog odgovora na presađeno tkivo druge jedinke iste vrste (alotransplantat) proširena je eksperimentalnim istraživanjima koja su istakla čak i veće značenje reakcija kasne preosjetljivosti (190) nego stanične citotoksičnosti (346) u patogenezi destrukcije alotransplantata. Veliki doprinos ovim istraživanjima bio je razvoj tehnologije hibridoma (148), što je rezultiralo produkcijom specifičnih monoklonskih protutijela koja su mogla detektirati specifične stanične biljege na površini stanica, pa smo tako mogli definirati i fenotip leukocitnih populacija koje vrše različite funkcije. Monoklonska protutijela usmjerena na molekule na stanicama transplantata, kao i na

## I AUTOR

---

Ime i prezime : Sanja Balen-Marunić  
Datum i mjesto rođenja.: 8. studenog 1964. Rijeka  
Završeni fakultet : Medicinski fakultet Rijeka, 1989.  
Posdiplomski studij: Medicinski fakultet u Rijeci, 1994  
Sadašnje zaposlenje: K B C Rijeka, Zavod za transfuziju

---

## II PODACI O DISERTACIJI I MENTORIMA

---

Naslov rada: ULOGA IMUNOLOŠKIH I NEIMUNOLOŠKIH ČIMBENIKA U DUGOROČNOM PREŽIVLJAVANJU ALOGENIČKIH BUBREŽNIH TRANSPLANTATA

Broj str.233,sl.35,tab.27, bibliografskih podataka: 422  
Ustanova ili mjesto gdje je disertacija izrađena: Medicinski fakultet Rijeka i KBC Rijeka  
Znanstvena disciplina: BIOMEDICINA I ZDRAVSTVO  
Mentori: akademik Daniel Rukavina i prof.dr.sc. Ksenija Vujaklija-Stipanović  
Fakultet na kojem je obranjena: Medicinski fakultet Rijeka

---

## III OCJENA I OBRANA

---

Datum prijave teme: 5. rujna 2000.  
Datum predaje rad: 3. siječnja 2001.  
Datum sjednice Vijeća na kojoj je rad prihvaćen: 20. ožujka 2001.  
Sastav Povjerenstva koje je rad ocijenilo  
prof.dr.sc. Petar Orlić, prof.dr.sc. Franjo Čohar, akademik Daniel Rukavina i  
prof.dr.sc. Ksenija Vujaklija-Stipanović  
Datum obrane : 3. travnja 2001.  
Sastav Povjerenstva pred kojim je rad obranjen: I s t i

---

dodiru, bez prethodne stimulacije. Otkriće abnormalne ekspanzije LGL u krvi pacijenata s dugoživućim transplantatom koji su bili pod imunosupresijom, potaknulo je brojne autore na istraživanje fenotipskih karakteristika i funkcija tih stanica (71).

Zahvaljujući suvremenim metodama genetskog inženjeringa, upoznati su molekularni temelji stanicama posredovane citotoksičnosti. Nove metode su omogućile proizvodnju životinja s genetskim deficitom i životinja u kojih je pojedini gen snažno ekspimiran (133). Ključni eksperimenti napravljeni na ovim životinjama ukazali su na postojanje dva puta s brzim citolitičkim učinkom koji se mjeri u minutama ili satima. Posredovani su perforinom i/ili sustavom Fas Ligand-Fas. Nedavno je otkriven i treći mehanizam, posredovan molekulama TNF-a, koje su vezane za površinu citolitičkih limfocita i djeluju tek nakon dugotrajne inkubacije s ciljnim stanicama (dulje od 18 sati) (31).

Kao što je već naprijed rečeno reakcije stanične citotoksičnosti (CMC) su posredovane ubilačkim limfocitima: CTL i NK stanicama. Ove stanice u svojoj citoplazmi sadrže sekrecijska granula bogato opskrbljena perforinom, serinskim esterazama (tzv. granzimi) i drugim apoptotičkim molekulama. Ubilački proces započinje prepoznavanjem i kontaktom efektorske i ciljne stanice. Aktivacijski signali, uključujući ulazak  $Ca^{++}$  u CTL i NK stanice uzrok su brze reorijentacije sekretornog aparata i egzocitoze granula na mjesto vezanja efektorske i ciljne stanice.

Citolitički glikoprotein perforin pronađen je u citoplazmatskim granulama stanica sa ubilačkom aktivnošću, kao što su NK stanice, CTL ( $CD8^+$  i gama/delta T limfociti) i LAK stanice (147). Prvobitno su perforin pozitivne stanice opisane uz virusna, autoimuna i

tumorska oboljenja gdje postoji imunološko prepoznavanje i potencijalno citolitičko djelovanje. Prisutnost perforin pozitivnih stanica dokazana je i u patološki promjenjenom tkivu u akutnoj transplantacijskoj reakciji na srčane, bubrežne i plućne alotransplantate (50, 138). Važnost ovog mehanizma stanične citotoksičnosti, posebno tijekom akutne krize odbacivanja, dokazali smo i u našim istraživanjima (19).

U regulaciji ekspresije perforina sudjeluju citokini, topivi glikopeptidi molekularne težine oko 30 kD koji posreduju specifične učinke na ciljnim stanicama. Njihovo se djelovanje mora sagledati u kontekstu tkivnog okoliša, u normalnim i patofiziološkim uvjetima (386). Prema Th1/Th2 staničnom modelu pokazalo se da Th1 citokini kao IL-2 i IFN-gamma imaju glavnu ulogu u reakciji akutnog odbacivanja posredovanog stanicama, tako što aktiviraju CD4+ limfocite T i makrofage, ali i CD8+CTL (388). Th2 citokini IL-4 i IL-10 mogli bi inhibirati proces odbacivanja, ili čak inducirati toleranciju (388). Citokini sudjeluju i u regulaciji ekspresije perforina.

Danas, na pragu trećeg milenija, u središtu interesa su čimbenici koji utječu na preživljavanje transplantata. Poznato je da na preživljavanje, osim imunoloških, djeluju i neimunološki ili tzv. klinički čimbenici. Neimunološki čimbenici koji utječu na ishod transplantacije mogu se podijeliti u tri grupe, ovisno da li su vezani za primatelja organa, davatelja ili sam transplantirani organ. Analiza davatelja uključuje dob, spol i uzrok smrti (u slučaju kadaveričnog transplantata) ili opće kliničko stanje živog davatelja. Što se samog transplantata tiče prati se trajanje ishemijske bubrega, način pohranjivanja, kirurške tehnike i utjecaj transplantacijskog centra. Kod primatelja se gleda dob, spol, osnovna bolest koja je dovela do kroničnog zatajenja bubrega, kliničko stanje u trenutku transplantacije

(psihofizička kondicija), vrijeme provedeno na dijalizi, način dijaliziranja, te eventualne prethodne transplantacije.

Posljednja dva desetljeća, zahvaljujući razvoju transplantacijske imunologije, molekularne biologije i imunosupresivne terapije, kao i rafiniranim kirurškim tehnikama, stotine transplantacijskih timova diljem svijeta postiže vrlo dobre rezultate, ističući pri tom jednogodišnje preživljavanje bolesnika veće od 90%, te preživljavanje transplantata od 80 do 90% (347).

Na žalost većina kliničkih studija, do danas, se bavila ili samo imunološkim, ili samo kliničkim parametrima. Međutim, sve je više dokaza koji govore u prilog njihovom zajedničkom međudjelovanju, pa je naš cilj bio ispitati utjecaj imunoloških i neimunoloških čimbenika na preživljavanje transplantata.

Cilj istraživanja neimunoloških čimbenika bio je ispitati utjecaj slijedećih parametara na preživljavanje presađenih bubrežnih transplantata: dob primatelja i davatelja organa, spol primatelja i davatelja organa, vrijeme provedeno na dijalizi prije transplantacije (tzv. "lista čekanja") i vrijeme trajanja hladne ishemije bubrega prije transplantacije.

Cilj retrospektivnih istraživanja imunoloških čimbenika bio je ispitati utjecaj podudarnosti u HLA sustavu (HLA-A, B i DR lokus), kao i utjecaj prisutnosti tzv "panel reaktivnih protutijela" (PRA) u serumu primatelja na preživljavanje presatka.

Cilj prospektivnih imunoloških istraživanja bio je ispitati promjene u mehanizmu limfocitima (stanicama) posredovane citotoksičnosti (cell-mediated cytotoxicity - CMC ili lymphocyte mediated cytotoxicity angloameričkih autora), posebno na molekularnoj razini.

Pored određivanja fenotipa citotoksičnih limfocita, ekspresije citolitičke molekule perforina u ovim stanicama, te sadržaja perforina po stanici (AFI vrijednost) u pojedinim subpopulacijama perforin pozitivnih limfocita periferne krvi (P+LPK) transplantiranih bolesnika), ispitali smo i NK citotoksičnost limfocita periferne krvi transplantiranih bolesnika

*In vitro* smo željeli istražiti i utjecaj pojedinih citokina za koje znademo da se luče lokalno tijekom reakcije odbacivanja presađenih transplantata, stoga smo ispitali fenotipske karakteristike i AFI vrijednost pojedinih subpopulacija perforin pozitivnih limfocita periferne krvi transplantiranih bolesnika, nakon stimulacije *in vitro* s IL-2 kroz 24 sata, te IL-2, IL-15 i ConA kroz 72 sata.

Cilj transplantacije kao terapijske metode je osigurati što duže preživljavanje presatka. Svakako se nameće potreba za utvrđivanjem parametara koji utječu na ishod transplantacije, pri čemu se mora uzeti u obzir etičke, biološke, sociološke i administrativne čimbenike. To zahtjeva suradnju stručnjaka iz različitih područja medicine, tehnike i molekularne biologije. Pitanje "kako osigurati dugogodišnje preživljavanje presatka?" u središtu je aktivnosti znanstvenika i zahvaljujući njihovim naporima i dostignućima svjedoci smo velikog napretka ostvarenog u zadnjem desetljeću.



## 2 OPĆI DIO

### 2.1 TRANSPLANTACIJA BUBREGA KROZ POVIJEST

Prvi pokušaji presađivanja tkiva i organa već se spominju u zapisima starog i srednjeg vijeka, no povijest transplantacije bubrega počinje u 20. stoljeću razvojem kirurških tehnika na krvožilju.

Prvu uspješnu eksperimentalnu transplantaciju bubrega na psima izveo je E.Ullman 1902.g u Beču (213). Četiri godine kasnije Jaboulay je pokušao presaditi bubreg svinje uremičnom bolesniku, što je rezultiralo neuspjehom (104).

Prvu kliničku transplantaciju bubrega krvno srodne osobe učinio je Michon sa suradnicima, u Francuskoj 1952.g., kada je majčin bubreg transplantirao unesrećenom sinu (208). Imunosupresivna terapija nije primjenjena i bubreg je odbačen 22. dana. Dvije godine kasnije u Bostonu, Merrill i suradnici izvode prvu uspješnu transplantaciju između genetski istovjetnih blizanaca. Početkom 1959.g. presađuju bubreg neidentičnom blizancu, prethodno ozračivši primatelja. Potaknuti njihovim uspjehom to isto čine i liječnici bolnice Necker u Parizu (104). Nakon toga slijede brojni pokušaji na području eksperimentalne transplantacije tkiva i organa, s različitim ishodom. U siječnju 1971.g. u Rijeci je uspješno presađen prvi bubreg (76). Od tada pa do danas najozbiljnija komplikacija vezana uz transplantaciju organa je kriza odbacivanja, kao odgovor imunološkog sustava na strano tkivo.

U ranom razdoblju razvoja transplantacije, imunosupresivna terapija nije ordinirana sve dok nije postojao klinički dokaz da prijeti proces odbacivanja. Međutim, kada je postalo jasno da se odbacivanje javlja uvijek, samo u različitim razdobljima nakon transplantacije, imunosupresija je postala rutinski postupak kojim se nastoji produžiti preživljavanje presatka (144).

Stjecanje novih znanja o imunosupresiji, dovodi 1953.g. do uvođenja kortikosteroida u transplantaciju. Kombinacijom kortikosteroida i azatioprima (Imuran) stvoren je standardni imunosupresivni protokol koji je rezultirao boljim preživljavanjem transplantata (122). Starzl 1966.g. prvi primjenjuje antilimfocitni globulin, a ranih osamdesetih godina, nakon pozitivnih iskustava što su ih stekli Calne i suradnici, s velikim entuzijazmom uvodi se Ciklosporin A. Otkriće moćnih imunosupresiva kao što su FK-506 (351), mišje monoklonsko protutijelo OKT3, te humanizirana monoklonska protutijela koja mogu djelovati na točno određenu stanicu ili stanični receptor doprinosi unaprijeđenju kliničke transplantacije.

Zbog nastojanja da se poboljšaju rezultati transplantacije paralelno s razvojem transplantacijske kirurgije povećao se interes za imunološka istraživanja. Jedan od pionira u tom području bio je Medawar sa suradnicima. On je od 1942-1945.g. objavio radove o ponašanju alogenih kožnih transplantata u miševa opisujući fenomen sekundarne reakcije (82, 203). Nešto kasnije Medawar ističe centralnu ulogu limfocita T u odbacivanju tuđeg tkiva, čime je stvoren novi pristup problemu imunološke reaktivnosti (190). Istraživanja koja su uslijedile pokazale su da je taj proces mnogo složeniji, te da uključuje elemente i stanične i humoralne imunosti. U patogenezi destrukcije alotransplantata veće je značenje

reakcije kasne preosjetljivosti (58, 190) nego stanične citotoksičnosti (164, 368). Velik doprinos ovim istraživanjima bio je razvoj tehnologije hibridoma (148), što je rezultiralo produkcijom specifičnih monoklonskih protutijela koja su mogla detektirati stanične biljege na površini stanica, te tako definirati fenotip različitih leukocitnih populacija. Monoklonska protutijela usmjerena na molekule na stanicama transplantata su omogućila praćenje kompleksnih zbivanja u presađenom tkivu tijekom odbacivanja (56, 107, 262).

I dok su nove spoznaje u području imunologije omogućile razvoj transplantacije, značajni uspjesi na polju kliničke transplantacije dali su novi poticaj imunolozima, stavljajući u središte interesa koncept stečene imunološke tolerancije i ulogu koju ima glavni sustav tkivne srodnosti (HLA) u kontroli imunološke reaktivnosti. Stvorena je čvrsta veza između transplantacije i imunologije čime je učinjen golem napredak u kliničkoj medicini.

## 2.2 ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA PREŽIVLJAVANJE TRANSPLANTATA

Cilj transplantacije, kao terapijske metode je osigurati što duže, a po mogućnosti i trajno, preživljavanje transplantata. Ukoliko do odbacivanja dođe u prvoj godini, to ne predstavlja nikakvu dobrobit za bolesnika u poredbi sa dijalizom, a niti u financijskom smislu (cost-benefit). Tijekom prve transplantacije i krize odbacivanja dolazi do senzibilizacije primatelja, što otežava, a ponekad i onemogućava ponovno nalaženje podudarnog presatka.

Van Rood je 1982.g. postavio hijerarhijsku ljestvicu imunoloških faktora koji utječu na ishod transplantacije (410). Prema njemu najvažniji čimbenik je da li je primatelj jak ili slab reaktivac (responder), a slijedeći su prijetransplantacijske transfuzije krvi. Tek na trećem mjestu je imunogeničnost HLA determinanti (podjednako A, B i DR lokus), a na četvrtom mjestu imunogeničnost non-MHC determinanti. Pri tom su naglašene međusobne interreakcije svih čimbenika. Međutim, osim imunoloških čimbenika o sudbini transplantata odlučuju i brojni neimunološki utjecaji. To se često zaboravlja u imunološkim stručnim krugovima, ali je dobro poznato kliničarima.

Posljednja tri desetljeća učinjen je velik napredak na području kliničke transplantacije bubrega. I dok je ranih šezdesetih godina jednogodišnje preživljavanje bubrega, ako se radilo o živućem donoru bilo 50%, a 30% za kadaverični transplantat, početkom devedesetih 85-90% kadaveričnih bubrega je funkcioniralo u prvoj godini (8). Isprva je najčešći razlog gubitka transplantata bila akutna kriza odbacivanja ili smrt uslijed infekcija koje su bile posljedica imunosupresivne terapije. Kasnije je akutno odbacivanje

postalo sve rjeđi razlog gubitka transplantata, ustupivši mjesto kroničnom odbacivanju ili sve češće korištenom izrazu kronične disfunkcije transplantata (196). Budući da je akutna kriza odbacivanja danas sve rjeđi razlog gubitka transplantata (293) u središtu interesa je kronično odbacivanje, pa su se klinička istraživanja i okrenula tom problemu. Dvije su glavne hipoteze patogeneze kroničnog odbacivanja. Prvu čine neimunološki čimbenici, odgovorni za kasni gubitak bubrežne funkcije (33, 371). Pretpostavlja se da smanjena bubrežna masa transplantiranih bubrega u odnosu na primateljeve potrebe, vodi hiperfiltraciji transplantiranih nefrona, što rezultira progresivnim oštećenjem bubrega i daljim razvojem hiperfiltracije preostalih nefrona (371). Začarani krug progresivnog gubitka nefrona uslijed hemodinamski izazvane glomeruloskleroze, povećava se oštećenjima nastalim tijekom prezervacije i reperfuzije organa, ciklosporinske citotoksičnosti i akutnih kriza odbacivanja (316). Međutim kako se histološki nalaz hiperfiltracije rijetko nađe u biopsijama transplantiranih kod kojih se razvija kronično odbacivanje, moglo bi se pretpostaviti da oštećenje izazvano hiperfiltracijom nije značajno za kasni gubitak bubrežne funkcije (195). No, Chertow i sur. su pokazali da količina funkcionirajućih nefrona u transplantatu u skladu sa primateljevim potrebama, značajno utječe na dugoročno preživljavanje transplantata (45, 46).

Druga pretpostavka je da kronično odbacivanje uzrokuju imunološki (antigeni) čimbenici. Pretpostavlja se da je u većine transplantiranih kroničnom odbacivanju prethodila akutna kriza odbacivanja (195, 371). Na mišjem eksperimentalnom modelu se vidjelo da je razvoj histoloških oštećenja karakterističnih za kronično odbacivanje proporcionalan broju akutnih kriza odbacivanja (121).

Akutna kriza predstavlja čimbenik rizika budući da dolazi do ireverzibilnog oštećenja nefrona, koje u pravilu dovodi do pojačane aktivnosti (u literaturi poznato kao hiperfiltracija) preostalih nefrona (196).

Klinička istraživanja koja su uslijedila dovela su do dva glavna čimbenika koji vode kroničnoj disfunkciji transplantata: neimunološki (33, 348) i imunološki (antigenički) (195, 121). Na žalost, većina studija koja je uslijedila, pratila je ili samo imunološke ili pak neimunološke čimbenike. Posljednjih 5 godina sve je više dokaza o njihovom zajedničkom utjecaju na preživljavanje transplantata (54, 120, 145, 196, 316).

Svakako se nameće utvrđivanje parametara koji utječu na ishod transplantacije, pri čemu se mora uzeti u obzir etičke, biološke, sociološke i administrativne čimbenike. Danas se smatra da na ishod transplantacije utječu:

- imunološki čimbenici
- klinički čimbenici (neimunološki čimbenici)
- čimbenici koji induciraju imunološku toleranciju (prijetransplantacijske transfuzije i imunosupresivna terapija)

## 2.2.1 IMUNOLOŠKI ČIMBENICI

### 2.2.1.1 Otkriće HLA sustava

Mnoge studije su pokazale važnost HLA sustava u transplantaciji. Prve spoznaje o leukocitnim antigenima dobili smo istraživanjem poslijetransfuzijskih reakcija (leukopenija i febrilne posttransfuzijske nehemolitičke reakcije). HLA antigeni su otkriveni aglutinacijskim tehnikama, korištenjem antileukocitnih seruma od imuniziranih davatelja. Za to otkriće su zaslužni Dausset i Nenna (60), koji su 1952.g. otkrili prvi leukoaglutinin. Nakon toga slijedi sustavno istraživanje protutijela izazvanih transfuzijama krvi, pri čemu se primjenjivala leukoaglutinacijska tehnika (254). Prvi leukocitni antigen u ljudi nazvan je Mac (sada HLA-2) prema inicijalima ljudi u kojih je identificiran, a otkrio ga je Dausset 1958.g. (61).

Slijedeći značajan korak učinjen je iste godine kada su Payne i Rolfs u SAD (255) i van Rood u Evropi (372) otkrili antileukocitna protutijela u serumima multipara. Koristeći računalne analitičke metode, van Rood 1963.g. uspijeva dokazati i drugi antigen koji naziva lokus 4 ili "FOUR", s dvije alele 4a i 4b (sada Bw4 i Bw6). Godinu dana kasnije R.Payne sa suradnicima potvrđuje postojanje dva lokusa, te prvootkriveni Mac nazivaju LA (od L-leukocit, A-prvi lokus), a za drugi zadržavaju naziv "FOUR" (373). Kasnije lokus LA postaje A, a FOUR postaje lokus B. Svaki od ova dva lokusa sadrži više alela koji dobivaju brojeve prema redoslijedu otkrivanja. Ta su otkrića omogućila postavljanje bazičnog koncepta HLA sustava. Dausset i sur.(62), te Capellini i sur. (42) kroz obiteljske studije

dokazuju da su oba lokusa smještena vrlo blizu na istom kromosomu, a Kissmeyer-Nielsen i sur. daju genetski dokaz o postojanju tih lokusa, opisavši prvi crossing-over (8).

Pored genetskih istraživanja treba istaći značajno otkriće Terasakija i Mc Clellanda 1964.g. o citotoksičnom djelovanju antiseruma, poznatom kao mikrolimfocitotoksični test (349). Iste godine su Bach i Hirschhorn utvrdili da se prepoznavanje HLA antigena može postići i uz pomoć receptora na limfocitima T (17), tzv testom miješane limfocitne kulture (MLC), kojim se može dokazati četvrti lokus D, koji je usko vezan uz HLA. Test se zasniva na miješanju u tkivnoj kulturi limfocita (MLC) dvaju pripadnika iste vrste, pri čemu nastaje blastična transformacija i stanična proliferacija limfocita, koja se može mjeriti dodavanjem radioaktivnog timidina.

Još je jedan čimbenik pridonio brzom otkrivanju izuzetno složenog područja HLA serologije i genetike. To je intenzivna međunarodna suradnja koja započinje 1964.godine Prvim workshopom i Konferencijom o histokompatibilnosti, a traje do današnjih dana (317). Kao rezultat otkrića mnogobrojnih novih specifičnosti u Torinu se 1967.godine osniva Komitet za nomenklaturu. Tri godine kasnije u Los Angelesu Komitet odlučuje da novootkrivene specifičnosti koje su do tada imale uglavnom lokalne oznake, dobiju oznaku "w" od workshop i odgovarajući broj prema redosljedu.

Model HLA sustava s dva lokusa nije se mogao dugo održati. Već 1970.godine Sandberg i suradnici su otkrili serum SA-AJ koji je davao dodatne pozitivne reakcije (288). Tri godine kasnije Mayr i sur. (201), te Solheim i sur. (318) potvrđuju postojanje trećeg lokusa, u novoj nomenklaturi nazvanog lokus C.



### 2.2.1.2 Uloga antigena tkivne srodnosti u transplantaciji

Iako su se prve spoznaje o HLA sustavu javile zbog transfuzioloških potreba, danas taj sustav ima najznačajniju primjenu u transplantacijskoj medicini. Van Rood i sur. su 1966.g. otkrili da kožni transplantat između HLA i ABO identičnih srodnika preživljavaju značajno duže nego transplantati koji su identični u samo jednom sustavu sa primateljem (374). Najvažniji kriterij za transplantaciju postaje što bolja podudarnost u ABO i HLA sustavu. Do kraja sedamdesetih godina se vodilo računa samo o podudarnosti u HLA-A i B antigenima, a danas se zna da najveće značenje ima podudarnost u DR lokusu, zatim B lokusu, manje A, a C lokus je gotovo nevažan.

Postoje vrlo jasni dokazi da antigeni klase I i klase II utječu na preživljavanje transplantata i služe kao stimulans u reakciji odbacivanja. Budući da se antigeni klase I nalaze na svim stanicama sa jezgrom, isto tako se nalaze i u transplantatu, potičući domaćina na imunološki odgovor. Antigeni klase II mogu biti prisutni u transplantiranom tkivu ili organu ili se mogu prenositi limfocitima B i monocitima u krvožilnom sistemu transplantata. Svakako, mehanizam odbacivanja, a isto tako i toleriranja presatka je mnogo složeniji i nikako se ne može objasniti samo polimorfizmom antigena klase I i II.

### 2.2.1.3 Antigeni klase I

Antigeni klase I kodirani su lokusima HLA-A, HLA-B i HLA-C i imaju neka zajednička svojstva. Nalaze se na svim stanicama sa jezgrom kao i na trombocitima, a najobilnije su zastupljeni na endotelnim stanicama i stanicama koštane srži. Njihova rasprostranjenost u organizmu obilježava njihovu funkciju u definiranju vlastitog i prepoznavanju tuđeg ili izmjenjenog vlastitog (63). Dausset ih je nazvao identifikacijskom kartom čitavog organizma (63).

Građeni su od dva polipeptidna lanca: teškog alfa lanca (44000 daltona) i lakog lanca (beta- mikroglobulin od 12000 daltona) (225). Teški se lanac nalazi na staničnoj površini, sastavljen je iz tri domene: alfa 1, 2 i 3 od kojih je svaka građena od 90 aminokiselina. Jedan se kraj proteže kroz staničnu membranu u citoplazmu, kodiran je HLA sustavom. Strominger i suradnici su odredili sekvencije aminokiselina (249, 332). Laki lanac je kodiran genima smještenim na 15. kromosomu i nekovalentno je vezan za alfa lanac (alfa 3 domenu) na staničnoj površini (144). Na taj način laki lanac zajedno sa alfa 1 i 2 domenama teškog lanca tvori "košaricu" tj mjesto gdje dolazi do spajanja aloantigena i MHC molekule i prezentacije antigena CD8+ limfocitima T.

Nešto kasnije su identificirana još tri gena klase I: HLA-E, HLA-F i HLA-G, no njihovo značenje u transplantacijskoj imunologiji nije još sasvim razjašnjeno (144). Antigeni koje određuju ovi geni nazivaju se i neklasični HLA antigeni klase I.

Zbog sve većeg nedostatka organa za transplantaciju, postavilo se pitanje da li nepodudarnost u nekim HLA specifičnostima mora voditi gubitku transplantata. Tako je

postavljena hipoteza dozvoljenih nepodudarnosti ( u anglosaksonskoj literaturi poznato kao permissible mismatching) (198). U potrazi za HLA specifičnostima koje primatelj može tolerirati, prepostavilo se da će bolesnik rjeđe stvarati HLA specifična protutijela na one HLA antigene majčinog haplotipa koje bolesnik nije naslijedio - NIMA (od engl. non-inherited maternal antigen) (48). U velikoj studiji Eurotransplanta koja obuhvaća 11-godišnje razdoblje, uočen je značajan efekt za nenaslijeđene antigene (NIMA) u HLA-A lokusu u trogodišnjem preživljavanju. To bi se moglo objasniti intrauterinom izlaganju imunog sustava fetusa nenaslijeđenim majčnim antigenima, a može se usporediti s povoljnim prijetransplantacijskim učinkom transfuzija krvi (308). Nije se pokazao povoljan efekat za nenaslijeđene majčine antigene u lokusima HLA-B i DR (308).

Već je ranih osamdesetih uočeno da podudarnost u DR lokusu ima jači utjecaj na preživljavanje transplantiranog bubrega nego li podudarnost u HLA-A i B lokusu (354). I kasnije studije su pokazale da podudarnost u HLA-A i B lokusu znatno manje utječe na preživljavanje transplantata, nego li podudarnost u DR lokusu (238, 352). No neki ipak sugeriraju da bolesnici podudarni sa davateljem u ovim lokusima imaju bolje preživljavanje, nego li oni nepodudarni (86, 306, 307).

#### 2.2.1.4 Antigeni klase II

Antigeni klase II su kodirani DR, DQ, DP, DO i DN lokusima, tj. dijelovima HLA-D regije (146). Nalaze se na stanicama koje su odgovorne za predočavanje antigena i indukciju imunog odgovora, a to su monociti, makrofagi, Langerhansove stanice epidermisa, dendritičke stanice limfatičnih organa, limfociti B i epitelne stanice timusa (300). Ostale stanice, napr. limfociti T i stanice endotela krvnih žila mogu eksprimirati molekule klase II nakon aktivacije citokinima ili izvjesnim infekcijskim agensima (144). Molekule klase II građene su od teškog alfa lanca (34000 daltona) i lakog beta lanca (28000 daltona) koji se protežu kroz staničnu membranu u citoplazmu (144). Svaki se lanac sastoji od dvije domene (Alfa 1 i 2, te beta 1 i 2) koje su smještene izvan stanice i protežu se kroz staničnu membranu u citoplazmu. Oba lanca imaju tri regije: ekstracelularnu hidrofilnu, transmembransku hidrofobnu i intracelularnu hidrofilnu. Beta lanac je polimorfan tj. nosi aloantigenska mjesta (144, 146).

Antigeni klase II mogu funkcionirati kao receptori za tuđe antigene, posredovati u kooperaciji između pojedinih populacija imunih stanica i kontrolirati produkciju protutijela (144). Oni služe kao restriktivni elementi u interrekciji između predočnih stanica i CD4+ limfocita T, koji reagiraju specifičnim imunim odgovorom. Antigeni klase II se dokazuju serološkim, imunokemijskim i staničnim metodama, među koje spada i MLR, te metodama molekularne biologije.

Uloga HLA-DR lokusa u transplantaciji je neosporna. Prvi su je dokumentirali Ting i Morris (354), a potvrdile su i brojne kasnije studije (238, 334). Smatra se da podudarnost

u DR lokusu ima veći utjecaj na preživljavanje presatka (354) vjerojatno zbog njegove veće imunogeničnosti i jače ekspresije DR molekula na endotelu presađenog bubrega (72).

Uvođenjem DNA metodologije, javlja se mogućnost definiranja tzv. "split" specifičnosti u DR lokusu (pod "split" specifičnostima se smatraju antigeni od 11 do 18 u DR lokusu tj. splitovi od DR 2, 3, 5 i 6). Vidjelo se da je pri ponovnim transplantacijama značajna podudarnost na nivou splitova DR lokusa (243). Uočeno je da je prisutnost nekih antigena HLA DR lokusa udružena s preživljavanjem presatka. Tako neki ukazuju na bolje preživljavanje presatka u DR1, DR2 i DR3 pozitivnih bolesnika, a drugi naprotiv na slabije preživljavanje (415). Istraživanja u Eurotransplantu su pokazala bolje preživljavanje DR6 pozitivnog bubrega (112), ali veću sklonost odbacivanju u DR6 pozitivnih primatelja (69).

Proučavanjem zajedničkog utjecaja DR lokusa u kombinaciji sa ostalim, pokazalo se da podudarnost u DR i B lokusu bitno poboljšava preživljavanje presatka (306, 307).

U Eurotransplantu je stalno prisutan pozitivan efekt podudarnosti u HLA sustavu kako na jednogodišnje, tako i na 5-godišnje preživljavanje presatka (238). Na grupi od 10000 transplantiranih kadaveričnih bubrega vidjelo se da ukoliko su primatelj i davatelj potpuno podudarni u HLA sustavu (zero mismatches – 0 MM), preživljavanje je značajno bolje nego u onih sa dvije nepodudarnosti (2MM), a isto tako i funkcija transplantata (238), a potpuno neovisno o primjeni ciklosporinske terapije. Slične analize iz različitih centara diljem svijeta pokazale su iste rezultate (223, 75, 374).

Novija uzvješća o važnosti HLA sustava u transplantaciji bubrega koncentriraju se na nacionalnu (246) i internacionalnu razinu (86, 245, 246, 314). Javlja se potreba za zadovoljavajućim statističkim testovima koji će pravilno vrednovati podatke prikupljene iz

nekoliko centara. Međutim postoji i problem poznat kao "efekt centra", što je vodilo kritiziranju multicentričnih podataka, međutim studije s izrazito velikim brojem bolesnika uključenih u analizu, mnogo su manje podložne utjecaju neuobičajenih slučajeva iz pojedinih centara (194).

Preživljavanje presatka je to bolje što je bolja podudarnost u HLA sustavu (posebice DR lokusu, zatim B i na kraju A lokusu). Uz isti stupanj podudarnosti u HLA, duže je preživljavanje bubrega biološki srodnog davatelja, jer se uz poznate gene u bloku nasljeđuju i nepoznati geni koji se vjerojatno mogu naći i u primatelja i u davatelja.

Usprkos znatnom napretku na području imunosupresivne terapije, poluživot transplantiranog bubrega (od umrlog davatelja) rijetko prelazi 10 godina (8). U slučaju HLA identične blizanačke transplantacije vijek preživljavanja se znatno produžava (na 34 godine), a ako je davatelj roditelj, koji je HLA haploidentičan, prosjek je 11 godina. Danas je općeprihvaćen stav da postoji značajna korelacija između podudarnosti u antigenima HLA sustava (naročito DR i B) i preživljavanja transplantata (306, 307). Unatoč toj korelaciji, dolazi do odbacivanja HLA identičnih bubrega, ali i dugogodišnjeg funkcioniranja potpuno nepodudarnih presadaka. To govori u prilog postojanju i drugih faktora koji također utječu na ishod transplantacije.

Pored glavnih ili snažnih (major) antigena HLA sustava, postoje i slabi (minor) antigeni. Među njima treba spomenuti **krvnogrupni sustav Lewis**: izgleda da nepodudarnost u Lewis antigenima između primatelja i davatelja ima loš utjecaj na preživljavanje presatka (8).

### 2.2.1.5 Citotoksična protutijela na HLA antigene

Nazočnost citotoksičnih protutijela u krvi primatelja na HLA antigene prisutne u davatelja svakako predstavlja problem. Protutijela mogu biti uperena protiv limfocita T, limfocita B i protiv antigena endotelno-monocitnog sustava (8).

Ukoliko su protutijela usmjerena protiv limfocita T, ona su uglavnom specifična za HLA antigene klase I i predstavljaju loš prognostički faktor, što su pokazale brojne studije (8). Prisutnost ovih protutijela, usmjerenih protiv limfocita T se ispituje rutinski u serumu potencijalnih primatelja u regularnim intervalima, na panelu stanica poznate antigeničnosti (odatle naziv panel reaktivna protutijela-PRA). Ako se nalaze u serumu primatelja i specifično reagiraju sa antigenima davatelja, predstavljaju apsolutnu kontraindikaciju za transplantaciju bubrega. Stoga ovi imunizirani bolesnici čine posebnu visokorizičnu skupinu primatelja kojoj je potrebno posvetiti posebnu pažnju. Visoko imunizirani bolesnici (PRA više od 85%) imaju tri puta veći rizik od gubitka transplantata u prvom mjesecu nakon transplantacije u poređenju s neimuniziranim bolesnicima (316). Chertow i sur. su potvrdili negativan utjecaj visokog postotka PRA u primatelja na preživljavanje transplantata (45). Pretpostavlja se da bolesnici s visokim postotkom PRA posjeduju alospecifične limfocite B (aktivirani B limfociti s funkcijom antigen predočnih stanica-APS), drugim rječima postoji indirektni put prepoznavanja antigena (117). Međutim, Bryan i sur. su vidjeli da se preživljavanje transplantata nije razlikovalo u grupi visoko senzibiliziranih bolesnika (PRA>80%) u poredbi sa bolesnicima s niskim postotkom PRA, bez obzira da li se radilo o prvoj ili drugoj transplantaciji (36). Ali, pokazalo se da je u ovih

visoko senzibiliziranih bolesnika izuzetno važna podudarnost u DR lokusu, jer je preživljavanje transplantata bilo značajno lošije u onih sa jednom ili dvije nepodudarnosti, negoli u podudarnih (36).

Protutijela protiv limfocita B se obično traže u trenutku izvođenja križne probe sa limfocitima davatelja organa. Prema reaktivnosti ova se protutijela dijele u tri tipa: usmjerena protiv antigena HLA-A, B i C; protiv antigena HLA klase II koja je prisutna na limfocitima B i protiv staničnih struktura nevezanih za HLA sustav tj. protiv endotelno-monocitnih stanica. Deset posto odbacivanja koja se javljaju 4-6 tjedana nakon transplantacije moglo bi se pripisati nepodudarnosti primatelja i davatelja u antigenima ovog sustava (8). Uočena je i povećana učestalost limfocitotoksičnih protutijela (36% : 4%) i povećana sekrecija IL-6 putem nestimuliranih limfocita B prije transplantacije u bolesnika koji čekaju drugi ili treći presadak (387). Međutim, interesantno je da funkcija limfocita T i pomoćničkih limfocita CD4 prije transplantacije drugog ili trećeg presatka nije povećana. Opelz nije u maloj grupi retransplantiranih pronašao veću učestalost akutnog odbacivanja, niti slabije jednogodišnje preživljavanje presatka (387).

Među imunološke čimbenike treba spomenuti i **pripadnost etničkoj grupi**, budući da se vidjelo da učestalost HLA antigena varira u pripadnika različitih etničkih grupacija i rasa, Dvije velike studije (194, 196) su pokazale lošije preživljavanje ukoliko bubreg potječe od davatelja crne rase.

Nezaobilazan imunološki kriterij predstavlja **podudarnost u ABO krvnogrpnom sustavu**, jer u protivnom dolazi do hiperakutnog odbacivanja (8).



### 2.3 TRANSPLANTACIJSKA IMUNOLOGIJA

Dio imunologije koji se bavi presađivanjem tkiva i organa naziva se transplantacijskom imunologijom, a imunološka reakcija koja u organizmu nastane na genetski tuđe presađeno tkivo je transplantacijska reakcija. Do nje ne dolazi samo ukoliko se radi o autotransplantaciji ili transplantaciji među jednojajčanim blizancima, jer se radi o genetski istovjetnim jedinkama. Smatra se da akutna kriza odbacivanja, kao i odgođena funkcija transplantata (delayed graft function u anglosaksonskoj literaturi) loše utječu na dugogodišnje preživljavanje transplantata (196).

S obzirom na nepodudarnost u genetskom sustavu između primatelja i davatelja može se razlikovati četiri vrste transplantata:

1. **Autologni transplantat**, kada se tkivo ili organ transplantira na drugo mjesto istoj osobi (npr. kožni transplantat u opeklinama, koštana srž u leukemičnih bolesnika u remisiji)
2. **Singenični transplantat**, presađeno tkivo u genetski istovjetnim jedinkama (jednojajčani blizanci, visokosrođeni sojevi životinja)
3. **Alotransplantat**, presađeno tkivo među jedinkama iste vrste
4. **Ksenotransplantat**, tkivo presađeno između jedinki različitih vrsta.

Transplantacijska reakcija ima sve odlike imunološke reakcije:

- svojstvo pamćenja što se očituje u sposobnosti da na tuđi antigen koji u organizam uđe po drugi put reagira brže no prvi put, pa tako razlikujemo primarnu i sekundarnu reakciju,
- generaliziranost, što znači da, bez obzira na koje mjesto u organizmu antigen uđe, reakcija će se odvijati nesmetano,
- specifičnost za određeni antigen,
- ovisnost o limfatičkom sustavu.

Imuni sustav zdravog čovjeka jasno prepoznaje potencijalno štetne i tuđe antigene koji bivaju neutralizirani ili odstranjeni iz organizma. Prilikom transplantacije alogernih tkiva dolazi do reakcije imunološki kompetentnih stanica primatelja na njima nepoznate antigene strukture transplantata. Već je tri desetljeća poznato da je imunološki odgovor primatelja staničnog i humoralnog tipa, ali dominantnu ulogu ima stanična imunost (8, 144).

### 2.3.1 KLASIFIKACIJA MEHANIZMA ODBACIVANJA TRANSPLANTATA

Iako se poduzimaju sve mjere ne bi li se što više produžilo vrijeme preživljavanja transplantata (izbor najkompatibilnijeg primatelja, negativna križna proba i imunosupresija), ipak svaki alotransplantat u pravilu bude odbačen.

Razlikujemo četiri tipa odbacivanja (8):

1. **Hiperakutno odbacivanje** zbiva se u osoba koje su bile presenzibilizirane na antigene davatelja (osobe koje su primale transfuzije krvi, višerotke ili su već bili transplantirani, te su stvorili protutijela). Hiperakutno odbacivanje može se javiti već u toku inplantiranja, napr. ako postoji inkompatibilnost krvnih grupa. Oštećenje tkiva započinje aktivacijom komplemента kompleksom antigen-protutijelo, a nastavlja se djelovanjem različitih tvari koje luče upalne stanice i aktivacijom koagulacijskog procesa. **Ubrzano akutno odbacivanje** se javlja nekoliko dana nakon transplantacije. Transplantat je infiltriran limfocitima i neutrofilima, a pokusi s životinjama su pokazali da je ovaj tip reakcije posredovan limfocitima T i njihovim produktima, ali ne i protutijelima (144).
2. **Akutno odbacivanje** nastaje do desetog dana po transplantaciji, ali ne mora se uočiti odmah, već može proći i nekoliko tjedana ukoliko pacijent prima imunosupresivnu terapiju. U ovom tipu odbacivanja posreduju limfociti T uz oslobađanje citokina (8). U kliničkoj slici javlja se povišena tjelesna temperatura, oliguria i oslabljena funkcija bubrega. Dijagnostički je značajan nalaz biopsije transplantata koji pokazuje mononuklearnu infiltraciju u perivaskularnim prostorima, te edem i atrofiju tubularnog

epitela, no ipak se smatra da je tubulitis, s invazijom tubularnog epitela limfoidnim stanicama, glavni dijagnostički kriterij (281). Dominiraju limfociti T (CD4+ i poglavito CD8+), zatim monociti, makrofagi, limfociti B, plazma stanice i NK stanice (275, 280, 281). Glomeruli nisu zahvaćeni promjenama. Navedene promjene su reverzibilne i povlače se nakon udarne terapije kortikosteroidima (8).

3. **Akutno kasno odbacivanje** javlja se nakon desetog dana po transplantaciji. Uzrokovano je protutijelima i citotoksičnim stanicama. Na stijenke arteriola i kapilara talože se protutijela i komplement, što potiče nakupljanje trombocita, začepljenje krvnih žila i odumiranje transplantata. Histološki se mogu vidjeti vaskularne okluzije, odlaganje fibrina, intersticijske hemoragije i tubularna nekroza. U kasnijoj fazi akutnog odbacivanja dolazi do odlaganja imunoglobulina i aktivacije komplementa, slično kao u kroničnom odbacivanju (8), a uglavnom ne reagira na imunosupresivnu terapiju.
4. **Kronično ili kasno odbacivanje** može se javiti mjesecima i godinama nakon uspješne transplantacije. Dominantne lezije su vaskularno-endotelne. Endotelne stanice krvnih žila izražavaju HLA antigene klase I, a u slučaju lokalne reakcije mogu se eksprimirati i antigeni klase II (70, 298). Proces je spor, a sastoji se u taloženju imunoglobulina, komplementa (C3 komponente) i kompleksa antigen-protutijelo na bazalnu membranu krvnih žila transplantata. Odlaganje imunoglobulina moglo bi navesti NK stanice da liziraju epitalne stanice preko mehanizma ADCC (143). Osim toga, dolazi do aktivacije koagulacijskih faktora i agregacije trombocita (8). Na kraju trombocitni faktori izazivaju migraciju i proliferaciju mišićnih stanica intime krvnih žila. Od kliničkih simptoma dominiraju hipertenzija i proteinurija. Histološki dominiraju sužene arterije

(uslijed odlaganja fibrina i trombocita) i proliferacija intime. Proces je ireverzibilan i ne reagira na imunosupresivnu terapiju (8.).

Osim gore navedenih postoji još jedan tip reverzibilnog odbacivanja tzv. **transplantacijska kriza** (100). Sam naziv je predložio Hamburger 1959. godine. Javlja se iznenada, u bilo kom trenutku nakon transplantacije, funkcija transplantata je znatno narušena, ali se oporavlja vrlo brzo nakon imunosupresivne terapije (tzv. udara). Mogu se razlikovati rane krize s dramatičnom kliničkom slikom, koje vrlo dobro reagiraju na terapiju i kasne krize sa slabo izraženom simptomatologijom, a nerijetko se otkrivaju tek na rutinskim kontrolama, te isto tako sporije reagiraju na terapiju. Ponekad se latentne krize mogu otkriti samo u centrima gdje se rutinski radi renalna biopsija (100).

I dok je nekada akutna kriza bila najčešći razlog gubitka transplantata, danas, zahvaljujući sve kvalitetnijoj imunosupresiji, boljim kirurškim tehnikama i sve sofisticiranijim laboratorijskim metodama, sve se rjeđe srećemo sa akutnim odbacivanjem (293), a u žiži interesa se našao problem kroničnog odbacivanja.

### **2.3.2 IMUNOLOŠKE PROMJENE U TRANSPLANTACIJSKOJ REAKCIJI**

Imunosni odgovor na alogeničke transplantate je T-ovisni odgovor i uključuje i stanične i humoralne mehanizme odbacivanja. Limfociti T koji prepoznaju antigen svojim staničnim receptorom (TCR), imaju bogat repertoar mogućih odgovora: apoptozu, anergiju, "zanemarivanje" (ignorance, angloameričkih autora), djelomičnu aktivaciju i punu aktivaciju s ekspanzijom klona i efektorskom funkcijom. Puna aktivacija limfocita T zahtjeva tri vanjska signala na receptore na limfocitu T:

1. predočavanje antigena od strane stanica koje predočuju antigen (APS)
2. kostimulacijske signale od APS,
3. citokine koji potiču rast, a luče ih aktivirani limfociti T

Poznavanje zbivanja na staničnoj i molekularnoj razini tijekom odbacivanja alotransplantata, nisu samo od temeljnog znanstvenog interesa, već imaju ključno kliničko značenje.

#### **2.3.2.1 Stanične interakcije u transplantacijskoj reakciji**

Mehanizmi koji sudjeluju u odbacivanju alogeničkih tkiva i organa su predmetom intenzivnih istraživanja, od vremena Medawarovih pokusa koji su pokazali imunološku prirodu reakcije odbacivanja. Poznato je da limfociti T imaju središnju ulogu u odbacivanju alotransplantata.

Proces njihove aktivacije počinje kontaktom i prepoznavanjem efektorske i ciljne stanice. Preko T staničnog receptora (TCR), limfociti T prepoznaju antigene davatelja (peptide), koji su udruženi s antigenima glavnog kompleksa histokompatibilnosti (MHC) nazočnim na transplantatu. I do 10% limfocita T primatelja može reagirati na ove antigene na tkivima alogeničkog davatelja (123, 381). Pomoćnički limfociti T (T helperi u anglosaksonskoj literaturi, uvriježena skraćenica Th) mogu biti aktivirani neposredno ili posredno. Predočne stanice iz transplantata (antigen prezentirajuće stanice -APS), tzv. "leukociti putnici", koje bogato ekspimiraju MHC alogeničke molekule davatelja klase II i peptide umetnute u njihovu brazdu, neposredno aktiviraju pomoćničke limfocite T (381). Posrednu aktivaciju pomoćničkih stanica vrše APS domaćina koje su smještene u limfnom čvoru, a obrađuju i predočuju antigene koje otpušta transplantat.

Aktivacija limfocita T zahtijeva interakciju kompleksa TCR/CD3 molekule s prerađenim antigenom koji je udružen sa HLA molekulom na predočnim stanicama (389). Interakciju karakterizira visoka specifičnost, ali je obično niskog afiniteta, a pojačavaju je molekule CD4 ili CD8 na površini dotičnog limfocita T, a koje također ulaze u interakciju s MHC molekulama na APS (389). Međutim za potpunu aktivaciju limfocita T i njihov snažni odgovor potrebni su dodatni kostimulacijski signali koje dobivaju preko drugih molekula (291, 389). Jedna od njih je CD2 molekula, izražena na limfocitima T i NK stanicama. Njenim kontaktom sa CD58 molekulom (LFA-3) na APS dolazi do potpune aktivacije limfocita T. Mnoga istraživanja, *in vitro* i *in vivo* su pokazala da se blokiranjem CD2 molekule monoklonskim protutijelima spriječava njena kostimulacijska funkcija što može suprimirati mnoge vidove stanične imunosti (44, 116). U aktivaciji limfocita T

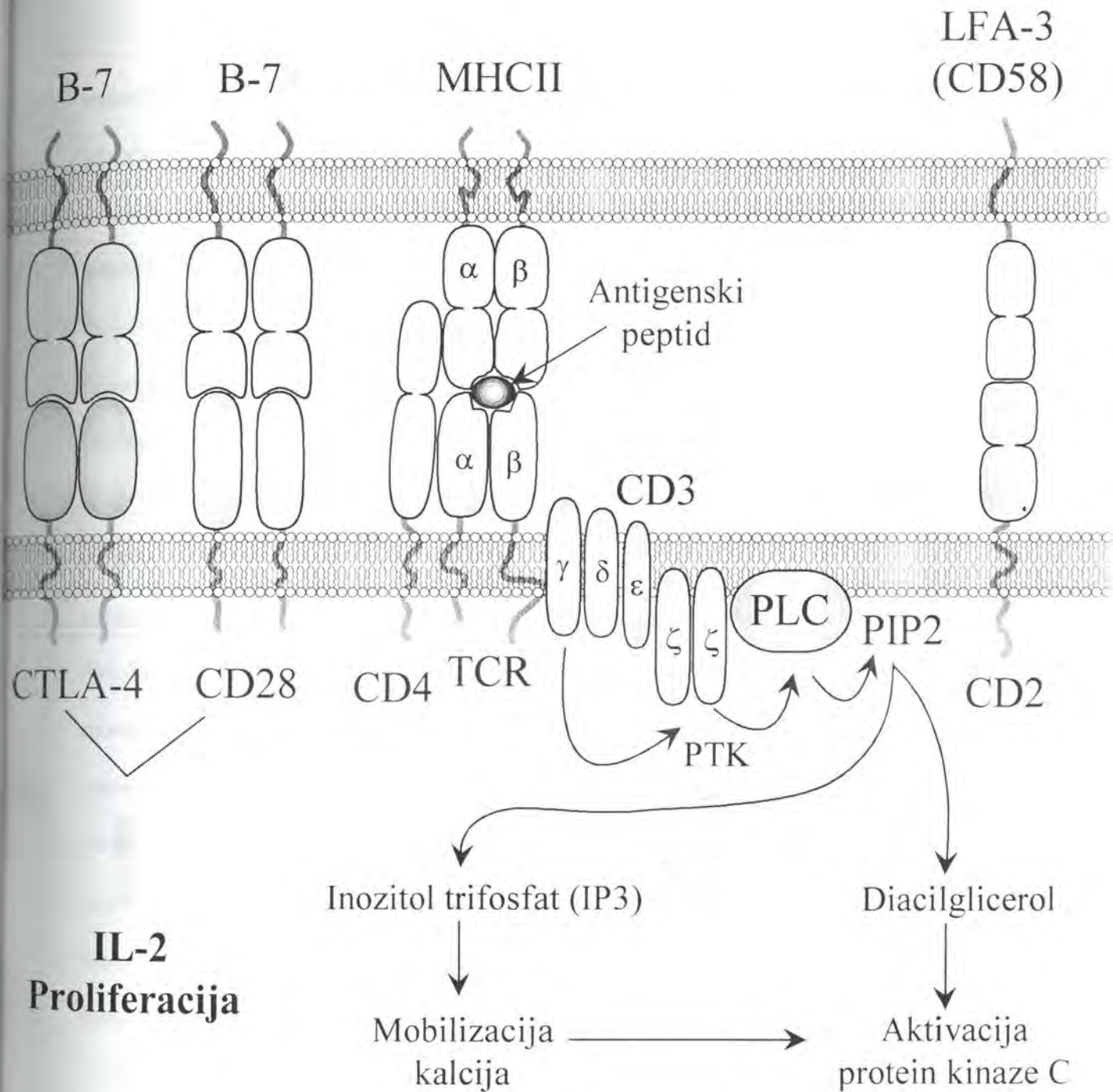
posebnu ulogu ima kostimulacijski put preko molekule CD28, koja se veže sa B7 receptorima na APS (180, 181, 182). B7 receptor se pojavljuje u nekoliko oblika (B7-1, B7-2 i B7-3) koji se vežu na molekule CD28 i CTLA-4 na limfocitima T. Vežanje preko TCR i CD28 molekule povećava ekspresiju molekule CTLA-4, koja je za molekule B7 alternativni receptor višeg afiniteta nego CD28 molekula (77, 78, 395). Vežanje CD28 i CTLA-4 s ovim ligandima dovodi do snažne produkcije IL-2 (44, 180, 296) i proliferacije limfocita T (14, 182), što se očituje u prelasku iz faze mirovanja (Go) u aktiviranu fazu (G1). Klonsku ekspanziju potiču citokini rasta (IL-2, IL-4, IL-7) koji okupiraju svoje receptore i aktiviraju tirozin kinaze i puteve prijenosa signala. Spriječi li se vežanje CD28 i CTLA-4 s B7 ligandima, snažno će se inhibirati T-stanični imunitet, u prvom redu zbog izostanka poticaja koji daje visoka produkcija IL-2 (171, 172, 178, 183, 367). Ovi mehanizmi prikazani su na slici 1.

Interakcije receptora na površini stanice potiču ne samo razvoj efekorskog luka reakcije, već i razvoj različitih populacija Th stanica, Th1 i Th2 koje čine podlogu staničnog i humoralnog odgovora.

Od interesa je ukratko razmotriti i unutarstanična zbivanja nakon interakcije receptor-ligand. Pomoću kompleksa CD3 molekule dolazi do unutarstaničnog prijenosa signala koji prati reakcije vezanja na staničnoj membrani. Pod utjecajem aktivacije CD2, CD28, TCR/CD4 ili TCR/CD8 receptora (116, 127) dolazi do promjene konformacije zeta lanca CD3 kompleksa i aktivacije nekoliko efekorskih puteva. Protein G i fosfolipaza C razgrađuju fosfatidil inozitol difosfat (PIP2) u staničnoj membrani na dvije komponente: inozitol trifosfat (IP3) i diacilglicerol (DAG). IP3 oslobađa endogeni kalcij iz



# APS/ciljna stanica



## Aktivacija staničnih funkcija

**Slika 1.** Aktivacija limfocita T putem TCR/CD3 kompleksa, koreceptora (CD4 ili CD8) i kostimulacijskih molekula (CD2, CD28 i CTLA4). Prikazani su i intracelularni putevi prijenosa signala (PTK= Proteinske tirozin kinaze; PLC= Fosfolipaza C; PIP2= Fosfadilinozitol-difosfat).

endoplazmatskog retikuluma, a on dovodi do ulaska izvanstaničnog kalcija u stanicu, što povećava i propusnost kanala za kalcij u membrani stanice, pa dugoročno raste unutarstanična razina kalcija. DAG s jedne strane aktivira protein kinazu C (PKC) čime potiče fosforilaciju serina i treonina na proteinima važnim za efektorsku funkciju stanice. S druge strane se sam razgrađuje do arahidonske kiseline, koja ciklooksigenaznim ili lipooksigenaznim putem stvara prostaglandine ili leukotrijene (337) važne za modulaciju stanične citotoksičnosti (336).

Transplantacija tkiva i organa je izvrstan model za proučavanje puteva prezentacije antigena (99). Aloantigeni mogu biti prezentirani primateljevim limfocitima T na dva prethodno opisana načina: direktni i indirektni. Nije još potpuno jasno da li u ova dva puta djeluju različite kostimulacijske molekule. Ustanovljeno je da dendritičke stanice, monociti, i limfociti B koji izražavaju dovoljnu količinu molekula klase II i kostimulacijskih molekula, mogu direktno aktivirati preostale CD4<sup>+</sup> limfocite, pa se nazivaju profesionalne predočne stanice (professional antigen presenting cells u anglosaksonskoj literaturi). Postavlja se pitanje fiziološkog značenja ispoljavanja molekula klase II na neprofesionalnim predočnim stanicama (99). Opće je mišljenje da epitelne stanice (bubrega ili pluća čovjeka), glatke mišićne stanice i fibroblasti koji eksprimiraju antigene klase II ne izazivaju proliferaciju CD4<sup>+</sup> limfocita na aloantigene (57), za razliku od endotelnih stanica koje to čine (263). Humane endotelne stanice ne ispoljavaju B7 molekulu, već je kostimulacijski signal osiguran preko CD58 molekule. Interesantno je da i epitelne stanice i fibroblasti također eksprimiraju CD58 molekulu, ali ne mogu aktivirati CD4<sup>+</sup> stanice. Postavljena je hipoteza da direktna stimulacija vodi akutnom odbacivanju,

no ono prestaje jednom kada davateljeve predočne stanice napuste transplantat (117). Mislilo se da je kronično odbacivanje posljedica oslobađanja antigena iz transplantata, koji bivaju prerađeni i predočeni primateljevim APS što vodi sporijem gubitku funkcije transplantata. Pretpostavilo se da samo stanice koje su porijeklom iz koštane srži mogu direktno stimulirati alogene limfocite T. Budući da je na parenhimnim stanicama srca, bubrega, pluća i jetre čovjeka, koje vjerojatno ne napuštaju transplantat, visoka ekspresija molekula klase II, postavlja se pitanje kako se onda ti antigeni prezentiraju imunom sustavu primatelja (99). Haan i sur. su predložili mehanizam kojim primateljeve T stanice mogu direktno prepoznati parenhimne stanice (99). Oni sugeriraju da limfociti T mogu prepoznati antigen direktno, prezentiran na neprofesionalnim APS, uz pomoć citokina (IL-12 i IL-1) koje luče monociti. Ova studija svakako predstavlja novi izazov da se istraži mogu li monociti osigurati pomoć citokina za direktno prepoznavanje parenhimnih stanica transplantata.

### 2.3.2.2 Sudjelovanje imunokompetentnih stanica

Citotoksični limfociti su efektorske stanice u reakcijama citotoksičnosti posredovane stanicama (CMC) i dijele se u dvije grupe: citotoksični limfociti T (CTL) i urođenoubilačke stanice ili NK stanice (od engl. natural killer) (67). Ove stanice sudjeluju u obrambenom mehanizmu domaćina u borbi protiv stranih patogena i njihovom uništavanju, kao i uništavanju stanica domaćina koje posjeduju osobine tuđeg (stanice s ekspresijom

tumorskih antigena, autoantigena i stanice alotransplantata). Ubilački limfociti u svojoj citoplazmi sadrže sekrecijska granula bogato opskrbljena perforinom, serinskim esterazama (tzv. granzimi) i drugim apoptotičkim molekulama. Razvojem molekularne biologije otkrivaju se i stanične populacije kojima se ranije nije pripisivao citolitički učinak, pa se tako citotoksičnost gamma/delta CD4<sup>+</sup> stanica pripisuje sadržaju perforina u njima (149, 392). U reakciji pomiješanih limfocita utvrđeno je da su reakcije brze citotoksičnosti posredovane perforinom i FasL, kao dva osnovna citolitička puta, ali ne i jedina (162, 398). Ubilački proces započinje prepoznavanjem i kontaktom efektorske i ciljne stanice. Aktivacijski signali, uključujući ulazak kalcija u CTL i NK stanice, uzrok su brze reorijentacije sekretornog aparata i egzocitoze granula na mjestu vezanja efektorske i ciljne stanice.

Uloga citotoksičnih limfocita u transplantacijskoj reakciji je naročito zanimljiva jer postoje dokazi za i protiv njihova sudjelovanja u destrukciji transplantata (393). Novija istraživanja su pokazala prisutnost donor specifičnih i citotoksičnih limfocita T u humanom renalnom alograftu i u eksperimentalnim presacima tijekom odbacivanja (280, 391), iako neki smatraju da sama prisutnost citotoksičnih limfocita T nije dovoljna za uništenje transplantata (37).

Budući da su ove stanice značajne prilikom odbacivanja trebalo bi razmotriti njihovu prisutnost kod živućih transplantata. Unatrag desetak godina pretpostavilo se da na transplantiranom organu nije izražen ciljni antigen za ove stanice, ili da je njihova aktivnost blokirana i u samom transplantatu putem facilitirajućih protutijela ili posredstvom supresorskih stanica, te da možda citotoksične stanice prisutne u transplantatu pokazuju

svoju citotoksičnost samo *in vitro*, a ne i u samom procesu odbacivanja (393), što danas smatramo vrlo upitnim.

Promatran je i apsolutni broj i postotak aktiviranih citotoksičnih limfocita T u perifernoj krvi zdravih osoba, dijaliziranih i transplantiranih pacijenata, te se nisu uočile značajnije razlike (414). Suprotno tome, supresorski limfociti T su bili značajno sniženi u dijaliziranih i transplantiranih pacijenata u odnosu prema kontrolnoj grupi, dok su pomoćnički limfociti bili povišeni (414). To je ukazivalo na činjenicu da bi normalne vrijednosti citotoksičnih limfocita T u perifernoj krvi transplantiranih pacijenata mogle biti dobar prognostički indikator dugog preživljavanja bubrežnog alotransplantata, dok je bio nejasan velik pad broja supresorskih limfocita T (414).

Koristeći metodu protočne citometrije, uočeno je da se populacija pomoćničkih limfocita T može podijeliti u dvije podgrupe: supresorske/induktorske limfocite (CD45R+) i tzv. prave pomoćničke stanice (CD45R-). Postotak supresorskih/induktorskih stanica je bio značajno snižen za vrijeme odbacivanja (104). Isto tako se citotoksični limfociti T mogu podijeliti na supresorske/efektorske stanice (CD11b+) i prave citotoksične stanice (CD11b-). Supresorske/efektorske stanice su također bile značajno snižene u odbačenom transplantatu (359). Izgleda da se i supresorske/efektorske i supresorske/induktorske stanice ponovno pojavljivale vrlo brzo nakon uspješne terapije. Ovi podaci bi mogli ukazivati na važnu ulogu tih stanica u stvaranju i održavanju poslijetransplantacijske tolerancije. Međutim, njihova uloga u prvim nekoliko dana nakon transplantacije, kada su citotoksične stanice najaktivnije, nije još jasna, a isto tako supresorske stanice ne blokiraju djelovanje već aktiviranih stanica. Novija istraživanja pratila su ekspresiju CD45 izoforme u CD4+ i

CD8+ limfocitima periferne krvi (LPK), zajedno sa aktivacijskim markerima HLA/DR i IL-2R (CD25) tijekom odbacivanja bubrežnog presatka (21). Pri tom su uočili značajan porast postotka CD45RO+ T stanica sa pamćenjem (memory cells) u obje limfocitne subpopulacije, što je bilo popraćeno relativnim sniženjem CD45RA+ limfocita T u poređenju sa bolesnicima bez znakova odbacivanja i sa zdravim osobama. Najviši porast je zabilježen u CD8+CD45RO+ limfocitima, kako tijekom odbacivanja, tako i za vrijeme stimulacije limfocita T zdravih osoba Concavalinom-A (Con-A). Želeći istražiti moguću asocijaciju CD45 T-limfocitnih podvrsti s CD25+ i HLA/DR+ limfocitima, uočili su velik porast postotka CD4+CD25+ i CD8+HLA/DR+ limfocita za vrijeme odbacivanja u poređenju sa bolesnicima bez znakova odbacivanja i sa zdravim osobama, a nije bilo promjene CD8+CD25+ limfocita. Druge studije su također potvrdile korelaciju između ekspresije HLA/DR i IL-2R i odbacivanja (21). Tijekom odbacivanja je viđen značajan porast CD4+CD45RO+ i CD4+CD25+ subpopulacije, ali isto tako i nakon stimulacije limfocita T zdravih osoba s Con-A.

Autori sugeriraju da promjena CD45RA+ limfocita T u CD45RO+ stanice u obje subpopulacije CD4+ i CD8+LPK, udruženo sa porastom CD4+CD25+ i CD8+HLA/DR+ stanica, može biti koristan parametar u praćenju bolesnika sa akutnom krizom odbacivanja.

U prospektivnoj studiji Opelz i sur. su uočili da se u bolesnika s defektnom funkcijom CD4+T limfocita prije transplantacije (manje od 10% aktivnosti) nije javljala akutna kriza odbacivanja, dok je do krize dolazilo u grupi u kojoj je aktivnost CD4+ stanica bila normalna (386), a također su uočili bolje jednogodišnje preživljavanje presatka (386). Autori pretpostavljaju da u tih bolesnika nema Th1 odgovora i da je intenzivna

imunosupresivna terapija nepotrebna. To se podudara sa spoznajama Lehmana i sur., koji su u eksperimentima na miševima pokazali da terapija sa protu-CD4 monoklonskim protutijelom izaziva preživljavanje bubrežnih, srčanih i kožnih, MHC I i II nepodudarnih presađaka, bez obzira na prisutnost aloreaktivnih limfocita T (169). Analizom limfocita periferne krvi metodom protočne citometrije, primjećen je porast CD4+ limfocita T 3-4 dana prije dijagnosticiranja akutne krize. Došlo je i do značajnog porasta razine aktivacijskih markera CD25 i CD71 u poredbi sa transplantatima čija je funkcija bila zadovoljavajuća (335).

Pokazalo se da prijetransplantacijski broj limfocitnih podvrsta CD4+, CD8+ i B stanica nema prediktivnu vrijednost za razvoj akutne krize. U bolesnika koji se redovito hemodijaliziraju, kao i u transplantiranih s dugogodišnjim toleriranjem presatka uočena je njihova funkcionalna abnormalnost. Štoviše, aktivacija ovih stanica se može djelotvorno blokirati visokim dozama imunosupresiva u poslijetransplantacijskom razdoblju (386).

Interesantan je nalaz značajno snižene ekspresije CD28 antigena na površini limfocita T u bolesnika koji toleriraju presađak preko 10 godina, dok u transplantata koji funkcioniraju preko 15 godina gotovo da i nije prisutan (236). Ekspresija antigena CD2 i CD11a bila je ista bez obzira na preživljavanje.

S obzirom na lučenje citokina, pomoćničke CD4+ stanice se mogu podijeliti u dvije podvrste: Th1 koje produciraju IL-2, IFN gamma i limfotoksin, te Th2 koje luče IL4, IL-5, IL-6 i IL-10 (218). Provedena istraživanja sugerirala su da aktivacija Th1 limfocita rezultira odbacivanjem, dok Th2 potiče preživljavanje presatka (89, 231). Međutim lučenje Th1

citokina nema prediktivnu vrijednost za preživljavanje presatka, vjerojatno zbog njihove efikasne inhibicije imunosupresivnim lijekovima (386).

### 2.3.2.3 Gama/delta limfociti T

Mehanizam aktivacije ostalih populacija citotoksičnih limfocita još uvijek je nedovoljno istražen. Tu spada i subpopulacija gama/delta limfocita, fenotipa CD3+CD4-CD8-, koji posjeduju svojstvo citotoksičnosti i NK aktivnosti *in vitro*, ali se vrlo malo zna o njihovoj funkciji *in vivo*. Zadnjih se godina istražuju mehanizmi kojima oni prepoznaju antigene (224). Pokusi na staničnim klonovima dokazuju da oni dvojako prepoznaju tuđi antigen. Klonovi limfocita T iz sinovijalne tekućine bolesnika s reumatoidnim artritismom (Vgamma9/Vdelta2) istovjetni su većini klonova iz periferne krvi zdrave osobe i lakše prepoznaju neprerađeni antigen (59), nego prerađen i vezan za molekule HLA sustava (382). Možda razlog za to leži u strukturi gamma/delta heterodimera, čiji dulji delta heterogeni i kraći gamma homogeni lanac građom podsjeća na protutijela. Neka istraživanja ukazuju na mogućnost da gamma/delta stanice stvaraju osnovni citokinski milje za preusmjerenje u Th1, odnosno Th2 obrazac imunološkog odgovora (74).

Biopsija bubrežnog transplatanta tijekom akutne krize odbacivanja nije pokazala nikakav porast postotka gama/delta limfocita T, a u perifernoj krvi nakon transplantacije je uočen njihov pad (277), što dododi u pitanje njihovu glavnu ulogu u imunološkom odgovoru domaćina na presađeni bubreg.



#### 2.3.2.4 NK stanice - veliki granulirani limfociti

NK stanice su dio sustava prirodne imunosti. Budući da uspješno liziraju tumorske stanice, koje ne ispoljavaju HLA antigene (K562 staničnu liniju) i virusima inficirane singenične stanice na čijoj je membrani potisnuto ispoljavanje molekula HLA razreda I, smatralo se da djeluju neovisno o HLA sustavu (157).

NK stanice su funkcionalno definirana grupa stanica sposobnih da liziraju određene strukture. One ubijaju ciljne stanice bez posredovanja protutijela, tj. u izravnom dodiru, pa su stoga i nazvane stanicama prirodnim ubojicama. Morfološki se mogu definirati kao LGL koji na svojoj površini nose receptor za Fc fragment IgG (tzv. Fc IgGRIII-CD16 molekula), a vrlo su heterogeni po svojim fenotipskim i funkcijskim značajkama (250, 363). Proizvedeno je monoklonsko protutijelo protu-CD16 koje reagira sa svim humanim NK stanicama, ali ne i limfocitima B, T ili monocitima (258), pa se njime može obuzdati liza NK stanicama.

NK aktivnost u ljudi potiču CD2, CD16, CD26, CD27, CD28 i CD44 molekule, a nedavno je otkrivena i nova obitelj membranskih bjelančevina CD161 (157). Geni koji kodiraju CD161 receptor se nalaze na 12 kromosomu u tzv. NKC regiji (od engl. natural killer cell complex). U laboratorijskim uvjetima CD161 prepoznaje oligosaharidne ligande na ciljnoj stanici i uvjetuje citotoksičnu aktivnost, ali njegovim specifičnim blokiranjem se ne može spriječiti liza nezaštićene ciljne stanice, a može sudjelovati i u inhibiciji lize (157).

Kloniranjem ovih stanica i proučavanjem klonova došlo se do velikog broja iznenađujućih rezultata koji su značajno izmijenili čitav koncept o NK stanicama, ukazavši

na njihove do tada nepoznate osobine. NK stanice potječu od prethodničkih stanica nazočnih u jetri embrija već između 6 i 8 tjedna trudnoće, ili postnatalno od nezrelih timocita. Specifično liziraju neke alogenske stanice. Različiti NK klonovi mogu biti dobiveni iz krvi iste osobe, što dokazuje postojanje probira NK-staničnog receptora. Funkcijski receptori su klonski raspoređeni i posreduju specifično prepoznavanje alela razreda I. Za razliku od limfocita T, učinak vezanja NK stanice za molekulu klase I jest provođenje negativnog signala, što dovodi do zaštite ciljne stanice.

Ranije se mislilo da nemaju specifični receptor za antigen, no danas je poznato da se na površini NK stanica nalaze dvije grupe receptora: receptori koji potiču aktivaciju NK stanica (NKTRs od engl. NK cells triggering receptors) i receptori koji provode negativni signal u NK stanicu, potiskujući njenu citolitičku aktivnost (157).

Receptori koji provode negativni signal u NK stanicu, tzv. KIR receptori (od engl. killer cell inhibitory receptors) predstavljeni su kao mogući receptori za HLA molekule klase I na humanim stanicama (215, 216). Geni za ove receptore nalaze se na 19 kromosomu i pripadaju porodici imunoglobulina. KIR-2D ili p58 je uključen u prepoznavanje HLA-C, a KIR-3D ili p70 u prepoznavanje HLA-B haplotipa. Dokazan je i KIR protein p140 za HLA-A haplotip (157). Membranski glikoprotein CD94, po svojoj građi istovjetan je p58 molekuli i odgovoran je za prepoznavanje HLA-A, B i C haplotipa (90, 215, 256), a udružen sa još nepoznatom molekulom može biti aktivacijski receptor za HLA-G (256).

Sudjelovanje velikih granuliranih limfocita (LGL) u odbacivanju bubrežnog transplantata je sporno. Uočilo se da se u životinja nakupljaju u transplantatu odmah nakon

implantiranja (116), a viđena je povećana NK aktivnost za vrijeme odbacivanja (320). U ljudi nema direktnog dokaza o njihovom sudjelovanju u mehanizmu odbacivanja.

Otkriće abnormalne ekspanzije LGL u krvi pacijenata s dugoživućim transplantatom koji su bili pod imunosupresijom, potaknulo je brojne autore na istraživanje fenotipskih karakteristika i funkcija tih stanica (165, 167). Uočilo se da je njihov broj smanjen i aktivnost oslabljena, bez obzira da li su pod konvencionalnom imunosupresivnom terapijom (azatioprin i prednizon) ili dobivaju ciklosporin (84, 166, 184, 214, 274, 400). U većini slučajeva to je popraćeno i sa sniženjem ADCC (71,184). Mehanizam kojim ovi lijekovi djeluju inhibitorno na aktivnost NK stanica nije bio potpuno jasan. Pretpostavljalo se da bi mogli djelovati na nivou koštane srži blokirajući prekursore NK stanica, ili možda prednizon utječe na migraciju LGL iz krvi u ostala limfna tkiva (274). Isto je tako bilo primjećeno da postoji korelacija između smanjenog broja LGL (osobito CD16+) u cirkulaciji i snižene NK aktivnosti tih pacijenata (166, 400).

Smanjena aktivnost NK stanica je potvrđena i u testu citotoksičnosti naspram K562 ciljnih stanica. Međutim i NK i LAK stanice bolesnika koji toleriraju bubrežni transplantat su bile sposobne uništiti tumorske ciljne stanice (bez obzira na tip tumorskih stanica), isto kao i kontrolna grupa (5).

### 2.3.2.5 Subpopulacije NK stanica

Daljim istraživanjem NK stanica došlo se do subpopulacije CD56+ stanica (400). Inače je CD56 glikoprotein, homologan sa NCAM molekulom (neural cell adhesion molecula), koja se nalazi na različitim stanicama i tkivima kao što su LGL (1), neuroektodermalno tkivo (185), tkivo prostate i neki plućni tumori (40). U zdravih ljudi LGL sa CD56 površinskim markerom mogu se dalje razlikovati po tome da li ekspimiraju NK stanični marker CD16 ili pan T stanični marker CD3 (156, 260).

U dugoživućih transplantata je uočeno da je postotak CD56+ stanica značajno povišen (79, 165). To je bilo zagonetno jer se u početku smatralo da su CD56+ stanice zadužene za NK aktivnost, a neki su autori pokazali da je ona u pacijenata sa dugoživućim transplantatom oslabljena (84, 166). Kasnije je dokazano da su za NK aktivnost odgovorne CD16+ stanice, te da je njihov smanjen broj uzrok niskoj NK aktivnosti (166). Štoviše, najcitotoksičnija NK podvrsta CD56-/CD16+ bila je najviše snižena. Izgleda da je za porast CD56+ stanica zaslužna ekspanzija CD56+/CD3+ podvrste (79, 165, 166, 400). Čini se da su CD56+/CD3+ stanice rezistentne na imunosupresivnu terapiju i ekspandiraju u krvi pacijenata sa dugoživućim transplantatom, ne bi li kompenzirali smanjen broj limfocita T (168). Te stanice morfološki odgovaraju tipičnim NK stanicama, ali im nedostaje svojstvo citotoksičnosti, a imaju sposobnost stvaranja E-rozeta i fenotipske karakteristike limfocita T (165). Smatra se da bi se moglo raditi o prekursorima NK stanica (2), a da se antigen CD56 ekspimirira kasnije u razvojnem putu NK stanica. I dok su CD3+CD4+CD56+ stanice jedva prisutne u zdravih osoba (1%), u krvi bolesnika sa

dugoživućim transplantatom njihov je broj povećan, pa mogu predstavljati i do 20% mononukleara periferne krvi (168).

#### 2.3.2.6 Uloga citokina u razvoju i aktivaciji NK stanica

Učinak pojedinih citokina na razvoj NK stanica je proučavan *in vitro*, u istraživanjima na kulturama stromalnih stanica, koje predstavljaju hematopoetske prekursore. IL-2 u kombinaciji s IL-7 i SCF-om dovodi do diferencijacije NK stanica (38). Najmoćniji citokin koji potiče razvoj progenitorskih stanica koštane srži u zrele NK stanice je IL-15. Štoviče, on jedini potiče diferencijaciju CD34+CD7- stanica koštane srži u NK stanice (37). Interesantno je da dodavanjem IL-15 u kulturu nezrelih postnatalnih timocita, dolazi do razvoja NK stanica sa specifičnim inhibitornim receptorom, podvrstom KIR molekula CD94. U različitim staničnim kulturama dokazano je da SCF i IL-7 pojačavaju IL-15 posredovanu ekspanziju NK stanica (37).

NK stanice u mirovanju ispoljavaju IL-15R alfa, IL-2R beta, i IL-2R gama, koji su neophodni za stvaranje odgovora na minimalne koncentracije IL-15 (39). IL-15 facilitira preživljavanje NK stanica *in vivo* (39). Naime, dodavanje IL-15 humanim leukocitima omogućava njihovo osmodnevno preživljavanje, bez dodatka seruma. Ovaj je učinak posljedica utjecaja IL-15 na spriječavanje apoptoze preko inhibicije ispoljavanja bcl-2 proteina (39). Pored snažnog kemotaktičnog učinka na NK stanice (6), IL-15 ima

sinergistični učinak s IL-12 na NK stanice, dovodeći do produkcije IFN-gama, TNF-alfa i GM-CSF (39, 12).

Istraživanja su pokazala da miševi koji nemaju IL-2R beta podjedinicu pokazuju značajan nedostatak NK stanica (35), sugerirajući važnost dva citokina IL-2 i IL-15 u regulaciji razvoja NK stanica, budući da samo oni koriste ovu podjedinicu svojih receptora. Međutim, dokazano je da IL-15 ima važniju ulogu od IL-2 u njihovom razvoju jer miševi kojima nedostaje alfa podjedinica IL-2R imaju normalan broj NK stanica (35). Vjerojatno u slučaju nedostatka IL-15, IL-2 preuzima njegovu ulogu u razvoju NK stanica. Nedostatak NK stanica je također uočen i u miševa kojima nedostaju geni za signalni peptid IL-15, ili u onih koji nemaju Jak3 kinazu, neophodnu za ostvarivanje učinka IL-15. Ukoliko nedostaje gama c podjedinica, bilo na mišjim ili humanim stanicama, također je uočen nedostatak NK stanica. NK stanice su prisutne u miševa kojima nedostaje gen za IL-2, IL-4 i IL-7.

## 2.4 CITOLITIČKI MEHANIZMI STANICAMA POSREDOVANE CITOTOKSIČNOSTI

Molekularni temelji stanicama posredovane citotoksičnosti upoznati su zahvaljujući suvremenim metodama genetskog inženjeringa koje su omogućile proizvodnju životinja s genetskim deficitom i životinja u kojih je pojedini gen snažno eksprimiran (133, 162, 233). Ključni eksperimenti napravljeni na ovim životinjama ukazali su na postojanje dva puta s brzim citolitičkim učinkom koji se mjeri u minutama ili satima. Posredovani su perforinom i/ili sustavom Fas Ligand-Fas (134). Nedavno je otkriven i treći mehanizam, posredovan molekulama TNF-a, koje su vezane za površinu citolitičkih limfocita i djeluju tek nakon dugotrajne inkubacije s ciljnim stanicama (dulje od 18 sati) (31). Sudjelovanje TNF-alfa u lizi stanica bilo je uvijek prikriveno brzim citolitičkim učincima posredovanim perforinom/granzimima i sustavom Fas/FasL. Molekule TNF su ispoljene na limfocitima T, NK i LAK stanicama, pa mogu ubiti ciljne stanice izravno, bez posredovanja MHC molekula (162). U pokusima *in vivo*, dokazana je uloga TNF-alfa kao medijatora u ozljedama tkiva i blažim oblicima reakcija transplantata protiv domaćina (engl. graft versus host disease-GVHD) (31).

#### 2.4.1 ULOGA SUSTAVA FAS LIGAND - FAS U MEHANIZMIMA CITOTOKSIČNOSTI

Fas ligand (FasL) je molekula porodice TNF proteina i predstavlja glavni nesekretorni mehanizam brze citotoksičnosti posredovane stanicama (162, 252, 362, 401). Vežanjem na Fas receptor, on izaziva "samoubilačku" smrt ciljane stanice tzv. apoptozu. Fas receptor na intracitoplazmatskom dijelu polipeptidnog lanca sadrži smrtonosnu domenu, koja je neophodna za prijenos signala stanične smrti.

FasL je do sada nađen na površini limfocita T (CD4+ i CD8+), NK stanicama i LAK stanicama, te stanicama trofoblasta, prednje očne komore i testisa (191). Stanice sa pamćenjem CD45RO+ (memory cells) izražavaju visok nivo za Fas, u poredbi sa CD45RA+ (naive cells). Ciklosporin A spriječava aktivaciju stanice ovisnu o kalciju i ispoljavanje FasL, što vodi zaključku da je ispoljavanje molekule FasL ovisno o kalciju. Apoptoza već ispoljenog FasL predstavlja citotoksičnost neovisnu o kalciju (252, 362). Tako ciklosporin A, retinoična kiselina i glukokortikoidi nemaju utjecaja na liziranje ciljnih stanica s ranije ispoljenim molekulama FasL na površini efektorske stanice.

Fas receptor (APO-1 ili CD95) je transmembranska molekula (48kD) i pripada glavnoj porodici receptora za čimbenik tumorske nekroze i receptora za čimbenik rasta živčanog tkiva (engl. TNF/NGF receptor superfamily). On je konstitucijski ispoljen na većini tjelesnih stanica. Njegova prisutnost na T limfocitima je povećana stimulacijom protutijelima protu-CD3 ili protu-TCR receptora.



Uloga citolitičkog sustava FasL-Fas najbolje je upoznata u eksperimentima na miševima u kojih ove molekule nisu funkcionalne. Interesantno je da obje deficijencije imaju gotovo identičan klinički rezultat tj. dovode do poliklonske proliferacije limfatičkog sustava što se očituje u hipertrofiji perifernih limfnih čvorova, autoimunim manifestacijama koje podsjećaju na sindrom SLE i ranoj smrti (9, 284).

Prva eksperimentalna i klinička istraživanja o ulozi sustava FasL-Fas u odbacivanju alogeničkih transplantata objavljena su tek u zadnje vrijeme (299, 301). U pokusima na FasL deficijentnim miševima pokazano je da ove životinje značajno duže nose ksenogeničke i alogeničke kožne transplantate. Nedostatak Fas receptora na transplantatu nije utjecao na vrijeme preživljavanja, što bi moglo ukazivati da Fas receptor nije jedini receptor za kojeg se veže FasL. Dakle, u nefiziološkom stanju imunološkog deficita, odsutnost Fas puta otežava, ali ne sprječava odbacivanje ksenogeničkih i alogeničkih transplantata.

Međutim, bitna je razlika u funkcijama ovih sustava kada je organizam "netaknut" i svi sustavi nazočni. Kliničko značenje ovog puta pokazali su Sharma i sur. (301). Oni nisu pronašli glasničku RNK (mRNA) za FasL u primatelja alogeničkog bubrega bez znakova akutne reakcije odbacivanja. U akutnoj krizi odbacivanja ona je bila nazočna, kao i Fas, a postojala je i direktna korelacija između histoloških kriterija akutne krize odbacivanja i unutarstanične ekspresije mRNA za FasL i Fas. Na temelju ovih nalaza, autori smatraju da bi učinkovita terapija u sprječavanju i/ili liječenju akutne krize odbacivanja alotransplantata bila specifična terapija usmjerena na blokiranje molekula koje ostvaruju citotoksičnost.

Istraživanja su pokazala da se tijekom odbacivanja bubrega javlja apoptoza tubularnih epitelnih stanica (125, 200), te da su pri tom nađene *in situ* citotoksične intratubularne stanice (280), za koje se pretpostavlja da djeluju citotoksički preko perforinskog ili Fas puta (301). Fas antigen je prisutan na epitelijalnim stanicama proksimalnih i distalnih tubula, a stimulacija s IFN gamma rezultira osmerostrukim povećanjem ekspresije Fas-a na površini, ali su izgleda stanice rezistentne na apoptozu posredovanu Fas-om, što sugerira glavnu ulogu perforinskog i granzimskog puta u destrukciji (27). Nađeni su pozitivni regulatorni proteini (Fas-associating protein with a death domain ili FADD, mediator of receptor-induced toxicity-1 ili MORT-1 i receptor interacting protein-RIP), koji se sa svojom "smrtonosnom domenom" vežu na Fas domen i mogu izazvati apoptozu ako su visoko ekspimirani u stanicama. Prema tome ne može se isključiti postojanje negativnih regulacijskih proteina koji, ako su snažno ispoljeni na epitelnim stanicama bubrežnih tubula, možda štite stanice od apoptoze posredovane Fas-om (31).

U biopstatima transplantiranih bubrega otkrivene su tzv. "tunel" metodom "tunel" pozitivne (apoptotične) stanice za vrijeme krize odbacivanja (127). Po nekim autorima apoptoza tubularnih epitelnih stanica se događa za vrijeme akutne krize (125, 139), a po drugima tijekom kroničnog odbacivanja (155). Usporedo sa eksperimentalnim studijama, FasL mRNA je otkrivena u akutnom, ali ne i kroničnom odbacivanju humanog bubrežnog transplantata (301). No prisutnost apoptotičkih stanica nije limitirana samo na bubrežni transplantat, značajna apoptoza je uočena za vrijeme kroničnog odbacivanja jetre (150). U modelu srčane transplantacije, FasL je detektiran za vrijeme akutne krize (331) i u

odbačenim organima (159), dok je Fas konstitutivno eksprimiran na miocitima singeničkih transplantata i alografta (129, 159). Zaključno bi se moglo reći da je apoptoza (definirana kao "tunelska" reakcija), prisutna u alograftima za vrijeme odbacivanja, a isto tako i u akutnoj tubularnoj nekrozi (267).

Daljnja eksperimentalna istraživanja u miševa su pokazala izuzetno nisku ekspresiju Fas-a u bubrezima, za razliku od jetre i srca gdje je konstitutivno prisutan u većoj količini (338, 380, 81). Vidjelo se da brojni organi odraslih miševa, uključujući i bubreg koeksprimiraju Fas i FasL, za razliku od srca, jetre i gušterače (81, 338). Wang i sur. (379) su na mišjem modelu odbacivanja bubrega uočili prisutnost mRNA za FasL, dok u normalnom bubregu nije bila prisutna, za razliku od Fas-a koji je konstitutivno eksprimiran, kako na presatku, tako i u normalnom bubregu. Swenson i sur. su pokazali da je prisutnost FasL na bubrežnom alotransplantatu rezultirala boljom funkcijom, kao i duljim preživljavanjem presatka (338). Dapače, visok nivo ekspresije FasL na presatku je vrlo dobro korelirao sa prihvaćanjem presatka (127). Porter i sur. su također zaključili da je visoka ekspresija FasL u bioptatu bubrega prije transplantacije, korelirala sa stabilnim stanjem transplantata nakon transplantacije, sugerirajući postojanje imunološke tolerancije (267).

Belgrau i sur. su pokazali da testikularno tkivo miša, koji eksprimira FasL, presađeno ispod bubrežne kapsule preživljava bez imunosupresije, a ukoliko sustav Fas-FasL ne funkcionira dolazi do odbacivanja. Nadalje, eksperimentalni model u miša je pokazao da lokalna ekspresija FasL u transplantiranoj rožnici vodi apoptozi infiltriranih mononukleara i posljedičnom prihvaćanju presatka, dok FasL-negativna rožnica sadrži

brojne upalne stanice, bez pridružene apoptoze (333). Ovi rezultati sugeriraju da bi ekspresija FasL na transplantatu mogla štititi od odbacivanja. Slična korelacija između prihvatanja grafta i ekspresije FasL je viđena prilikom transplantacije rožnice u ljudi (333). Stuart i sur. su izvjestili da ljudska rožnica konstitutivno eksprimira FasL, što ubija Fas pozitivne limfocite *in vitro* (333). Pretpostavilo se da limfociti T specifično prepoznaju presadak, bivaju aktivirani i ekspimiraju Fas, te u kontaktu sa stanicama presatka gdje je ekspimiran FasL dolazi do apoptoze T limfocita što možda osigurava specifičnu imunosupresiju presatka (338, 22).

U kliničkim ispitivanjima presadaka rožnice i testikularnog tkiva vidjelo se da visoka razina ekspresije FasL na transplantatu inducira toleranciju, zahvaljujući apoptotičkoj deleciji stanica koje infiltriraju presadak, putem Fas/FasL posredovane citotoksičnosti (158). Ali, visoka ekspresija FasL, *per se*, ne garantira prihvatanje presatka, što se vidjelo u transplantaciji gušterače (161).

Svježe izolirani neutrofili, nasuprot limfocitima i monocitima, izražavaju visok nivo Fas molekule, što možda vodi pretpostavci da FasL regrutira neutrofile i aktivira njihov citolitički potencijal, uz oslobađanje IL-8 iz epitelnih stanica, rezultirajući lokalnom upalom i nespecifičnim oštećenjem presatka. (394).

Svakako da ovi rezultati ukazuju na vrlo kompleksnu ulogu sustava Fas/FasL u toleranciji i odbacivanju presatka. Vjerojatno će buduća istraživanja pokazati koji su organi zaštićeni od odbacivanja zahvaljujući konstitutivnoj ekspresiji FasL.

## 2.4.2 ULOGA PERFORINA U MEHANIZMIMA CITOTOKSIČNOSTI

Perforin (sinonimi: citolizin, C9-srodan protein) je citoplazmatski granularni citolitički glikoprotein molekulske mase od 70 KD, komplementaran C9 komponenti komplekta (176). Perforin pozitivne stanice (P+) primarno su opisane uz virusna, autoimuna i tumorska oboljenja, gdje postoji imunološko prepoznavanje (227, 282). Stanice koje sadrže perforin nisu viđene u slezeni, plućima, jetri, žlijezdama slinovnicama i koži (227, 282). Perforin je predmet intenzivnog istraživanja tek zadnjih 10 godina, kao jedan od primarnih čimbenika u posredovanju citotoksičnosti citotoksičnim limfocitima T (CTL) i prirodnim stanicama ubicama (NK).

### 2.4.2.1 Grada perforina

Perforin je pročišćen iz citoplazmatskih granula mišjih NK i CTL klonova, te je sa SDS-PAGE (eng. sodiumdodecyl sulfat polvacrylamide gel electrophoresis) dokazano da se radi o glikoproteinu molekulske mase od 65-70 KD. Klonirana je cDNA mišjeg, humanog i štakorskog perforina i na taj način određena njegova primarna struktura (176, 302). Perforin sve tri vrste građen je od 534 aminokiseline, sa gotovo identičnom molekulskom masom (otprilike 60 KD). Homologija mišjeg i humanog perforina iznosi 68%, humanog i štakorskog 69%, te mišjeg i štakorskog 85% (176, 302).

Humani perforin primarno je nazvan "C9-srodan protein", na bazi funkcionalne i strukturalne sličnosti između perforina i te komponente komplekta (364, 403).

Određivanje primarne strukture perforina i C9 komponente komplemента pokazalo je da između njih postoji visoka regionalna sličnost. Najveću sličnost pokazuje regija od 189-218 aminokiselina (AK), koja ima hidrofobna svojstva i stvara konformaciju alfa uzvojnice (187). Središnji dio perforinske molekule koji sadrži otprilike 300 AK, pokazuje 20% homologije s C6, 7, 8a i 9 komponentom komplemента, što je znatno više od one sa N terminalnom regijom (403). Četrdeset aminokiselina N-terminalnog kraja i sto aminokiselina C-terminalnog kraja jedinstveno je za perforin, odnosno komponente komplemента. Slijed prvih 34 aminokiselina N-terminalne regije ili točnije samo 19 prvih aminokiselina stvara beta karotensku strukturu, odgovornu za interreakciju sa fosfolipidnim dvoslojem i polimerizaciju perforinskih monomera u polimer u čijoj sredini nastaje pora. Promjer pore raste od 5 do 20 nm zbog progresivnog vezanja novih monomera koji mogu spontano inzerirati u staničnu membranu, što ističe važnost ove regije u stvaranju pora i lizi stanice (234).

Na osnovi tih strukturalnih sličnosti, stvaranje pora perforinom na ciljnoj stanici je proces sličan stvaranju pora komplementom (403). Međutim C9 komponenta komplemента cirkulira slobodno u plazmi i ne može sama lizirati stanične membrane ili multilamelarne vezikule. Za svoju punu aktivnost se mora udružiti sa C5b-C8 komponentom i vezati za proteinski receptor ciljne stanice. Za razliku od C9 komponente, perforin se veže za fosforilkolin, u prisutnosti kalcijevih iona uz pH iznad 6 (365). Budući da je fosforilkolin široko rasprostranjen na svim tipovima stanica, perforin predstavlja potencijalnu opasnost za svaku stanicu, pa se pohranjuje u citoplazmatskim zrcima koja se prazne samo na odgovarajući impuls procesom ovisnim o kalciju (187).

U mnogobrojnim studijama, *in vitro*, se vidjelo da perforin i/ili citoplazmatske granule izolirane iz CTL i NK stanica mogu lizirati različite ciljne stanice. Pri tome nastaju karakteristične lezije u vidu pora na staničnim membranama ciljnih stanica (68, 105, 265). Međutim, pročišćeni perforin sam ne može izazvati sve morfološke i biokemijske posljedice izazvane ovim tipom citotoksičnosti, već je za to potrebno i sudjelovanje serinskih proteaza.

#### 2.4.2.2 Zastupljenost perforina u stanicama i staničnim linijama

Niz istraživača, služeći se vrhunskom tehnologijom (Northern-bloting tehnikom, *in situ* hibridizacijom i imunohistologijom) uz korištenje monoklonskih protutijela protiv mišjeg rekombinatnog i humanog perforina, definitivno su pokazali da se perforin eksprimira *in vivo* i *in vitro*, u fiziološkim i patofiziološkim uvjetima. Brojni su dokazi za to, kako na mišjim eksperimentalnim modelima, tako i na humanom materijalu.

Ekspresija perforina zabilježena je u NK stanicama (228), CD8<sup>+</sup> T stanicama, granuliranim stanicama metrijalne žlijezde, kožnim gama/delta stanicama (147), te u alfa/beta i gama/delta T stanicama crijevnog epitela (98).

U patološkim uvjetima, perforinska ekspresija je dokazana u limfocitima tijekom mišjeg virusnog horiomeningitisa, virusnog miokarditisa (207, 297), u reakciji domaćina protiv transplantata (93), u autoimunom dijabetesu (405) i u lupus eritematodesu (226). U

svim navedenim slučajevima, ekspresija perforina je u dobroj korelaciji sa citolitičkom aktivnošću i oštećenjem tkiva.

Prisutnost perforin pozitivnih stanica dokazana je i u patološki promjenjenom tkivu u akutnoj transplantacijskoj reakciji na srčane i bubrežne alotransplantate (138), u reumatoidnom artritisu (93), u miokarditisu (406), te u pacijenata sa infektivnom mononukleozom ili sa Epstein-Barr-ovim virusom (406).

Veoma zahvalnim za istraživanje perforina pokazali su se limfociti periferne krvi (LPK). Oni konstitutivno ekspimiraju značajan nivo mRNA za perforin u NK i gama/delta T stanicama (228). Perforin se ekspimirira u 20-30% CD8+ T stanica. Subpopulacija CD8+ T stanica koja ekspimirira perforin je i CD11b+, što sugerira da ona, *in vivo*, predstavlja efektorske citotoksične limfocite T. Perforin konstitutivno nije prisutan u 40-60% CD8+CD11b- T stanica, ali se ekspresija može izazvati sa anti-CD3 monoklonskim protutijelom i IL-2. Dakle, ova subpopulacija možda predstavlja prekursore CTL (397). Interesantno je da i u 5-20% CD4+ T stanica, koje konstitutivno ne ekspimiraju perforin, različitom stimulacijom također možemo inducirati sintezu perforina (397). U svim ispitivanjima ekspresija perforina je u dobroj korelaciji sa citolitičkim potencijalom i u stimuliranih i u nestimuliranih limfocita periferne krvi. Eksperimentalna istraživanja su pokazala da i u normalnih i u perforin deficitnih miševa CD4+ Th1 limfociti mogu sintetizirati citokine, za razliku od CD8+ gdje perforin ne samo da smanjuje proizvodnju citokina, već i njihovu proliferacijsku sposobnost, možda zbog smanjene sinteze IL-2 (295).



### 2.4.2.3 Uloga perforina u citolizi

Perforinski mehanizam citolize započinje vezanjem perforin pozitivne stanice za membranu ciljne stanice. Iza toga dolazi do direktnog vezanja perforinskih molekula za membranu ciljne stanice, uz prisustvo  $\text{Ca}^{2+}$ , neovisno o temperaturi (365). Taj proces inercije perforina za membranu ciljne stanice odvija se jednako na  $+4^{\circ}\text{C}$ , kao i na  $+37^{\circ}\text{C}$  (404). Suprotno tome, konformacijske promjene molekula perforina, kao i njihova polimerizacija, odvijaju se samo na  $+37^{\circ}\text{C}$ . Tako, na kraju, oko 20 molekula perforina formira tubularni kompleks, kojemu je promjer 16  $\mu\text{m}$  i ima izgled prstenastog kanala (55, 264, 402). Taj transmembranski kanal omogućuje ulaz citoplazmatskih molekula u ciljnu stanicu, te ulaz vode i iona, kao i sadržaja citoplazmatskih granula NK stanica. Posljedica toga je osmotska liza, dezintegracija jezgre i fragmentacija DNA ciljne stanice. Za citotoksičnost izazvanu egzocitozom sadržaja granula nije potrebna suradnja ciljne stanice, čak i potpuno pasivni ciljevi poput eritrocita bivaju uništeni. Ukoliko je oštećenje stanice opsežno doći će do brze smrti stanice nekrozom. Uočeno je da postoji perforin-ovisan i perforin- neovisan mehanizam lize ciljne stanice.

Kroz pore na membrani u ciljnu stanicu ulaze i serinske proteaze (posebno granzim B), koje su sastavni dio granula i oslobađaju se zajedno sa perforinom. Iako lizira većinu ciljnih stanica, perforin ne izaziva mjerljivu količinu fragmentacije DNA (267). Upravo su serinske esterase i druge proteaze zaslužne za kondenzaciju kromatina i bubrenje jezgrine membrane, te DNA fragmentaciju i konačno apoptozu (267). Nadalje, oštećenje membrane perforinom i intracelularni val kalcija neposredno uzrokuje reakciju staničnog oporavka. To

se očituje u endocitozi odsječka membrane zajedno s porama. Endocitozom se obično uvuče i mala količina tekućine iz okoliša (pinocitoza), koja sadrži oslobođene esteraze ili esteraze povezane s perforinom proteoglikanskim kompleksom (266). Prema tome, složeni sustav granzima i perforina predstavlja ubilački sustav kojemu se stanica ne može oduprijeti. Naime, ako ne nastupi oporavak stanica će umrijeti (nekroza), a ako dođe do oporavka aktivirat će se mehanizam apoptoze (267).

Istraživanja na životinjama kojima je uklonjen gen za perforin (perforin deficitne životinje), pokazala su da one ne mogu kontrolirati infekcije s necitolitičkim virusima i intracelularnim parazitima koje normalna životinja eliminira s lakoćom, ne mogu odbaciti transplantate imunogeničkih tumora, oslabljene su im reakcije preosjetljivosti odgođenog tipa, te *in vivo* i *in vitro* citotoksičnost (267).

#### 2.4.2.4 Perforin u transplantacijskoj reakciji

Zadnjih nekoliko godina sve je više podataka i dokaza o sudjelovanju perforina u citolizi posredovanoj stanicama. Selvaggi i sur. (299) su pokazali da perforin deficitni miševi mogu odbaciti ksenogeničke i alogeničke transplantate, gotovo jednako brzo kao i normalni miševi. To ukazuje da u odbacivanju alotransplantata važnu ulogu igraju i drugi mehanizmi, koji u uvjetima deficita mogu zamijeniti perforinom posredovanu citotoksičnost. Iako sam mehanizam još uvijek nije do kraja razjašnjen, ipak perforin je, *in vivo*, marker za aktivirane citotoksične limfocite (95). To je veoma važno u području

transplantacijske imunologije, gdje bi se on mogao koristiti u dijagnostici i prevenciji reakcije odbacivanja, jer se izgleda perforin pozitivni limfociti pojavljuju u biopsijama transplantata prije nego što se histološki može uočiti oštećenje (94). Smatra se da glavnu ulogu u akutnom odbacivanju igra stanična imunost, što dokazuje difuzna infiltracija odbačenih organa CTL (341, 342), nasuprot minimalnom broju CD56 stanica (237). Imunohistološkom analizom uz korištenje protuperforinskih protutijela, vidjelo se da je odbačeni bubreg infiltriran mnoštvom perforin pozitivnih stanica (138), a uočena je i prisutnost perforin pozitivnih intratubularnih stanica za vrijeme odbacivanja (280, 391), što sugerira dominirajuću ulogu perforina i granzima, *in vivo*, u destrukciji tubularnih epitelnih stanica putem CTL. Suprotno tome, broj perforin pozitivnih stanica u uzorcima tkiva dobivenim biopsijom 1 sat nakon transplantacije bio je zanemariv (138, 199). Isto tako, histološka analiza srčanog transplantata pokazala je da bi se perforin mogao koristiti kao značajan pokazatelj rane krize odbacivanja (50, 94, 169), dok bi njegova odsutnost u kasnoj krizi značila dobar prognostički znak u preživljavanju transplantata (50). Perforin se također može naći u alveolarnim limfocitima za vrijeme odbacivanja plućnog transplantata (331, 169, 51). Uočeno je da ekspresija perforina u citoplazmi LPK korelira sa akutnom krizom odbacivanja (265, 268). Analiza bioptata transplantiranog bubrega za vrijeme akutne krize, pokazala je povišenu ekspresiju mRNA za perforin (331). Međutim Sharma i sur. (301) su pokazali da mRNA za perforin nije u korelaciji s akutnim i kroničnim odbacivanjem.

Istovremeno ispitivanje ekspresije perforina, granzima B i FasL moglo bi biti dobar dijagnostički pokazatelj akutnog odbacivanja (331). U kroničnom odbacivanju uočena je

povišena ekspresija perforina, FasL i IL-15, ali ne i IL-10, IL-7 i granzima B (331). U biopstatima bubrega, čija je funkcija zadovoljavajuća 3 i 6 mjeseci nakon transplantacije nije nađena povišena ekspresija perforina i granzima B (331). Ispitivanja su pokazala da postoji klinička korelacija između snage odbacivanja i opsega infiltracije transplantata perforin pozitivnim stanicama (138). Tako je broj perforin pozitivnih stanica u ireverzibilnoj reakciji odbacivanja znakovito veći nego u reverzibilnoj. Imunohistokemijska analiza je također pokazala razlike između ireverzibilne i reverzibilne reakcije odbacivanja (199). U ireverzibilnoj reakciji citoplazma perforin pozitivnih stanica je difuzno obojena, dok je u reverzibilnoj ispunjena granulama. To bi moglo ukazivati na veću aktiviranost perforin pozitivnih stanica pri ireverzibilnom odbacivanju (199).

U reverzibilnoj reakciji perforin pozitivne stanice su u kontaktu sa endotelnim stanicama intersticijskih kapilara, koje uništavaju, što rezultira ishemijskim oštećenjem tkiva (199). Suprotno tome, u ireverzibilnom odbacivanju intersticij je difuzno prožet perforin pozitivnim mononuklearima. Prisutan je i tzv. tubulitis, odnosno perforin pozitivne stanice, smještene uz vanjsku površinu tubula, direktno uništavaju tubularni epitel. Tako uzrokuju nepovratno oštećenje tubula (280). Iz tih razloga, tubulitis smatraju lošom prognozom pri preživljavanju transplantata (199), te jednim od glavnih dijagnostičkih kriterija odbacivanja bubrežnog transplantata (281).

Važno je napomenuti učinak imunosupresivnih lijekova. U eksperimentima, ciklosporin snižava ekspresiju mRNA na perforin. Imunosupresija u ljudi isto tako uvjetuje redukciju ekspresije perforina (199).

Nedavna ispitivanja pokazuju da je ekspresija perforinske mRNA veoma visoka u toleriranih organa tj. snažno inducirana, što ukazuje na održavanje citotoksičnosti u tim transplantatima. To otvara nova pitanja i traži nove odgovore o važnosti perforina u transplantacijskoj imunologiji, sa ciljem da se pronađu što raniji i sigurniji indikatori akutnog odbacivanja, te tako uspostavi kontrola nad transplantacijskom reakcijom.

**Granzimi** su grupa serinskih proteaza, a nalaze se u citoplazmatskim granulama i vrlo su homologni. Njihova glavna funkcija je degradacija i fragmentacija DNA ciljne stanice. Klonovi CD8+CTL sintetiziraju granzim A i B (GA, GB) te perforin nakon stimulacije s alogenim stanicama. Litički proteini su pohranjeni u sekretornim granulama. GA se može detektirati 2-10 dana nakon alogene stimulacije. GB je primarno eksprimiran u aktiviranim citotoksičnim stanicama. Pripada obitelji kimotripsina i glavna je komponenta litičke mašinerije citotoksičnih stanica (301). Njegov ulazak u stanicu omogućava perforin stvaranjem transmembranskih kanala i složenim unutarstaničnim zbivanjima koja izgleda uključuju aktivaciju apoptotičkih proteaza (CPP32) (98), uzrokuju fragmentaciju DNA i smrt stanice. Istraživanja su pokazala korelaciju između ekspresije mRNA za GB u bubregu i akutnog, ali ne i kroničnog odbacivanja. Intenzitet odbacivanja bio je jači ukoliko je bila prisutna glasnička RNA za GB (49, 301). Biopsija bubrega tijekom akutne krize odbacivanja pokazala je da GB, uz perforin, sudjeluje u destruktiji tubularnih epitelnih stanica (391). Istraživanja su pokazala da i prilikom akutnog odbacivanja drugih organa kao što su pluća, srce i jetra je povšena ekspresija mRNA u presatku (114, 391).

### 2.4.3 ULOGA CITOKINA U REAKCIJI ODBACIVANJA I REGULACIJI EKSPRESIJE PERFORINA

Naziv citokini prvi je upotrijebio Cohen, a odnosi se na topive glikopeptide, molekularne težine oko 30 kD, koji posreduju specifične učinke na ciljnim stanicama. Njihovo se djelovanje mora sagledati u kontekstu tkivnog okoliša, u normalnim i patofiziološkim uvjetima (188, 229). Konstitutivno se ne luče ili se luče u vrlo niskim koncentracijama, ali se njihovo lučenje može inducirati. Produkcija citokina je prolazna i malog djelokruga, te oni djeluju na autokrini i parakrini način. No već pikomolarne koncentracije izazivaju učinke vežući se na specifičan, visokoafinitetni receptor što rezultira kaskadom biokemijskih događaja u stanici. Ona vode u različito ispoljavanje gena što može uzrokovati smrt ili proliferaciju ili utjecati na stanično ponašanje kao pokretljivost, površinski fenotip, stvaranje matriksa, sekreciju ili citotoksičnost (188). Vidjelo se da Th2 tip sekrecije citokina (IL-4, IL-6 i IL-10) ima važnu ulogu u humoralnom imunom odgovoru, dok Th1 sekrecija (IL-2, TNF alfa i IFN-gamma) je upletena u imunost posredovanu stanicama (387). Prema Th1/ Th2 staničnom modelu pokazalo se da Th1 citokini kao IL-2 i IFN-gamma imaju glavnu ulogu u reakciji akutnog odbacivanja posredovanog stanicama, tako što aktiviraju CD4<sup>+</sup> limfocite T i makrofage (74, 387), ali i CD8<sup>+</sup>CTL (387). Mislilo se da bi Th2 citokini IL-4 i IL-10 mogli inhibirati proces odbacivanja, ili čak inducirati toleranciju (392), no neke studije su ukazale na njihovo sudjelovanje u procesu odbacivanja (331, 422). Izgleda da imunosupresivni protokoli uključujući CsA, kortikosteroide i anti-CD4 monoklonsko protutijelo inhibiraju

proizvodnju Th1 citokina, ali slabo djeluju na Th2 citokine (92, 219, 273). Pretpostavlja se da bi Th2 citokini mogli sudjelovati u kroničnom odbacivanju (160, 261). Citokini sudjeluju i u regulaciji ekspresije perforina.

#### 2.4.3.1 Interleukin-2

Mnogi autori su mišljenja da je interleukin-2 (IL-2) primarni citokin odgovoran za regulaciju ekspresije perforina. U humanim NK i gama/delta T stanicama IL-2 nema većeg utjecaja na povećanje ekspresije perforina, jer je perforin u tim stanicama eksprimiran konstitutivno (228, 311). Suprotno tome, CD3+LPK stimulirani IL-2 kroz četiri sata pokazuju četverostruki porast mRNA za perforin u odnosu na nestimuliranu kontrolu, a nakon šest sati postiže se najveće povećanje (7-8x). Populacija obogaćena CD8+ alfa/beta T stanicama pokazuje 10 puta veće ispoljavanje mRNA za perforin nego CD4+T limfocitna subpopulacija. Isto je zapaženo s NK stanicama u perifernoj krvi CD3-CD16+CD56+ fenotipa, koje konstitutivno eksprimiraju visok nivo mRNA za perforin, ali se njen sadržaj ne može dodatno povećati stimulacijom IL-2 *in vitro* (304). Suprotno tome Clement i sur. su dokazali porast ispoljavanja mRNA za perforin i granzim A i B (0,4-1 puta) u NK stanicama šest sati nakon stimulacije s 200i.j./ml IL-2 (49). IL-2 može povećati citotoksičnost NK stanica prema NK osjetljivoj i rezistentnoj staničnoj liniji drugim mehanizmima: staničnim vezanjem, staničnim prepoznavanjem i povećanjem egzocitoze putem aktivacije CD16+ molekule. Deplecija CD16+ LPK protutijelom protu-CD16 i

komplementom ukida direktnu citotoksičnost IL-2 stimuliranih CD3+ i CD3- stanica protiv K562 stanične linije. Prema tome IL-2 stimulira povećanje stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima.

Istraživanja su pokazala da je IL-2 snažno eksprimiran u transplantatu tijekom akutne krize odbacivanja. Postoji značajna korelacija između ekspresije mRNA za IL-2 u graftu i akutne krize odbacivanja (340). Već je godinama poznato da tijekom odbacivanja dolazi do produkcije IL-2 putem stimuliranih CD4+ limfocita i razvijanje receptora za IL-2 (IL-2R+) na površini aktiviranih CD4+ i CD8+ limfocita T, nekih limfocita B i makrofaga (356). IL-2 nije potreban za održavanje procesa odbacivanja, već samo na njegovu početku (341). IL-2 omogućava sazrijevanje i proliferaciju citotoksičnih limfocita T, a pojačava aktivnost NK stanica i drugih citotoksičnih stanica. Nishodna regulacija proizvodnje IL-2 u limfocitima T bi, *in vivo*, mogla biti dovoljna za održavanje tolerancije na presadak (38), što se vidjelo u eksperimentima s miševima, bez obzira na prisutnost velikog broja specifičnih CTL u presatku (58). Injekcijom IL-2 se postiglo promptno odbacivanje presatka (79).

Interleukin-2 receptor (IL-2R) spada u porodicu faktora rasta, a raznovrsni su po svom obliku i strukturi. Jedan tip građen je od dva različita lanca: alfa lanac molekularne težine 75kD i beta lanac molekularne težine 55 kD. On pokazuje vrlo slab afinitet prema IL-2. Nasuprot tome, drugi tip je heterotrimer, građen od alfa i beta lanca nekovalentno vezanih i trećeg gama lanca (356). Gen koji kodira alfa lanac nalazi se na desetom kromosomu, a može se ispoljiti samo nakon aktivacije T stanica. Gen za beta podjedinicu se nalazi na 22 kromosomu, konstitutivno je ispoljen na CD8+ CTL i NK stanicama, a nije



u CD4+ stanicama (26), a može se ispoljiti u svim T stanicama ako se prethodno aktiviraju. Kombinacija beta i gama podjedinice je potrebna za provođenje signala u stanicu, dok su sve tri podjedinice potrebne za postojanje visokoafinitetnog receptora. Pretpostavlja se da su ovi, još nedovoljno poznati receptori, važni u reakcijama odbacivanja, jer selektivna terapija monoklonskim protutijelima protiv stanica sa IL-2R može zaustaviti odbacivanje i značajno utječe na preživljavanje transplantata (356).

Budući da je punih dvadeset godina IL-2 smatran kraljem citokinske obitelji, iznenađujuće je bilo otkriće da IL-2 deficitni sojevi miševa, ne samo da imaju održane imunološke funkcije, već mogu odbaciti transplantat, isto kao i normalni miševi (328). Isto tako, blokada IL-2 u samom transplantatu nije spriječila odbacivanje (174, 408). Pretpostavilo se da bi se to moglo objasniti time što IL-2 dijeli svoje receptore sa ostalim citokinima. Aktivacija limfocita T, preko kaskade reakcija, dovodi do induciranja ekspresije IL-2 i IL-2R alfa podjedinice, te brzom pridruživanju beta i gamma podjedinice, koje na staničnoj površini formiraju kompleks receptora visokog afiniteta (407). To vodi regrutaciji i autoaktivaciji (fosforilaciji) Janus tirozin kinaza -Jak1 i Jak3 (128, 173). Aktivirani Jak 1 i 3 predstavljaju vezno mjesto za preoblikovače signala (signal transducer) i aktivatore transkripcije: Stat1, Stat3, Stat5a i Stat5b (173). Ovako aktivirani Stats se oslobađa iz beta lanca i formira homo i/ili heterodimere što regulira transkripciju (358). Jaks (Jak1, Jak2, Jak3 i Tyk2) su relativno velike tirozin kinaze (120-130kDa). Dok su Jak1, Jak2 i Tyk2 eksprimirani u većini stanica, Jak3 se javlja samo u limfocitima i NK stanicama (173). U slučaju nedostatka Jak3, i u ljudi i u miševa, razvija se ozbiljan sindrom imunodeficijencije, koji se očituje u reduciranom broju limfocita T i nefunkcionalnim B

stanicama (173). Pokazalo se da Jak/Stat put mogu koristiti različiti citokini (173, 358). Naime, svaki citokin ima svoj specifični «osobni» receptor, ali vrlo često on istovremeno dijeli jedan ili više zajedničkih receptora s drugim citokinima (407). Preko gama podjedinice IL-2R, citokini IL-4, IL-7, IL-9, IL-13 i IL-15 mogu aktivirati isto Jak1 i Jak3 tirozin kinaze, kao i Stat5a i Stat5b transkripcijske faktore (66), dok IL-4 aktivira Stat6 (66). Vidjelo se da bar tri člana kraljevske obitelji citokina: IL-7, IL-9 i IL-15 imaju vrlo slično djelovanje na limfocite T, kao i IL-2, pa zato više ne iznenađuje što IL-2/IL-4 deficijentni miševi mogu razviti akutnu krizu odbacivanja transplantata posredstvom IL-7, IL-9 i/ili IL-15 (174).

#### 2.4.3.2 Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) se luči u Th2 imunom odgovoru, sudjeluje u kasnoj diferencijaciji limfocita B i formiranju plazma stanica, a novija istraživanja su ukazala na njegovu moguću ulogu u procesu odbacivanja (386). Praćenjem IL-6 u krizi odbacivanja, vidjelo se da dolazi do porasta koncentracije u urinu i u bioptatu tkiva, te da se vraća na normalu nakon uspješne imunosupresivne terapije, ali nivo cirkulirajućeg IL-6 nije pokazao nikakvu korelaciju sa krizom odbacivanja. Međutim, njegovo javljanje u infekcijama, akutnoj tubularnoj nekrozi i nekim imunosupresivnim protokolima smanjuje njegovu važnost kao mogućeg indikatora krize odbacivanja (378). Štoviše, jedna studija sugerira

moću ulogu IL-6 u supresiji imunog odgovora na presađak, time što djeluje inhibirajuće na proizvodnju IFN-gamma putem aloreaktivnih limfocita T (358).

IL-6 nije u stanju izazvati ekspresiju perforina u CD8<sup>+</sup> T stanicama samostalno, ali je učinkovit zajedno sa IL-2 (312), pri čemu dolazi do specifičnog povećanja mRNA za perforin, a ne i do generalizirane T stanične aktivacije IL-2. Blokadom p75 podjedinice IL-2 receptora na limfocitima T prestaje taj učinak. Poslije indukcije sa IL-2 ili kombinirane indukcije sa IL-2 i IL-6, TGF-beta djeluje inhibicijski na izazivanje sinteze mRNA za perforin (312). Iako na NK stanicama periferne krvi postoji p75 IL-2 receptor, kostimulacija IL-2/IL-6 ne mijenja razinu perforinske mRNA, nego samo povećava citotoksičnu aktivnost. To dokazuje povećana aktivnost pročišćenih CD3- limfocita protiv K562 stanične linije u klasičnom kratkotrajnom testu citotoksičnosti nakon stimulacije IL-2, IL-6 ili kostimulacije IL-2/IL-6 (310).

#### 2.4.3.3 Interleukin-4

Interleukin-4 (IL-4) ima funkciju pojačivača ispoljavanja MHC molekula klase II i CD23 biljega na limfocitima B, te njegovog vlastitog receptora na limfocitima. Izaziva sekreciju IgG1 i IgE, te predstavlja faktor rasta za limfocite i mastocite (140). Glavni je regulator razvoja CD4<sup>+</sup> stanica Th2 fenotipa, što sugerira pojačanje humoralne imunosti na račun smanjenja celularne imunosti i citotoksičnosti. Istraživanja u miševa su pokazala da direktna stimulacija citotoksične T limfocitne linije R8i IL-4 (kojoj za rast nije potreban IL-

2), dovodi do porasta količine mRNA za perforin i samog perforina u istoj količini kao i stimulacija IL-2, IL-3 i IL-6. Pri tom ne dolazi do proliferacije stanica, što govori u prilog njegovog specifičnog učinka na diferencijaciju CTL (186). Prisutnost IL-4 nije opažena u transplantatu tijekom akutne krize odbacivanja (202). Štoviše, nađen je u srčanom transplantatu miša tijekom indukcije tolerancije (305, 343). Također ekspresija mRNA za IL-4 nije inhibirana u anergičnim stanicama (292). Budući da je ekspresija gena za IL-4 najčešće udružena sa dugogodišnjim preživljavanjem presatka u eksperimentalnim istraživanjima, moguće je da on igra ulogu u toleriranju presađenog organa (231, 331, 303).

Međutim, prateći ekspresiju gena za IL-4 u limfocitima T periferne krvi, vidjelo se da za vrijeme akutne krize odbacivanja bubrežnog transplantata dolazi do značajnog porasta ekspresije IL-4 (344). Isto tako uočena je povišena ekspresija mRNA za IL-4 tijekom akutne krize odbacivanja srčanog transplantata (169). Budući da neke studije govore u prilog sudjelovanja IL-4 u održavanju poslijetransplantacijske tolerancije, a druge o njegovom uplivu u akutnom odbacivanju, svakako su potrebna dalja istraživanja (422).

#### **2.4.3.4 Interleukin-10**

Interleukin-10 (IL-10) proizvode Th2 limfociti periferne krvi i aktivirani monociti (127). IL-10, poput IL-4 inhibira aktivaciju NK stanica posredovanu IL-2 (127) i inhibira predočne stanice (APS), blokirajući ekspresiju MHC molekula klase II (65). Također sprječava proizvodnju IL-12 i smanjuje ispoljavanje receptora za IL-12 na stimuliranim

limfocitima (396), čime se smanjuje i egzocitoza perforina iz granula CTL. On dakle inhibira sekreciju Th1 citokina, ekspresiju MHC klase II na monocitima, te ekspresiju B7 kostimulatornog liganda na površini makrofaga (65). Pretpostavlja se da je to možda put kojim inhibira odbacivanje. Interesantno je da vrlo niska koncentracija IL-10 prije transplantacije (manje od 100 pg/ml) značajno utječe na preživljavanje i bolju funkciju presatka (386, 392), dok visoka koncentracija (>1000 pg/ml), uz normalnu funkciju CD4+ limfocita vodi kroničnom odbacivanju i gubitku transplantata (386).

Međutim, pretpostavka da je IL-10 možda *in vivo* immunosupresivni citokin, dovedena je u pitanje nalazom mRNA u biopstatima bubrega tijekom akutne krize odbacivanja (289, 331, 340), a značajno viša ekspresija mRNA za IL-10 uočena je i u odbačenom transplantatu pankreasa (u štakora) (136). Interleukin-10 djeluje kao faktor rasta i diferencijacije limfocita B, te stimulira ADCC i tako možda povećava humoralni imuni odgovor na transplantat (65, 232). Također se vidjelo da tijekom akceleriranog vaskularnog tipa odbacivanja bubrežnog transplantata, limfociti koji infiltriraju transplantat luče povećane količine IL-10 (331). Štoviše, smatra se da je prisutnost IL-10, zajedno sa granzimom B, značajan i specifičan pokazatelj akutne, ali ne i kronične krize odbacivanja (136, 331, 422).

#### 2.4.3.5 Interleukin-12

Interleukin-12 (IL-12) luče monociti, makrofagi, limfociti B i druge antigen prezentirajuće stanice najčešće kao odgovor na infektivne agense (116). Utječe na razvoj limfocita CD4+ diferencirajući ih u Th1 fenotip i regulirajući njihovu funkciju (119, 295). Umjereno potiče stvaranje GM-CSF, TNF-alfa, i IL-8 u T i NK stanicama (26, 96). Sudjeluje u stvaranju tzv. LAK stanica iz T i NK limfocita, pa tako NK klonovi kultivirani s IL-12 učinkovitije ubijaju osjetljive, neosjetljive i protutijelima presvučene ciljne stanice, bolje ispoljavaju adhezijske molekule (CD2, ICAM i LFA-1) i aktivacijske markere (CD69) (26, 96). Isto tako dolazi do dvostrukog povećanja količine mRNA za perforin i granzim B već nakon nekoliko sati stimulacije s IL-12 (287). Radi se o relativno neovisnom putu stimulacije preko IL-12 receptora. Ovi receptori su izraženi na aktiviranim limfocitima T, a konstitucijski na humanim NK stanicama (396).

#### 2.4.3.6 Interleukin-15

Interleukin-15 (IL-15) je po biološkoj aktivnosti sličan IL-2 i smatra se da u slučaju nedostatka IL-2 preuzima njegovu funkciju (18, 38, 340). Proizvode ga aktivirani makrofagi, mišićne stanice, keratinociti, bubrežne epitelne stanice i endotelne stanice, ali ne i limfociti T (18, 422), što je važno posebno naglasiti jer IL-2 produciraju jedino aktivirani limfociti T. IL-15 se veže za kompleks receptora koji uključuju beta i gama lanac IL-2 receptora, ali i specifični alfa lanac IL-15 receptora, koji ne spada u porodicu citokinskih

receptora (16, 422). Distribucija alfa IL-15R je vrlo široka, ispoljen je na T i B limfocitima, makrofazima, timičnim staničnim linijama (85), a dokazan je u jetri, slezeni, plućima, srcu, poprečno-prugastoj muskulaturi i aktiviranom endotelu (23).

IL-15, slično kao i IL-2, stimulira proliferaciju aktiviranih limfocita T i NK stanica, aktivaciju CTL i pojačava ekspresiju IFN-gamma (271, 422). Veoma snažno utječe na razvoj citotoksičnih efektorskih stanica i na nastanak LAK stanica (od lymphokine activated killers). Ako IL-15 dodamo u kulturu T stanica, pojačat će se ispoljenost: IL-2R alfa (CD25), IL-2R beta (CD122), Fas (CD95), a dolazi do nishodne regulacije CD27 (124). Interesantno je naglasiti da protutijelo protiv beta podjedinice IL-2R u potpunosti blokira sve nabrojene učinke IL-15 koje ostvaruje na T i B limfocitima i NK stanicama.

Danas se smatra da je za poticanje perforinskog ispoljavanja dominantna stimulacija T i NK stanica citokinima IL-2 i IL-15 (340). Uočeno je, da bez obzira na blokadu IL-2/IL-2R sa anti-CD25 monoklonskim protutijelom, ipak dolazi do odbacivanja srčanog transplantata (16, 385, 417). IL-15 je zajedno sa interleukinom 7 (IL-7) nađen tijekom odbacivanja humanih bubrežnih transplantata. Štoviše, uočena je njihova snažna ekspresija za vrijeme akutne krize odbacivanja, a neovisno o IL-2 i IL-4 (331, 412, 416, 422). Budući da je ekspresija IL-7 i IL-15 rezistentna na ciklosporin, ovi bi citokini mogli igrati ulogu u podržavanju reakcije odbacivanja u bolesnika koji su pod konvencionalnom imunosupresijom (422).

Međutim, vidjelo se da IL-15 inhibira apoptozu izazvanu anti-Fas, anti-CD3 ili anti-IgM monoklonskim protutijelima ili deksametazonom u aktiviranim limfocitima T i B, *in vitro* (38). U mišjem eksperimentalnom modelu IL-15-IgG2b suprimira apoptozu

induciranu anti-Fas-om, *in vivo* (38). Pretpostavilo se da bi IL-15 mogao biti moćan inhibitor apoptoze, *in vivo i in vitro*, što bi se moglo koristiti u terapijske svrhe.

Svakako da su potrebna daljnja istraživanja koja će nam rasvijetliti ulogu IL-15 u reakcijama odbacivanja.

#### 2.4.3.7 Interleukin-7

IL-7 je dobiven pročišćavanjem nadtaloga kulture promijenjenih stromalnih stanica koštane srži (52). Osim poticanja diobe normalnih limfocita B u ranim fazama razvoja, može poticati umnažanje timocita u odsustvu mitogena kao što je fitohemaglutinin (PHA) i pojačati mitogeni učinak na timocite i zrele limfocite T (52). Njegova ključna uloga u ranom razvoju T i B limfocita, te djelovanje na zrele limfocite T, svrstava ga među važne citokine u regulaciji imunološke reakcije, a činjenica da snažno inducira citotoksičnost posredovanu limfocitima T i LAK stanicama, sugerira njegov upliv u odbacivanju presatka. Nađen je zajedno s IL-15 tijekom akutne krize odbacivanja bubrežnog transplantata (331, 422).

Od ostalih stimulusa, **OKT3** monoklonsko protutijelo (mAt) brzo izaziva ekspresiju perforina u limfocitima T periferne krvi, uz prisustvo monocita (311). To ukazuje na mogućnost da je CD3 signalna molekula neovisna o IL-2, jer monoklonska protutijela protiv IL-2 ili IL-2R ne inhibiraju indukciju perforina sa OKT3 mAt.



Stimulirani CD4+ limfociti T (Th1 tipa) luče i **IFN-gama**, limfokin koji također sudjeluje u imunom odgovoru. On djeluje kao faktor aktivacije makrofaga (MAF) i na taj način ubrzava fagocitozu, citotoksičnost i ostale njihove funkcije, te pojačava aktivnost NK stanica. Isto tako pojačava se ispoljenost antigena MHC klase II na antigen prezentirajućim stanicama (356). Dokazano je da i IFN-gama i IL-1 mogu reducirati proteinsku sintezu i uvjetovati destrukciju zdravog bubrežnog parenhima (209). Isto tako regulira i ekspresiju adhezijskih molekula na površini endotelijalnih i tubularnih epitelijalnih stanica u presatku (386)

Proinflamatorni monokini također igraju važnu ulogu u akutnom odbacivanju. IL-1 i TNF-alfa stimuliraju humane tubularne stanice na proizvodnju IL-8 i faktora aktivacije neutrofila proizvedenog u epidermalnim stanicama, koji imaju snažnu neutrofilnu i limfocitnu kemotaktičku aktivnost (387). To rezultira putovanjem inflamatornih stanica u transplantirani organ (387).

Međutim, iako je uočena prisutnost citokina u odbačenim organima, njihova uloga do danas još nije potpuno razriješena (189). Istraživanja ekspresije gena za citokine u dugoživućih transplantata su pokazala visoku razinu IL-4, IL-10, transformirajućeg čimbenika rasta (TGF) beta, IFN-gama, te nemjerljivo nisku razinu IL-2. Tijekom akutne krize odbacivanja visoko su eksprimirani IL-2, IFN-gamma, TGF-beta, dok IL-4 i IL-10 nisu detektirani. Izgleda da je akutno odbacivanje udruženo sa ekspresijom Th1 citokina IL-2 i IFN-gamma, dok u dugoživućih transplantata predominira ekspresija Th2 citokina

IL-4 i IL-10 (303). Grupa autora je pratila ekspresiju gena za IL-4, IL-5, IL-10 i IL-13 u limfocitima periferne krvi (LPK) u ranom poslijetransplantacijskom razdoblju. Uočili su da u bolesnika sa stabilnom funkcijom presatka značajno pada ekspresija IL-4 i IL-5, a raste IL-10. No IL-4 se kroz 2 tjedna vraća na vrijednosti prije transplantacije. Za vrijeme akutne krize ekspresija IL-4 i IL-5 značajno je porasla, dok je IL-10 drastično smanjena. Primjenom imunosupresivne terapije razina IL-4 i IL-5 se smanjila na početne vrijednosti, a IL-10 ponovno porasla (344). Izgleda da imunosupresivna terapija koja uključuje CsA, kortikosteroide, anti-CD4 monoklonska protutijela inhibira Th1 citokine, ali Th2 citokinska produkcija ostaje pošteđena (92, 219, 273).

Ovi rezultati ukazuju na citokine kao izuzetno važne sudionike patofizioloških zbivanja u transplantacijskoj reakciji, ali isto tako na složenu i još uvijek nedovoljno poznatu, međusobnu isprepletenost njihovih specifičnih funkcija.

## 2.5 NEIMUNOLOŠKI ČIMBENICI (KLINIČKI KRITERIJI)

Brojna istraživanja, a posebno u novije vrijeme, pokušavaju utvrditi utjecaj različitih faktora na uspješno preživljavanje presatka. Jedna od njih je i velika CTS studija (Collaborative Transplant Study) koja je započela još 1982.g. u Heidelbergu i traje sve do današnjih dana, a u nju je uključeno preko 300 transplantacijskih centara. Najjednostavniji način vrednovanja utjecaja ovih faktora na ishod transplantacije je statistička analiza preživljavanja presatka u različitim grupama primatelja. Čimbenici koji utječu na ishod transplantacije mogu se podijeliti u tri grupe, ovisno da li su vezani za primatelja organa, davatelja ili sam transplantirani organ. Analiza davatelja uključuje dob, spol i uzrok smrti (u slučaju kadaveričnog transplantata) ili opće kliničko stanje živog davatelja. Što se samog transplantata tiče prati se trajanje ishemije bubrega, način pohranjivanja, kirurške tehnike i utjecaj transplantacijskog centra. Kod primatelja se gleda dob, spol, osnovna bolest koja je dovela do kroničnog zatajenja bubrega, kliničko stanje u trenutku transplantacije (psihofizička kondicija), vrijeme provedeno na dijalizi, način dijaliziranja, te eventualne prethodne transplantacije.

### 2.5.1 DOB DAVATELJA

Praćenjem neimunoloških čimbenika već je ranije uočeno da na preživljavanje utječe dob davatelja organa (238). Naime, smatra se da u starijih davatelja postoje multiorganske promjene, vezane upravo uz višu životnu dob, te da nefroskleroza, ateroskleroza i slabija glomerularna filtracija vodi lošijem preživljavanju transplantata (3, 103, 152, 192). CTS studija je pokazala da najbolje preživljavanje ima bubreg davatelja u dobi od 16 do 40 godina (8). Nekoliko studija uočava lošije preživljavanje kad su davatelji stariji od 50 godina (8, 45, 46, 196, 307, 315). Ukoliko su davatelji stariji preživljavanje kroz 5 godina je čak 20% lošije (8). Studija NIT-a (Nord Italian Transplant) koja je obuhvatila 1169 transplantiranih bolesnika također to potvrđuje (307). Naime bubreg davatelja mlađeg od 50 godina ima značajno više 4-godišnje preživljavanje, nego li u starijih davatelja (85,3%:73,5%). Također je i postotak transplantata s odličnom funkcijom-EGF (excellent graft function) značajno viši u mlađoj grupi davatelja (72,7%:40,8%). Druga veća studija NIT koja je obuhvatila 3101 bolesnika ponovno je to potvrdila. (306). Chertow i sur. su u dvije velike studije potvrdili da je viša životna dob davatelja udružena sa lošijim preživljavanjem transplantata (45, 46), a do istih rezultata su došli i Matas i sur. (196). Rezultati iz Eurotransplanta ukazuju na lošije preživljavanje ukoliko je davatelj mlađi od 16 i stariji od 55 godina (315). Nasuprot tome Sharma i sur. su pokazali da danas, u situaciji nestašice organa za transplantaciju, uz dobar odabir i podudarnost, dob davatelja ne utječe na uspjeh transplantacije (153).

## 2.5.2 DOB PRIMATELJA

Posljednjih 15-tak godina, znatno se povećao broj uremičara starije životne dobi (152, 192). Zadnjih godina sve se više pažnje obraća promjenama, imunološke i neimunološke prirode, koje starenje izaziva u organizmu. Pretpostavlja se da dolazi do promjene sastava seruma i krvnih elemenata, a također i do više ekspresije HLA-DR antigena na limfocitima (276), promjene u produkciji IL-6 (330), kao i povišene koncentracije TGF-beta u stimuliranim limfocitima (285). Niz studija je pokazao da je u starijih primatelja viši mortalitet i češće se razvija akutna kriza odbacivanja, negoli u mlađih (152, 307). Kaplan i sur. su uočili da starija životna dob primatelja predstavlja veći rizik za razvoj kroničnog zatajenja transplantata, neovisno od ostalih čimbenika, kao što su dob davatelja, trajanje hladne ishemije i javljanje akutne krize (152). I velika studija Eurotransplanta koja je obuhvatila 11495 transplantiranih bolesnika pokazala je da je preživljavanje bolje u primatelja ispod 55 godina (313). Studija NIT-a je pokazala da primatelj iznad 50 godina života ima značajnije lošije preživljavanje transplantata nego primatelj mlađe životne dobi (78,1%:84,4) (307), a i funkcija grafta (EGF) je lošija u usporedbi sa mlađom dobnom skupinom (58,3%:70,9%- podaci iz NIT-a) (307). I nove studije (192, 204) su potvrdile da su stariji primatelji izloženi većem riziku za razvoj kroničnog zatajenja transplantata, što se pokazalo neovisnim o dobi davatelja, trajanju hladne ishemije i akutnoj krizi odbacivanja.

Ovi podaci sugeriraju da na preživljavanje značajno utječe dob primatelja i davatelja organa (306). Ukoliko su mlađe životne dobi (od 16 do 50 godina) preživljavanje je bolje, pa bi trebalo nastojati da su primatelj i davatelj približno iste dobi.

### **2.5.3 SPOL PRIMATELJA I DAVATELJA**

Osim dobi primatelja i davatelja, postavilo se pitanje utjecaja spola. Spol primatelja nema bitan utjecaj na ishod transplantacije (223). Što se spola davatelja tiče, neki autori smatraju da bubreg muškog davatelja preživljava bolje nego bubreg ženskog, a najlošije preživljavaju bubrezi ženskih davatelja u muških primatelja (75). No, analize u NIT-u pokazale su da spol primatelja i davatelja ne igraju ulogu u uspjehu transplantacije (306).

### **2.5.4 TRAJANJE DIJALIZE**

Trajanje dijalize prije transplantacije općenito nema značajan utjecaj na preživljavanje bolesnika i transplantata, osim u mlađih od 15 godina u kojih dugotrajne dijalize mogu biti štetne (377). Studije NIT-a su pokazale da nema razlike u preživljavanju transplantata, bez obzira da li je dijaliza trajala manje ili više od 3 godine (306, 307)

## 2.5.5 HLADNA ISHEMIJA BUBREGA

Vidjelo se da je i stanje samog transplantata važno za njegovo preživljavanje. Smatra se da hladna ishemija dovodi do povišene ekspresije MHC antigena i adhezijskih molekula, te do lokalnog oslobađanja citokina u bubregu (Interferona gamma, transformirajućeg čimbenika rasta beta-1, IL-2, IL-10), posljedičnog oštećenja bubrežnog tkiva i kasnijem gubitku transplantata (87). Tako se primjetilo da trajanje hladne ishemije bubrega, prije transplantacije, dulje od 36 sati, pogoršava sam ishod (8). NIT studija (307) sugerira da bubrezi transplantirani nakon 24 sata hladne ishemije imaju lošije preživljavanje nego ukoliko su transplantirani unutar 24 sata (69,2%:83,6%), međutim rezultat nije statistički značajan. Njihova kasnija studija na većem broju transplantiranih ne pokazuje razliku u preživljavanju u odnosu na trajanje hladne ishemije bubrega (306). Lee i sur. su primjetili da hladna ishemija koja je trajala preko 24<sup>h</sup>, loše utječe na funkciju transplantata u ranom poslijetransplantacijskom razdoblju, ali dugoročno gledano nema utjecaja na preživljavanje (163). Jedno istraživanje na laboratorijskim miševima je pokazalo da produljena hladna ishemija ima negativan efekt ukoliko bubreg potječe od starije životinje (366). Iako većina studija nije dokazala utjecaj trajanja hladne ishemije na preživljavanje transplantata, Smits i sur. su uočili da je, ukoliko je ona trajala više od 24 sata, rizik gubitka bubrežnog transplantata značajno viši (316). Prednost kratkotrajne hladne ishemije je uočena praćenjem živućih nesrodničkih transplantata (313).

Neke studije su pokušale dokazati da kratkotrajna hladna ishemija može smanjiti ili čak poništiti potrebu za HLA tipiziranjem (326). Međutim CTS je pokazala da

nepodudarnost u HLA sustavu negativno utječe, čak i ako je hladna ishemija trajala kraće od 7 sati (245, 246).

### **2.5.6 KLINIČKO STANJE PRIMATELJA**

Svakako treba naglasiti važnost općeg kliničkog stanja primatelja prije transplantacije pri čemu se ne smije zanemariti ni primarna bubrežna bolest koja je dovela do KRI (7). Tako je u uremičara sa oboljenjima, kao što su diabetes i hipertenzija, vijek preživljavanja transplantata kraći u usporedbi sa genetskim bolestima kao što su policistični bubrezi ili Alportov sindrom (247). Najčešće loše opće stanje primatelja utječe na lošije preživljavanje transplantiranog organa, npr. u dijabetičara u kojih je opće stanje organizma narušeno, lošije je i preživljavanje samog transplantata (8).

### **2.5.7 ODNOS VELIČINE BUBREGA / TJELESNE MASE PRIMATELJA**

Primjećeno je da bi veličina transplantiranog bubrega, tzv. kritična masa nefrona, trebala odgovoriti na metaboličke potrebe primatelja u skladu sa njegovom tjelesnom masom, što povoljno utječe na preživljavanje transplantata (230). Jedna studija je pokazala da je uspjeh transplantacije lošiji u pretilih primatelja (s indeksom tjelesne težine >25), neovisno o ostalim rizičnim čimbenicima (205). Budući da neke studije (193) nisu uočile značajniji utjecaj indeksa tjelesnih masa primatelja i davatelja, svakako su potrebna dalja istraživanja na većem broju bolesnika, prije nego se stvore jasne preporuke.



### 2.5.8 UTJECAJ TRANSPLANTACIJSKOG CENTRA

Od ne malog značaja je i utjecaj transplantacijskog centra, poznato kao «efekt centra», o čemu su podatke dali još 1979.g. Opelz i Terassaki (241), što su kasnije potvrdili i drugi autori (47, 86, 194, 307). Općenito se smatra da se transplantacijski centri međusobno razlikuju prema broju transplantacija godišnje što svakako utječe na iskustvo transplantacijskog tima (kirurga, nefrologa, imunologa, anesteziologa, transfuziologa), na primjenu imunosupresivne terapije, te na strategiju odabira najpogodnijeg primatelja (8). Jedna velika studija u Kaliforniji (86) koja je obuhvatila 68 centara, je pokazala veliki utjecaj samog centra na preživljavanje transplantata (poluživot transplantata je varirao od 3 do 26 godina, ovisno o centru, a uspješnost preživljavanja od 60 do 90%).

Chertow i sur. (45) su u velikoj studiji (31 515 slučajeva kadaverične transplantacije) uočili da je ishod transplantacije lošiji ukoliko su davatelji starije životne dobi, ženskog spola ili crne rase, uz povećanu tjelesnu površinu u primatelja kao viši faktor rizika. U drugoj analizi (8582 slučajeva transplantacije sa živog donora) ponovno su potvrdili da starija životna dob davatelja i povećana tjelesna površina u primatelja imaju negativan učinak na preživljavanje transplantata. Pored toga ističu rizične čimbenike vezane za primatelja kao što su mlađa dob, crna rasa i PRA (46). Terasaki i sur (348), su ukazali na 5 čimbenika koji negativno utječu na preživljavanje transplantata: transplantacija dječjih bubrega koji potječu od davatelja starosne dobi 4-6 godina, kombinacija ženski davatelj/muški primatelj, javljanje akutnih kriza odbacivanja i kadaverična transplantacija

(naspram živuće). Želeći utvrditi koji su imunološki, tj. neimunološki čimbenici rizika za kasni gubitak funkcije transplantata, Matas i sur. (196) su uočili akutnu krizu odbacivanja kao jedini značajan čimbenik rizika tijekom transplantacije bubrega sa živog donora. U slučaju kadaverične transplantacije rizična je dob davatelja preko 50 godina, te crna rasa primatelja. Massy i sur. su u svom istraživanju pratili utjecaj imunoloških i neimunoloških čimbenika za razvoj kroničnog odbacivanja (193), te nisu uočili značajniji utjecaj dobi i rase davatelja, te indeksa tjelesnih masa primatelja i davatelja. Značajan čimbenik rizika je akutna kriza odbacivanja, povišena razina triglicerida u serumu i proteinuria (193).

Ranije se smatralo da ponovna transplantacija predstavlja veći rizik za preživljavanje i funkciju transplantata. Međutim, studije NIT-a, Eurotransplanta i CTS nisu to pokazale.

Svakako bi trebalo prepoznati važnost neimunoloških čimbenika na dugoročno preživljavanje transplantata (80, 245, 257), budući je njihov štetan utjecaj stalan (316), za razliku od imunoloških čiji negativan učinak lagano opada s vremenom. Tako su Smits i sur. (316) primjetili da je visoka životna dob primatelja konstantno udružena s povećanim rizikom gubitka transplantata, bez obzira na vrijeme proteklo od transplantacije -efekat ovisan o vremenu (time-dependent effect u anglosaksonskoj literaturi). Matas i sur. sugeriraju da u slučaju kadaverične transplantacije i imunološki i neimunološki čimbenici utječu na ishod transplantacije (196). Međutim, ako se radi o transplantaciji bubrega živog donora, značajnu ulogu imaju samo imunološki čimbenici. Tako su Kerr i sur. (141) izvjestili da dob (živućeg) davatelja ne utječe na rezultat transplantacije. Naime u živog davatelja bubreg nije izložen oštećenjima izazvanim hladnom ishemijom kao u slučaju

kadaverične transplantacije. Može se pretpostaviti da je smanjen broj funkcionalnih nefrona u starijoj dobi, ukoliko nisu bili izloženi oštećenjima, dostatan za uspješnu transplantaciju.

## 2.6 IMUNOSUPRESIVNA TERAPIJA U TRANSPLANTACIJI

Prije otkrića ciklosporina (Cs), imunosupresivna terapija u reakciji odbacivanja bila je ograničena na azatioprim i visoke doze steroida ili antilimfocitni globulin (ALG). Pokušalo se i drugim sredstvima unaprijediti preživljavanje transplantata kao npr. zračenjem cijelog tijela, zračenjem krvi primatelja ili zračenjem transplantata, zatim ciklofosamidom, bredininom, splenektomijom, timektomijom, ali to nije dalo željene rezultate (217). Takva, uglavnom nespecifična terapija, nije mogla obuzdati sve imunološke reakcije odbacivanja i gubitak presatka, a morbiditet i mortalitet transplantiranih bolesnika bili su relativno visoki.

Svaki imunosupresivni agens ima tri učinka: imunosupresivni koji je jedini poželjan, te toksični neimuni (nefrotoksični) i toksični imuni (imunološki deficit) što otvara put za infekcije i veću učestalost malignoma. Osnovni koncept imunosupresije sadrži tri faze:

- **indukciju**, koja podrazumijeva «žestoku» imunosupresiju kojom se nastoji odgoditi odbacivanje i omogućiti razvoj adaptacijskih mehanizama između primatelja i presađenog organa;
- **reverziju odbacivanja**, koja podrazumijeva kratkotrajnu primjenu imunosupresije da se spriječi rani imuni odgovor;

- održavajuću imunosupresiju, kojom se želi postići parcijalna inhibicija imunog sustava, a pri tome omogućiti nesmetano djelovanje vlastitih obrambenih mehanizama u primatelja.

### 2.6.1 CIKLOSPORIN

Ciklosporin A (CsA) su izolirali stručnjaci u mikrobiološkom laboratoriju Sandoz Pharme iz Basela, kao protugljivični metabolit, a Borel je 1972.g. otkrio njegov imunosupresivni potencijal (28). Calne ga uvodi u kliničku praksu 1978. godine (41), Od tada je izolirano 25 prirodnih Cs i upoznat je njihov kemijski sastav. Građeni su od 11 aminokiselina, a obično se razlikuju samo po različitom položaju jedne aminokiseline (29). Isto tako, sintetizirano je 750 vrsta njihovih sintetskih analoga, ali se samo neki od njih mogu koristiti u kliničkoj praksi (29). Danas se koristi Sandimmun i Neoral, noviji galenski oblik dobiven tehnologijom mikroemulgiranja. Od prirodnih Cs jako djelovanje *in vivo* imaju CsA, CsC, CsD, CsG i CsM.

Cs pokazuje čitav spektar farmakoloških aktivnosti: suprimira imunološki odgovor posredovan protutijelima ili stanicama, inhibira kronični upalni proces, djeluje antifungicidno i antibakterijski. Izgleda da su limfociti T glavni cilj djelovanja Cs u regulaciji imunoloških zbivanja prilikom transplantacije. Cs prepoznaje specifičnu molekulu na limfocitima T nazvanu ciklofilin (294). Ciklofilin je protein izomeraza koji regulira aktivaciju limfocita T. Nađeno je 4 tipa ciklofilina: A, B, C i D (93) i sa izuzetkom ciklofilina C, nađeni su u svim tkivima i prisutni su u limfocitima T. Samo je C, bar u

miševa, izgleda odsutan u jetri i limfocitima T, a prisutan u bubregu (294). Ciklofilin A, B i C (154, 294) stvaraju kompleks s kalcineurinom u prisutnosti CsA. Smatra se da je kalcineurin, koji je također prisutan u limfocitima T u malim količinama, ciljna molekula na koju se veže kompleks CsA/ciklofilin (ili FK506/makrofilin) i inhibira njegovu aktivnost. Tako npr. terapija CsA rezultira smanjenjem broja aktiviranih limfocita T što se posebno odnosi na aktivirane pomoćničke limfocite koji eksprimiraju CD4 i CD25 površinski antigen (154), dok ne djeluje na supresorske T stanice koji eksprimiraju CD8 i CD25 antigen. No, vidjelo se da učinkovita ciklosporinska terapija ne sprečava infiltraciju transplantata citotoksičnim limfocitima T, već smanjuje učestalost javljanja CD8+ limfocita, koji eksprimiraju perforin i granzim B (331). Vrlo snažno inhibira i proizvodnju IL-2 (25, 154), a snižen je i broj limfoblastoidnih stanica koje eksprimiraju IL-2R (154). Isto tako inhibira ekspresiju FasL i IFN-gamma (331).

Pokusi su pokazali da osjetljivost na CsA u zdravih osoba ovisi o HLA-DR fenotipu na odgovarajućoj limfocitnoj populaciji, a kasnija istraživanja, *in vivo*, su ukazala na moguć utjecaj antigena klase II na individualnu osjetljivost prema CsA (415). CsA i kortikosteroidi snižavaju ekspresiju antigena klase II na bubrežnom transplantatu, što bi vodilo zaključku da je smanjena ekspresija MHC molekula odgovorna za preživljavanje i stabilnu funkciju transplantata u imunosuprimiranih pacijenata (4).

U svakom slučaju, kliničke studije pacijenata sa bubrežnim alotransplantatom koji su pod terapijom CsA, pokazale su znakovit porast u preživljavanju transplantata u usporedbi sa konvencionalnom imunosupresijom (123). Sve više se prednost daje

monoterapiji Cs (177, 212), a vidjelo se da administriranje CsA u jednoj dozi vodi boljoj hemodinamici unutar samog bubrega sa poboljšanjem klirensa kreatinina (177).

CsA pojačava ekspresiju transformirajućeg čimbenika rasta-beta (TGF-beta), koji izaziva apoptozu epitelnih stanica (111) i uzrokuje intenzivnu vazokonstrikciju bubrežne mikrocirkulacije, stvarajući tako uvjet za razvoj intersticijske fibroze. Ovaj toksični učinak Cs može dovesti do kronične bubrežne ishemije i posljedičnog kroničnog odbacivanja, ako potraje duže vrijeme (59, 111). Stoga treba stalno pratiti koncentraciju CsA u serumu i odrediti dozu koja je dovoljno niska da isključuje toksične nuspojave, a koja povoljno utječe na preživljavanje transplantata što je dosta teško postići (135, 137).

## 2.6.2 ANTILIMFOCITNI GLOBULIN

Prvi antilimfocitni serum (ALS) priredio je Metchnikoff koncem prošlog stoljeća (207), a nakon godina eksperimentalnog rada prvi ga je na čovjeku primjenio Starzl (321). Budući da je cilj proizvodnje ALS izdvajanje gotovo čistog IgG otuda i novi naziv antilimfocitni globulin (ALG) (357).

ALG djeluje na limfocite u cirkulaciji uglavnom opsonizacijom, a u većim koncentracijama ima i citotoksični učinak. Dio limfocita je inhibiran jer ALG prekriva receptore za prepoznavanje antigena (210). Djeluje uglavnom na smanjenje broja limfocita T što se reflektira u slabljenju staničnog imuniteta (248), dok na proizvodnju protutijela ima znatno manji učinak (248).

U tijeku liječenja ALG opisane su trombopenije, trombocitoze, leukopenije i anemije, kao posljedica destrukcija tih stanica protutijelima iz ALG (210, 361). Zbog toga se vrše svakodnevne kontrole leukocita i trombocita u tih pacijenata. Mogući je i razvoj alergijskih reakcija kao što su urtikarija, hipotenzija, anafilatički šok i serumska bolest, što se liječi kortikosteroidima (322). Nefrotoksičnost u ljudi nije primjećena.

Djelovanje ALG se očituje u rjeđem i kasnijem javljanju krize, kao i slabijem intenzitetu odbacivanja (322, 360), ali se zbog svojih popratnih djelovanja i relativne nespecifičnosti danas sve manje koristi.

### 2.6.3 KORTIKOSTEROIDI

Kortikosteroidi su najčešće korišteni imunosupresivni lijekovi jer osim u transplantiranih bolesnika, služe i u liječenju stanja čiju pozadinu čini imunološki proces. U transplantaciju bubrega kortikosteroidi su uvedeni zbog smirivanja krize odbacivanja (91), a nakon toga počinje njihova široka primjena u okviru poslijetransplantacijske imunosupresivne terapije (19). Oni utječu na smanjenje celularnog i humoralnog odgovora. Vežu se za citoplazmatske receptore limfocita (21), a svojim utjecajem na RNA mijenjaju sintezu proteina. Smanjuju citotoksičnost limfocita. Djeluju na limfocite T u stanju mirovanja, tj. kad nisu uključeni u imuni odgovor, dok se osjetljivost aktivnih limfocita prema kortikosteroidima znakovito povećava (327). Kortikosteroidi isto tako imaju i vrlo snažan protuupalni učinak, djeluju na aferentni i eferentni luk imunološke reakcije (248).

Glukokortikoidi inhibiraju proliferaciju limfocita T induciranu antigenima i mitogenima i zaustavljaju proizvodnju IL-2, a izgleda i IL-1 (25). Utvrđeno je da inhibiraju nuklearni čimbenik kapa/beta (NF kapa/beta), zapravo transkripcijski čimbenik važan u regulaciji indukcije gena za kodiranje IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8 i interferona gamma (59, 111). Pri tome je važna blokada ekspresije gena za IL-1 (poznati endogeni pirogen) i IL-6 kao kostimulatora ekspresije IL-2. Upravo zbog inhibicijskih učinaka na proizvodnju citokina, primjena kratkotrajne kortikosteroidne terapije u visokim tzv. "pulsnim dozama" predstavlja svrsishodnu terapiju odbacivanja (13, 288).

Na limfocite B kortikosteroidi ne utječu značajno, osim u vrijeme transformacije u plazma stanice koje proizvode protutijela (408). Moglo bi se pretpostaviti da je proizvodnja protutijela manja i zbog smanjene sinteze proteina uopće (321).

#### **2.6.4 MONOKLONSKA PROTUTIJELA**

Razvojem tehnike hibridoma dobiven je Orthoclone OKT3. Primjenom njegovih produkata u kliničku praksu počinje era monoklonskih protutijela (88, 53). OKT3 monoklonsko protutijelo djeluje protiv CD3 molekularnog kompleksa, receptora prisutnog na limfocitima T (TCR/CD3), potrebnog za prepoznavanje aloantigena i prijenos signala u stanicu. Na taj način dolazi do blokade izvršne funkcije limfocita T u reakcijama odbacivanja, te oni ne mogu prepoznati tuđe antigene prisutne na transplantatu (88). Toksički učinci su najčešće posljedica oslobađanja citokina iz raspadnutih limfocita pa se govori o "sindromu oslobađanja citokina" (59). Unatoč tome, OKT3 se koristi u profilaksi i



terapiji akutnog odbacivanja kao i u slučajevima rezistentcije na kortikosteroidnu terapiju (88, 111, 384).

Napredak biotehnologije omogućio je proizvodnju novih monoklonskih protutijela (59, 169, 221). Neka su uperena protiv specifičnih epitopa i/ili adhezijskih molekula (ICAM-1, ICAM-2). Druga djeluju protiv receptora na limfocitima T (TCR-CD3, CD4), protiv receptora za IL-2 na aktivnim limfocitima T, limfocitima B i monocitima (221).

Zadnjih nekoliko godina se genetskim inženjeringom nastoje proizvesti tzv. humanizirana monoklonska protutijela, kako bi se izbjegle nuspojave (59). Javljaju se novi imunosupresivi "treće generacije". Neki su još u eksperimentalnoj fazi (sirolimus), drugi se zbog svojih nedostataka napuštaju (CsG), a treći su već uvedeni u kliničku praksu (tacrolimus FK506, rapamicin) (111).

**Tacrolimus ili FK506** je makrolidni antibiotik. Mehanizam djelovanja je sličan ciklosporinskom samo što deset puta jače inhibira sintezu citokina. Primjenjuje se u transplantaciji jetre, a najčešće u terapiji tvrdokornih odbacivanja. U području transplantacije bubrega još su u tijeku prospektivna multicentrična istraživanja (59).

**Mikofenolat-Mofetil** je izoliran iz nekih vrsta *Penicilliuma*, a budući da djeluje na metabolizam purina, u nekim je protokolima istisnuo azatioprim. Ima selektivni antiproliferativni učinak na limfocite T i B, ne utječući pri tom na proizvodnju citokina. Danas se primjenjuje u kombinaciji s CsA u prevenciji i terapiji tvrdokornih odbacivanja, te u sprječavanju progresivne arteriolopatije, osnovne patološke značajke kroničnog odbacivanja (59).

## 2.6.5 INDUKCIJA TOLERANCIJE NA ALOANTIGEN

Opelz je sa suradnicima, još 1973.g., uočio značajno veće preživljavanje presatka u uremičnih bolesnika koji su prije transplantacije bubrega s umrle osobe primali transfuzije krvi (239, 240). Kasnije retrospektivne studije nisu potvrdile zaštitno djelovanje transfuzija krvi na transplantat, pa se ta strategija sve rjeđe primjenjuje, naročito nakon uvođenja Cs. Unatoč tome, Opelz je sa sur. u prospektivnoj randomiziranoj studiji, ponovno uspio dokazati povoljan učinak transfuzija krvi u prijetransplantacijskom razdoblju (244). Opelz je također pokazao da je velik broj transfuzija krvi prije transplantacije udružen sa povišenom razinom TNF-alfa i IFN-gamma u serumu, što ukazuje na aktivaciju T-limfocitnog/monocitnog sistema putem transfuzija (386). Isto tako se vidjelo da primjena infuzije donor-specifične koštane srži u kombinaciji s kratkotrajnom nespecifičnom imunosupresijom (poliklonskim protutijelima) pogoduje "preživljavanju" transplantata, bez standardne imunosupresije (59). Smatra se da su za to odgovorni mali limfociti tzv. veto stanice iz koštane srži, koji izazivaju toleranciju na antigen.

Mehanizam imunomodulacije i tolerancije u ova dva modaliteta nije još potpuno razjašnjen. Pretpostavlja se da oni stimuliraju stvaranje protu-HLA protutijela, aktivaciju supresorskih i/ili veto stanica, klonsku deleciju, regulaciju molekula na staničnoj membrani, regulaciju citokina, stvaranje miješanog kimerizma ili kombinaciju svih tih čimbenika (32).

## 2.6.6 PROTOKOLI IMUNOSUPRESIVNE TERAPIJE

Postoji više mogućnosti kombiniranja imunosupresivnih lijekova. U Evropskoj multicentričnoj studiji korišten je samo Cs u visokom dozama (217), te je uočeno da je unaprijeđeno preživljavanje transplantata, ali je oslabljena bubrežna funkcija. U cilju poboljšanja rezultata terapije, Cs su dodani steroidi u niskim dozama, no svejedno nije uočen veći napredak u odnosu na monoterapiju Cs. Dapače, bolesnici sa steroidima u terapiji razvili su različite infekcije, kataraktu, kardiovaskularne komplikacije i arterijsku hipertenziju mnogo češće nego oni koji su dobivali Cs (15). Samo je jedna studija pokazala da se, možda, uvođenjem steroida smanjuje stupanj nefrotoksičnosti (217). Cilj monoterapije ciklosporinom je izbjeći metaboličke i ostale komplikacija koje prate kortikosteroidnu terapiju, te štetne nuspojave dugotrajne terapije ostaim imunosupresivima. Salaman je u svom istraživanju ukazao da je pri monoterapiji Cs bilo više epizoda akutnog odbacivanja nego li pri terapiji Cs i azatioprimom (217). Međutim, novija istraživanja su pokazala da u bolesnika s niskim imunološkim rizikom (PRA<25%, bez krize odbacivanja prije uvođenja ciklosporina), stabilnom funkcijom transplantata (nivo kreatinina u serumu prije uvođenja ciklosporina <125mikromola/L), glomerulopatijom kao primarnom bolesti koja je dovela do KRI i dobi davatelja<40 godina, monoterapija ciklosporinom osigurava dugotrajno preživljavanje transplantata (177). Možda bi se «niskorizičnim» bolesnicima, sa stabilnom funkcijom transplantata, mogao ukinuti prednizon i azatioprim, da se izbjegnu komplikacije vezane za ove lijekove, a bez štetnog učinka na preživljavanje presatka(177).

Neko vrijeme je bila popularna tzv. trostruka terapija: Cs, azatioprim i steroidi. Činilo se da pacijenti pod tom terapijom ne ulaze često u krizu odbacivanja, iako s obzirom na vijek preživljavanja transplantata nema većih prednosti pred monoterapijom niskim dozama Cs (217, 177). U posljednje vrijeme nastoji se izbjeći primjena steroida zbog niza štetnih nuspojava i ograničiti samo na krizu odbacivanja.

Uvođenje ALG u trostruku terapiju provela je grupa iz Minneapolisa i rezultati su bili odlični (217). Štoviše, oni u slučaju zastoja rada bubrega nisu uvodili Cs sve dok se stanje nije normaliziralo, što je značajno skratilo trajanje akutne tubularne nekroze. Neke su grupe koristile tzv. sekvencijalnu terapiju, gdje je primjenjen ALG zajedno sa prednizonom i azatioprimom. Ukoliko je bubrežna funkcija bila zadovoljavajuća ALG je zamjenjen sa Cs (217).

U Francuskoj se pokušalo umjesto ALG koristiti OKT3 monoklonsko protutijelo, međutim uočene su učestalije infekcije i pojava smrtnosti, iako je bilo manje kriza odbacivanja (217).

Protokol konverzivne terapije uvele su grupe iz Oxforda, Australije i Holandije. Oni su Cs, koji se koristi mjesecima nakon transplantacije, zamjenili azatioprimom i prednizonom. Rezultati su bili dobri jer je obustavom Cs naglo poboljšana bubrežna funkcija, a i preživljavanje transplantata je bilo zadovoljavajuće. Ipak, u prvom mjesecu nakon konverzije postojalo je 30% šanse da dođe do akutnog odbacivanja (217).

Sigurno je da do danas, s obzirom na provedena istraživanja i dostupne podatke, ne možemo sa sigurnošću tvrditi, koji je tip terapije najbolji za pacijenta. Protokoli koji uključuju nove imunosupresive, kao što su FK506, mikofenolat-mofetil, rapamicin i

humanizirana monoklonska protutijela nisu potpuna zapreka imunom odgovoru primatelja na presadak (59).

U svakom slučaju možemo biti sigurni da će uspješna imunosupresivna terapija u transplantaciji i dalje uključivati Cs. Najveća privlačnost terapije Cs, bilo samostalno ili u kombinaciji s drugim lijekovima je ta što steroidi najčešće nisu potrebni (59, 217). Svakako treba analizirati i pratiti prednosti i nedostatke ovih lijekova i njihovih kombinacija da bi se što uspješnije utjecalo na preživljavanje transplantata uz minimum štetnih posljedica po transplantat i primatelja u cjelini. Uz to treba spomenuti mogućnost moduliranja imunoreaktivnosti i/ili izazivanja antigen specifične tolerancije kao moguće rješenje.

## 2.7 TOLERANCIJA NA PRESADAK

Jedan od ciljeva kliničke transplantacije je svakako izazivanje specifične tolerancije, što bi rezultiralo dugogodišnjim preživljavanjem presatka. Pod pojmom tolerancija, podrazumijeva se nereaktivnost imunog sustava prema vlastitim ili stranim antigenima. Tolerancija na presadak se može postići putem nekoliko mehanizama, uključujući djelovanje supresorskih stanica, indukciju anergije ("zanemarivanje", tj. termin *ignorance* angloameričkih autora) ili deleciju davateljevih limfocita reaktivnih na antigene transplantata (10, 132). Poznato je da su neka tkiva, kao rožnica i testikularno tkivo povlaštena u imunološkom pogledu, tj. prihvaćena su. Prethodno izlaganje primateljevih limfocita T bubrežnim epitelnim stanicama koje ekspimiraju MHC klase II u mišjem eksperimentalnom modelu, dovodi do specifične anergije (30). Smatra se da migracija stanica, repopulacija i kimerizam povoljno utječu na preživljavanje presatka, naročito jetre i srca, a nešto rjeđe bubrega (323, 324, 325) i vode stečenoj donor specifičnoj toleranciji. Uočeno je da postoji pozitivna korelacija između perifernog mikrokimerizma (migratorni leukociti davatelja u perifernoj krvi transplantiranog bolesnika) i prihvaćanja presatka, tj. postojanja tolerancije, uz odsutnost odgovora u testu MLR (329). Da bi se povećala tolerancija u transplantaciji bubrega, gdje je migratorna sposobnost leukocita vrlo mala, jedna od terapijskih mogućnosti je perioperativna infuzija limforetikularnih stanica koštane srži donora (20, 32, 211, 350). Migratorne stanice mogle bi biti dendritičke stanice, ranije poznate kao "passenger" leukociti ili leukociti putnici (325). Za praćenje imunološkog odgovora domaćina, mogao bi se koristiti test miješane limfocitne kulture (MLR) i test

limfocitotoksičnosti posredovane stanicama (CML), ne samo neposredno prije transplantacije, već i u poslijetransplantacijskom razdoblju. Neki pretpostavljaju da bi se njihovim praćenjem mogla reducirati ili čak i ukinuti terapija steroidima ili CsA, te tako izbjeći morbiditet izazvan imunosupresivima (323, 329).

Nedavno definirana interakcija između receptora CD28/CTLA4 na limfocitima T i odgovarajućeg liganda B7.1 (CD80) i B7.2 (CD86) na APS, predstavljena je kao drugi signal neophodan za aktivaciju limfocita T (220). Blokodom te interakcije pomoću protu-B7 protutijela ili CTLA4-Ig fuzijskog proteina, spriječila bi se aktivacija limfocita T i izazvala tolerancija tj. anergija. Taj se mehanizam pokazao djelotvornim u eksperimentalnim modelima transplantacije srca, bubrega, tkiva gušterače i mioblasta (97, 160, 172, 394). Također se vidjelo da blokada samo liganda CD86 sa anti-CD86 protutijelom neposredno prije transplantacije vodi višegodišnjem preživljavanju transplantata (130).

U drugim slučajevima tolerancija nije posredovana anergijom, nego promjenom ravnoteže pomoćničkih limfocita Th1 i Th2. Tako neki imunosupresivni protokoli uključivši CTLA4-Ig, rapamycin, donor-specifične transfuzije krvi i protu-CD4 protutijela, te ciklosporin inhibiraju djelovanje Th1 klona i njihovih citokina, favorizirajući tako Th2 klon, koji proizvodi IL-4 i IL-10, posredujući u dugogodišnjem preživljavanju i razvoju tolerancije na presadak (130, 170, 386).

Iz svega navedenog, vidljivo je da je problem preživljavanja presatka vrlo složen i da se ne može ograničiti na samo jedan ili dva čimbenika. Timovi stručnjaka diljem svijeta svakodnevno stječu nove spoznaje iz imunologije, molekularne biologije, eksperimentalne i kliničke transplantacije. Poznavanje zbivanja na celularnoj i molekularnoj razini tijekom odbacivanja alotransplantata nisu samo od temeljnog znanstvenog interesa već imaju i ključno kliničko značenje. Suvremene spoznaje iz ovog područja mogu nam pomoći u odabiru strategije i pristupa za potiskivanje imunološke reakcije odbacivanja transplantata i tako otvoriti put za još uspješnije razdoblje kliničke transplantacije. Ukoliko se uzme u obzir da je od prve uspješne transplantacije (1954.g.) do danas učinjen golem napredak, ostaje nam nada da će i ovaj problem biti riješen već početkom novog milenija.



### **3 ISPITANICI I METODE**

#### **3.1 ISPITANICI**

U prospektivnim istraživanjima su obuhvaćeni bolesnici Odjela za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju KBC Rijeka, koji toleriraju presađeni bubreg preko dvije godine. Prilikom ispitivanja imunoloških čimbenika uzimali smo uzorak venske krvi iz kubitalne vene. Drugu grupu čine bolesnici koji se redovno hemodijaliziraju kroz više godina. Kontrolnu skupinu predstavljaju zdravi muškarci i zdrave negravidne žene.

Retrospektivna analiza obuhvaća 226 bolesnika (od 8 do 72 godine), kojima je transplantiran bubreg u razdoblju od 1985. do 1999.g.

#### **3.2 METODE**

##### **3.2.1 ISPITIVANJE NEIMUNOLOŠKIH ČIMBENIKA**

U analizi preživljavanja korištene su životne tablice (Life table), s razdiobom frekvencija prema vremenima preživljavanja kategoriziranim u određen broj vremenskih intervala, te Kaplan-Meierova metoda (55, 306). Uspoređivanje preživljavanja između uzoraka rađeno je neparametrijskim testovima: Gehanovim generaliziranim Wilcoxon testom, odnosno Coxovim F-testom (55, 306).

### 3.2.2 ISPITIVANJE IMUNOLOŠKIH ČIMBENIKA

#### 3.2.2.1 Kemikalije

Ethylenediaminetetraacetat-Na<sub>2</sub>-salt (EDTA), Merck 2931

Fetal calf serum (FCS), Gibco 011-0629OM

Lymphoprep

Gentamycin sulfat, Serva 22345

L-Glutamin, Merck 289

Hepes, Serva 25245

Kalcij-klorid, CaCl<sub>2</sub>, Kemika

Kalij-dihidrogenfosfat, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Kemika

Kalijev-klorid, KCl, Kemika

Magnezijev-klorid-6-hidrat, MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, Kemika

Merkaptoethanol, Merc 805740

Natrij azid, NaN<sub>3</sub>, Difco 0601-13

Natrijev-dihidrogenfosfat-2-hidrat, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, Kemika

Natrij-hidroksid, NaOH, Kemika

Natrij-klorid, NaCl, Kemika

Paraformaldehid, Kemika

Pencillin, Grunenthal, Stolberg, 113944

Propidium iodide, Serva 33671

Saponin, Sigma, S-1252

Streptomycin sulfat, Merck 10117

Tripansko modriilo (Tripa blue), Serva 37252

Turk, Serva

### 3.2.2.2 Mediji i puferi

#### 1. Kompletan RPMI 1640, medij za kulturu stanica

Medij RPMI 1640 1l, L-glutamin 2 mM, 2-Merkaptoetanol  $5 \times 10^{-5}$  hepes (ph 7,2) 10 mM, Penicillin  $1 \times 10^3$  U/l, Streptomycin sulfat 0,1 g/l Gentamycin sulfat 0,05 g/l, Fetalni goveđi serum (FCS) 5-10%.

#### 2. PBS (puferirana fiziološka otopina)

Natrij klorid (NaCl) 140 mM, Kalij klorid (KCl) 2,7 mM, Natrij hidrogenfosfat-2-hidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) 6,5 mM, Kalij dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 1,5 mM, Kalcij klorid ( $\text{CaCl}_2$ ) 0,7 mM, Magnezij klorid-6-hidrat ( $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) 0,7 mM.

#### 3. Medij za protočni citometar (FACS medij)

PBS 1L, EDTA 10 mM, Herpes (ph 7,2) 20 mM, Fetalni goveđi serum 2%, Natrij azid ( $\text{NaN}_3$ ) 0,1%.

#### 4. Saponinski pufer (za permeabilizaciju staničnih membrana)

PBS, 0.1% saponin, 2% fetalnog goveđeg seruma, 1mM EDTA.

#### 5. 4% paraformaldehid (ph 7,4), za fiksaciju staničnih membrana

Paraformaldehid 40 g/l, Natrij hidrogenfosfat-2-hidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) 16,83 g/l, Natrij hidroksid (NaOH) 3,85 g/l, Glukoza 5,4 g/l.

#### 6. Citokini

Interleukin-2 (IL-2), Sigma; Interleukin-15 (IL-15), R&D Comp.

#### 7. Concavalin A

Poliklonski mitogenik

#### 8. Protutijela – Tablica 1

PROTUTIJELO	PROIZVOĐAČ	SPECIFIČNOST
Serum Balb/c miša Razrujeđen 1:1000	Laboratorij Zavoda za fiziologiju i imunologiju, Med.fakultet, Rijeka	Kontrola za površinske biljege
IgG2b	Laboratorij Zavoda za fiziologiju i imunologiju, Med.fakultet, Rijeka	Supernatant, kontrola za perforin
Monoklonsko mišje protuhumano protuperforinsko protutijelo, IgG2b	Donacija prof.dr.E.Podacka, Laboratorij za mikrobiologiju i imunologiju, Sveučilište u Miamiju, Florida	Perforin
Monoklonsko mišje protuhumano protu-CD8 protutijelo konjugirano fikoeritriinom	Beckton-Dickinson, USA	Limfociti T
Monoklonsko mišje protuhumano protu-CD56 protutijelo konjugirano fikoeritriinom	Beckton-Dickinson, USA	NK stanice

### 3.2.2.3 Laboratorijsko plastično posuđe

Pasteurova pipeta, Kartell

Plastične kušalice za protočni citometar (12x70mm, Falcon)

Plastične petrijeve zdjelice (100x20mm, Tissue culture grade quality, Grainer)

Plastični nastavci za pipete (0-1000 mikrolitara, Kartell)

Plastične ploče za kulturu tkiva sa 6 rupica (Tissue culture grade quality, Grainer)

## 3.3 LABORATORIJSKE METODE

### 3.3.1 DOBIVANJE SUSPENZIJE LIMFOCITA PERIFERNE KRVI (LPK)

Uzorak krvi (10 kubika) uziman je od transplantiranih i dijaliziranih bolesnika smještenih na Odjelu za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju KBC Rijeka, iz kubitalne vene, u staklene epruvete sa 0,5 ml heparina, da bi se spriječilo zgrušavanje.

Odmah po uzimanju uzorak je dopremljen na Zavod za fiziologiju i imunologiju. Svi dalji postupci vršeni su u sterilnim uvjetima, u komori sa laminarnim protokom zraka.

Uzorak periferne krvi naslojen je na gradijentu gustoće i centrifugiran kroz 20 minuta na 800 x g. Prsten mononuklearnih stanica naslojenih na Lymphoprepu, pažljivo je pokupljen i ispran dva puta u RPMI 1640, a zatim resuspendiran u RPMI mediju za kulturu stanica. Broj stanica određen je pomoću Turkove otopine, a vijabilnost stanica određena pomoću tripanskog modrila i uvijek je bila 98% - 100%.

### **3.3.2 ODREĐIVANJE STANIČNIH BILJEGA PROTOČNOM CITOMETRIJOM**

Tijekom postupaka pripreme stanica za protočnu citometriju uzorak od  $1 \times 10^6$  LPK stavljen je u plastične epruvete s okruglim dnom (Falcon).

S obzirom da smo željeli odrediti fenotip perforin pozitivnih stanica, morali smo istovremeno obilježiti perforin kao unutarstanični biljeg i površinske CD8 i CD56 biljege na istim stanicama. Da bismo obilježili perforin morali smo staničnu membranu prethodno fiksirati i permeabilizirati, a zatim ponovno zatvoriti radi obilježavanja površinskih CD8 i CD56 biljega.

### **3.3.3 FIKSACIJA I PERMEABILIZACIJA STANIČNE MEMBRANE**

Staničnu membranu smo fiksirali 4% otopinom Paraformaldehida (podešenoj koncentraciji stanica od  $1 \times 10^6/100$  ul, dodano je 100 ml 4% otopine Paraformaldehida radi stabilizacije stanične membrane i inkubirano 10 minuta na sobnoj temperaturi). Potom smo stanice isprali dva puta u mediju za protočni citometar i resuspendirali u 100 mikrolitara 0,1% saponinskog pufera, te inkubirali 20 minuta na sobnoj temperaturi. Treba napomenuti da se za svaki uzorak permeabiliziranih stanica, za kontrolu permeabilizacije, uzima uzorak netretiranih stanica (Paraformaldehydom i saponinskim puferom).

### **3.3.4 OBILJEŽAVANJE PERFORINA METODOM INDIRECTNE IMUNOFLUORESCENCIJE**

Nakon inkubacije od 20 minuta na sobnoj temperaturi, mišja protuhumana protuperforinska protutijela smo dodali direktno u suspenziju LPK u saponinskom puferu i inkubirali 30 minuta na +4°C. Nakon toga uzorke smo dva puta isprali u saponinskom puferu, da bismo otklonili nevezana primarna protutijela. Potom smo dodali sekundarno protutijelo GAM-FITC (od engleskog Goat-anti-mouse), obilježeno fluorescentnom bojom fluorescein-izo-tio-cijanatom (FITC), 1 mikrogram po uzorku, razrijeđeno u 100 mikrolitara saponinskog pufera, ponovno inkubirali 30 minuta na +4°C, te isprali dva puta u saponinskom puferu. Na talog smo stavili 0,5 ml medija za protočni citometar, kojem je zadatak zatvoriti saponinom permeabiliziranu staničnu membranu, te inkubirali 5 minuta.

### **3.3.5 OBILJEŽAVANJE POVRŠINSKIH BILJEGA METODOM DIREKTNE IMUNOFLUORESCENCIJE**

Iz istih uzoraka LPK, centrifugiranjem smo odstranili supernatant, a na talog dodali primarno protu-CD8 ili protu-CD56 protutijelo, direktno konjugirano sa fikoeritriinom (PE), 1 mikrogram po uzorku razrijeđen u 100 mikrograma medija za protočni citometar. Uzorak smo inkubirali 30 minuta na +4°C, te isprali dva puta u mediju za protočni citometar. Na dobiveni talog smo dodali 0,5 mililitara medija za protočni citometar. Tako pripremljeni uzorci bili su spremni za uzimanje u protočni citometar.

### 3.3.6 TESTOVI STIMULACIJE

Mononuklearne stanice periferne krvi zdravih osoba, te transplantiranih i dijaliziranih bolesnika, u koncentraciji od  $1 \times 10^6$  stanica/ml RPMI medija za kulturu stanica, kultivirali smo tijekom 6 ili 24 sata u sterilnim uvjetima, na  $37^\circ\text{C}$  i u atmosferi s 5%  $\text{CO}_2$ :

- same, tj. samo stanice resuspendirane u mediju,
- uz dodatak IL-2 u koncentraciji 100i.j./ml.

Iste LPK transplantiranih i dijaliziranih bolesnika kultivirali smo tijekom 72 sata u sterilnim uvjetima, na  $37^\circ\text{C}$  i u atmosferi s 5%  $\text{CO}_2$  s IL-2, IL-15 i Concavalinom A.

Iz suspenzije stanica pokupili smo LPK kao neadherentnu staničnu populaciju, koju smo koristili za određivanje staničnih biljega protočnom citometrijom.

### 3.3.7 PRIPREMA LIMFOCITA PERIFERNE KRVI ZA NK TEST CITOTOKSIČNOSTI

Limfocite periferne krvi transplantiranih i dijaliziranih bolesnika kultivirali smo tijekom 24 sata samo u mediju za kulturu stanica ili u prisustvu IL-2 (100i.j./ml). Citolitičku aktivnost tako pripremljenih LPK određivali smo dvosatnim PKH-26 (red) testom citotoksičnosti, uz očitavanje protočnim citometrom. Kao ciljne stanice koristili smo NK osjetljivu K562 staničnu liniju eritroleukemije u različitim omjerima izvršnih i ciljnih stanica (6:1, 12,5:1, 25:1, 50:1).



### **3.3.8 ODREĐIVANJE PERFORINA U TESTU CITOTOKSIČNOSTI**

Limfocitima periferne krvi intracelularno je određivana koncentracija perforina neposredno prije ulaska u test citotoksičnosti i 2 sata nakon izlaganja K562 staničnoj liniji u omjeru 50:1.

### **3.3.9 TEST CITOTOKSIČNOSTI UZ OČITAVANJE PROTOČNIM CITOMETROM**

Funkcionalni NK stanični test citotoksičnosti izveli smo sa PKH-26 crveno obojenim K562 ciljnim stanicama, prateći upute proizvođača (Sigma, BioSciences, St.Luis, Mo; PKH-26 Red Fluorescent Cell Kit). Ciljne stanice K562 obojili smo PKH-26 lipofilnom bojom koja se veže na staničnu membranu i fluorescira narančasto-crveno. Tako obojene K562 stanice smo inkubirali s limfocitima periferne krvi transplantiranihi dijaliziranih bolesnika (nestimuliranim ili stimuliranim s IL-2 ) u različitom omjeru od 6:1 do 50:1, tijekom 2 sata, na 37°C i 5%CO<sub>2</sub>.

U polipropilenske epruvete smo stavljali stanice i medij slijedećim redoslijedom:

Epruvete	Medij (RPMI 10%FCS)	Limfociti periferne krvi ( $5 \times 10^6$ /ml)	K562 ( $2,5 \times 10^6$ )
1	100 mikrolitara	100 mikrolitara	
2	100 mikrolitara	/	100 mikrolitara
3	/	100 mikrolitara	100 mikrolitara
4	50 mikrolitara	50 mikrolitara	100 mikrolitara
5	75 mikrolitara	25 mikrolitara	100 mikrolitara
6	88 mikrolitara	12 mikrolitara	100 mikrolitara

Po isteku vremena inkubacije, ovako pripremljene stanice smo isprali u mediju za protočni citometar, te na dobiveni talog dodali 300 mikrolitara medija za protočni citometar i 200 mikrolitara Propidium jodida (u koncentraciji od 10 mikrograma/ml). Postotak ubijenih K562 stanica mjerili smo protočnim citometrom.

U citotoksičnom testu promatrali smo citotoksični učinak NK stanica periferne krvi na ciljne stanice (K562).

#### Normalne vrijednosti NK citotoksičnosti za odrasle osobe:

Omjer stanica	Normalne vrijednosti % mrtvih stanica
50:1	10-40%
25:1	5-30%
12,5:1	3-20%

### 3.3.10 PROTOČNA CITOMETRIJA

Protočnom citometrijom smo analizirali promjene u broju perforin pozitivnih stanica, te dvostruko pozitivnih stanica na perforin i na CD8 i CD56 površinski biljeg. Koristili smo Lysis program (Becton-Dickinson) protočnog citometra uz standardne parametre za FCS (parametar veličine stanice), SSC (parametar složenosti stanice), FL1 (intenzitet zelene fluorescencije), FL2 (intenzitet narančaste fluorescencije) i FL3 (intenzitet crvene fluorescencije).

U testu citotoksičnosti ciljne stanice su obojane lipofilnom narančastom bojom (PKH-26), te se detektiraju u FL2 fluorescenciji, dok efektorske stanice nisu obojane. Propidij jodid ulazi u mrtve stanice i boji ih crveno, te su one vidljive u FL3 fluorescenciji.

Budući da su ciljne stanice obojane narančasto i da su neke od njih mrtve, postotak mrtvih stanica očitamo kao vrijednost dvostruko obojanih stanica (FL2 i FL3 pozitivne).

### 3.3.11 STATISTIČKA OBRADA I PRIKAZIVANJE REZULTATA

Statistička obrada je izvršena pomoću standardnog kompjuterskog programa za t-test (student t-test za nezavisne uzorke). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost uz naznačenu standardnu devijaciju i statističku značajnost. Korišteni su slijedeći kompjuterski programi za prikazivanje rezultata: Sygma plot 40, Power Point i Microsoft Word. Druge statističke metode, za analizu utjecaja neimunoloških čimbenika, opisane su pod 3.2.1.

## 4 REZULTATI

### 4.1 REZULTATI RETROSPEKTIVNE ANALIZE NEIMUNOLOŠKIH ČIMBENIKA

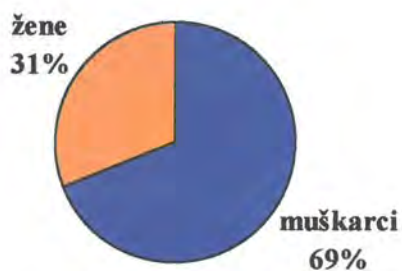
Analizirana je populacija od 226 bolesnika kojima je u KBC Rijeka transplantiran bubreg u razdoblju od 1985. do 1999. godine. Iz analize su isključeni bolesnici koji su tijekom ovih 10-tak godina (zbog raspada bivše Jugoslavije) prestali dolaziti na kontrole, te je izgubljen uvid u njihovo kliničko stanje. Kao uvjet za presađivanje uzeta je podudarnost u ABO krvnogrupnom sustavu, uz što je moguće bolju podudarnost u HLA sustavu (najprije DR, zatim B i na kraju A). U svih je bolesnika primjenjen isti imunosupresivni protokol na početku transplantacije (preoperativno azatioprim u dozi 3mg/kg, intraoperativno 0,5-1g metilprednizolona, postoperativno azatioprim u dozi 3mg/kg, kortikosteroidi 0,3mg/kg, antilimfocitni globulin 2mg/kg kroz 1-3 tjedna i CsA 2-3mg/kg kad je uspostavljena bubrežna funkcija tj. kreatinin manji od 300mikromola/l, s postepenim povećanjem na 5-6mg/kg ovisno o koncentraciji CsA u krvi). U kasnijem tijeku se imunosupresivni protokol mijenjao, prema komplikacijama.

Budući da se čimbenici koji utječu na ishod transplantacije mogu podijeliti u tri grupe, ovisno da li su vezani za primatelja organa, davatelja ili sam transplantirani organ, mi smo na taj način i izvršili ovu analizu.

#### 4.1.1 OPIS UZORKA PRIMATELJA BUBREGA

##### 4.1.1.1 Raspodjela transplantiranih bolesnika u uzorku prema spolu

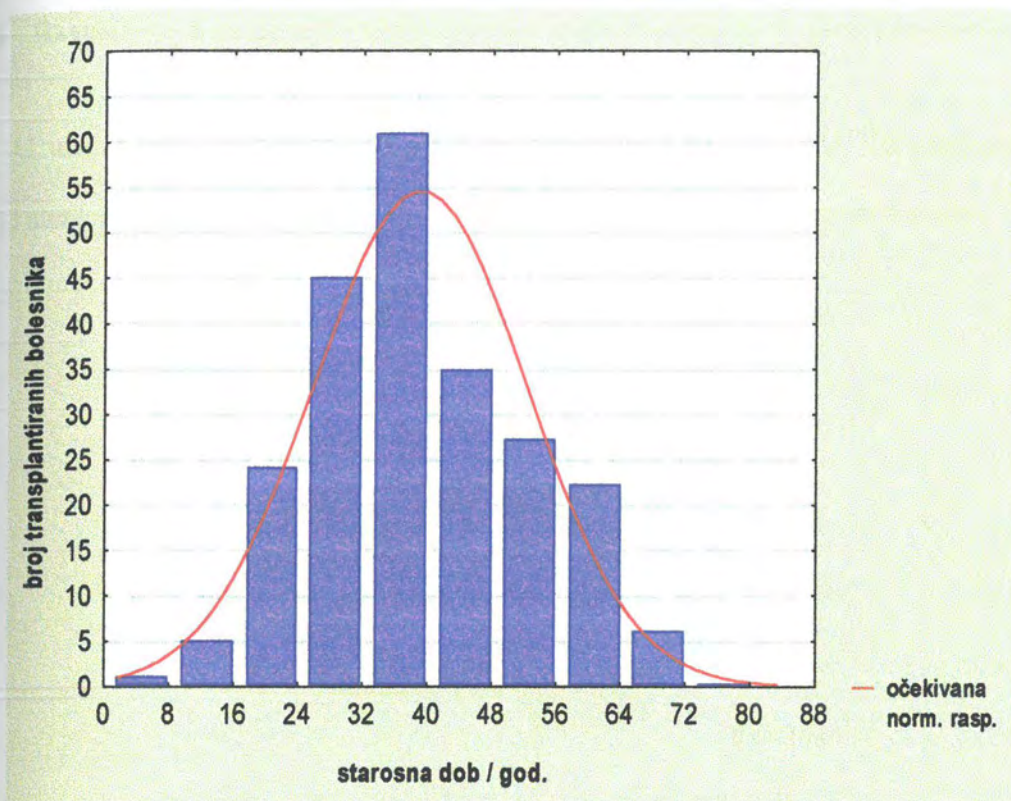
Od 226 primatelja bubrežnog transplantata 70 čine žene (31,0%), a 156 muškarci (69%) (slika 2).



Slika 2. Zastupljenost transplantiranih bolesnika u uzorku prema spolu

##### 4.1.1.2 Raspodjela transplantiranih bolesnika u uzorku prema starosnoj dobi

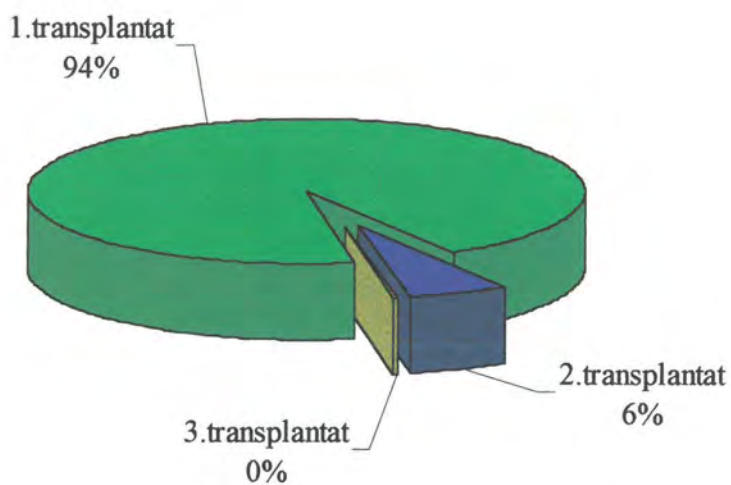
Starosna dob bolesnika se kretala od 8 do 72 godine, s prosjekom od 39 godina i standardnom devijacijom od 13 godina (slika 3). Dobna struktura bolesnika se ne razlikuje statistički značajno prema spolu; naime za žene srednja starosna dob iznosi 38,9 +/- 14,5 ; a za muškarce 39,1 +/- 12,6 godina.



Slika 3. Raspodjela bolesnika u uzorku s obzirom na starosnu dob

#### 4.1.1.3 Raspodjela transplantiranih bolesnika u uzorku prema broju transplantacija

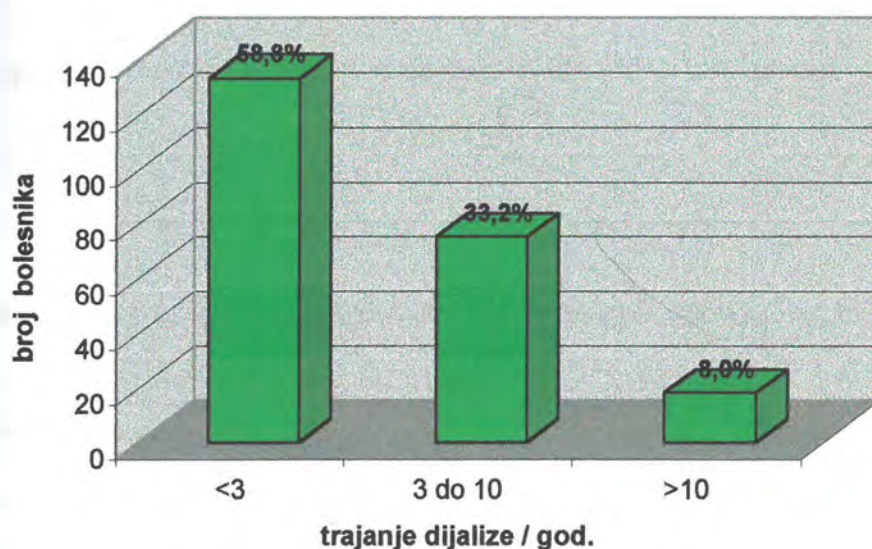
U analizi je obuhvaćeno 212 primarnih transplantacija (93,8%), 13 sekundarnih (5,8%) i samo jedan bolesnik kojemu je treći put transplantiran bubrež (0,4%) (slika 4).



Slika 4. Zastupljenost bolesnika u uzorku s obzirom na broj transplantacija bubrega kojima su podvrgnuti

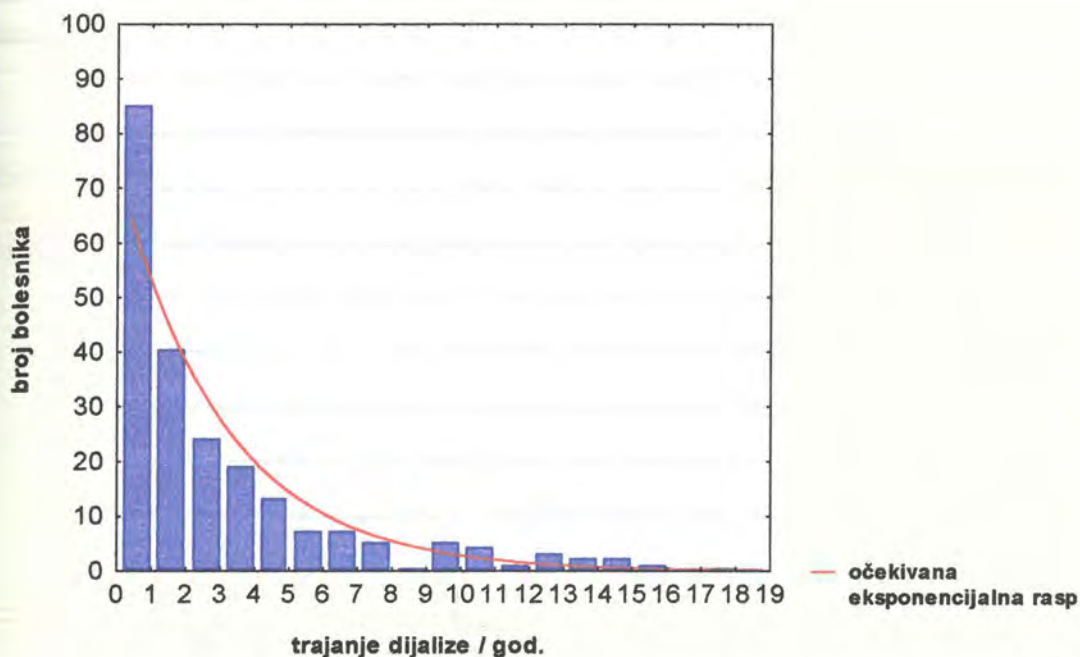
#### 4.1.1.4 Raspodjela transplantiranih bolesnika u uzorku prema trajanju dijalize prije transplantacije

S obzirom na trajanje dijalize prije transplantacije bolesnike smo podijelili u tri grupe: 133 bolesnika (58,8%) koji su se dijalizirali manje od 3 godine prije transplantacije, 75 (33,2%) koji su na dijalizi proveli 3-10 godina i treća grupa od 18 bolesnika (8,0%) koji su preko 10 godina čekali na transplantat (slika 5). Raspodjela frekvencija (broja dijaliziranih bolesnika) je dobro prilagođena eksponencijalnoj raspodjeli (slika 6).



Slika 5. Raspodjela bolesnika s obzirom na trajanje dijalize: do 3 godine, od 3 do 10 i preko 10 godina





Slika 6. Raspodjela bolesnika s obzirom na trajanje dijalize prije transplantacije

#### 4.1.1.5 Raspodjela transplantiranih bolesnika u uzorku prema osnovnoj bolesti

Prema osnovnoj bolesti koja je dovela do kronične terminalne renalne insuficijencije (KTRI) bolesnici su podijeljeni u 6 kategorija. Glomerulonefritis je najčešći uzrok koji je doveo do kronične terminalne renalne insuficijencije (KTRI) –129 bolesnika (57,1%), odmah iza njega je pijelonefritis-48 bolesnika (21,2%). U 15 bolesnika (6,6%) do zatajenja bubrega je dovela nefroskleroza, u 13 (5,8%) su razlog bili policistični bubrezi, a

u 10 (4,4%) juvenilni tip dijabetesa. U preostalih 11 (4,9%) radilo se o različitim sistemnim bolestima, koje pored ostalog oštećuju i bubrege (tablica 2).

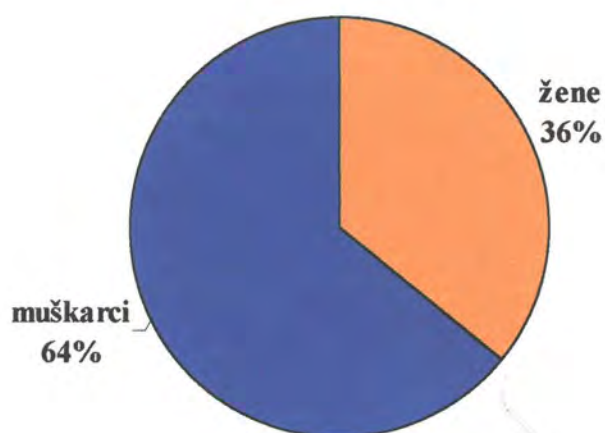
**Tablica 2:** Zastupljenost osnovnih bolesti koje su dovele do KTRI u obrađenom uzorku bolesnika

<i>osnovna bolest</i>	<i>broj bolesnika</i>	<i>%</i>
1 Glomerulonefritis	129	57,1
2 Pijelonefritis	48	21,2
3 Nefroskleroza	15	6,6
4 Policistični bubrezi	13	5,8
5 Juvenilni diabetes	10	4,4
6 Ostale bolesti	11	4,9
<b><i>Ukupno</i></b>	<b>226</b>	<b>100</b>

## 4.1.2 OPIS UZORKA DAVATELJA BUBREGA

### 4.1.2.1 RASPODJELA DAVATELJA BUBREGA U UZORKU PREMA SPOLU

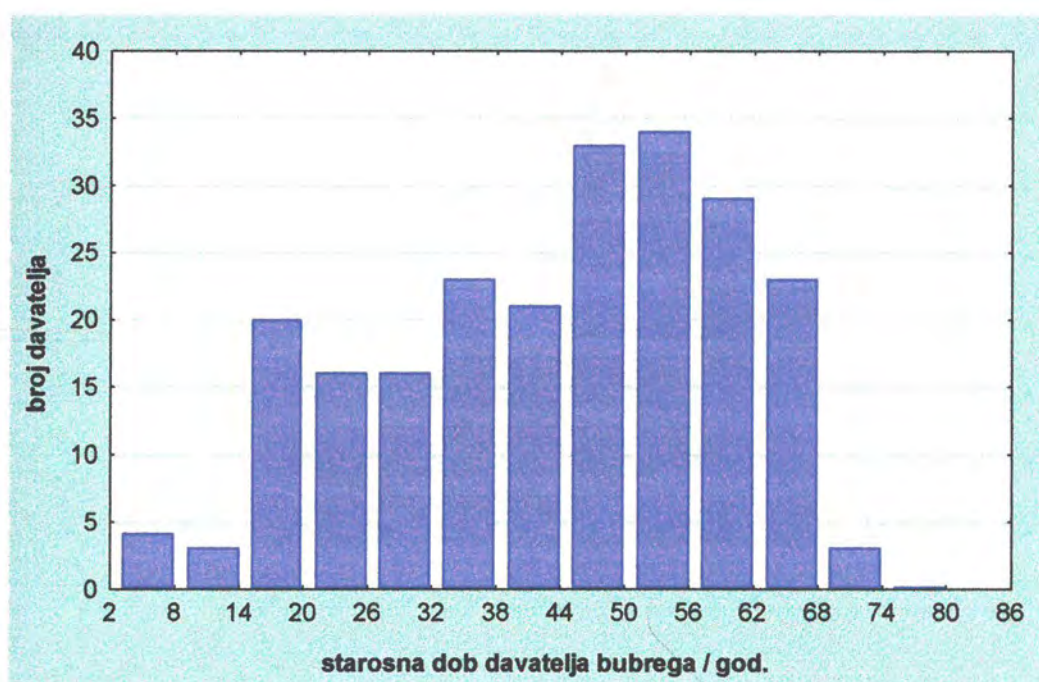
Uzorak davatelja bubrega također smo analizirali prema spolu: 81 bubreg je potjecao od davatelja ženskog spola (35,8%), a 144 (64,2%) od muškog davatelja (slika 7).



Slika 7. Spolna struktura uzorka davatelja bubrega

#### 4.1.2.2 RASPODJELA DAVATELJA BUBREGA U UZORKU PREMA STAROSNOJ DOBI

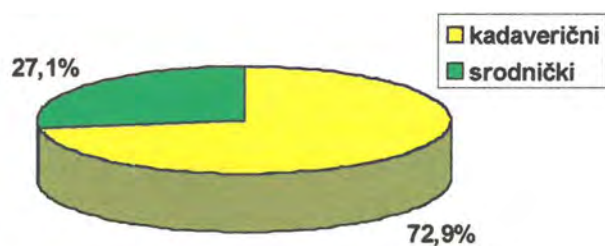
Starosna dob davatelja se kretala od 4 do 69 godina, sa srednjom vrijednosti od 43,4 godine i standardnom devijacijom 16,0 godina.(slika 8).



Slika 8. Raspodjela u grupi davatelja bubrega s obzirom na starosnu dob

#### 4.1.2.3 RASPODJELA DAVATELJA BUBREGA U UZORKU PREMA PORIJEKLU BUBREGA

Prema porijeklu bubrega davatelji su podijeljeni u dvije grupe: srodnički i kadaverični tj. bubreg umrle osobe. U 164 slučaja radilo se o transplantaciji bubrega s umrle osobe (72,9%), a u 61 slučaju (27,1%) je davatelj bio u srodstvu s primateljem (slika 9).

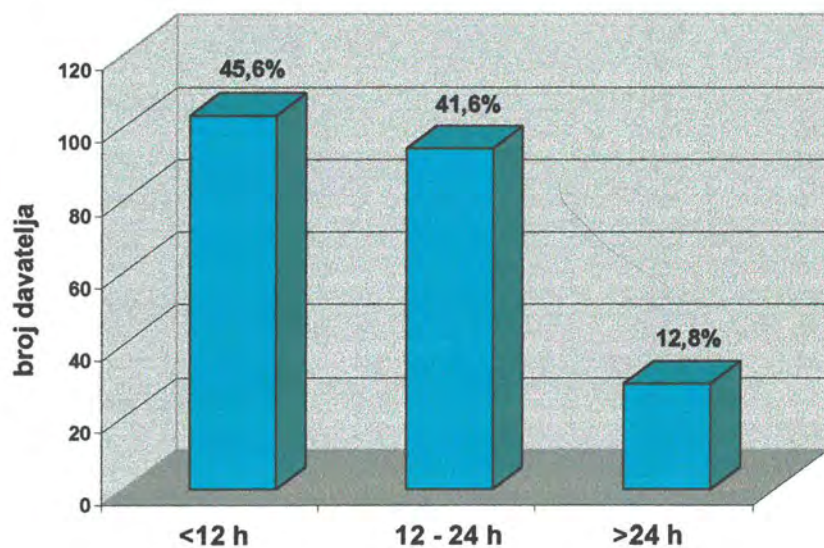


Slika 9. Raspodjela u grupi davatelja prema porijeklu bubrega (kadaverični ili srodnički)

### 4.1.3 TRANSPLANTAT

#### 4.1.3.1 Raspodjela u uzorku transplantiranih bubrega prema trajanju hladne ishemije

Svakako na uspjeh transplantacije utječe i sam organ koji se transplantira. Uočeno je da trajanje hladne ishemije može oštetiti bubreg. Stoga smo uzorak raspodijelili prema trajanju hladne ishemije u tri grupe: u 45,6% je hladna ishemija trajala manje od 12 sati, u 41,6% od 12 do 24 sata i u 12,8% je trajala dulje od 24 sata. Hladna ishemija bubrega prije transplantacije je iznosila od 0 do 45 sati, sa srednjom vrijednosti koja je iznosila 12,4 sata i standardnom devijacijom od 16 sati (slika 10).



Slika 10. Raspodjela u grupi davatelja bubrega prema trajanju hladne ishemije bubrega prije transplantacije

**Tablica 3:** Sumarna tablica za opis uzorka primatelja i davatelja.

<i>Karakteristike primatelja i davatelja organa</i>		<i>broj</i>	<i>%</i>
<b>Ukupno primatelja</b>		226	100
<b>spol primatelja</b>	Ženski	70	31
	Muški	156	69
<b>starosna dob primatelja</b>	0-15 (medijan=12)	6	2,7
	16-50 (medijan=36)	172	76,1
	>50 (medijan=57)	48	21,2
<b>starosna dob davatelja</b>	0-15 (medijan=8)	7	3,5
	16-50 (medijan=36)	129	57,1
	>50 (medijan=58)	89	39,4
<b>prethodne transplantacije bubrega</b>	Ne	212	93,8
	Da	14	6,2
<b>Protutijela reaktivna na panel limfocita (PRA,%)</b>	Odsutni	196	86,7
	Prisutni (medijan PRA=28,5%)	30	13,3
<b>Pretransplantacijske transfuzije</b>	Ne	57	25,2
	Da	169	74,8
<i>Nepodudarnosti u HLA sustavu</i>			
<b>HLA-A nepodudarnosti</b>	0	49	21,7
	1	148	65,5
	2	29	12,8
<b>HLA- B nepodudarnosti</b>	0	35	15,5
	1	167	73,9
	2	24	10,6
<b>HLA-DR nepodudarnosti</b>	0	107	47,3
	1	106	46,9
	2	1	0,4
<b>HLA-A,B nepodudarnosti</b>	0-1	61	27,0
	2	131	58,0
	3-4	34	15,0
<b>HLA-A,B,DR nepodudarnosti</b>	0-1	36	15,9
	2-4	188	83,2
	5-6	2	0,9
<i>Karakteristike transplantata</i>			
<b>trajanje hladne ishemije / h</b>	0-12 (medijan=1)	112	49,6
	>12 (medijan=20)	114	50,4
	0-24 (medijan=11)	205	90,7
	>24 (medijan=28)	21	9,3
<b>porijeklo bubrega</b>	kadaverični	164	72,9
	srodnički	61	27,1

Svih 226 bolesnika predstavljaju homogenu grupu jednog centra i to s obzirom na preoperativnu pripremu, primjenjenu kiruršku tehniku, postoperativno praćenje i imunosupresivni protokol. Neminovne modifikacije koje su nastajale tijekom godina kao posljedica novih spoznaja u transplantacijskoj medicini distribuirane su ravnomjerno.

Metodološko diferenciranje funkcionirajućeg od nefunkcionirajućeg transplantata izvršeno je prema opće prihvaćenom kriteriju po kojem je funkcionirajući transplantat onaj koji omogućuje život bez dijalize, neovisno o stupnju dostignute renalne funkcije. Afunkcionalni transplantat je i onaj koji unatoč postignutoj diurezi nema zadovoljavajuće klirence.



#### 4.1.4 ANALIZA PREŽIVLJAVANJA TRANSPLANTATA

U analizi preživljavanja za opis podataka koriste se životne tablice (Life table). To su tablice razdiobe frekvencija prema vremenima preživljavanja kategoriziranim u određen broj vremenskih intervala.

U životnim tablicama navode se sljedeći parametri:

- *broj pacijenata koji ulazi u interval* predstavlja ukupni broj slučajeva (pacijenata) koji su "ušli" u zadani vremenski interval preživljavanja bez odbacivanja transplantata.
- *broj rizičnih slučajeva* računa se kao broj slučajeva koji ulaze u interval bez odbacivanja - polovica broja koji su cenzurirani u tom intervalu.
- *postotak odbacivanja* izračunava se kao postotak broja odbacivanja u tom intervalu u odnosu na broj rizičnih slučajeva u istom intervalu.
- *postotak preživljavanja*
- *kumulativni postotak preživljavanja* u određenom intervalu predstavlja kumulativni postotak preživljavanja do tog intervala. Računa se množenjem vjerojatnosti preživljavanja preko svih prethodnih intervala. Temeljem ovih vrijednosti, bilo kao prorporcija/vjerojatnost ili postotak, računa se kumulativna funkcija preživljavanja, te prikazuje graf ovisnosti preživljavanja o proteklom vremenu.
- *medijan* u pojedinom intervalu predstavlja vrijeme preživljavanja za koje je kumulativna funkcija preživljavanja jednaka 0,5 (ili 50%).

- *gustoća vjerojatnosti odbacivanja*, po jedinici vremena (godišnja) računa se prema formuli:  $F = (S - q) / h$ , gdje je S-kumulativna proporcija preživljavanja na kraju danog intervala, q- proporcija odbacivanja u danom intervalu, te h-širina danog intervala. (proporcija = postotak /100).
- *stopa hazarda (hazard rate)* definirana je kao vjerojatnost da će pacijent, koji je preživio do početka određenog intervala, odbaciti transplantat tijekom tog intervala.

U opisu podataka također se koriste:

- tablice s vrijednostima medijana i aritmetičke sredine za preživljavanje unutar pojedinih kategorija za određenu varijablu (npr. starosna dob pacijenata, kategorizirana u 3 kategorije: 0-15 god, 16-50 god. i >50 god.). Navode se i medijan i aritmetička sredina kako bi se uočio eventualni utjecaj ekstremnih vrijednosti na mjeru centralne tendencije.
- grafovi za preživljavanje transplantata u ovisnosti o proteklom poslije-trasplantacijskom vremenu (temeljem podataka iz životne tablice, ili izračunom prema Kaplan-Meier metodi).

#### **4.1.5 USPOREĐIVANJE PREŽIVLJAVANJA U POJEDINIM GRUPAMA**

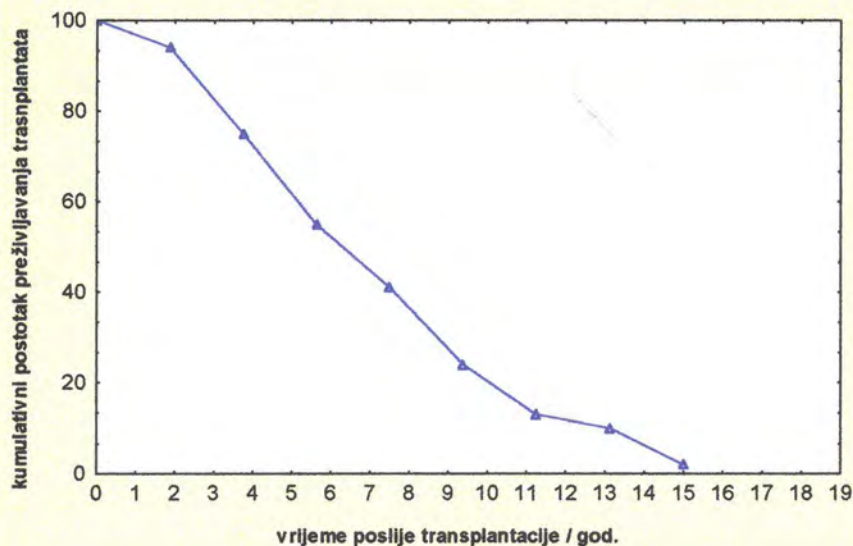
Uspoređivanje preživljavanja u pojedinim grupama rađeno je neparametrijskim testovima (Gehanovim generaliziranim Wilcoxon testom, odnosno Coxovim F-testom).

##### **4.1.5.1 Analiza preživljavanja transplantata u cijelom uzorku**

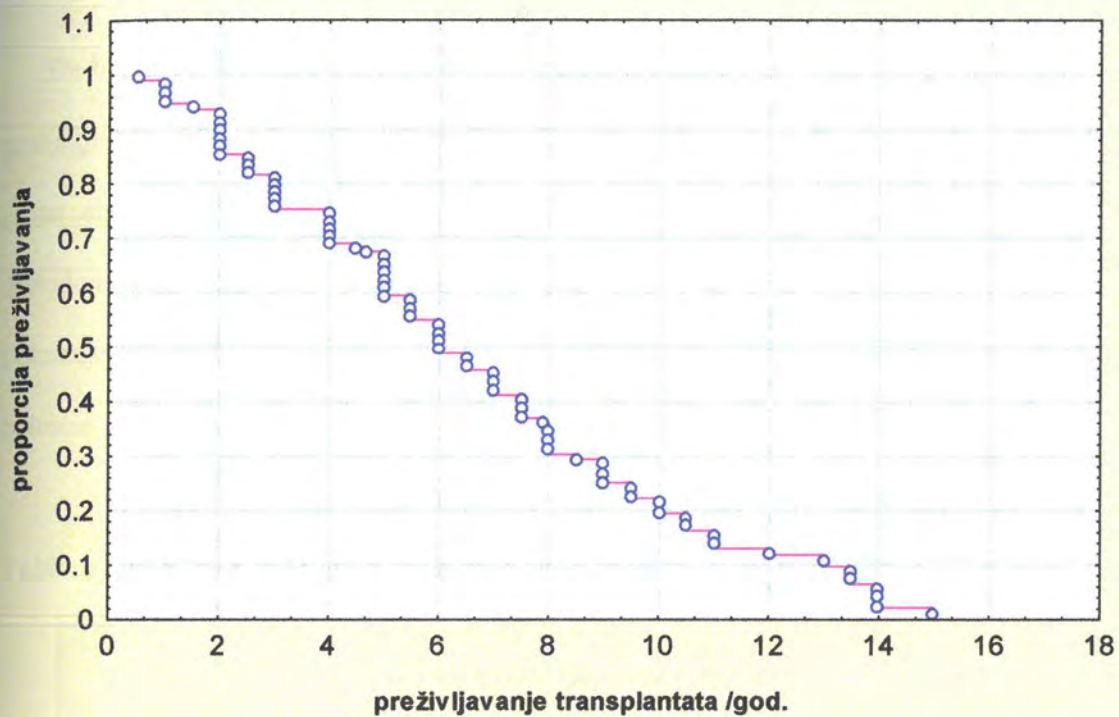
Koristeći se životnim tablicama, analiziran je cjelokupni uzorak, tj. preživljavanje transplantata u svih 226 transplantiranih bolesnika i prikazan u tablici 4. Vidljivo je da postotak preživljavanja opada s vremenom proteklim od transplantacije. Petogodišnje preživljavanje je 60%, što se podudara s podacima iz literature (8). Na slici 11 također je uočljiv trend snižavanja kumulativnog postotka preživljavanja s obzirom na vrijeme proteklo od transplantacije. Korištenjem Kaplan-Meierove metode koja uzima u obzir svaki pojedini podatak, ne grupirajući ih u intervale, dobiva se ista krivulja (slika 12).

Tablica 4: Životna tablica za cjelokupni uzorak transplantiranih bolesnika.

Br. Int	početak intervala /god.	Broj pacijenata koji ulazi u interval	broj rizičnih slučajeva	% odbacivanja	% preživljavanja (P)	medijan	gustoća vjerojatnosti odbacivanja u intervalu $\pm$ SD	stopa hazarda $\pm$ SD
1	0	226	199	6	94	6,2	0,03 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01
2	1,875	160	149,5	20	80	4,8	0,10 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,02
3	3,75	108	104,5	27	73	4,1	0,11 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,03
4	5,625	73	70	26	74	3,4	0,08 $\pm$ 0,02	0,16 $\pm$ 0,04
5	7,5	49	47,5	40	60	2,5	0,09 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,06
6	9,375	27	25,5	47	53	2,3	0,06 $\pm$ 0,02	0,33 $\pm$ 0,09
7	11,25	12	12	25	75	2,7	0,02 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,09
8	13,125	9	9	78	22	1,2	0,04 $\pm$ 0,01	0,68 $\pm$ 0,20
9	15	2	2	100	0			



Slika 11. Preživljavanje transplantata s obzirom na proteklo vrijeme nakon transplantacije



Slika 12. Proporcija preživljavanja transplantata s obzirom na vrijeme preživljavanja transplantata. Podaci su izračunati temeljem Kaplan-Meierove metode (uzima u obzir svaki pojedini podatak, a ne grupira ih u pojedine intervale).

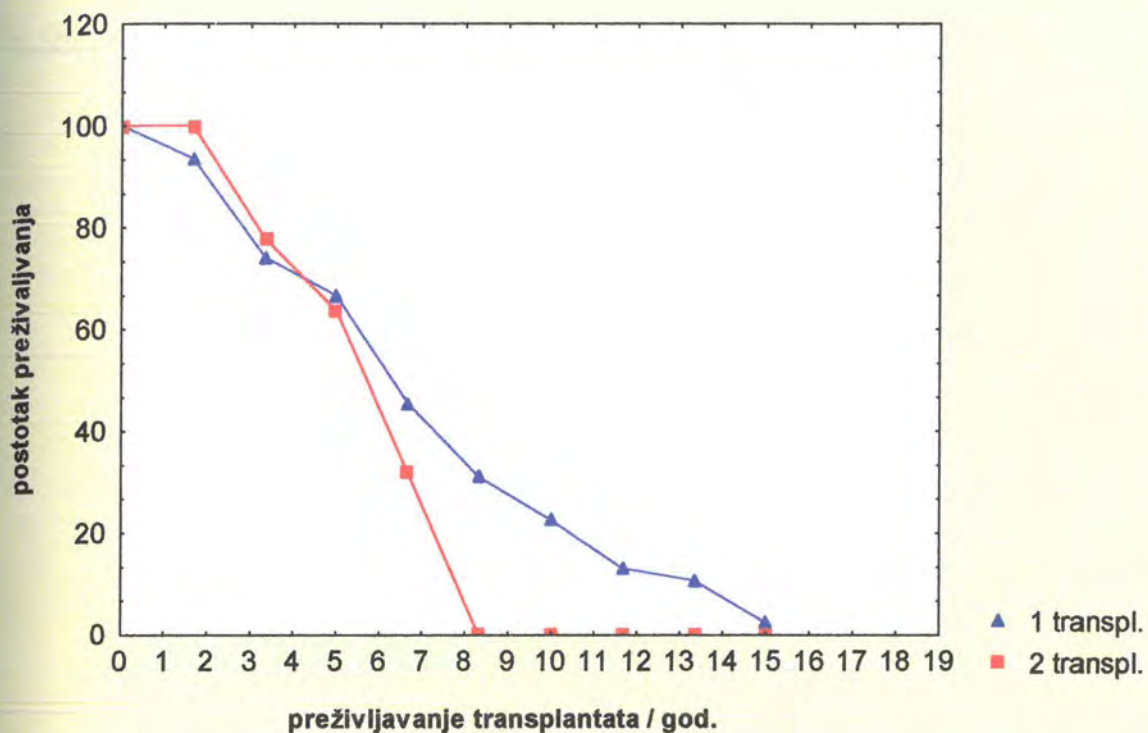
#### 4.1.5.2 Analiza preživljavanja transplantata s obzirom na broj transplantacija

Da bismo mogli analizirati preživljavanje s obzirom na broj transplantacija, bolesnici su podijeljeni u dvije grupe ovisno da li se radi o prvoj ili drugoj transplantaciji (postoji i jedan slučaj treće transplantacije, ali ovdje nije uzet u analizu). Podaci su obrađeni metodom uspoređivanja višestrukih uzoraka u statističkoj analizi preživljavanja. Rezultat pokazuje da nema statistički značajne razlike u preživljavanju između dvije kategorije bolesnika ( $p=0,36$  – tablica 5).

Tablica 5: Preživljavanje transplantata s obzirom na broj transplantacija

Broj transplantacija	ukupni broj bolesnika	broj odbacivanja	preživljavanje transplantanata / god.		
			medijan	srednja vrijednost $\pm$ SD	p
1	212	88	3	4,4 $\pm$ 3,8	0,36
2	13	6	3	3,4 $\pm$ 2,5	(n.s.)
ukupno	225	94			

Na slici 13 izgleda da je preživljavanje bolje u grupi s prvim transplantatom, što se čini i prema opisu srednjih vrijednosti vremena preživljavanja transplantanata u dvije grupe bolesnika, no zbog velike varijabilnosti u grupi (velika SD) ta razlika nije statistički značajna (također: medijani su jednaki).



**Slika 13.** Preživljavanje transplantata u ovisnosti o vremenu za dvije grupe bolesnika, podijeljene s obzirom na broj učinjenih transplantacija (vidi legendu)

Podaci su analizirani i Coxovim F-testom, uspoređivanjem dva uzorka (bolesnici s jednom i bolesnici s dvije transplantacije). Iskazuje se da među njima nema statistički značajne razlike ( $p=0,12$ ) za cjelokupni vremenski interval preživljavanja (0-15 godina), kao ni za četverogodišnje preživljavanje ( $p=0,16$  – tablica 6).

**Tablica 6:** Životna tablica za preživljavanje transplantata u prvoj i u drugoj transplantaciji

br. int.	početak intervala / god.	% preživljavanja (P)		P
		1 transpl	2 transpl	
1	0	94	100	0,12 (n.s.)
2	1.67	79	78	
3	3.33	90	82	
4	5.0	68	50	
5	6.67	68	0	
6	8.33	73	0	
7	10.0	58	0	
8	11.67	82	0	
9	13.33	22	0	
10	15.0	0	0	

#### 4.1.5.3 Analiza preživljavanja transplantata s obzirom na porijeklo transplantiranog bubrega

Bolesnici su podijeljeni u dvije grupe s obzirom na porijeklo transplantiranog bubrega: kadaverični ili srodnički (Tablica 7). Nismo uočili statistički značajnu razliku u preživljavanju transplantata s obzirom na njegovo porijeklo, kako za cijelo promatrano razdoblje ( $p=0,20$ ), tako niti za četverogodišnje razdoblje ( $p=0,26$ ) što je vidljivo u životnoj tablici 8 i na slici 14.

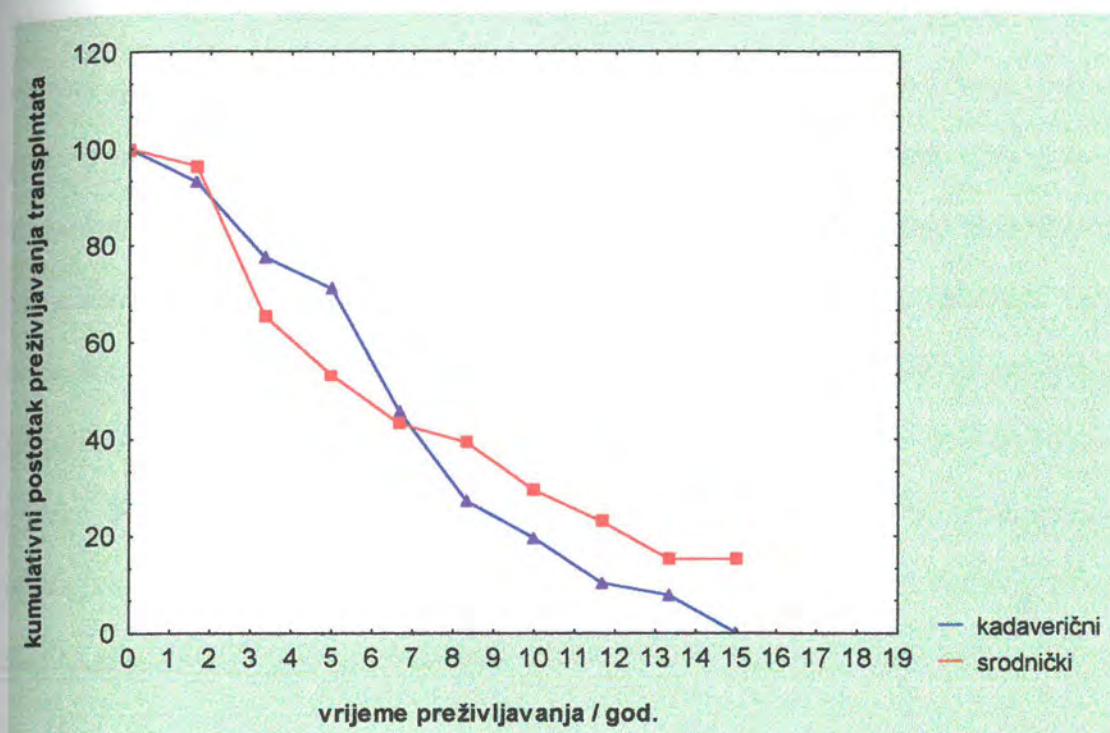


Tablica 7: Preživljavanje transplantata s obzirom na porijeklo bubrega: bolesnici su podijeljeni u dvije skupine s obzirom na porijeklo transplantiranog bubrega - kadaverični i srodnički.

Porijeklo bubrega	ukupni broj bolesnika	Broj odbacivanja	preživljavanje transplantata / god.		
			medija n	srednja vrijednost	SD
Kadaverični	164	62	4	4,5	3,7
Srodnički	61	32	3	3,9	3,6
<b>Ukupno</b>	<b>225</b>	<b>94</b>			

Tablica 8: Životna tablica za preživljavanje transplantata (izraženo u %) unutar ovih dviju kategorija bolesnika

br. int.	početak intervala / god.	% preživljavanja (P)		p
		kadaverični i bubreg	srodnički bubreg	
1	0	93	96	0,20 (n.s.)
2	1.67	83	68	
3	3.33	92	81	
4	5.0	64	81	
5	6.67	59	91	
6	8.33	72	75	
7	10.0	53	78	
8	11.67	75	67	
9	13.33	0	100	
10	15.0	0	0	



Slika 14. Kumulativni postotak preživljavanja kroz proteklo poslijetransplantacijsko vrijeme, za dvije kategorije bolesnika, prema porijeklu transplantiranog bubrega (vidi legendu)

#### 4.1.5.4 Analiza preživljavanja transplantata s obzirom na dob primatelja

Budući da nam podaci iz literature sugeriraju utjecaj dobi primatelja na preživljavanje transplantata, podijelili smo bolesnike u tri grupe: od 0 do 15 godina, od 16 do 50 i preko 50 godina. Podaci su obrađeni metodom uspoređivanja višestrukih uzoraka u statističkoj analizi preživljavanja (Survival analysis; comparing multiple samples). Rezultat usporedbe

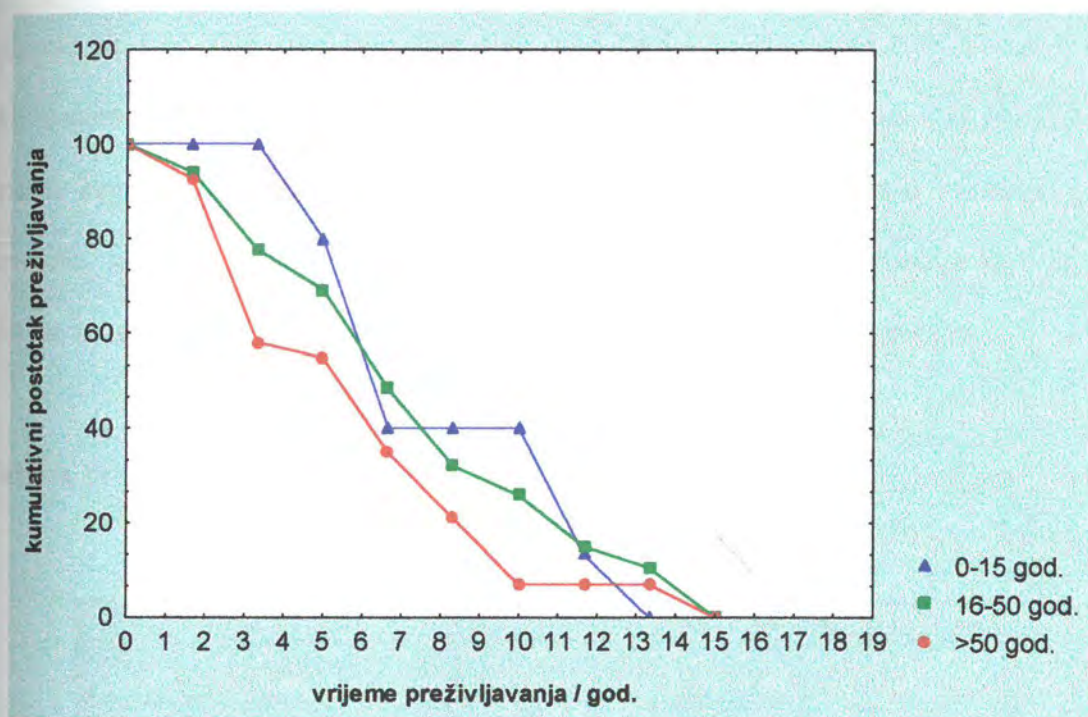
iskazuje da nema statistički značajne razlike u preživljavanju između pojedinih dobnih skupina primatelja ( $\chi^2=3,97$ ;  $p=0,13$ ), iako je uočljiv trend skraćivanja vremena preživljavanja u starijoj dobnj skupini (Tablica 9). U analizi izvršenoj u Nord Italian Transplantu je napravljena usporedba s obzirom na četverogodišnje preživljavanje transplantata, pa smo to učinili i mi, no ponovno razlika nije statistički značajna. Grupa bolesnika starosne dobi od 0 do 15 godina je vrlo mala (samo 6 bolesnika), pa smo je stoga isključili iz analize. Usporedbom preostale dvije grupe (bolesnici starosne dobi od 16 do 50 i preko 50 godina) iskazuje se statistički značajna razlika ( $p=0,03$ ), tj. četverogodišnje preživljavanje je značajno lošije ukoliko je primatelj stariji od 50 godina (Tablica 10). Na slici 15 je uočljivo da najlošije preživljavaju transplantati u primatelja starije dobi.

**Tablica 9:** Preživljavanje presađenog bubrega s obzirom na dob primatelja transplantata

dob primatelja / god.	ukupni broj pacijenata	broj odbacivanja	preživljavanje transplantata / god.		
			medijan	srednja vrijednost $\pm$ SD	P
0-15	6	2	5,5	6,2 $\pm$ 3,2	0,13
16-50	172	76	3	4,5 $\pm$ 3,8	(n.s.)
>50	48	17	2,5	3,7 $\pm$ 3,7	
<b>Ukupno</b>	<b>226</b>	<b>95</b>			

Tablica 10: Četverogodišnje preživljavanje presađenog bubrega s obzirom na dob primatelja

dob primatelja / god.	ukupni broj pacijenata	broj odbacivanja	preživljavanje transplantata (do 4 god.) / god.		
			Medijan	srednja vrijednost $\pm$ SD	P
16-50	100	63	2	$1,8 \pm 1,3$	0,03
>50	30	16	1	$1,3 \pm 1,1$	
Ukupno	130	79			



Slika 15. Kumulativni postotak preživljavanja transplantata s obzirom na vrijeme preživljavanja transplantata. Podaci su prikazani za pojedine grupe razvrstane prema starosnoj dobi primatelja (vidi legendu).

#### 4.1.5.5 Analiza preživljavanja transplantata s obzirom na dob davatelja

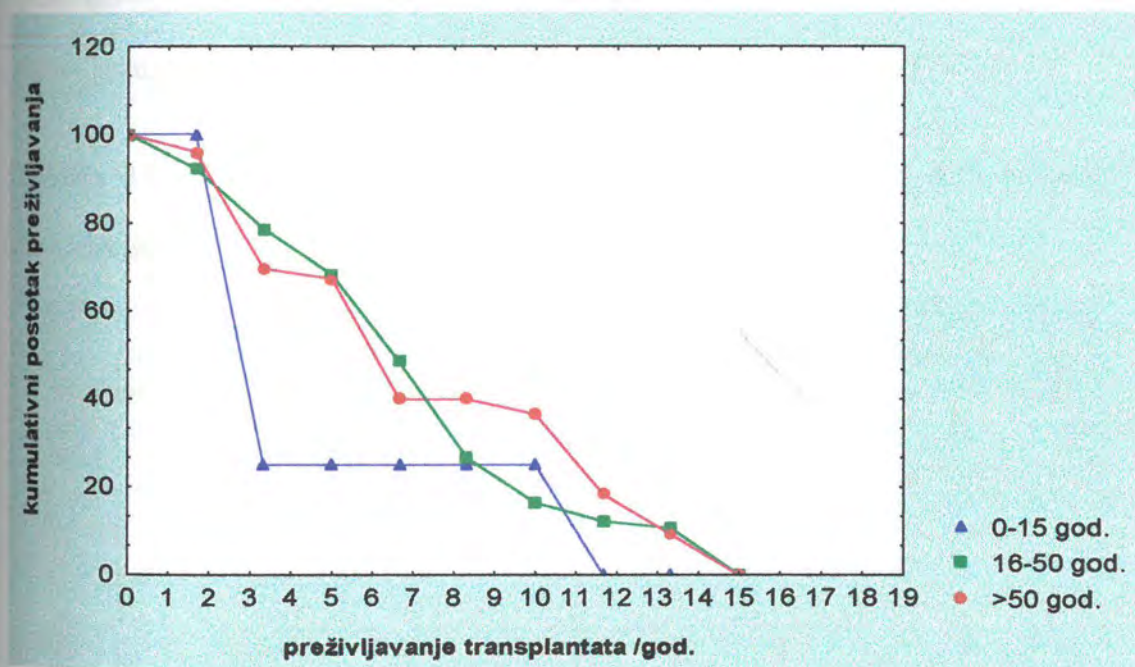
Osim starosne dobi primatelja, poznato je da i dob davatelja utječe na preživljavanje transplantata. Tako smo i davatelje podijelili u tri grupe prema starosnoj dobi: od 0 do 15 godina, od 16 do 50 i preko 50 godina, a podatke obradili na isti način kao i kod primatelja. Rezultat usporedbe iskazuje da nema statistički značajne razlike u preživljavanju bez obzira na dob davatelja organa ( $\chi^2=1,7$ ;  $p=0,42$  – tablica 11). Statistički značajna razlika se ne iskazuje niti kad isključimo grupu davatelja od 0 do 15 godina (samo 8 slučajeva), a niti ako uzmemo u obzir samo četvrogodišnje preživljavanje ( $p=0,13$  – tablica 12). Na slici 16 prateći kumulativni postotak preživljavanja transplantata u ovisnosti o starosnoj dobi davatelja, može se primjetiti da je najlošije preživljavanje za grupu davatelja od 0 do 15 godina, no zbog malog broja (samo 8), ne iskazuje se statistički značajna razlika.

Tablica 11: Preživljavanje transplantata s obzirom na starosnu dob davatelja organa

dob davatelja/ god.	preživljavanje transplantata / god.				
	ukupni broj pacijenata	broj odbacivanja	medijan	srednja vrijednost $\pm$ SD	P
0-15	8	4	1,25	$2,2 \pm 3,3$	0,42
16-50	130	41	4,25	$4,9 \pm 3,7$	(n.s.)
>50	88	49	2,5	$3,7 \pm 3,6$	
ukupno	226	94			

Tablica 12: Četverogodišnje preživljavanje transplantata s obzirom na starosnu dob davatelja organa

dob davatelja / god.	ukupni broj pacijenata	broj odbacivanja	preživljavanje transplantata (do 4 god.) / god.		
			medijan	srednja vrijednost $\pm$ SD	p
16-50	65	31	2	$1,8 \pm 1,4$	0,13
>50	60	18	1,75	$1,6 \pm 1,1$	(n.s.)
ukupno	125	49			



Slika 16. Kumulativni postotak preživljavanja transplantata s obzirom na vrijeme preživljavanja transplantata, u ovisnosti o starosnoj dobi donora

#### 4.1.5.6 Analiza preživljavanja s obzirom na starosnu dob primatelja i davatelja

Željeli smo analizirati preživljavanje prateći uporedo starosnu dob i primatelja i davatelja organa, tako što smo ih grupirali u 4 kategorije:

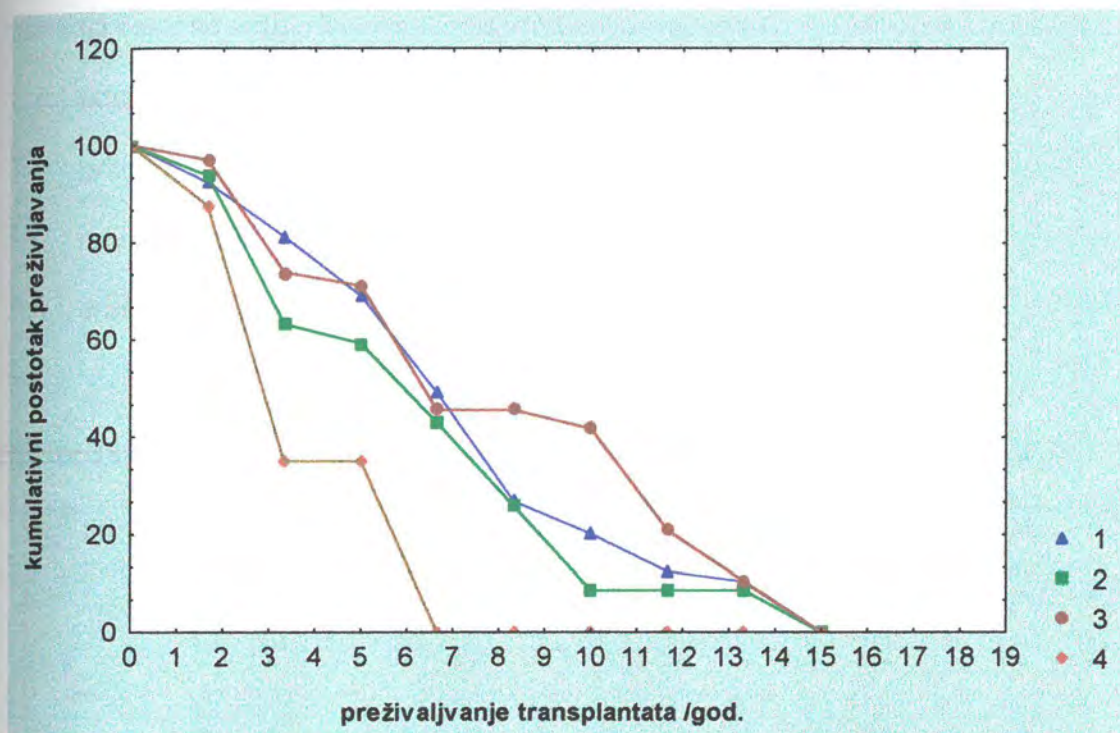
1. dob primatelja < 50 god i dob davatelja < 50 god.
2. dob primatelja > 50 god i dob davatelja < 50 god.
3. dob primatelja < 50 god i dob davatelja > 50 god.
4. dob primatelja > 50 god i dob davatelja > 50 god.

Uspoređivanje kategorija 1, 2, 3 i 4 pokazuje da nema statistički značajne razlike u preživljavanju ( $\chi^2=5,46$ ,  $p=0,13$ ). Međutim, uočljiv je trend snižavanja postotka preživljavanja u grupi 4, gdje su i primatelj i davatelj stariji od 50 godina (Tablica 13).

**Tablica 13:** Analiza preživljavanja uz istodobno praćenje starosne dobi primatelja i davatelja organa

b r. in t.	početak interval / god.	sredina interval / god.	% preživljavanja (P)				p
			Prim<50 dav<50 1	Prim>50 dav<50 2	Prim<50 Dav>50 3	Prim>50 Dav>50 4	
1	0	0,9375	92	93	97	89	0,13 (n.s.)
2	1,875	2,8125	90	72	76	50	
3	3,75	4,6875	69	86	78	67	
4	5,625	6,5625	75	75	78	50	
5	7,5	8,4375	55	55	92	50	
6	9,375	10,3125	56	20	50	50	
7	11,25	12,1875	83	50	50	50	
8	13,125	14,0625	20	50	50	50	
9	15		50	50	50	50	

Na slici 17 još se bolje uočava lošije preživljavanje ukoliko su primatelj i davatelj stariji od 50 godina.



Slika 17. Kumulativni postotak preživljavanja za proteklo vrijeme preživljavanja transplanata, s obzirom na kombinaciju starosne dobi primatelja i davatelja organa: 1-dob primatelja < 50 god. i dob davatelja < 50 god., 2-dob primatelja > 50 god. i dob davatelja < 50 god., 3-dob primatelja < 50 god. i dob davatelja > 50 god., 4-dob primatelja > 50 god. i dob davatelja > 50 god.



#### 4.1.5.7 Analiza preživljavanja transplantata s obzirom na spol primatelja i davatelja

Neke svjetske studije (75, 223, 306) pratile su i utjecaj spola primatelja i davatelja na preživljavanje transplantata, pa smo i mi analizirali preživljavanje prateći uporedo spol primatelja i spol davatelja, također ih grupiravši u 4 kategorije:

1. primatelj i davatelj muškog spola-M/M
2. primatelj muškog spola i davatelj ženskog spola-M/Ž
3. primatelj ženskog spola i davatelj muškog spola-Ž/M
4. primatelj i davatelj ženskog spola-Ž/Ž

**Tablica 14:** Životna tablica za uzorak kombinacije spola muški primatelj/muški davatelj

br. int.	početak interval. / god.	sredina interval. / god.	broj pacije nata	broj izloženi	broj odbacivanja	% odbacivanja	% preživljavanja (P)	gustoća vjerojatnosti odbacivanja u intervalu ± SD	Stopa hazarda ± SD
1	0	0,9375	103	91	7	8	92	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,02
2	1,875	2,8125	72	67	12	18	82	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,03
3	3,75	4,6875	50	48	14	29	71	0,12 ± 0,03	0,18 ± 0,05
4	5,625	6,5625	32	31,5	8	25	75	0,07 ± 0,02	0,16 ± 0,05
5	7,5	8,4375	23	22,5	10	44	56	0,09 ± 0,03	0,30 ± 0,09
6	9,375	10,3125	12	12	6	50	50	0,06 ± 0,02	0,4 ± 0,1
7	11,25	12,1875	6	6	2	33	67	0,01 ± 0,01	0,2 ± 0,1
8	13,125	14,0625	4	4	3	75	25	0,03 ± 0,02	0,6 ± 0,3
9	15		1	1	1	50	50		

Tablica 15: Životna tablica za uzorak kombinacije spola muški primatelj/ženski davatelj .

br. Int.	početak interval / god.	sredina interval / god.	broj pacijenata	broj izloženi	broj odbacivanja	% odbacivanja	% preživljavanja (P)	gustoća vjerojatnosti odbacivanja intervalu $\pm$ SD	Stopa hazarda $u \pm$ SD
1	0	0,9375	53	47	2	4	96	0,02 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01
2	1,875	2,8125	39	35	10	29	71	0,15 $\pm$ 0,04	0,18 $\pm$ 0,05
3	3,75	4,6875	21	20	3	15	85	0,05 $\pm$ 0,03	0,09 $\pm$ 0,05
4	5,625	6,5625	16	14	4	29	71	0,09 $\pm$ 0,04	0,18 $\pm$ 0,09
5	7,5	8,4375	8	8	4	50	50	0,11 $\pm$ 0,05	0,3 $\pm$ 0,2
6	9,375	10,3125	4	4	2	50	50	0,06 $\pm$ 0,04	0,3 $\pm$ 0,2
7	11,25	12,1875	2	2	0	25	75	0,01 $\pm$ 0,02	0,2 $\pm$ 0,2
8	13,125	14,0625	2	2	1	50	50	0,02 $\pm$ 0,02	0,3 $\pm$ 0,3
9	15		1	1	1	50	50		

Tablica 16: Životna tablica za uzorak kombinacije spola ženski primatelj/muški davatelj .

r. Int.	početak interval / god.	Sredina interval / god.	broj pacijenata	broj izloženi	broj odbacivanja	% odbacivanja	% preživljavanja (P)	gustoća vjerojatnosti odbacivanja intervalu $\pm$ SD	Stopa hazarda $u \pm$ SD
1	0	0,9375	42	36,5	3	8	92	0,05 $\pm$ 0,03	0,05 $\pm$ 0,03
2	1,875	2,8125	28	27,5	4	15	85	0,08 $\pm$ 0,03	0,09 $\pm$ 0,05
3	3,75	4,6875	23	22,5	4	18	82	0,08 $\pm$ 0,04	0,12 $\pm$ 0,06
4	5,625	6,5625	18	18	3	17	83	0,06 $\pm$ 0,03	0,11 $\pm$ 0,06
5	7,5	8,4375	15	14,5	5	35	65	0,11 $\pm$ 0,04	0,3 $\pm$ 0,1
6	9,375	10,3125	9	8	4	50	50	0,10 $\pm$ 0,04	0,4 $\pm$ 0,2
7	11,25	12,1875	3	3	1	33	67	0,03 $\pm$ 0,03	0,2 $\pm$ 0,2
8	13,125	14,0625	2	2	1	50	50	0,03 $\pm$ 0,03	0,4 $\pm$ 0,4
9	15		1	1	1	50	50		

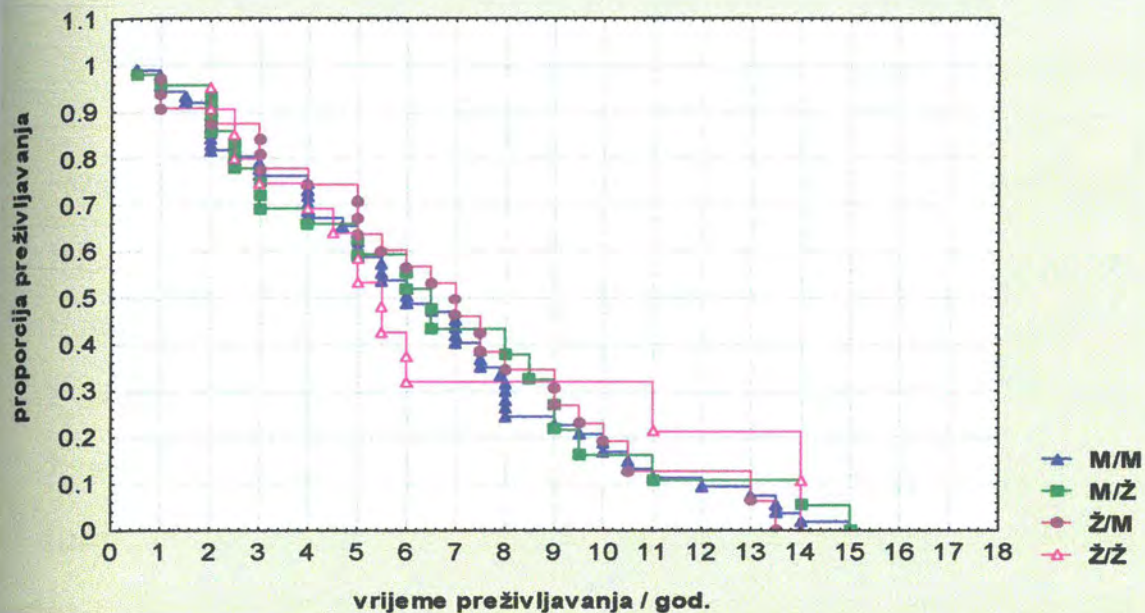
Tablica 17: Životna tablica za uzorak kombinacije spola ženski primatelj/ženski davatelj .

br. int.	početak interval / god.	sredina interval / god.	broj pacijenata	broj izloženi	broj odbacivanja	% odbacivanja	% preživljavanja (P)	gustoća vjerojatnosti odbacivanja u intervalu $\pm$ SD	Stopa hazarda $\pm$ SD
1	0	0,9375	28	24,5	0	2	98	0,01 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,01
2	1,875	2,8125	21	20	5	25	75	0,14 $\pm$ 0,05	0,16 $\pm$ 0,07
3	3,75	4,6875	14	14	4	29	71	0,12 $\pm$ 0,05	0,19 $\pm$ 0,09
4	5,625	6,5625	10	10	4	40	60	0,12 $\pm$ 0,05	0,3 $\pm$ 0,1
5	7,5	8,4375	6	6	0	8	92	0,01 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,07
6	9,375	10,3125	6	4,5	0	11	89	0,02 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ 0,09
7	11,25	12,1875	3	3	1	33	67	0,05 $\pm$ 0,04	0,2 $\pm$ 0,2
8	13,125	14,0625	2	2	0	25	75	0,02 $\pm$ 0,03	0,2 $\pm$ 0,2
9	15		2	2	2	75	25		

**Tablica 18:** Sumarna tablica za preživljavanje s obzirom na kombinaciju spolova primatelj/davatelj. Uspoređivanje kategorija M/M, M/Ž, Ž/M i Ž/Ž pokazuje da nema statistički značajne razlike u preživljavanju ( $\chi^2=73$ ,  $p=0,86$ ).

br. Int.	početak intervala / god.	sredina intervala / god.	% preživljavanja (P)				p
			M/M	M/Ž	Ž/M	Ž/Ž	
1	0	0,9375	92	96	92	98	0,86 (n.s.)
2	1,875	2,8125	82	71	85	75	
3	3,75	4,6875	71	85	82	71	
4	5,625	6,5625	75	71	83	60	
5	7,5	8,4375	56	50	65	92	
6	9,375	10,3125	50	50	50	89	
7	11,25	12,1875	67	75	67	67	
8	13,125	14,0625	25	50	50	75	
9	15		50	50	50	25	

Uspoređivanjem ove 4 kategorije, uočava se da nema statistički značajne razlike u preživljavanju ( $\chi^2=73$ ,  $p=0,86\%$  - tablica 18), što je vidljivo i iz slike 18.



Slika 18. Proporcija preživljavanja transplantata s obzirom na vrijeme preživljavanja transplantata za kombinaciju spolova primatelj/davatelj: primatelj i davatelj muškog spola-M/M, primatelj muškog spola i davatelj ženskog spola-M/Ž, primatelj ženskog spola i davatelj muškog spola-Ž/M, primatelj i davatelj ženskog spola-Ž/Ž. Podaci su izračunati temeljem Kaplan-Meierove metode.

#### 4.1.5.8 Analiza preživljavanja transplantata s obzirom na trajanje dijalize prije transplantacije

Prema trajanju dijalize prije transplantacije bolesnici su grupirani u tri skupine (tablica 19):

1. trajanje dijalize manje od 3 godine
2. trajanje dijalize od 3 do 10 godina
3. trajanje dijalize više od 10 godina

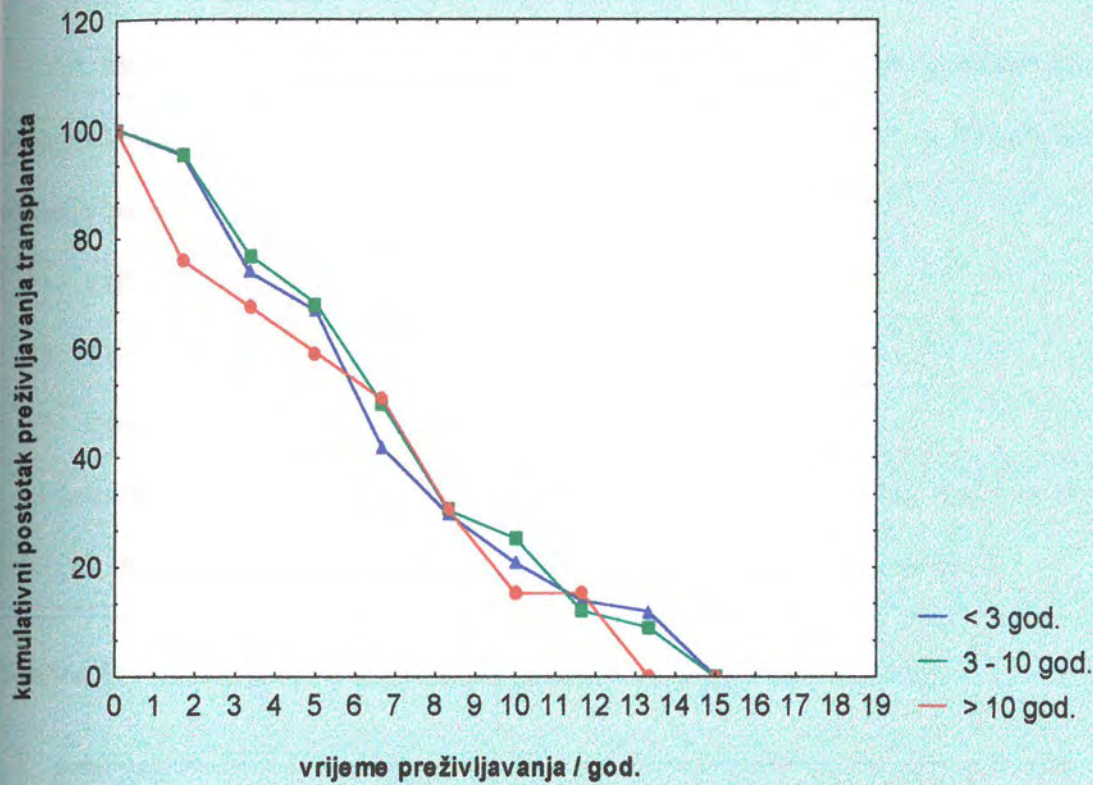
Uspoređivanjem preživljavanja u ovim kategorijama nije nađena statistički značajna razlika ( $\chi^2=0,96$ ;  $p=0,62$  – tablica 20), što bi vodilo zaključku da trajanje dijalize prije transplantacije ne utječe značajno na preživljavanje transplantata, a vidljivo je na slici 19.

**Tablica 19:** Preživljavanje transplantata s obzirom na trajanje dijalize

trajanje dijalize	ukupni broj bolesnika	broj odbacivanja	preživljavanje transplantata / god.		
			medijan	srednja vrijednost	SD
< 3 god	134	55	3	4,5	3,6
3-10 god.	79	36	2,5	4,0	4,0
>10 god.	13	3	5	5,0	3,8
<b>Ukupno</b>	<b>226</b>	<b>94</b>			

**Tablica 20:** Životna tablica preživljavanja transplantata s obzirom na trajanje dijalize u navedene tri skupine bolesnika

br. Int.	početak intervala / god.	% preživljavanja (P)			P
		dijaliza < 3 god.	dijaliza 3-10 god.	Dijaliza > 10 god.	
1	0.0	95	95	76	0,62 (n.s.)
2	1.67	78	81	89	
3	3.3	90	89	88	
4	5.0	63	73	86	
5	6.67	71	61	60	
6	8.3	70	83	50	
7	10.0	67	47	100	
8	11.67	86	75	0	
9	13.3	0	0	0	
10	15.0	0	0	0	



*Slika 19.* Kumulativni postotak preživljavanja kroz proteklo poslijetransplantacijsko vrijeme, za tri kategorije bolesnika prema trajanju dijalize prije transplantacije (vidi legendu)



#### 4.1.5.9 Analiza preživljavanja transplantata s obzirom na trajanje hladne ishemije

Već smo spomenuli da na uspjeh preživljavanja utječe i kvalitet samog organa koji se transplantira. Stoga smo analizirali preživljavanje transplantata s obzirom na trajanje hladne ishemije bubrega prije transplantacije (tablica 21):

1. trajanje hladne ishemije do 12 sati
2. trajanje hladne ishemije od 12 do 24 sata
3. trajanje hladne ishemije dulje od 24 sata.

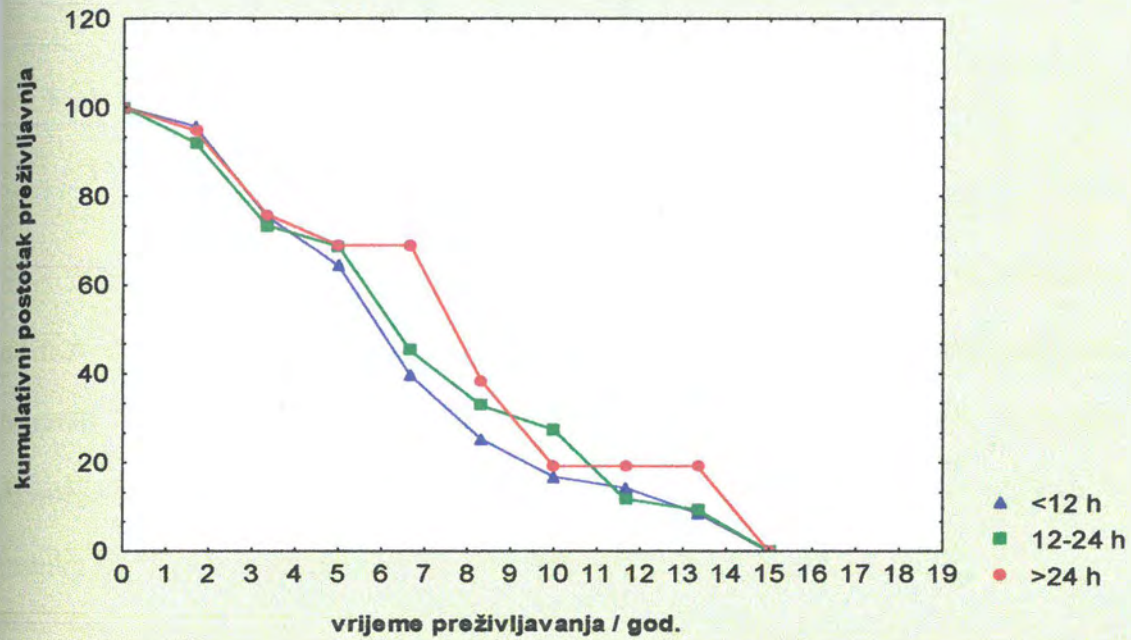
Uspoređivanjem preživljavanja u ove tri grupe nije nađena statistički značajna razlika ( $\chi^2=0,73$ ;  $p=0,67$  – tablica 22), što je vidljivo i u tablici preživljavanja i na slici 20.

**Tablica 21:** Preživljavanje transplantata s obzirom na trajanje hladne ishemije

Trajanje hladne ishemije	ukupni broj bolesnika	broj odbacivanja	preživljavanje transplantata / god.		
			medijan	srednja vrijednost	SD
<12 h	103	44	3	4,2	3,5
12-24 h	102	42	3	4,3	3,9
>24 h	21	8	4	5,3	4,3
<b>Ukupno</b>	<b>226</b>	<b>94</b>			

**Tablica 22:** Životna tablica preživljavanja transplantata s obzirom na trajanje hladne ishemije

br. int.	početak intervala / god.	% preživljavanja (P) trajanje hladne ishemije			p
		<12 h	12-24 h	>24 h	
1	0	96	92	95	0,67 (n.s.)
2	1.67	79	80	80	
3	3.33	85	94	91	
4	5.0	62	66	100	
5	6.67	64	73	56	
6	8.33	67	83	50	
7	10.0	85	43	100	
8	11.67	60	80	100	
9	13.33	0	0	0	
10	15.0	0	0	0	



Slika 20. Kumulativni postotak preživljavanja kroz proteklo poslijetransplantacijsko vrijeme, za tri kategorije bolesnika prema trajanju hladne ishemije (vidi legendu)

## 4.2 REZULTATI RETROSPEKTIVNE IMUNUNOLOŠKE ANALIZE

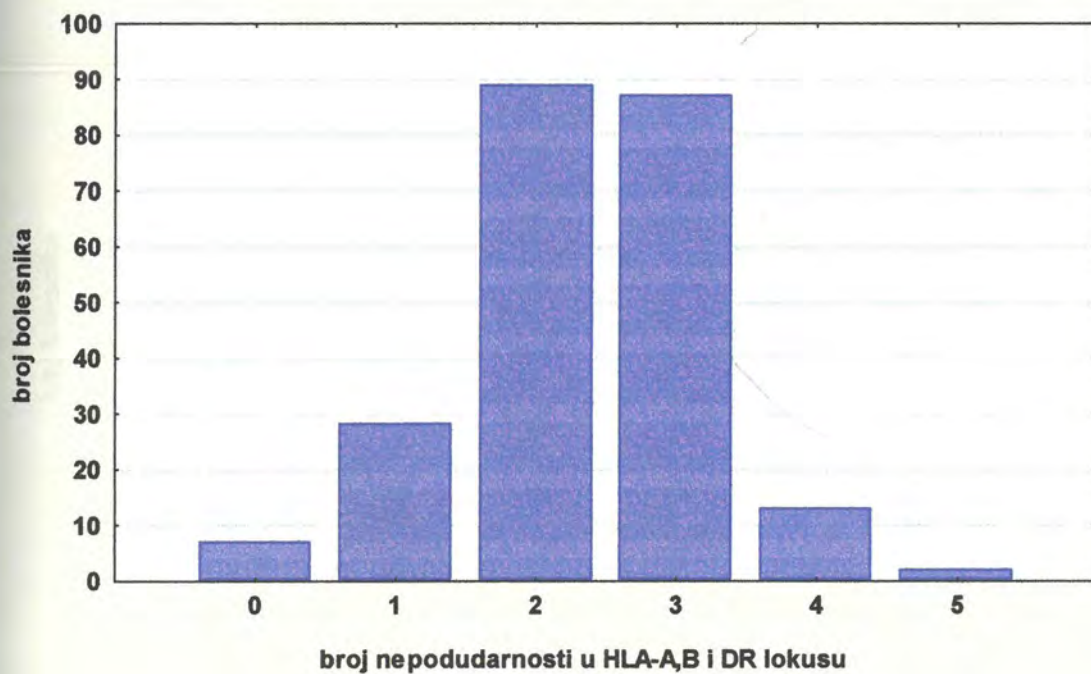
### 4.2.1 RASPODJELA TRANSPLANTIRANIH BOLESNIKA U UZORKU PREMA PODUDARNOSTI U HLA SUSTAVU

Budući da je jedan od glavnih parametara za odabir primatelja bubrega podudarnost u HLA sustavu s davateljem, analizirali smo i broj nepodudarnosti (u anglosaksonskoj literaturi mismatches tj. skraćeno MM) u HLA-A, B i DR lokusu između primatelja i davatelja organa. Opće je prihvaćen stav da se za transplantaciju biraju primatelji sa što manjim brojem nepodudarnosti (i to u DR, zatim B i na kraju A lokusu).

Prateći ukupan broj nepodudarnosti u sva tri lokusa vidjeli smo da je svega 7 (3,1%) bolesnika bilo potpuno podudarno s davateljem (u literaturi poznato kao puna podudarnost «full house»), 28 (12,4%) je imalo jednu nepodudarnost, 89 (39,4%) dvije, a 87 (38,5%) tri nepodudarnosti. Svega dva bolesnika (0,9%) imala su pet nepodudarnosti, a njih 13 (5,7%) četiri (slika 21, tablica 23).

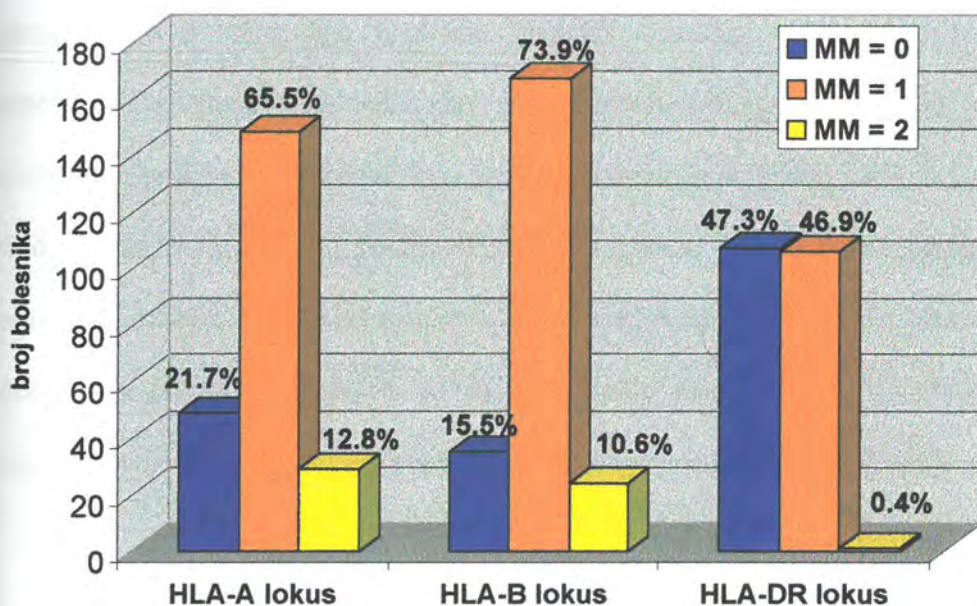
**Tablica 23:** Raspodjela broja bolesnika u uzorku prema ukupnom broju nepodudarnosti u HLA-A,B i DR lokusu.

<i>broj nepodudarnosti</i>	<i>broj bolesnika</i>	<i>%</i>
0	7	3,1
1	28	12,4
2	89	39,4
3	87	38,5
4	13	5,7
5	2	0,9
<b><i>Ukupno</i></b>	<b><i>226</i></b>	<b><i>100</i></b>



**Slika 21.** Raspodjela broja bolesnika prema ukupnom broju nepodudarnosti u HLA-A,B i DR lokusu

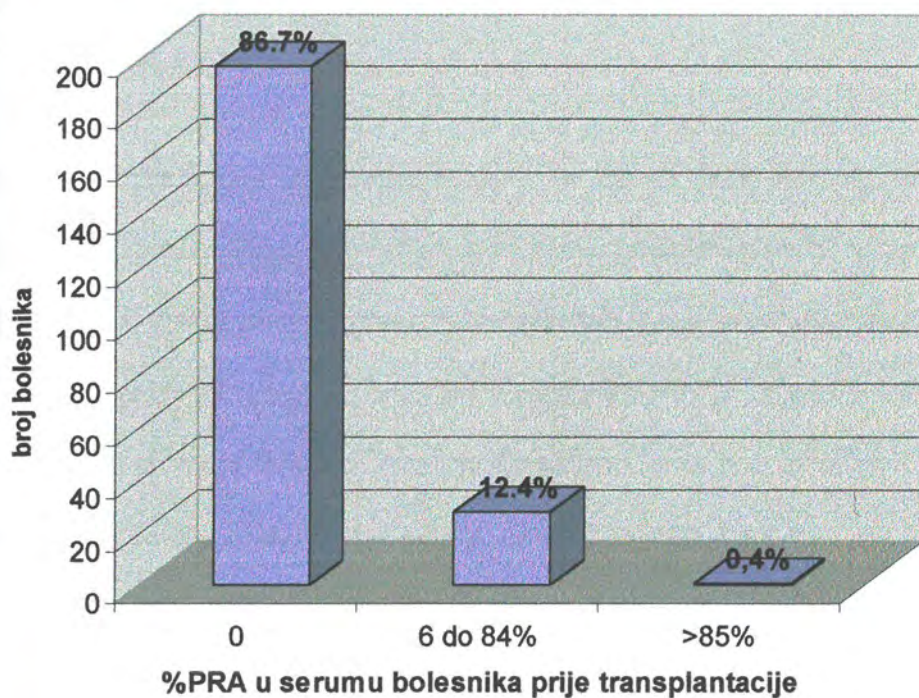
Smatra se da je za uspješno preživljavanje transplantiranog bubrega najvažnija podudarnost u DR lokusu, o čemu se u našem Centru vodi računa. Čak 107 bolesnika (47,3%) je podudarno u DR lokusu sa davateljem, 106 (46,9%) ima jednu nepodudarnost, a samo jedan bolesnik (0,4%) dvije nepodudarnosti. Drugi po važnosti je B lokus. Od 226 bolesnika, 35 (15,5%) je bilo podudarno sa davateljem, 167(73,9%) je imalo jednu, a 24 (10,6%) dvije nepodudarnosti. I na kraju u A lokusu većina bolesnika (65,5%) je imala jednu nepodudarnost, njih 29 (12,8%) dvije nepodudarnosti, dok ih je 49 (21,7%) bilo podudarno (slika 22).



Slika 22. Raspodjela bolesnika prema broju nepodudarnosti (MM) u pojedinim HLA-lokusima

#### 4.2.2 RASPODJELA TRANSPLANTIRANIH BOLESNIKA U UZORKU PREMA PRISUTNOSTI CITOTOKSIČNIH PROTUTIJELA

Uzorak primatelja bubrega je analiziran s obzirom na prisutnost citotoksičnih protutijela u serumu prije transplantacije. U dijaliziranih bolesnika se periodično (svaka 3 mjeseca) vrši «screening» za citotoksična protutijela u serumu. Pod «screeningom» se podrazumijeva testiranje seruma ispitanika s panelom limfocita poznate HLA specifičnosti metodom mikrolimfocitotoksičnog testa, u prisutnosti komplementa, standardnim postupkom prema Terasakiju. Bolesnik je senzibiliziran u smislu prisutnosti citotoksičnih protutijela ako u testu daje pozitivnu reakciju s nekim od limfocita s panela. U anglosaksonskoj literaturi je uobičajeni način izražavanja npr. prisutno je 50% panel-reaktivnih protutijela ili skraćeno PRA, pa se ta skraćunica uvriježila i kod nas. Od ukupno 226 bolesnika, 196 (86,7%) ih nije bilo senzibilizirano tj, nije imalo prisutna PRA u posljednjem uzorku seruma neposredno prije transplantacije. U 30 bolesnika (12,9%) su nađena citotoksična (PRA od 6 do 84%), s nešto malo većim udjelom bolesnika s prosječnom vrijednosti od 10%, a samo jedan od njih imao je više od 85% PRA (slika 23).



Slika 23. Raspodjela broja bolesnika prema postotku panel reaktivnih protutijela (PRA) u posljednjem uzorku seruma, prije transplantacije.



#### 4.2.3 ANALIZA PREŽIVLJAVANJA TRANSPLANTATA S OBZIROM NA PODUDARNOST U HLA SUSTAVU

Pored neimunoloških čimbenika poznato je da na preživljavanje imaju utjecaj i imunološki čimbenici. Stoga smo željeli ispitati kako podudarnost u HLA sustavu (HLA-A, B i DR lokusu) djeluje na preživljavanje transplantata u našem istraživanju. Bolesnike smo podijelili u grupe s obzirom na broj nepodudarnosti (u anglosaksonskoj literaturi mismatches ili skraćeno MM, pa ćemo tu skraćenicu koristiti u daljnjem tekstu): 0 MM- podudarni, 1 MM- 1 nepodudarnost, 2 MM- 2 nepodudarnosti, 3-4 MM- 3 do 4 nepodudarnosti i 5-6 MM- 5 do 6 nepodudarnosti (tablica 24).

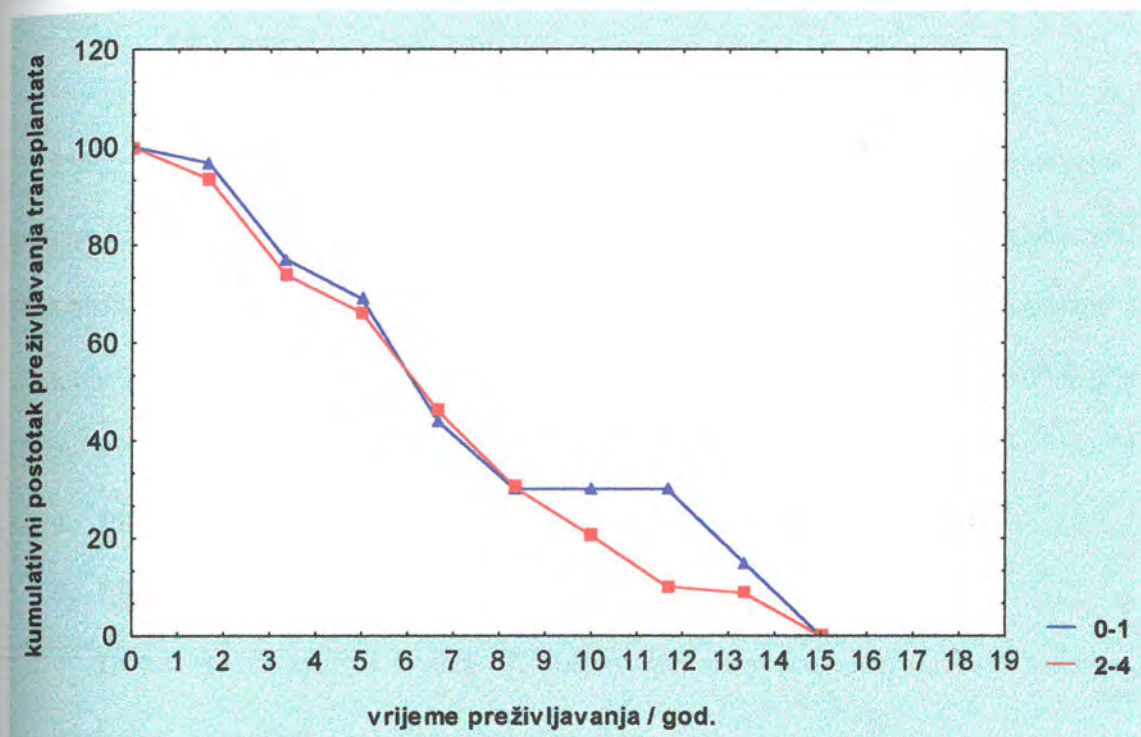
**Tablica 24:** Preživljavanje s obzirom na broj nepodudarnosti u HLA lokusu. Bolesnici su podijeljeni u skupine s obzirom na broj nepodudarnosti u HLA lokusima.

Broj nepodudarnosti lokusima	ukupni u broj bolesnika	Broj odbacivanja	preživljavanje transplantata / god.		
			medijan	srednja vrijednost	SD
<b>HLA-A</b>					
0	49	21	4	4,7	3,8
1	148	64	3	4,2	3,8
2	29	9	4	4,5	3,6
<b>HLA-B</b>					
0	35	12	5	5,2	4,5
1	167	68	3	4,3	3,7
2	24	14	3,5	3,8	3,1
<b>HLA-A,B</b>					
0-1	61	23	5	5,0	3,9
2	131	59	3	4,0	3,8
3-4	64	12	4,5	4,5	3,2
<b>HLA-A,B,DR</b>					
0-1	35	14	4	4,9	4,3
2-4	189	79	3	4,3	3,7
5-6	2				

Uočene razlike u preživljavanju s obzirom na broj nepodudarnosti u HLA sustavu nisu statistički značajne, što se može objasniti premalim brojem ispitanika u pojedinim skupinama (uočljivo u tablici preživljavanja 24 i na slici 24).

**Tablica 25:** Tablica preživljavanja za pojedine grupe bolesnika prema broju nepodudarnosti u pojedinim HLA lokusima. Preživljavanja su uspoređena unutar zadanih skupina.

		% preživljavanja											
		broj nepodudarnosti u pojedinim HLA lokusima											
		HLA-A			HLA-B			HLA-A,B			HLA-A,B,DR		
Br.	Int	početak	0	1	2	0	1	2	0-1	2	3-4	0-1	2-4
.		intervala	/ god.										
1	0	9	96	82	94	93	10	96	95	87	97	93	
		5					0						
2	1.67	8	76	85	83	77	93	82	75	87	79	79	
		6											
3	3.33	8	88	10	95	88	91	91	86	95	89	89	
		9		0									
4	5.0	6	71	57	61	71	60	62	73	65	64	69	
		6											
5	6.67	5	71	71	73	68	40	62	72	58	68	66	
		2											
6	8.33	1	71	50	88	72	0	90	75	25	100	68	
		0											
		0											
7	10.0	1	52	50	10	45	0	10	47	0	100	48	
		0			0			0					
		0											
8	11.67	6	75	10	60	86	0	60	86	0	50	88	
		7		0									
9	13.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
10	15.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		<i>P</i>	0,46 (n.s.)			0,42 (n.s.)			0,75 (n.s.)			0,27 (n.s.)	



Slika 24. Kumulativni postotak preživljavanja kroz proteklo poslijetransplantacijsko vrijeme, za dvije kategorije bolesnika prema ukupnom broju nepodudarnosti u HLA lokusima A, B i DR. U obradi podataka bolesnici su kategorizirani u 3 skupine prema ukupnom broju nepodudarnosti (0-1, 2-4 i 5-6), no u trećoj kategoriji je premali broj slučajeva za izračun preživljavanja.

#### 4.2.4 ANALIZA PREŽIVLJAVANJA TRANSPLANTATA S OBZIROM NA CITOTOKSIČNA PROTUTIJELA U SERUMU

Drugi važan imunološki čimbenik svakako predstavljaju citotoksična protutijela u serumu primatelja prije transplantacije (panel reactive antibody ili PRA u anglosaksonskoj literaturi). Analizirajući uzorak primatelja, mi smo ih grupirali u 3 skupine s obzirom na postotak PRA: 0%, 6-84% i >85%, no zbog premalog broja ispitanika u posljednoj grupi (PRA>85%) ograničili smo analizu samo na dvije grupe (tablica 26):

1. PRA prisutna u serumu prije transplantacije
2. PRA negativna u serumu prije transplantacije

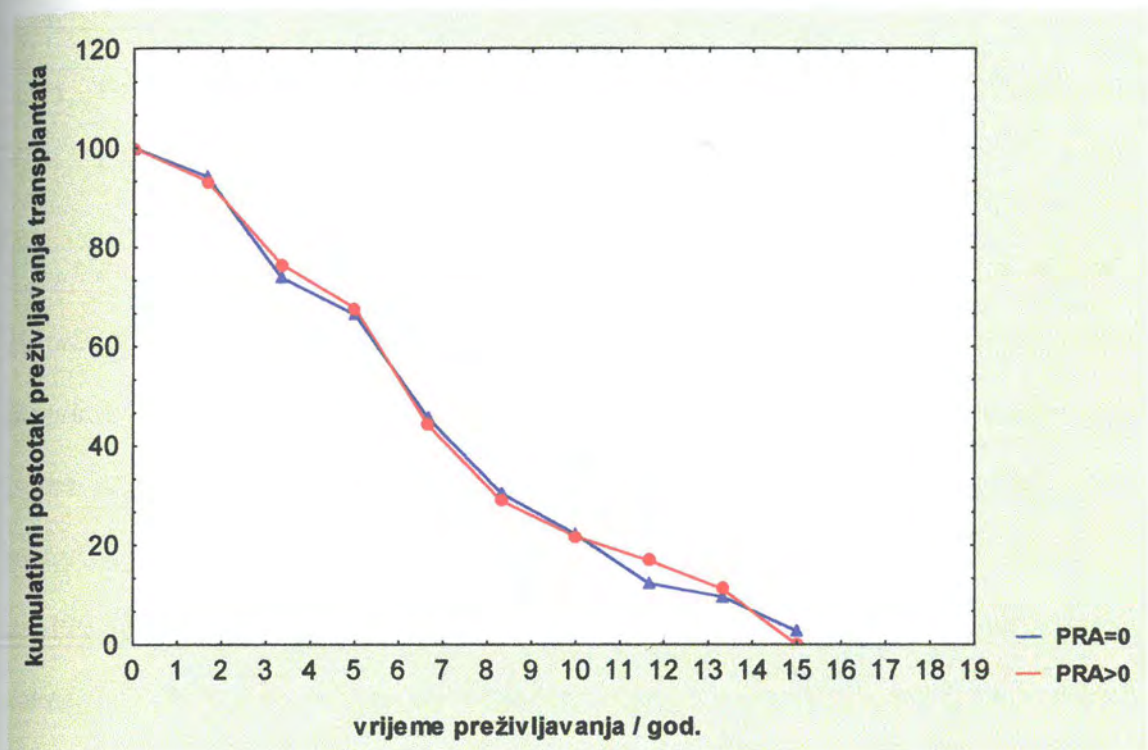
Iz životne tablice 27 i slike 25 vidi se da nema statistički značajne razlike u preživljavanju između ove dvije grupe ( $p=0,41$ ).

**Tablica 26:** Preživljavanje s obzirom na prisutnost *panel reactive antibodies* (PRA) u serumu: bolesnici su podijeljeni u dvije skupine: 1. bez prisutnosti PRA i 2. PRA >0

panel reactive antibodies (PRA)	ukupni broj bolesnika	broj odbacivanja	preživljavanje transplantata / god.		
			Medijan	srednja vrijednost	SD
Odsutni	175	74	3	4,3	3,7
Prisutni	51	20	4	4,4	3,9
<b>Ukupno</b>	<b>226</b>	<b>94</b>			

**Tablica 27:** Životna tablica za preživljavanje transplantata u ove dvije grupe bolesnika

br. int.	početak intervala / god.	% preživljavanja (P)		p
		PRA=0	PRA>0	
1	0	94	93	0,41 (n.s.)
2	1.67	78	82	
3	3.33	90	88	
4	5.0	69	65	
5	6.67	67	66	
6	8.33	73	75	
7	10.0	56	78	
8	11.67	78	67	
9	13.33	28	0	
10	15.0	0	0	



Slika 25. Kumulativni postotak preživljavanja kroz proteklo poslijetransplantacijsko vrijeme, za dvije kategorije bolesnika prema prisutnosti *panel reactive antibodies* (PRA) u serumu (vidi legendu)

### 4.3 REZULTATI PROSPEKTIVNE IMUNOLOŠKE ANALIZE

#### 4.3.1 UČINAK IL-2 NA ISPOLJAVANJE PERFORINA U LIMFOCITIMA PERIFERNE KRVI TRANSPLANTIRANIH BOLESNIKA

Poznato je da je IL-2 jedan od najmoćnijih citokina odgovornih za regulaciju ekspresije perforina u perifernoj krvi. Istraživanja su pokazala da je IL-2 snažno eksprimiran u transplantatu tijekom akutne krize odbacivanja (340). Stoga smo željeli ispitati učinak stimulacije limfocita periferne krvi s IL-2 (100 i.j./ml) kroz 6<sup>h</sup> i kroz 24<sup>h</sup> u transplantiranih bolesnika koji toleriraju presađeni bubreg dulje od tri godine. Uočili smo da 100 i.j./ml ne povećava udio perforin pozitivnih limfocita (P+), niti nakon 6<sup>h</sup>, a niti nakon 24<sup>h</sup>, iako, u transplantiranih bolesnika značajno povećava prosječan broj molekula perforina po pojedinoj stanici, tzv. AFI (od engl. Average Fluorescence Intensity) nakon 6<sup>h</sup> ( $p < 0,05$ , slika 26). Stimulacija limfocita periferne krvi (LPK) sa 100 i.j./ml IL-2 u zdravih odraslih osoba ne povećava udio P+ stanica, a niti prosječan broj molekula perforina po pojedinoj stanici (slika 26). Interesantno je da se ne razlikuje postotak P+ stanica prije stimulacije IL-2 u zdravih i transplantiranih osoba. Nema značajnih razlika niti 6<sup>h</sup> i 24<sup>h</sup> nakon stimulacije s IL-2. Međutim broj molekula P po stanici (AFI vrijednost) mnogostruko je niži u bolesnika s transplantiranim bubregom, koji su podvrgnuti višegodišnjoj imunosupresivnoj terapiji (AFI-15 u usporedbi s AFI-41 u zdravih osoba,  $p < 0,05$ ). Stimulacija s IL-2 u dozi od 100 i.j./ml samo je lagano povisila AFI za P u zdravih osoba, ali je statistički značajno povisila u transplantiranih, kako je i rečeno. Međutim, iste



više vrijednosti u transplantiranih (AFI-24) su niže od AFI vrijednosti u zdravih nakon 6-satne stimulacije (AFI-45) i približavaju se istoj vrijednosti nakon 24<sup>h</sup>.

Pratili smo i učinak stimulacije istom koncentracijom IL-2 na P+ subpopulacijama LPK. Vidjeli smo da se u transplantiranih bolesnika ne povećava udio dvostruko pozitivnih P+CD8+, ali se povećava prosječan broj molekula perforina po pojedinoj stanici nakon 24-satne stimulacije ( $p < 0,05$ , slika 27). U zdravih osoba ne povećava se udio dvostruko pozitivnih P+CD8+ limfocita, niti se povećava prosječan broj molekula perforina po pojedinoj stanici nakon 6-satne i 24-satne stimulacije sa 100 i.j./ml IL-2 (slika 27). Postotak P+CD8+ stanica je prije stimulacije gotovo isti u zdravih i transplantiranih i ne mijenja se značajno niti nakon stimulacije. I ovdje su AFI vrijednosti u transplantiranih prije i nakon stimulacije IL-2 dvostruko niže nego u zdravih. Šest sati nakon stimulacije, AFI vrijednost za P u CD8+P+ stanicama transplantiranih je značajno niža nego u zdravih osoba ( $p < 0,01$ ). Tijekom 24-satne kultivacije s 100 i.j./ml IL-2 došlo je do značajnog porasta u transplantiranih ( $p < 0,04$ ), dok u zdravih taj porast nije bio značajan.

Također, stimulacija limfocita periferne krvi sa IL-2 ne povećava udio dvostruko pozitivnih P+CD56+ limfocita niti u zdravih, niti u transplantiranih osoba, a postotak P+CD56+ je podjednak u obje grupe. U transplantiranih bolesnika AFI vrijednost je višestruko niža nego u zdravih, kako prije, tako i 24 sata nakon stimulacije ( $p < 0,05$ , slika 28). No, dok se u zdravih gotovo ne mijenja tijekom 6 i 24-satne stimulacije, u transplantiranih se značajno povećava nakon 6-satne stimulacije ( $p < 0,05$ , slika 28). Interesantno je primjetiti da u obje subpopulacije dolazi do porasta AFI vrijednosti za

perforin, s time da u P+CD56+ limfocitima koji su prva linija obrane organizma taj porast nastupa ranije, 6<sup>h</sup> nakon stimulacije, a u CD8+P+ stanicama 24<sup>h</sup> nakon stimulacije.

#### **4.3.2 UČINAK IL-15 NA ISPOLJAVANJE PERFORINA U LIMFOCITIMA PERIFERNE KRVI TRANSPLANTIRANIH I DIJALIZIRANIH BOLESNIKA**

Punih dvadeset godina IL-2 je smatran «kraljem» citokinske obitelji. Međutim, otkriće da IL-2 deficitni sojevi miševa imaju održane funkcije imunološkog sustava i mogu odbaciti transplantat isto kao i normalni miševi (328); te da blokada IL-2 u samom transplantatu ne sprečava odbacivanje (174, 408), potaklo je na istraživanje uloge ostalih citokina u transplantacijskoj imunologiji. Interleukin-15 je po svojoj biološkoj aktivnosti sličan IL-2, a smatra se da u slučaju nedostatka IL-2 preuzima njegovu funkciju. Interleukin-15 je nađen tijekom odbacivanja humanih bubrežnih transplantata, neovisno o IL-2 (331, 422). Stoga smo željeli ispitati učinak trodnevne stimulacije limfocita periferne krvi s IL-15 (2ng/ml) u bolesnika koji toleriraju transplantirani bubreg dulje od tri godine. Uočili smo da IL-15 višestruko povećava udio perforin pozitivnih limfocita periferne krvi ( $p < 0,05$ ), za razliku od trodnevne stimulacije s IL-2 i Concavalinom A (ConA), koji ne utječu na postotak perforin pozitivnih limfocita, vjerojatno zbog malog broja uzoraka i stoga velikog raspona vrijednosti (slika 29). Prosječan broj molekula perforina po pojedinoj stanici, (AFI) se ne mijenja u trodnevnoj kulturi, bez obzira da li su limfociti stimulirani IL-2, IL-15 ili ConA (slika 29). U bolesnika koji se redovito hemodijaliziraju, trodnevna

stimulacija limfocita periferne krvi s IL-2, IL-15 ili ConA ne povećava udio perforin pozitivnih stanica, niti prosječan broj molekula perforina po pojedinoj stanici (slika 29). Međutim, interesantno je usporediti učinak stimulacije limfocita periferne krvi dijaliziranih i transplantiranih bolesnika citokinima (IL-2 i IL-15) i ConA kroz tri dana (slika 29). Nema značajne razlike u postotku P+ stanica između dijaliziranih i transplantiranih bolesnika prije stimulacije, ali se razlike pojavljuju nakon stimulacije. Interleukin-15 se pojavljuje kao snažan stimulus za porast ekspresije P u limfocitima transplantiranih (postotak P+limfocita raste s 22% na 75%;  $p < 0,05$ ), dok u dijaliziranih nema nikakvog utjecaja i postotak P+ limfocita je značajno niži nego u transplantiranih ( $p < 0,05$ ). Nema značajnog porasta nakon stimulacije s IL-2 (38%) i ConA (42%).

Prateći subpopulacije dvostruko pozitivnih limfocita periferne krvi nakon stimulacije citokinima u transplantiranih bolesnika, vidjeli smo da IL-15 značajno povećava udio P+CD8+ limfocita periferne krvi ( $p < 0,01$ ), u odnosu na trodnevnu stimulaciju IL-2 i ConA (slika 30). Prosječan broj molekula perforina po pojedinoj stanici, se ne mijenja bez obzira na vrst stimulacije (slika 30). U dijaliziranih bolesnika je postotak P+CD8+ limfocita gotovo jednak kao i u transplantiranih, a trodnevna stimulacije citokinima (IL-2 i IL-15) i ConA ne utječe na njega. Ako usporedimo odgovor CD8+P+ limfocita na stimulaciju citokinima u obje grupe, vidimo da je on znatno jači i viši u transplantiranih bolesnika ( $p < 0,01$ ), dok u dijaliziranih praktički nema odgovora. Vrijednost AFI se u dijaliziranih ne mijenja tijekom trodnevne stimulacije IL-15 i IL-2 i značajno je niža nego li u transplantiranih ( $p < 0,05$ ).

Postotak nestimuliranih P+CD56+ limfocita podjednak je u transplantiranih i dijaliziranih bolesnika. Trodnevna stimulacija IL-2 i ConA ne utječe na postotak CD56+P+ stanica u obje grupe (slika 31). Međutim, IL-15 značajno povećava udio P+CD56+ limfocita periferne krvi u transplantiranih bolesnika ( $p < 0,05$ ), a taj je porast značajno viši nego u dijaliziranih (slika 31,  $p < 0,05$ ). Trodnevna kultivacija ne mijenja AFI vrijednost za perforin u obje grupe, iako je ona niža u dijaliziranih, kako prije stimulacije, tako i nakon nje.

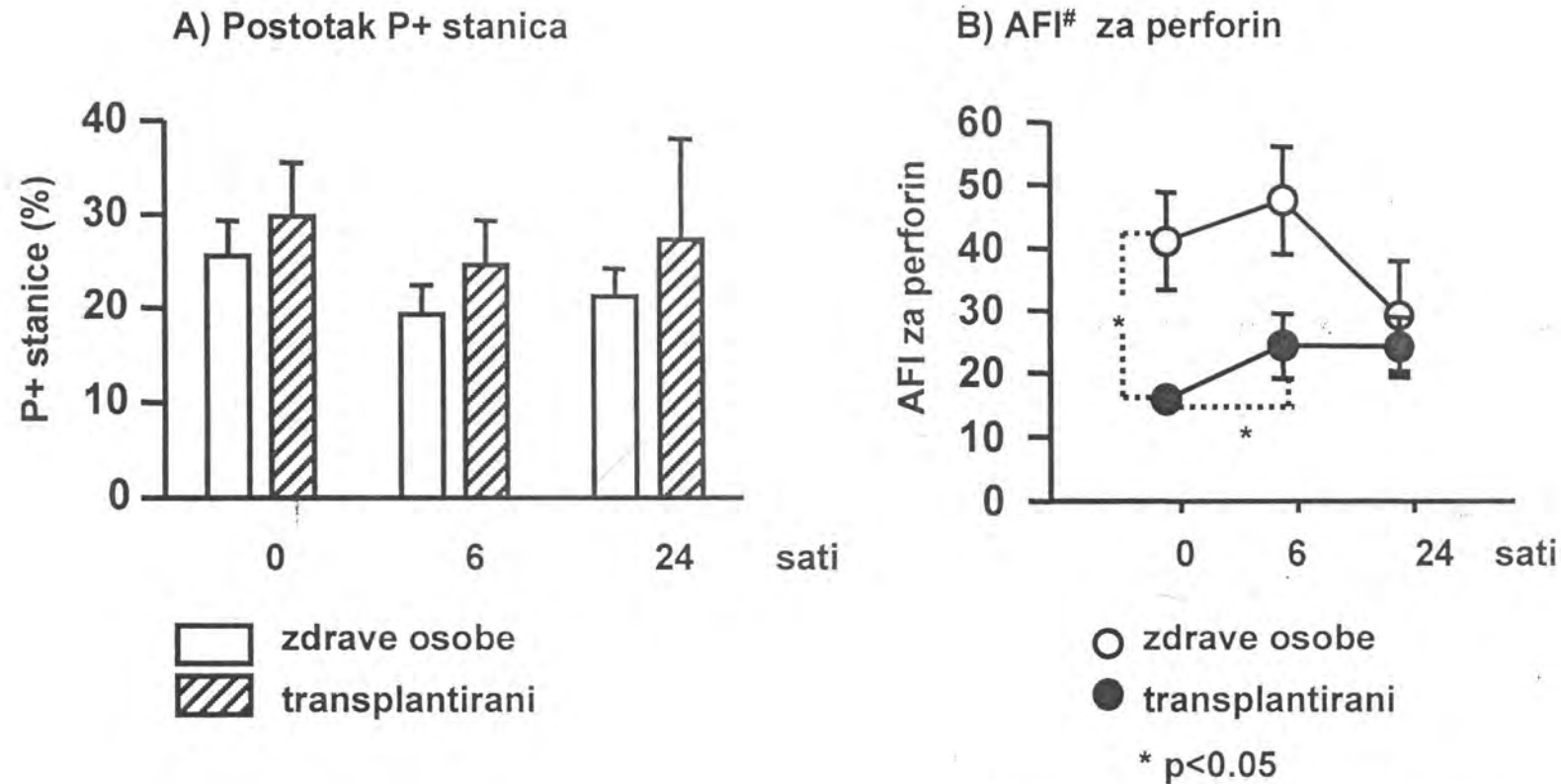
#### **4.3.3 CITOTOKSIČNOST LIMFOCITA PERIFERNE KRVI U TRANSPLANTIRANIH I DIJALIZIRANIH BOLESNIKA**

Budući je perforin glavni citolitički medijator u reakcijama limfocitima posredovane citotoksičnosti, također smo željeli ispitati citolitičku aktivnost NK stanica periferne krvi prema NK osjetljivoj staničnoj liniji K562 u transplantiranih bolesnika. U dvosatnom testu citotoksičnosti ispitivali smo citolitičku sposobnost nestimuliranih limfocita periferne krvi, te nakon 24-satne stimulacije sa IL-2 (100 i.j./ml) protiv ciljnih stanica K562 u različitim omjerima efektorskih i ciljnih stanica (6:1, 12,5:1, 25:1, 50:1) (slika 32). Dvadeset četiri satna stimulacija s IL-2 značajno povećava citolitičku sposobnost limfocita periferne krvi ( $p < 0,01$ ). Usporedno s određivanjem citolitičke aktivnosti ispitivali smo i ispoljenost perforina u limfocitima neposredno prije ulaska u test i nakon što su 2 sata bili u kontaktu s K562 stanicama u omjeru 50:1. Rezultati su pokazali da nestimulirani limfociti periferne krvi ne gube perforin tijekom dvosatnog testa citotoksičnosti, ali se

značajno povećava prosječan broj molekula perforina po pojedinoj stanici ( $p < 0,01$ , slika 33). Za razliku od njih, limfociti stimulirani kroz 24<sup>h</sup> IL-2 (100 i.j./ml) gube perforin tijekom dvosatnog testa citotoksičnosti ( $p < 0,05$ ), dok se prosječan broj molekula perforina po pojedinoj stanici ne mijenja (slika 34).

Ispitali smo i citolitičku sposobnost nestimuliranih limfocita periferne krvi dijaliziranih bolesnika, te nakon 24-satne stimulacije s IL-2 (100 i.j./ml) i IL-15 (5ng/ml) protiv ciljnih K562 stanica u istim omjerima efektorskih i ciljnih stanica (6:1, 12,5:1, 25:1, 50:1). Vidjeli smo da je citolitička sposobnost nestimuliranih limfocita periferne krvi dijaliziranih bolesnika izrazito niska i da IL-2 na nju značajno ne utječe, kao što to čini u transplantiranih bolesnika (slika 35). Međutim, dvadeset četiri satna stimulacija s IL-15 (5ng/ml) značajno povećava citolitičku sposobnost limfocita periferne krvi ( $p < 0,01$ ).

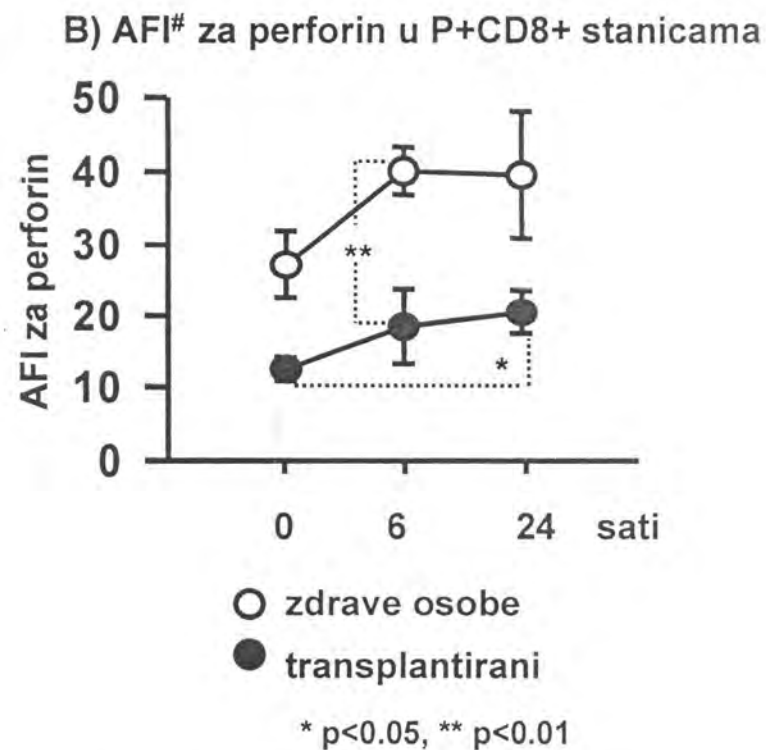
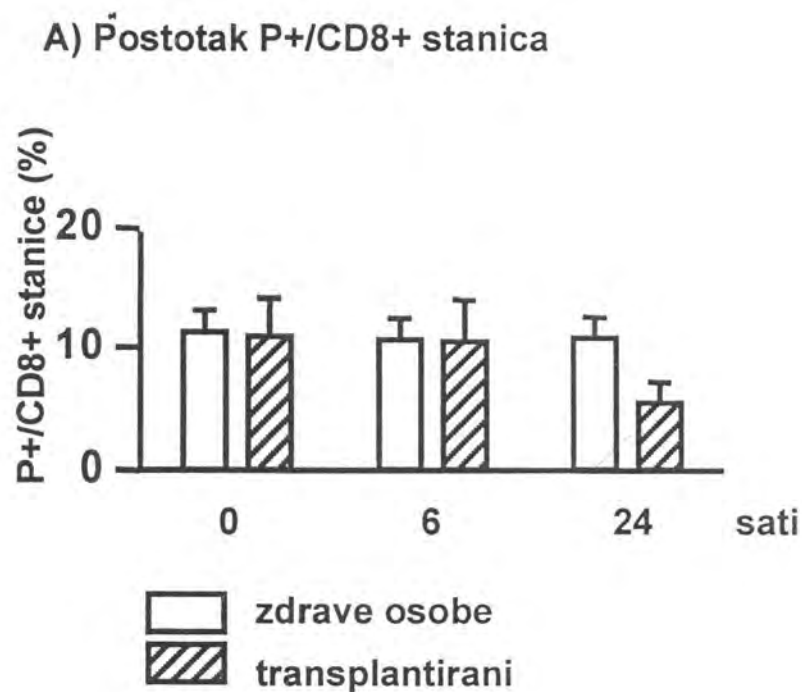
Slika 26. Učinak stimulacije interleukinom-2 (100 i.j./ml) *in vitro* limfocita periferne krvi zdravih osoba i bolesnika s transplantiranim bubregom na ispoljavanje perforina (P):



□ zdrave osobe  
 ▨ transplantirani

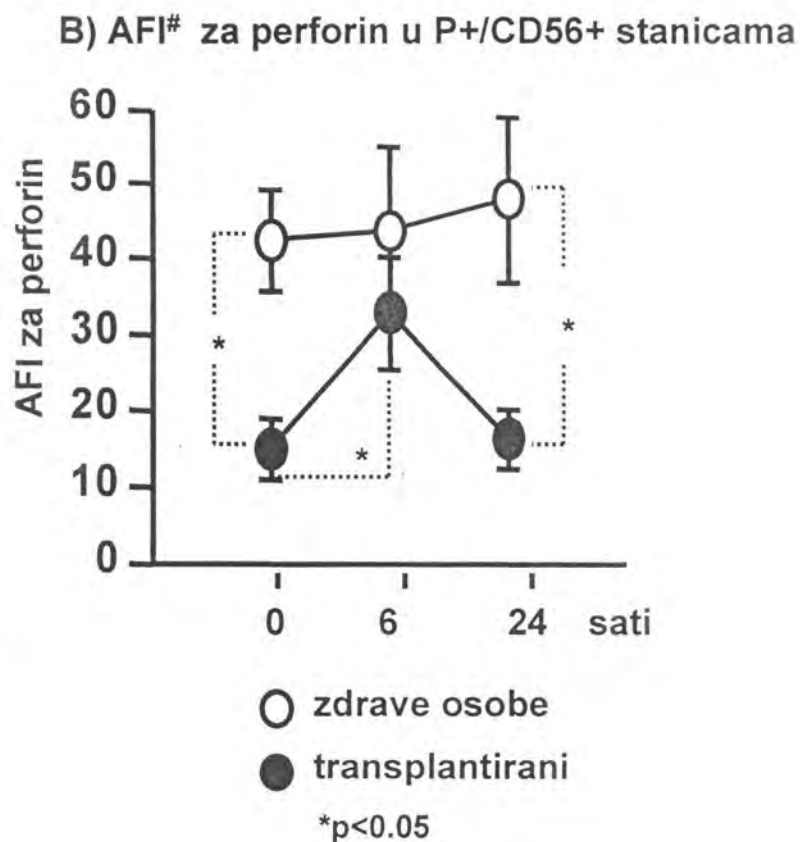
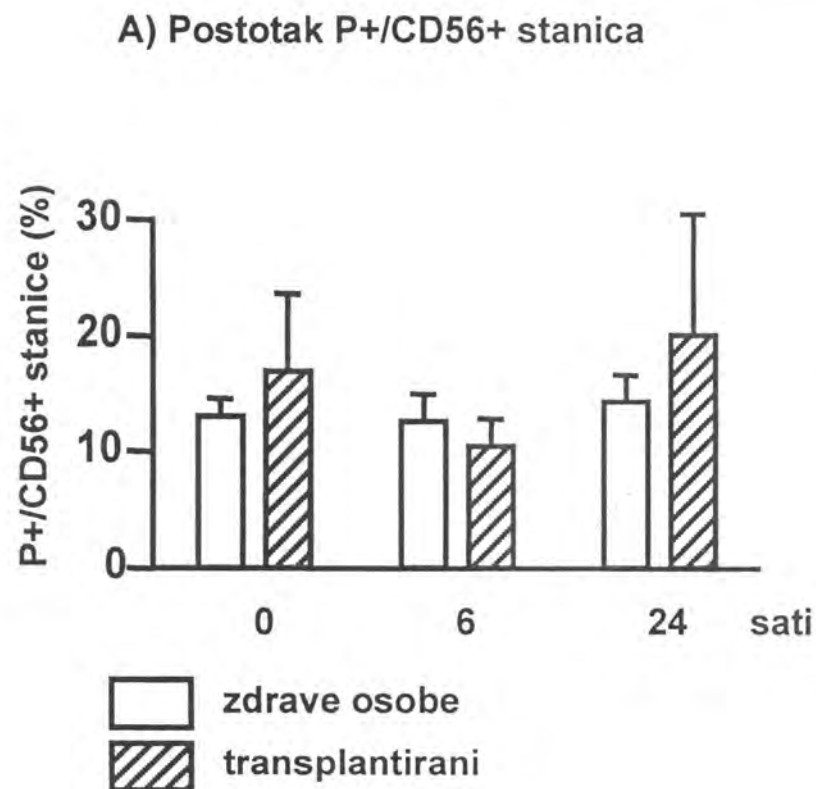
○ zdrave osobe  
 ● transplantirani

Slika 27. Učinak stimulacije interleukinom-2 (100i.j./ml) *in vitro* limfocita periferne krvi zdravih osoba i bolesnika s transplantiranim bubregom na ispoljavanje perforin+ /CD8+ stanica (P+/CD8+):



# Average Fluorescence Intensity

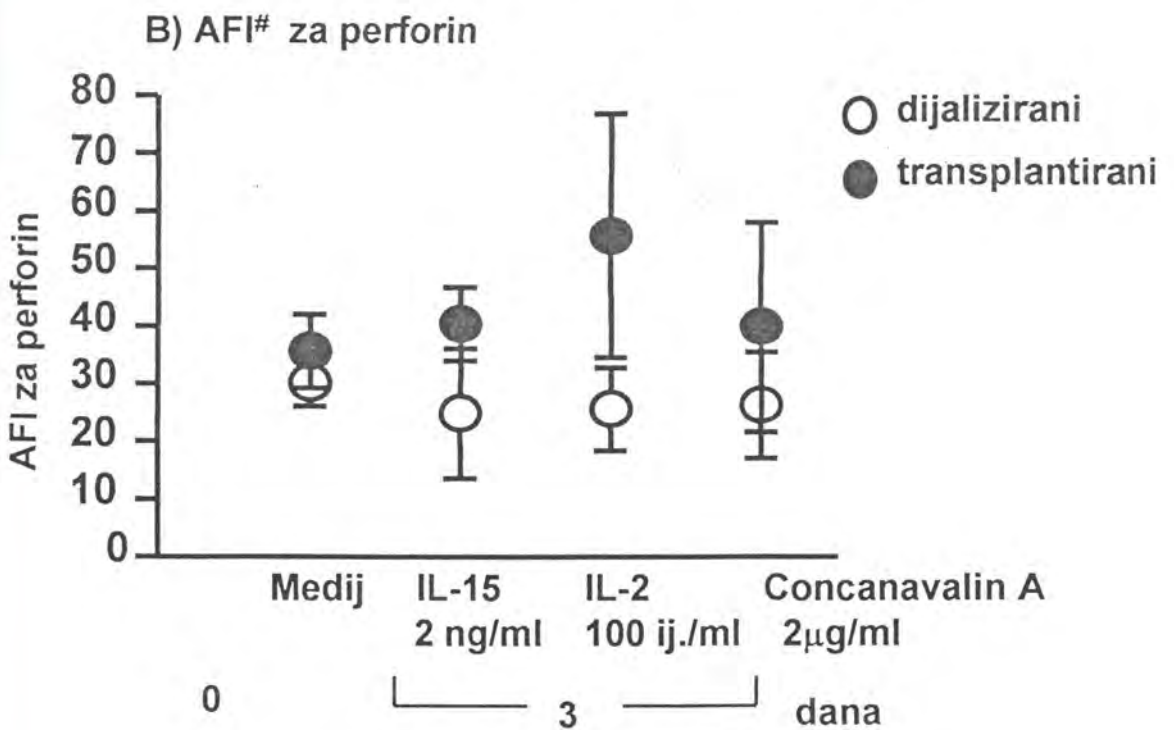
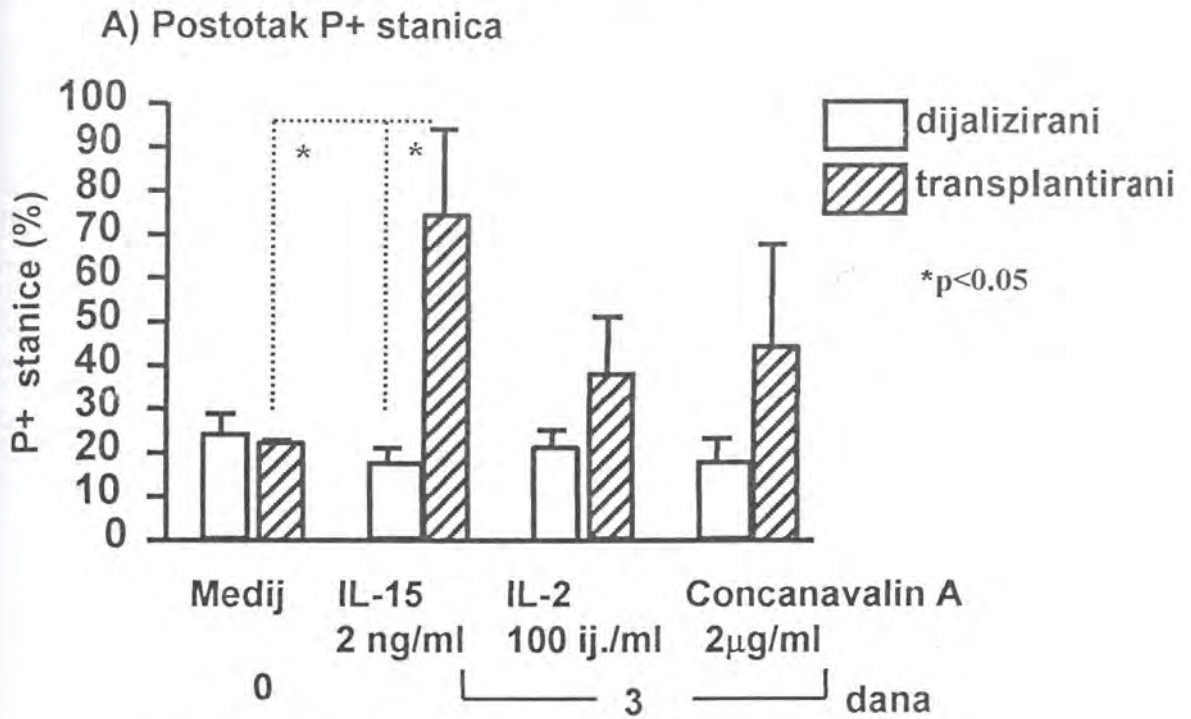
Slika 28. Učinak stimulacije interleukinom-2 (100i.j./ml) *in vitro* limfocita periferne krvi zdravih osoba i bolesnika s transplantiranim bubregom na ispoljavanje perforin+ /CD56+ stanica (P+/CD56+):



# Average Fluorescence Intensity

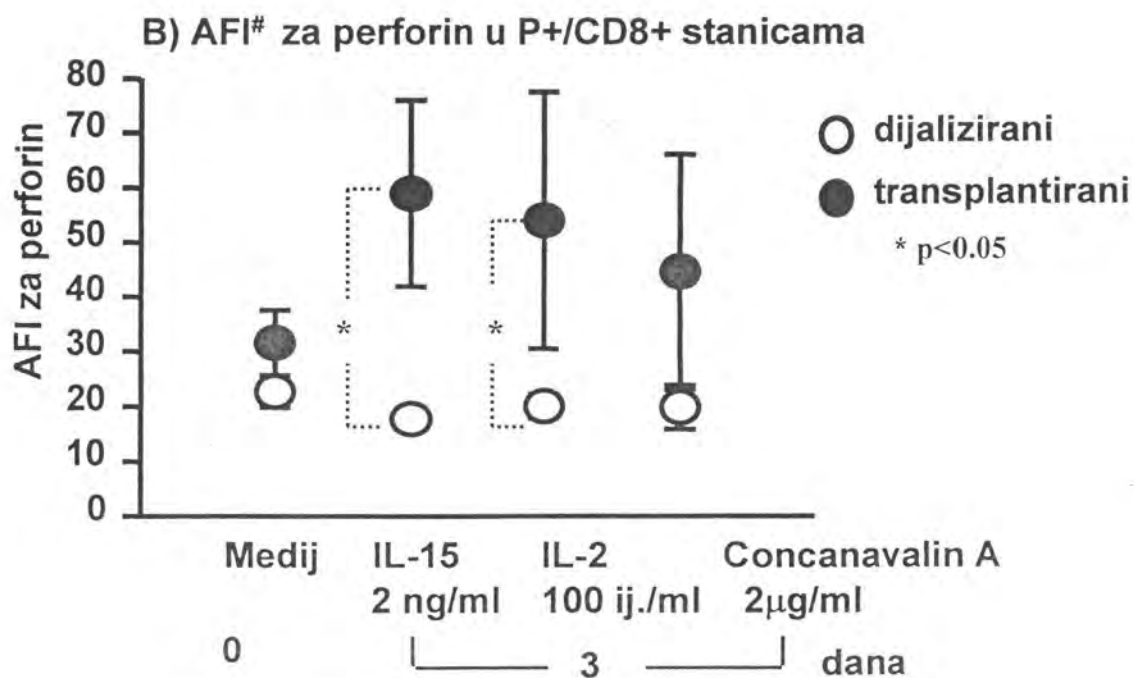
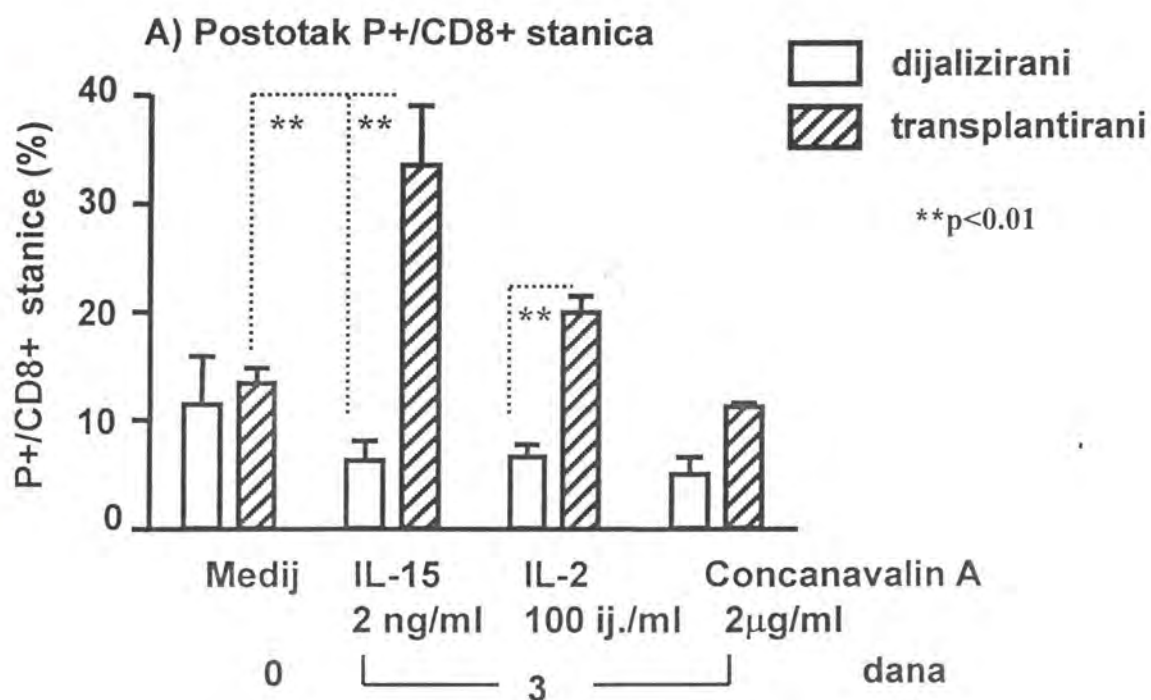


Slika 29. Učinak stimulacije *in vitro* limfocita periferne krvi dijaliziranih bolesnika i bolesnika s transplantiranim bubregom na ispoljavanje perforin+ (P+) stanica:



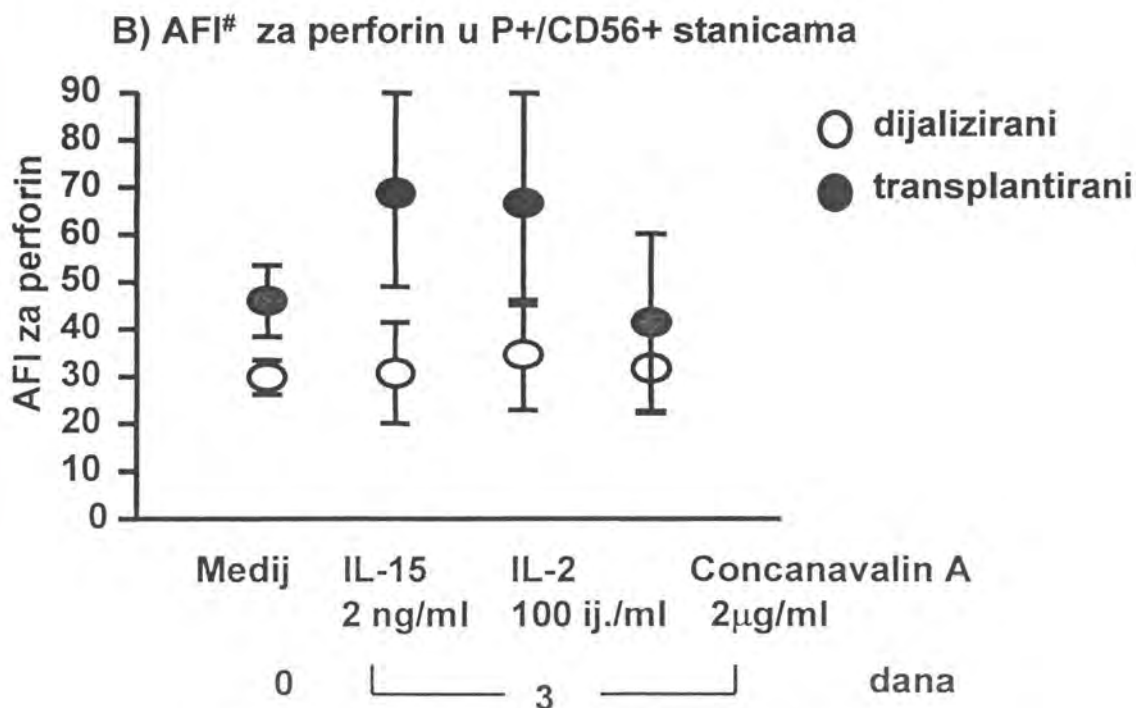
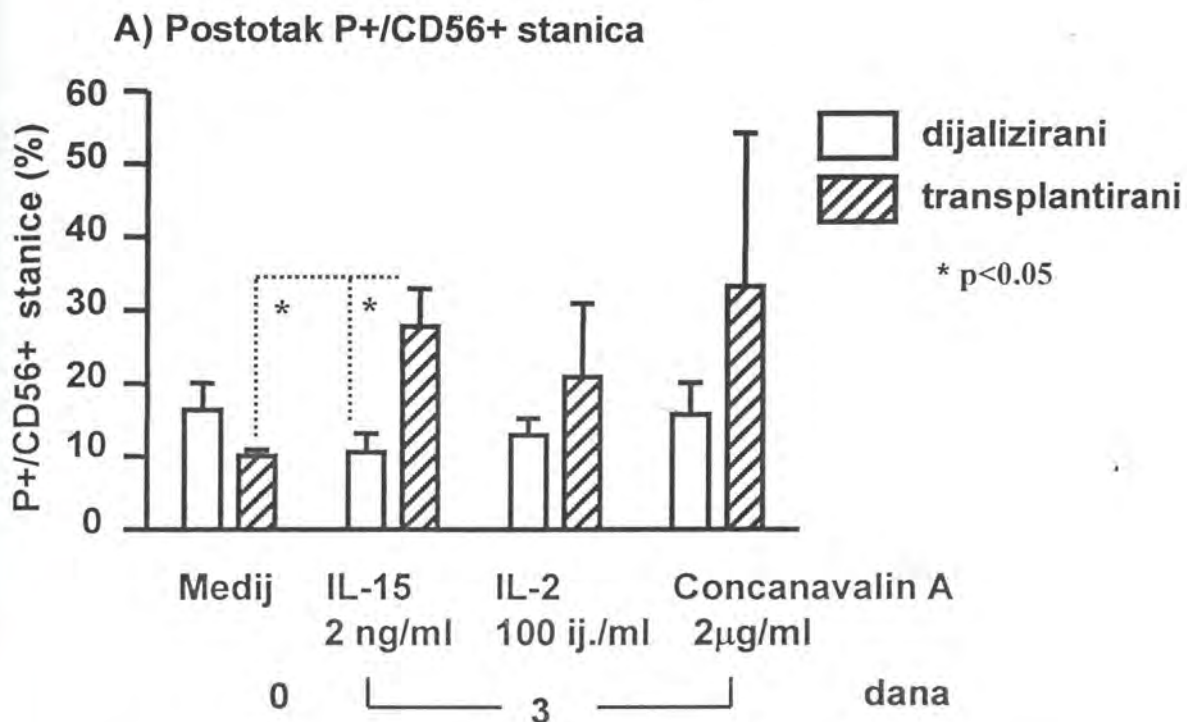
# Average Fluorescence Intensity

**Slika 30. Učinak stimulacije *in vitro* limfocita periferne krvi dijaliziranih bolesnika i bolesnika s transplantiranim bubregom na ispoljavanje perforin+/CD8+ (P+/CD8+) stanica:**



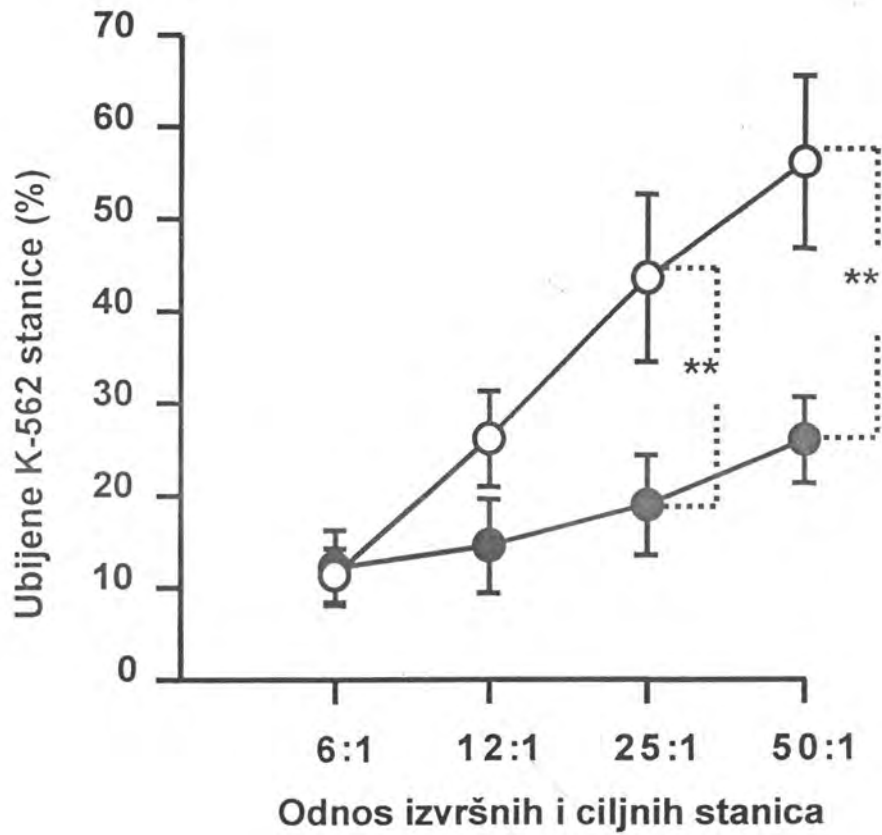
# Average Fluorescence Intensity

**Slika 31. Učinak stimulacije *in vitro* limfocita periferne krvi dijaliziranih bolesnika i bolesnika s transplantiranim bubregom na ispoljavanje perforin+/CD56+ (P+/CD56+) stanica:**



# Average Fluorescence Intensity

Slika 32. IL-2 snažno potiče citotoksičnost limfocita periferne krvi (LPK) u osoba s transplantiranim bubregom

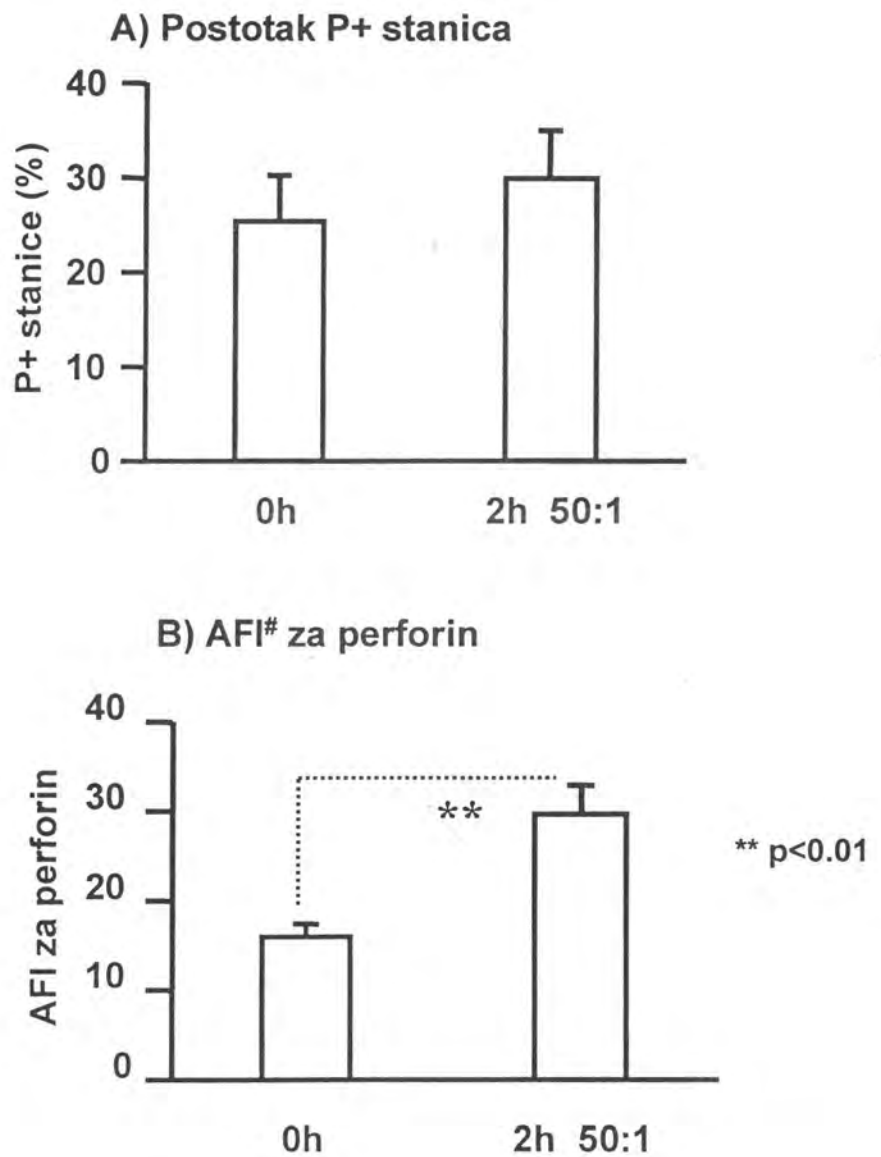


● LPK (24h)

○ LPK + IL2 (100 i.j./ml/24h)

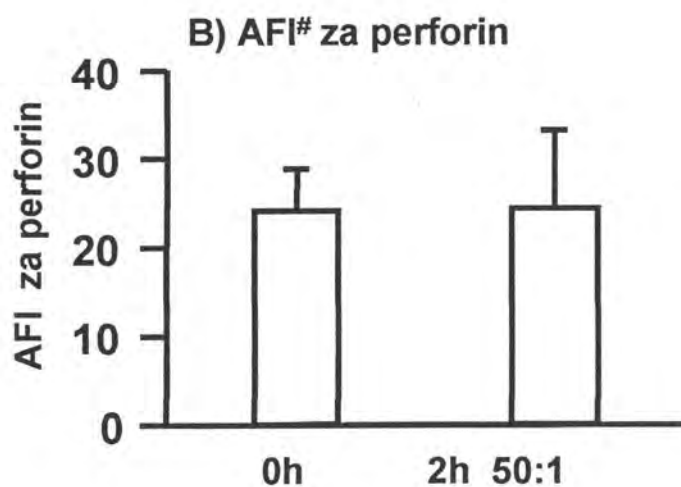
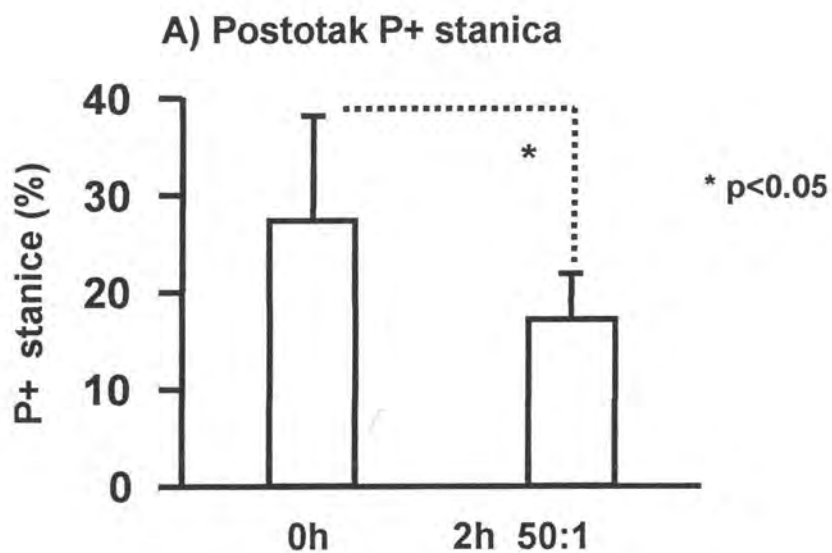
\*\* p<0.01

**Slika 33. Sadržaj citolitičkog medijatora perforina ( P ) u limfocitima periferne krvi (LPK) osoba sa transplantiranim bubregom tijekom 2h testa citotoksičnosti:**



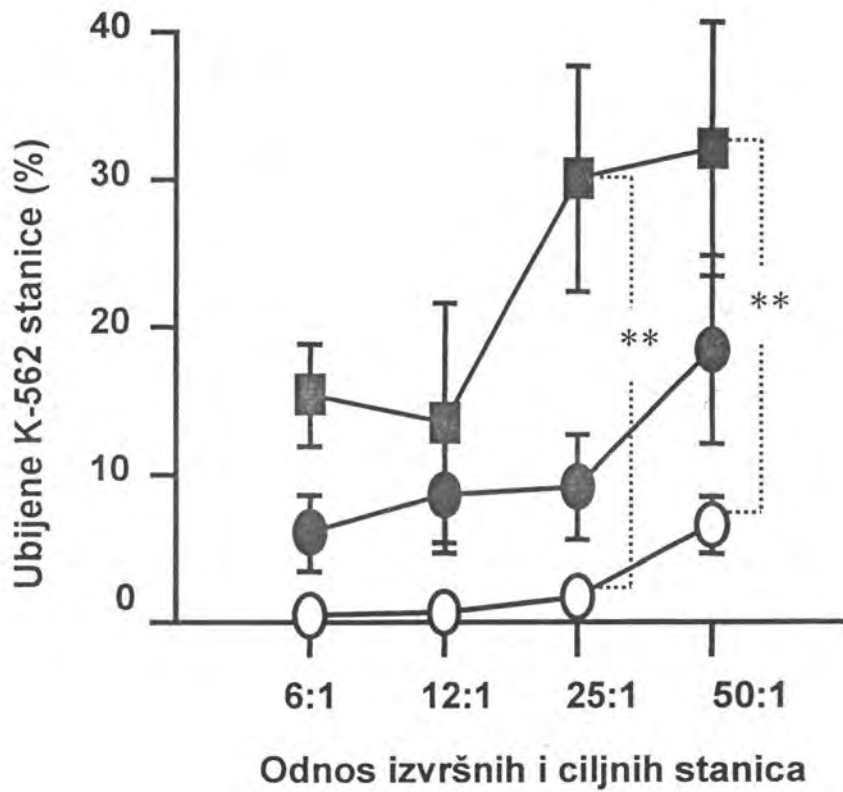
# Average Fluorescence Intensity

**Slika 34. Sadržaj citolitičkog medijatora perforina (P) u interleukin-2 stimuliranim limfocitima periferne krvi (LPK) osoba s transplantiranim bubregom tijekom 2h testa citotoksičnosti:**



# Average Fluorescence Intensity

**Slika 35. Učinak interleukina-2 (IL-2) i interleukina-15 (IL-15) na citoličku aktivnost limfocita periferne krvi (LPK) u dijaliziranih bolesnika protiv NK ošjetljive K-562 stanične linije**



○ LPK (24h)

● LPK + IL-2 (100 i.j./ml/24h)

■ LPK + IL-15 (5 ng/ml/24h)

\*\* p<0.01

## 5 RASPRAVA

### 5.1 RASPRAVA O UTJECAJU NEIMUNOLOŠKIH ČIMBENIKA NA PREŽIVLJAVANJE TRANSPLANTATA

Na početku novog milenija klinička transplantacija se susreće s velikim problemom, a to je nedostatak organa za transplantaciju. U zadnjih par desetljeća intenzivno se radi na proširenju programa transplantacije s nesrodnih davatelja (transplantacija organa s umrlih osoba), a istovremeno se istražuju nove mogućnosti kao napr. transplantacija životinjskih organa, što bi moglo predstavljati i trajno rješenje. Pored transplantacije rožnice, koja je imunološki privilegirano tkivo, transplantacija bubrega je svakako najzastupljeniji vid kliničke transplantacije organa.

Budući da je cilj transplantacije osigurati što duže, a po mogućnosti i trajno preživljavanje presatka, odbacivanje transplantata u prvoj godini ne predstavlja nikakvu dobrobit za bolesnika u usporedbi s dijalizom, a niti u financijskom smislu (cost-benefit). Naime tijekom prve transplantacije dolazi do senzibilizacije primatelja, što otežava ili onemogućava pronalaženje novog podudarnog presatka. Stoga se svakako nameće utvrđivanje parametara koji utječu na ishod transplantacije. Još 1982.g. Van Rood je postavio hijerarhijsku ljestvicu imunoloških faktora koji utječu na ishod transplantacije (375). Prvi na listi tih čimbenika bio bi da li je primatelj jak ili slab reaktor (responder), a slijedeći su prijetransplantacijske transfuzije krvi. Tek na trećem mjestu je imunogeničnost



HLA determinanti (podjednako A, B i DR lokusa), a na četvrtom imunogeničnost non-MHC determinanti, uz naravno međusobne interreakcije svih čimbenika.

Danas se smatra da na preživljavanje presatka utječu tri vrste čimbenika: imunološki, neimunološki ili tzv. klinički i čimbenici koji induciraju imunološku toleranciju. Mnogobrojne studije diljem svijeta u zadnje vrijeme pokušavaju utvrditi utjecaj ovih čimbenika na uspješno preživljavanje presatka. Jedna od njih je i velika CTS studija (Collaborative Transplant Study) koja je započela još 1982.g. u Heidelbergu i traje sve do današnjih dana, a u nju je uključeno preko 300 transplantacijskih centara (8). Najjednostavniji način vrednovanja utjecaja ovih faktora na ishod transplantacije je statistička analiza preživljavanja presatka u različitim grupama primatelja.

Čimbenici koji utječu na ishod transplantacije mogu se podijeliti u tri grupe, ovisno da li su vezani za primatelja, davatelja ili sam transplantirani organ.

Tako je uočeno da na preživljavanje utječe dob primatelja i davatelja organa (3, 45, 46, 103, 152, 192, 307, 313, 315). Analize CTS-a su pokazale da najbolje preživljavanje ima bubreg davatelja u dobi od 16 do 40 godina. Ukoliko su davatelji stariji preživljavanje kroz 5 godina je čak 20% lošije (247). Rezultati iz Eurotransplanta ukazuju na lošije preživljavanje ukoliko su davatelji mlađi od 16 i stariji od 55 godina (315). Studija NIT-a (Nord Italian Transplant) koja je obuhvatila 1169 transplantiranih bolesnika također to potvrđuje. Naime bubreg davatelja mlađeg od 50 godina ima značajno više 4-godišnje preživljavanje, nego li u starijih davatelja (85,3%:73,5%) (307). Također je i postotak za EGF (excellent graft function ) značajno viši u mlađoj grupi davatelja (72,7%:40,8%) (307). Druga veća studija NIT koja je obuhvatila 3101 bolesnika ponovno je to potvrdila

(306). Chertow i sur. su u dvije velike studije potvrdili da je viša životna dob davatelja udružena s lošijim preživljavanjem transplantata (45, 46), a do istih rezultata su došli i Matas i sur. (196). Mi nismo uočili razliku u preživljavanju s obzirom na dob davatelja, što bi se moglo objasniti i premalim brojem bolesnika u našem uzorku, ali niti neke veće studije nisu potvrdile da viša životna dob davatelja lošije utječe na preživljavanje (153, 193).

Također se vidjelo da primatelj iznad 50 godina života ima značajnije lošije preživljavanje transplantata negoli ukoliko je mlađe životne dobi (podaci iz NIT-a: 78,1%:84,4%) (307, 315). Slično tome u starijih bolesnika je i lošija funkcija grafta (EGF) u usporedbi sa mlađom dobnom skupinom (58,3%:70,9%) (307). I nove studije (192, 204) su pokazale da su stariji primatelji izloženi većem riziku za razvoj kroničnog zatajenja transplantata, što se pokazalo neovisnim o dobi davatelja, trajanju hladne ishemije i akutnoj krizi odbacivanja. Mi smo također zapazili statistički značajno bolje 4-godišnje preživljavanje transplantata u starosnoj grupi primatelja od 16-50 godina u odnosu na primatelje preko 50 godina. Pokušali smo usporediti preživljavanje transplantata prateći usporedo starosnu dob i primatelja i davatelja, grupiravši ih u 4 kategorije: primatelj i davatelj mlađi od 50 godina; primatelj stariji od 50 godina, davatelj mlađi od 50 godina; primatelj mlađi od 50 godina, davatelj stariji od 50 godina i primatelj i davatelj stariji od 50 godina. Iako nismo dobili statistički značajnu razliku u preživljavanju, ipak je uočljiv trend lošijeg preživljavanja ukoliko su i primatelj i davatelj stariji od 50 godina. Zaključno bismo mogli reći da će, ukoliko su i primatelj i davatelj mlađi od 50 godina,

ishod transplantacije, gledan kroz 4-godišnje preživljavanje i funkciju transplantata, biti svakako znatno bolji, nego ukoliko pripadaju starijim dobnim skupinama.

Međutim, sve je više uremičnih bolesnika starijih od 65 godina života (370). Budući da starija životna dob primatelja ne predstavlja povoljan čimbenik za preživljavanje transplantata, mogućnost transplantacije treba pažljivo razmotriti, uzimajući u obzir ne samo medicinsku, već i etičku, te socijalnu problematiku. U NIT-u su ovaj problem pokušali riješiti uvođenjem protokola tzv. dvostrukog bubrega (double kidney), tj. oba bubrega davatelja starijeg od 60 godina (oštećena dijabetesom, hipertenzijom i sl) se transplantiraju primatelju približno iste dobi, koji je prethodno informiran o stanju bubrega (197, 278), što je pokazalo dobre rezultate, a isto izvještavaju Mackenzie i suradnici (197).

Osim dobi primatelja i davatelja, postavilo se pitanje utjecaja spola. Još je ranih sedamdesetih godina uočeno da spol primatelja nema bitan utjecaj na ishod transplantacije (223). Što se spola davatelja tiče, vidjelo se da bubreg muškog davatelja preživljava bolje nego bubreg ženskog, a najlošije preživljavaju bubrezi ženskih davatelja u muških primatelja (75), što su potvrdile i kasnije studije (348, 45). Analize u NIT-u pokazale su da spol primatelja i davatelja ne igraju ulogu u uspjehu transplantacije, što se slaže i s našim rezultatima.

Terasaki i sur (348), su ukazali na 5 čimbenika koji negativno utječu na preživljavanje transplantata: transplantacija dječjih bubrega koji potječu od davatelja starosne dobi 4-6 godina, kombinacija ženski davatelj/muški primatelj, javljanje akutnih kriza odbacivanja i kadaverična transplantacija (naspram živuće). Chertow i sur. (45) su u velikoj studiji (31515 slučajeva kadaverične transplantacije) uočili da je ishod

transplantacije lošiji ukoliko su davatelji starije životne dobi, ženskog spola ili crne rase, uz povećanu tjelesnu površinu u primatelja kao viši faktor rizika. U drugoj analizi (8582 slučajeva transplantacije sa živog donora) ponovno su potvrdili da starija životna dob davatelja i povećana tjelesna površina u primatelja imaju negativan efekat (vezano uz moguću hiperfiltraciju) na preživljavanje transplantata. Pored toga navode i čimbenike rizika vezane za primatelja kao što su mlađa dob, crna rasa i prisutnost citotoksičnih protutijela (PRA) (46). Želeći utvrditi koji su čimbenici rizika za kasni gubitak funkcije transplantata, Matas i sur. (196) su uočili akutnu krizu odbacivanja kao jedini značajan čimbenik rizika tijekom transplantacije bubrega sa živog donora. U slučaju kadaverične transplantacije rizična je dob davatelja preko 50 godina, te crna rasa primatelja. Massy i sur. su u svom istraživanju pratili utjecaj imunoloških i neimunoloških čimbenika za razvoj kroničnog odbacivanja (193), te nisu uočili značajniji utjecaj dobi i rase davatelja, kao niti indeksa tjelesnih masa primatelja i davatelja. Značajan čimbenik rizika je akutna kriza odbacivanja, povišena razina triglicerida u serumu i proteinuria (193).

Trajanje dijalize prije transplantacije općenito nema značajan utjecaj na preživljavanje bolesnika i transplantata, osim u mlađih od 15 godina u kojih dugotrajne dijalize mogu biti štetne (377). Studije NIT-a su pokazale da nema razlike u preživljavanju transplantata, bez obzira da li je dijaliza trajala manje ili više od 3 godine (307). U našem istraživanju vrijeme provedeno na dijalizi prije transplantacije nije utjecalo na ishod transplantacije, što se podudara sa rezultatima CTS i NIT-a.

Vidjelo se da je i stanje transplantata važno za njegovo preživljavanje. Iako većina studija nije dokazala utjecaj trajanja hladne ishemije na preživljavanje transplantata,

Amroso i sur. su primjetili da trajanje hladne ishemije bubrega, prije transplantacije, dulje od 36 sati pogoršava preživljavanje (8). Smits i sur. su uočili da je, ukoliko je hladna ishemija trajala više od 24 sata, rizik gubitka bubrežnog transplantata značajno viši (316). Smatra se da akutna ishemija dovodi do lokalnog oslobađanja citokina u bubregu (Interferona gamma, transformirajućeg čimbenika rasta beta-1, IL-2, IL-10), posljedičnog oštećenja bubrežnog tkiva, te kasnije gubitka transplantata (87). Prednost kratkotrajne hladne ishemije je uočena praćenjem živućih nesrodničkih transplantata (313).

NIT studija sugerira da bubrezi transplantirani nakon 24 sata hladne ishemije imaju lošije preživljavanje nego ukoliko su transplantirani unutar 24 sata (69,2%:83,6%), međutim rezultat nije statistički značajan. Njihova kasnija studija na većem broju transplantiranih ne pokazuje razliku u preživljavanju u odnosu na trajanje hladne ishemije bubrega, što odgovara našim rezultatima. Neke studije su pokušale pokazati da kratkotrajna hladna ishemija može smanjiti ili čak poništiti potrebu za HLA tipiziranjem (326). Međutim CTS je pokazala da nepodudarnost u HLA sustavu negativno utječe, čak i ako je hladna ishemija trajala kraće od 7 sati (245, 246).

Na žalost većina kliničkih studija ne prati istovremeno i imunološke i neimunološke čimbenike. Međutim posljednjih nekoliko godina sve je više dokaza o zajedničkom međudjelovanju ovih čimbenika (196, 316, 235, 54, 145, 120).

Danas se nameće važnost prepoznavanja neimunoloških čimbenika u dugoročnom preživljavanju transplantata (247, 80, 257), budući je njihov štetan utjecaj stalan (316), za razliku od imunoloških čiji negativan efekat lagano opada s vremenom. Tako su Smits i sur. primjetili da je visoka životna dob primatelja konstantno udružena sa povećanim

rizikom gubitka transplantata, bez obzira na vrijeme proteklo od transplantacije -efekat ovisan o vremenu (time-dependent effect u anglosaksonskoj literaturi) (316). Matas i sur. sugeriraju da u slučaju kadaverične transplantacije i imunološki i neimunološki čimbenici utječu na ishod transplantacije (196). Međutim, ako se radi o transplantaciji bubrega živog donora, značajnu ulogu imaju samo imunološki čimbenici. Tako su Kerr i sur. (141) izvijestili da dob živućeg davatelja ne utječe na rezultat transplantacije. Naime u živog davatelja bubreg nije izložen oštećenjima, kao u slučaju kadaverične transplantacije. Može se pretpostaviti da je smanjen broj funkcionalnih nefrona u starijoj dobi, ukoliko nisu prethodno bili izloženi oštećenjima, dostatan za uspješnu transplantaciju.

## 5.2 RASPRAVA O UTJECAJU IMUNOLOŠKIH ČIMBENIKA NA PREŽIVLJAVANJE TRANSPLANTATA

Glavni je cilj kliničke transplantacije tkiva i organa osigurati dugogodišnje preživljavanje transplantata. Iako je došlo do značajnog napretka na polju transplantacije bubrega, gubitak transplantata, bilo kao posljedica akutnog ili kroničnog odbacivanja, i dalje predstavlja velik problem. Nastoji se pronaći metoda koja će, što je ranije moguće, ukazati na reakciju odbacivanja koja se u transplantiranom organu odvija, kako bi se pravovremenom i uspješnom imunosupresivnom terapijom spriječilo odbacivanje transplantata. Današnja dijagnostika se uglavnom zasniva na utvrđivanju disfunkcije transplantata i histopatološkom ispitivanju. Tipična klinička slika uz azotemiju i staničnu infiltraciju transplantata je nedovoljna, i najčešće se dijagnoza akutne krize postavlja retrospektivno, prema odgovoru na imunosupresivni protokol u krizi odbacivanja.

Danas kada je akutna kriza odbacivanja sve rjeđi uzrok gubitka transplantiranog organa, u središtu interesa se našlo kronično odbacivanje, tj. imunološki (antigeni) čimbenici koji ga uzrokuju. Pretpostavlja se da je u većine transplantiranih kroničnom odbacivanju prethodila akutna kriza odbacivanja (195, 371). Na mišjem eksperimentalnom modelu se vidjelo da je razvoj histoloških oštećenja karakterističnih za kronično odbacivanje proporcionalan broju akutnih kriza odbacivanja (121).

Akutna kriza predstavlja čimbenik rizika budući da dolazi do ireverzibilnog oštećenja nefrona, koja u pravilu dovodi do pojačane aktivnost preostalih nefrona (196).

Tijekom transplantacije dolazi do imunog konflikta između antigenih struktura

transplantata i imunokompetentnih stanica primatelja. Jedan od glavnih čimbenika je svakako HLA podudarnost (od Human leucocyte antigens-HLA ili u anglosaksonskoj literaturi Major Histocompatibility Complex-MHC) između primatelja i presađenog organa. Još 1966.g. Van Rood i sur. otkrivaju da kožni transplantat presađen između HLA i ABO identičnih srodnika značajno dulje preživljava, nego ako su podudarni samo u jednom sustavu (375). Do kraja sedamdesetih godina se vodilo računa samo o podudarnosti u HLA-A i B lokusu, dok se danas najveće značenje pridaje DR, zatim B i nešto manje A lokusu. Postoje vrlo jasni dokazi o važnosti HLA antigena klase I i II u preživljavanju transplantata.

Antigeni klase I su kodirani lokusima HLA-A, B i C, a s obzirom na njihovu rasprostranjenost u organizmu, Dausset ih je nazvao identifikacijskom kartom organizma (63). Oni imaju funkciju definiranja vlastitog i prepoznavanje stranog ili izmjenjenog vlastitog (63). Opelz i sur. su pokazali da podudarnost u HLA-A i B lokusu s davateljem nije imala utjecaj na 5-godišnje preživljavanje transplantata (238), što se slaže s našim rezultatima. Druge studije su sugerirale da bolesnici podudarni sa davateljem u ovim lokusima imaju bolje preživljavanje, nego li oni nepodudarni (86). Istraživanja provedena u NIT-u (Nord Italian Transplant) potvrđuju da podudarnost u HLA-A i B lokusu zajedno sa podudarnošću u DRB1 vodi značajno boljem preživljavanju i funkciji transplantata (307).

Antigeni klase II su kodirani DR, DQ, DP, DO i DN lokusima, a nalaze se na stanicama koje su odgovorne za prezentiranje antigena i indukciju imunog odgovora. Uloga HLA-DR lokusa u transplantaciji bubrega je neosporna. Prvi su je dokumentirali Ting i Morris (354), a potvrdile su brojne kasnije studije (238, 334). Vidjelo se da podudarnost u DR lokusu ima veći utjecaj na preživljavanje presatka (352) vjerojatno zbog njegove veće



imunogeničnosti i jače ekspresije DR molekula na endotelu presađenog bubrega (72). Nedavno je uočeno da je pri ponovnim transplantacijama značajna podudarnost na nivou DR splitova (243). Proučavanjem zajedničkog utjecaja DR lokusa u kombinaciji sa ostalim, pokazalo se da podudarnost u DR i B lokus bitno poboljšava preživljavanje presatka (197).

U analizama Eurotransplanta se stalno isticao pozitivan efekt podudarnosti u HLA sustavu kako na jednogodišnje, tako i na 5-godišnje preživljavanje presatka (353). Na grupi od 13000 transplantiranih kadaveričnih bubrega vidjelo se da ukoliko su primatelj i davatelj potpuno podudarni u HLA sustavu (nula nepodudarnosti – 0 MM), preživljavanje je značajno bolje nego u onih sa 2 MM, a isto tako i funkcija transplantata (353), a potpuno neovisno o primjeni ciklosporinske terapije. Slične analize iz različitih centara diljem svijeta pokazale su iste rezultate (126, 334). Međutim, ponovnom analizom prognostičkih faktora u Eurotransplantu vidjelo se da je podudarnost u HLA sustavu značajna tijekom prve dvije godine poslije transplantacije, dok se kasnije taj efekt gubi (315). Analiza podataka u našem centru nije pokazala statistički značajno preživljavanje transplantata s obzirom na podudarnost u HLA sustavu zbog premalog broja ispitanika u uzorku.

Novija uzvješća o važnosti HLA sustava u transplantaciji bubrega koncentriraju se na nacionalnu (283) i internacionalnu razinu (242, 314). Javlja se potreba za zadovoljavajućim statističkim testovima koji će pravilno vrednovati prikupljene podatke iz nekoliko centara. Međutim postoji i problem poznat kao "efekt centra", što je vodilo kritiziranju multicentričnih podataka, međutim studije s izrazito velikim brojem bolesnika uključenih u analizu, mnogo su manje podložne utjecaju neuobičajenih slučajeva iz pojedinih centara (47).

Uz mnogobrojne rane radove koji govore o lošem preživljavanju transplantata u senzibiliziranih bolesnika, postoje i oni koji govore da bolesnici s prisutnim citotoksičnim protutijelima (PRA) preživljavaju jednako dobro (406). Visoko imunizirani bolesnici (PRA viša od 85%) imaju tri puta veći rizik od gubitka transplantata u prvom mjesecu nakon transplantacije u poređenju sa neimuniziranim bolesnicima (316). Taj negativni utjecaj perzistira u čitavom poslijetransplantacijskom razdoblju i može biti jedan od glavnih razloga kasnog gubitka transplantata (316). Chertow i sur. su potvrdili negativan utjecaj visokog postotka PRA u primatelja na preživljavanje transplantata (45, 46). Pretpostavlja se da bolesnici s visokim postotkom PRA posjeduju alospecifične limfocite B (aktivirani B limfociti s funkcijom predočnih stanica-APS), drugim rječima postojanje indirektnog puta prepoznavanja antigena (117). Analiza naših bolesnika nije pokazala da je preživljavanje u senzibiliziranih bolesnika lošije, što bi se moglo objasniti premalim brojem senzibiliziranih bolesnika u uzorku (svega 1 sa PRA>85%, te 13% sa PRA od 6-85%). Bryan i sur. su također vidjeli da se preživljavanje transplantata ne razlikuje u visoko senzibiliziranih bolesnika (PRA>80%), u poređenju sa onima u kojih je postotak citotoksičnih protutijela nizak (36).

Poznato je da je T-stanična aktivacija i posljedična infiltracija transplantata aktiviranim CD4+ i CD8+ limfocitima, makrofagima i NK stanicama ključni događaj u reakciji akutnog odbacivanja. Uočeno je, kako u eksperimentalnoj, tako i u kliničkoj transplantaciji, da ekspresija T-staničnih gena prethodi kliničkim znacima odbacivanja transplantiranog organa. Tako otkriće markera za aktivirane citotoksične limfocite, kao što su perforin i granzim B, u transplantatu, može biti dobar dijagnostički pokazatelj akutne krize jer se glasnička RNA javlja prije nego se histološki može uočiti oštećenje (50, 94, 331, 169). Također je uočeno da povišena ekspresija perforina u citoplazmi limfocita periferne krvi korelira sa akutnom krizom odbacivanja (265, 268). Međutim, u biopsijama dobivenim iz transplantata čija je funkcija bila zadovoljavajuća 3 i 6 mjeseci nakon transplantacije nađeni su infiltrati mononukleara, ali bez povišene ekspresije perforina i granzima (331).

U odbačenim transplantatima je uočena prisutnost citokina, ali njihova uloga do danas nije potpuno razjašnjena (56). Citokini su topivi glikoproteinski proizvodi koji neenzimskom aktivnošću reguliraju funkcije stanica. Oni se ne mogu ispravno definirati prema svojim učincima na pojedinu stanicu, budući da svoje različite aktivnosti ostvaruju kao sastavni dijelovi «citokinske mreže». Citokini pokazuju brojne efektorske funkcije u održavanju normalne homeostaze, ali i u razvoju imunog odgovora na transplantat. Vidjelo se da Th2 tip sekrecije citokina (IL-4, IL-6, IL-10) sudjeluje u humoralnom odgovoru, dok je Th1 tip sekrecije upleten u imunost posredovanu stanicama (383). Uočeno je da Th1 citokini, kao IL-2 i IFN-gamma igraju ulogu u reakciji akutnog odbacivanja posredovanog stanicama, aktivirajući CD4+ limfocite T i makrofage, ali i CD8+ limfocite (74, 383).

Nasuprot tome, u bolesnika koji više godina toleriraju transplantat nađena je visoka ekspresija IL-4, IL-10, IFN-gamma, TGF-beta i nemjerljivo niska razina IL-2 (303).

Istraživanja su pokazala da je IL-2 snažno eksprimiran u transplantatu tijekom akutne krize odbacivanja. Postoji značajna korelacija između ekspresije mRNA za IL-2 u graftu i akutne krize odbacivanja (340). Već je godinama poznato da tijekom odbacivanja dolazi do produkcije IL-2 putem stimuliranih CD4+ limfocita i razvijanje receptora za IL-2 (IL-2R+) na površini aktiviranih CD4+ i CD8+ limfocita T, nekih limfocita B i makrofaga (356), a IL-2 je potreban samo na početku akutne krize odbacivanja (341). IL-2 omogućava sazrijevanje i proliferaciju citotoksičnih limfocita T, a pojačava aktivnost NK stanica i drugih citotoksičnih stanica. Nishodna regulacija proizvodnje IL-2 u limfocitima T bi, *in vivo*, mogla biti dovoljna za održavanje tolerancije na presadak (38), što se vidjelo u eksperimentima s miševima, bez obzira na prisutnost velikog broja specifičnih CTL u presatku (58). Injekcijom IL-2 se postiglo promptno odbacivanje presatka (79).

Učinak imunosupresivne terapije na dinamiku ekspresije gena u transplantatu još uvijek je nedovoljno poznat. Možda bi se snižena ekspresija gena za IL-7, IL-10 i IL-15, perforin i granzim B mogla smatrati pokazateljem uspješne imunosupresije u krizi odbacivanja (331). Izgleda da imunosupresivna terapija koja uključuje CsA, kortikosteroide, anti-CD4 monoklonska protutijela inhibira Th1 citokine, dok Th2 citokinska produkcija ostaje pošteđena (92, 219, 273).

Mnogi autori smatraju da je interleukin-2 primarni citokin odgovoran za regulaciju ekspresije perforina. U humanim NK i gama/delta T stanicama IL-2 nema većeg utjecaja na povećanje ekspresije perforina, jer je perforin u tim stanicama eksprimiran konstitutivno

(228, 311), dok stimulacija CD3+LPK interleukinom-2 kroz četiri sata pokazuje četverostruki porast mRNA za perforin u odnosu na nestimuliranu kontrolu, a nakon šest sati postiže se najveće povećanje (7-8x). Populacija obogaćena CD8+ alfa/beta T stanicama pokazuje 10 puta veće ispoljavanje mRNA za perforin nego CD4+T limfocitna subpopulacija. Isto je zapaženo s NK stanicama u perifernoj krvi CD3-CD16+CD56+ fenotipa, koje konstitutivno eksprimiraju visok nivo mRNA za perforin, ali se njen sadržaj ne može dodatno povećati stimulacijom IL-2 *in vitro* (304). Suprotno tome Clement i sur. su dokazali porast ispoljavanja mRNA za perforin i granzim A i B (0,4-1 puta) u NK stanicama šest sati nakon stimulacije s 200 i.j./ml IL-2 (49). Interleukin-2 može povećati citotoksičnost NK stanica prema NK osjetljivoj i rezistentnoj staničnoj liniji drugim mehanizmima: staničnim vezanjem, staničnim prepoznavanjem i povećanjem egzocitoze putem aktivacije CD16+ molekule. Deplecija CD16+ LPK protutijelom protu-CD16 i komplementom ukida direktnu citotoksičnost IL-2 stimuliranih CD3+ i CD3- stanica protiv K562 stanične linije (49). Prema tome IL-2 stimulira povećanje stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima.

Da bi se što bolje pristupilo problemu toleriranja transplantata, svakako je interesantno pratiti nivo citokina u perifernoj krvi bolesnika koji transplantirani bubreg toleriraju više godina. Mi smo stimulirali limfocite periferne krvi zdravih osoba i bolesnika s transplantiranim bubregom s IL-2 (100i.j./ml) i nismo uočili povećanje udjela P+ limfocita u obje grupe, ali je došlo do porasta prosječnog broja molekula perforina po pojedinoj stanici u grupi transplantiranih bolesnika. I dok se postotak P+ limfocita bitno ne razlikuje u zdravih i transplantiranih bolesnika prije i nakon stimulacije s IL-2, AFI

vrijednost je značajno niža u transplantiranih bolesnika prije stimulacije, što govori u prilog smanjenom citolitičkom potencijalu njihovih stanica.

Stimulacijom subpopulacija limfocita periferne krvi transplantiranih bolesnika vidjeli smo da IL-2 ne povećava postotak P+CD8+ limfocita, ali statistički značajno povećava prosječan broj molekula perforina po pojedinoj stanici nakon 24-satne stimulacije, dok u zdravih osoba ne utječe niti na postotak P+CD8+ limfocita, niti na AFI. I ovdje je AFI za perforin 6<sup>h</sup> nakon stimulacije značajno niži u transplantiranih bolesnika nego u zdravih osoba. Također u transplantiranih bolesnika stimulacija IL-2 u koncentraciji od 100 i.j./ml ne povećava postotak P+CD56+ limfocita, ali povećava prosječan broj molekula perforina po pojedinoj stanici nakon 6-satne stimulacije, što se podudara s rezultatima Clementa i sur (49). U zdravih osoba ne mijenja se niti postotak P+CD56+ stanica koji je podjednak onom u transplantiranih, a niti AFI, koji je značajno viši nego u transplantiranih, kako prije, tako i 24<sup>h</sup> nakon stimulacije. Dok je postotak P+ limfocita kao i njegovih subpopulacija podjednak u zdravih i transplantiranih prije i nakon stimulacije s IL-2, AFI vrijednost za P je višestruko niža u transplantiranih. Izgleda da imunosupresivna terapija koja djeluje inhibitory na sekreciju IL-2, djeluje ponajprije na gustoću perforinskih molekula po stanici. Naime, dodavanjem egzogenog IL-2 u koncentraciji od 100 i.j./ml dolazi do porasta AFI vrijednosti za P u P+CD56+ limfocitima nakon 6-satne stimulacije (koji su i prva linija obrane organizma) i P+CD8+ limfocitima nakon 24-satne stimulacije, što govori o postojanju citolitičkog potencijala ovih stanica, koji je inhibiran imunosupresivnom terapijom.

Kada je u pitanju direktan učinak IL-2 na citotoksičnost humanih NK stanica periferne krvi vidljiv je snažan citolitički efekt, što potvrđuju i naši rezultati: IL-2 u limfocitima periferne krvi jasno povišuje citotoksičnost tijekom dvosatnog citotoksičnog testa uz značajan gubitak perforina tijekom izlaganja K562 staničnoj liniji. Koncentracija IL-2 od 100 i.j./ml ostvarila je citotoksični učinak u limfocitima periferne krvi, a isto tako je bila dostatna za značajno induciranje ispoljenosti perforina. To govori u prilog pretpostavci da su limfociti periferne krvi sačuvali potencijal regulacije ekspresije perforina u citotoksičnim limfocitima. Naime, već je godinama poznato da imunosupresivna terapija koju dobivaju transplantirani bolesnici smanjuje ili gotovo ukida nespecifični stanični imuni odgovor, koji je uključen kako u reakcije odbacivanja transplantata, tako i u obranu organizma od virusnih infekcija. Jedan od glavnih mehanizama je redukcija proizvodnje limfokina, među ostalima i IL-2 (5). Naši rezultati ukazuju i na mogući dodatni mehanizam: supresiju ekspresije citolitičkog mehanizma. Da li je on rezultat direktnog učinka imunosupresije i/ili supresije citokina (IL-2) što indirektno smanjuje aktivaciju gena za perforin, teško je reći na temelju ovih rezultata. U svakom slučaju dodavanjem egzogenog IL-2 u koncentraciji od 100 i.j./ml značajno se povećava i ekspresija perforina i NK aktivnost u transplantiranih bolesnika.

U dijaliziranih bolesnika NK aktivnost je vrlo niska, a IL-2 nema učinka na citotoksičnost NK stanica (420). Međutim, IL-15 u dozi od 5ng/ml ostvaruje snažan citotoksični učinak u limfocitima periferne krvi dijaliziranih bolesnika. Naime, poznato je da kronična renalna insuficijencija i hemodijaliza značajno snižavaju postotak NK stanica u

perifernoj krvi, što može biti prognostički pokazatelj sklonosti razvoja infekcija i malignih oboljenja (420).

Svakako je iznenađujuće bilo otkriće da IL-2 deficitni sojevi miševa, ne samo da imaju održane imunološke funkcije, već mogu i odbaciti transplantat, isto kao i normalni miševi (328), te da blokada IL-2 u samom transplantatu ne sprječava odbacivanje (174, 408). Vjerojatno je razlog tome što IL-2 dijeli svoje receptore sa ostalim citokinima. Naime, svaki citokin ima svoj specifični receptor «osobni», ali vrlo često on istovremeno dijeli jedan ili više zajedničkih receptora s drugim citokinima (407). Tako IL-4, IL-7, IL-9, IL-13 i IL-15 dijele gama podjedinicu IL-2R (66). Vidjelo se da bar tri člana «kraljevske» obitelji citokina: IL-7, IL-9 i IL-15 imaju vrlo slično djelovanje na limfocite T, kao i IL-2, pa zato više ne iznenađuje što IL-2/IL-4 deficitantni miševi mogu razviti akutnu krizu odbacivanja transplantata posredstvom IL-7, IL-9 i/ili IL-15 (174).

Interleukin-15 (IL-15) je po biološkoj aktivnosti sličan IL-2, a u slučaju nedostatka IL-2 preuzima njegovu funkciju (18, 38, 340). Proizvode ga aktivirani makrofagi, mišićne stanice, keratinociti, bubrežne epitelne stanice i endotelne stanice, ali ne i limfociti T (18, 422), za razliku od IL-2 kojeg produciraju jedino aktivirani limfociti T. IL-15 se veže za beta i gama lanac IL-2 receptora, ali i specifični alfa lanac IL-15 receptora, koji ne spada u porodicu citokinskih receptora (17, 422). Interleukin-15, slično kao i IL-2, stimulira proliferaciju aktiviranih limfocita T i NK stanica, aktivaciju CTL i pojačava ekspresiju IFN-gamma (271, 422). Veoma snažno utječe na razvoj citotoksičnih efektorskih stanica i na nastanak LAK stanica (od lymphokine activated killers). Ako IL-15 dodamo u kulturu T stanica, pojačat će se ispoljenost: IL-2R alfa (CD25), IL-2R beta (CD122), Fas-a (CD95), a



dolazi do nishodne regulacije CD27 (124). Interesantno je naglasiti da protutijelo protiv beta podjedinice IL-2R u potpunosti blokira sve nabrojene učinke IL-15 koje ostvaruje na T i B limfocitima i NK stanicama.

Smatra se da je za poticanje perforinskog ispoljavanja dominantna stimulacija T i NK stanica citokinima IL-2 i IL-15 (340). Uočeno je, da bez obzira na blokadu IL-2/IL-2R sa protu-CD25 monoklonskom protutijelom, ipak dolazi do odbacivanja srčanog transplantata (16, 385, 417), što sugerira da i drugi citokini sudjeluju u odbacivanju. Interleukin-15 je zajedno sa interleukinom 7 (IL-7) nađen tijekom odbacivanja humanih bubrežnih transplantata. Štoviše, uočena je njihova snažna ekspresija za vrijeme akutne krize odbacivanja, a neovisno o IL-2 i IL-4 (331, 412, 416, 422). Povišena ekspresija gena za IL-15 (uz povišenu ekspresiju gena za perforin, granzim B, Fas Ligand i IL-7) nađena je u biopsijama transplantata koji su po Banff histološkom kriteriju klasificirani kao subkliničko odbacivanje, bez kliničkih znakova disfunkcije transplantata (339). Svakako bi trebalo razmotriti mogućnost tretiranja upravo ovih subkliničkih oblika, ne bi li se tako spriječila pojava kliničkog odbacivanja i osiguralo dugogodišnje preživljavanje (331). Budući da je ekspresija IL-7 i IL-15 rezistentna na ciklosporin, ovi bi citokini mogli igrati ulogu u podržavanju reakcije odbacivanja u bolesnika koji su pod konvencionalnom imunosupresijom (422).

Svakako je od interesa razmotriti kako djeluje trodnevna stimulacija limfocita periferne krvi transplantiranih bolesnika IL-15 (2ng/ml), IL-2 (100U i.j./ml) i Concavalin-A. Vidjeli smo da IL-15 značajno povećava udio perforin pozitivnih limfocita periferne krvi, u odnosu na IL-2 i Concavalin-A, ali ne utječe na prosječni broj

molekula perforina po stanici, dok se u dijaliziranih bolesnika ne mijenja niti udio perforin pozitivnih limfocita periferne krvi, niti prosječni broj molekula perforina po stanici. Interesantno je uočiti da je postotak P+limfocita podjednak u obje grupe prije stimulacije, ali nakon trodnevne stimulacije IL-15 u dijaliziranih ostaje nepromjenjen, dok u transplantiranih raste gotovo četverostruko. Prateći učinak IL-15 na subpopulacije limfocita u transplantiranih bolesnika, uočili smo da se povećava udio P+CD8+ i P+CD56+ limfocita, a ne mijenja AFI za te stanice, za razliku od trodnevne stimulacije IL-2 i Concavalinom-A koja ne utječe na ove subpopulacije. U dijaliziranih bolesnika trodnevna stimulacija IL-2, IL-15 i Concavalinom-A nema utjecaj na ove subpopulacije. Međutim, IL-15 u dozi od 5ng/ml ostvaruje snažan citotoksični učinak u NK stanicama periferne krvi dijaliziranih bolesnika.

Dobro je poznato da je kronična hemodijaliza udružena s promjenama na razini aktivacije komplementa, granulocitnih markera, funkcije makrofaga, aktivacije limfocita T, oslobađanja proinflammatoryh citokina (409). U bolesnika koji se redovno hemodijaliziraju, snižen je humoralni i stanični odgovor, što za posljedicu ima učestalije infekcije, te pojavu malignih oboljenja (411). Smanjena humoralna imunost može biti posljedica smanjenog broja Th2 limfocita, ili pak predominacije Th1 limfocita (411).

Neki smatraju da su imunološke komplikacije povezane s povećanom proizvodnjom proinflammatoryh citokina putem monocita, vjerojatno zbog čestog kontakta krvi s membranom dijalizatora tijekom hemodijalize (409, 411). Ranije studije su pokazale neravnotežu između proinflammatoryh i regulatornih monokina. Pretpostavlja se da uremija i dijaliza inhibiraju limfocite T koji ne mogu proizvoditi Th2 citokine. Vidjelo se da je

produkcija IL-2, upletenog u stanični imuni odgovor, te IL-4 i IL-10, upletenih u humoralnu imunost, značajno snižena u dijaliziranih bolesnika. Za razliku od njih, sekrecija IL-12 putem makrofaga je povećana (418). Interleukin-12 aktivira NK stanice, pa one proizvode INF-gamma koji ponovno inducira aktivnost makrofaga (418). Očito je da je mehanizam kojim hemodijaliza kao terapija narušava imunološki sustav bolesnika vrlo složen.

Međutim, vidjelo se da IL-15 inhibira apoptozu izazvana anti-Fas, anti-CD3 ili anti-IgM monoklonskim protutijelima ili deksametazonom u aktiviranim limfocitima T i B, *in vitro* (38). U mišjem eksperimentalnom modelu IL-15-IgG2b suprimira apoptozu induciranu anti-Fas-om, *in vivo* (38). Pretpostavilo se da bi IL-15 mogao biti moćan inhibitor apoptoze, *in vivo* i *in vitro*, što bi se moglo koristiti u terapijske svrhe. Sve je više studija koje ukazuju na značajnu ulogu IL-15 u odbacivanju transplantiranih organa, a njegov nalaz u biopsijama prije nego li se klinički može uočiti ispad funkcije transplantata (331, 339), sugerira mogućnost njegovog korištenja kao prognostičkog markera u preživljavanju transplantata. Svakako bi trebalo razmotriti mogućnost korištenja njegovih antagonista u terapiji ne samo krize odbacivanja, već i njenog spriječavanja.

Ovi rezultati ukazuju na citokine kao izuzetno važne sudionike patofizioloških zbivanja u transplantacijskoj reakciji, ali isto tako na složenu i još uvijek nedovoljno poznatu međusobnu isprepletenost njihovih međusobnih funkcija. Rezultati nadalje ukazuju i na citolitički mehanizam kao put kojim ovi citokini ostvaruju učinke u odbacivanju alotransplantata.

Svakako da postoje znatna ograničenja prisutna u našoj analizi. Matas i sur. su još prije jednog desetljeća prikazali prednosti i nedostatke velikih multicentričnih studija, kao i onih ograničenih samo na jedan centar (194). Vrlo mali broj naših bolesnika u usporedbi sa svjetskim multicentričnim studijama svakako nije dovoljan za dobivanje statistički značajnih rezultata. Isto tako, retrospektivna analiza onemogućila je pristup nekim važnim informacijama (kao npr. imunosupresivna terapija u čitavom poslijetransplantacijskom razdoblju) Treba naglasiti da je prednost analize u jednom centru mogućnost istovremenog praćenja imunoloških i neimunoloških čimbenika. Stoga bi naše buduće analize svakako morale biti prospektivne i sveobuhvatne, uz obavezan timski rad, što uključuje transplantacijskog kirurga, internistu, imunologa i transfuziologa.

## 6 ZAKLJUČNI PREGLED

U našem istraživanju obuhvatili smo imunološke i neimunološke čimbenike koji utječu na preživljavanje transplantiranog organa.

Retrospektivna analiza neimunoloških čimbenika pokazala je bolje četverogodišnje preživljavanje transplantata u starosnoj grupi primatelja od 16 do 50 godina. Uočljiv je trend lošijeg preživljavanja transplantata ukoliko su i primatelj i davatelj stariji od 50 godina. Spol primatelja i davatelja, trajanje hladne ishemije prije transplantacije, kao niti vrijeme provedeno na dijalizi nisu imali utjecaja na preživljavanje.

Retrospektivna analiza imunoloških čimbenika pokazala je da u sustavu suvremenog nadzora nad transplantatima, podudarnost u HLA sustavu i prisutnost panel reaktivnih protutijela (PRA) nisu značajnije utjecali na duljinu preživljavanja transplantata. Može se raditi o premalom broju u uzorku, a slične rezultate pokazale su i brojna novija istraživanja.

Cilj prospektivnih imunoloških istraživanja bio je ispitati promjene u mehanizmima limfocitima posredovane citotoksičnosti, posebno na molekularnoj razini. Postotak perforin pozitivnih limfocita i njihovih subpopulacija je podjednak u zdravih i transplantiranih, kako prije, tako i nakon stimulacije IL-2 (100 i.j./ml). Prosječni broj molekula perforina po pojedinoj stanici (AFI vrijednosti) je značajno niži u transplantiranih bolesnika kako prije, tako i nakon stimulacije s IL-2 u usporedbi sa zdravim osobama. Stimulacija IL-2 u transplantiranih bolesnika dovodi do porasta AFI vrijednost za perforin

u CD56+P+ limfocitima nakon 6-satne stimulacije i u CD8+P+ limfocitima nakon 24-satne stimulacije.

Kada je u pitanju direktan učinak IL-2 na citotoksičnost humanih NK stanica periferne krvi vidljiv je snažan citolitički učinak: IL-2 u limfocitima periferne krvi jasno povisuje citotoksičnost tijekom dvosatnog citotoksičnog testa uz značajan gubitak perforina tijekom izlaganja K562 staničnoj liniji. Koncentracija IL-2 od 100 i.j./ml ostvarila je citotoksični učinak u limfocitima periferne krvi, a isto tako je bila dostatna za značajno induciranje ispoljenosti perforina.

Trodnevna kultivacija limfocita periferne krvi s IL-15 dovodi do porasta udjela perforin pozitivnih limfocita u transplantiranih bolesnika, djelujući i na CD8+P+ i na CD56+P+ limfocite. Postotak perforin pozitivnih limfocita transplantiranih i dijaliziranih bolesnika prije stimulacije gotovo je jednak, no IL-15 značajno povećava postotak perforin pozitivnih limfocita u transplantiranih, dok u dijaliziranih ostaje praktički nepromjenjen.

Vrlo mali broj naših bolesnika u usporedbi sa svjetskim multicentričnim studijama svakako nije dovoljan za dobivanje statistički značajnih rezultata. Budući da je prednost analize u jednom centru mogućnost istovremenog praćenja imunoloških i neimunoloških čimbenika, svakako bi naše buduće analize morale biti prospektivne i sveobuhvatne. No, već ovi rezultati pokazuju da je riječki transplantacijski centar na razini transplantacijske medicine u svijetu.

## 7. POPIS LITERATURE

1. Abo T, Balch CM. A differentiation antigen of human NK cells and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1). *J.Immunol.* 1981;127:1024.
2. Abo T, Miller CA, Balch CM. Characterization of human granular lymphocyte subpopulations expressing HNK-1 (Leu-7) and Leu 11 antigens in the blood and lymphoid tissues from fetuses, neonates and adults. *Eur.J.Immunol.* 1984;14:616.
3. Abrass CK, Adcox MJ, Raugi GJ. Aging-associated changes in renal extracellular matrix. *Am.J.Pathol.* 1995;146:742.
4. Alamartine E, Berthoux F. Natural killer lymphocytes in kidney transplantation. *Presse.Med.* 1992;21:1957.
5. Alamartine E, Sabido O, Dumollard JM, Berthoux F. Lack of evidence for natural cytotoxicity deficiency against human ex vivo tumour cells in allograft recipients. *Nephrol.Dial.Transplant.* 1997;12(5):988-94.
6. Allavena P, Giardino G, Bianchi G, Mantovani A. IL-15 is chemotactic for natural killer cells and stimulates their adhesion to vascular endothelium. *J.Leukoc.Biol.* 1997;61(6):729-35.
7. Amend WJC, Gjertson DW, Cecka JM. Primary disease effects in patients with early posttransplant events. In *Clinical transplants 1995*. Eds. JM Cecka and PI Terasaki. UCLA Tissue Typing Laboratory. Los Angeles, USA 1996:395-404.
8. Amoroso A, Dall'Omo AM, Gambelunghe C, Berrino M, Mazzola G, Curtoni ES. HLA e trapianti renali. Eds. Curtoni E, Illeni MT, Reali G. *Il maggior sistema di istocompatibilita nell'uomo*. SITS-AITC Editre. Milano 1993: pp373-422.

9. Andrews BS, Eisenberg RA, Theofilopoulos AN, Izui S, Wilson CB, McConahay PJ, Murphy ED, Roths JB, Dixon FJ: Spontaneous murine lupus-like syndromes. *J.Exp. Med.* 1978; 148: 1198-1215.

10. Arnold B, Schonrich G, Mamerling GJ. Multiple levels of peripheral tolerance. *Immunol.Today* 1993;14:12.

11. Ascher NL. Effector mechanisms in allograft rejection. *Transpl.Proc.* 1981;13:103.

12. Aste-Amezaga M, D Andrea D, Kubin M, Trinchieri G. Cooperation of natural killer cells stimulatory factor/interleukin-12 with other stimuli in the induction of cytokines and cytotoxic cell-associated molecules in human T and NK cells. *Cell Immunol.* 1994;156:480-492.

13. Auphan N, Didonato JA, Rosette C. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of TNF-beta. *Science* 1995;270:286-290.

14. Azuma M, Cayabyab M, Buck D, Phillips JH, Lanier LL. CD28 interaction with B7 costimulates primary allogeneic proliferative responses and cytotoxicity mediated by small resting T lymphocytes. *J.Exp.Med.* 1992;175:353-60.

15. Baan CC, Knoop CJ, Van Gelder T, Holweg CT, Niesters HG, Zondervan PE, Balk AH, Weimer W. Redundancy of the cytokine network in the development of rejection after clinical heart transplantation. *Transpl.Int.* 1998;11:s512-4.

16. Baan CC, Knoop CJ, Van Gelder T, Holweg CT, Niesters HG, Smeets TJ, Van der Ham F, Zondervan PE, Maat LP, Balk AH, Weimer W. Anti-CD25 therapy reveals the redundancy of the intragraft cytokine network after clinical heart transplantation. *Transplantation* 1999; 67:870-6.



17. Bach JF, Hirschhorn K. Lymphocyte interaction: a patiental histocompatibility test in vitro. *Science* 1964;143:813-814.
18. Badoloto R, Ponzi AN, Millesimo M, Notarangelo LD, Musso T. Interleukin-15 induces IL-8 and monocyte chemotactic protein 1 production in human monocytes. *Blood* 1997;90(7):2804-9.
19. Balen-Marunić S. Značaj ekspresije perforina u kliničkoj transplantaciji bubrega. Magistarski rad, Medicinski fakultet u Rijeci, 1994.
20. Barber WH, Mankin JA, Laskow DA, et al. Long term results of a controlled prospective study with transfusion of donor specific bone marrow in 57 cadaveric renal allograft recipients. *Transplantation* 1991; 51:70.
21. Beik AI, Baterman WJ, Morris AG, Higgins RM, Lam FT. Monitoring of T-lymphocyte subsets in acute renal allograft rejection. *Transpl.Proc.* 1998;30:168.
22. Belgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff, Duke RC. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 1995;377:630.
23. Beauchamp JL, Croy BA. Assesment of expression of the receptor for colony-stimulating factor-1 (fms) in bovine trophoblast . *Biology of reproduction* 1991;45(6):811-.
24. Blancho G, Buzelin F, Dantae J, Hourmant M, Cantarovich D, Baatard R, Bonneville M, Vie H, Bugeon L, Soulillou JP. Evidence that early acute renal failure may be mediated by CD3-CD16+ cells in a kidney graft recipient with large granular lymphocyte proliferation. *Transplant.* 1992;53:1242.
25. Bloemena E, Lier RAW, Oers MHJ, Weinreich S, Stilma-Meinesz AP, Schellekens A. The effects of prednisolone and cyclosporine A on monocyte-dependent and independent human T cell proliferation in vitro. *Transpl.Proc.* 1989;21:861.

26. Bonnema MY, Rivlin KA, Ting AT, Schoon RA, Abraham RT, Leibson PJ. Cytokine-enhanced NK cell-mediated cytotoxicity. Positive modulatory effects of IL-2 and IL-12 on stimulus dependent granule exocytosis. *J.Immunol.*1994;152:2098-2104.
27. Boonstra J, Van der Woude Fokko J, Wever PC, Laterveer JC, Daha MR, Van Cooten C. Expression and function of Fas (CD95) on human renal tubular epithelial cells. *Journal of the American Society of Nephrology* 1997;1517-1523.
28. Borel JF. Cyclosporin A-Present experimental status. *Transpl. Proc.* 1981; 13: 344.
29. Borel JF. The Cyclosporins. *Transpl.Proc.*1989;21:810.
30. Braun MY, McCormack A, Webb G, Batchelor JR. Evidence for clonal anergy as a mechanism responsible for the maintenance of transplantation tolerance. *Eur. J .Immunol.*1993;23:1462.
31. Braun MJ, Lowin B, French L, Acha-Orbea H, Tschopp J. Cytotoxic T cells deficient in both functional Fas ligand and perforin show residual cytolytic activity yet lose their capacity to induce lethal acute graft-versus host disease. *J.Exp.Med.*1996;183:657-661..
32. Brennan DC, Mohanakumar T, Flye MW. Donor specific transfusion and donor bone marrow infusion in renal transplantation tolerance: a review of efficacy and mechanism. *Am.J.Kidney Dis.*1995;26(5):701-715.
33. Brenner BM, Cohen RA, Milford EL. In renal transplantation, one size may not fit al. *J.Am.Soc.Nephrol.*1992;3(2):162.
34. Brescia MJ, Cimino JE, Appel K, Hurwich BJ. Chronic hemodialysis using venapuncture and a surgically created arteriovenous fistula *New Engl J Med* 1966, 275:1089-1092.

35. Brooks AG, Posch PE, Scorzelli CJ, Borego F, Coligan JE. NKG2A complexed with CD94 defines a novel inhibitory natural killer cell receptor. *Journal of experimental Medicine* 1997;185:795-800.
36. Bryan CF, Shield CF, Pierce GF, Warady BA, Aeder MI, Martinez J, Luger AM, Nelson PW, Ross G, Muruve N, Mitchell SI. Successful cadaveric renal transplantation of patients highly sensitized to HLA Class I antigens. *Clinical Transplantation* 2000;14(1):79-84.
37. Bugeon L, Paineau J, Soulillou JP. Similar levels of granzyme A and perforin mRNA expression in rejected and tolerated heart allografts in donor specific tolerance in rats. *Transplant*. 1993;56:405.
38. Bulfone Paus S, Ungureanu D, Pohl T, Lindner G, Paus R, Ruckert R, Krause H, Kunzendorf U. Interleukin-15 protects from lethal apoptosis in vivo. *Nature medicine* 1997;3(10):1124-8.
39. Bulmer JN, Morrison L, Johnson PM, Meager A. Immunohistochemical localization of interferons in human placenta in normal, ectopic and molar pregnancy. *Am.J.Reprod.Immunol.* 1990;22:109-116.
40. Bunn PA, Gazdar AF, Carney DN, Minna J. Small cell lung carcinoma and NK cells share an antigenic determinant, Leu-7. *Clin.Res.* 1984;32:413.
41. Calne RJ, White DJG, Pentlow BD, Rolles K, Syrakos K, Ohtava T, Smith DP, McMaster P, Evans BD, Herberston BM, Thiru S. Cyclosporin A-Preliminary observations in dogs with pancreatic duodenal allografts and patients with cadaveric renal transplants, *Transpl.Proc.* 1979;11:860.

42. Ceppellini R, Curtoni ES, Mattiuz PL, Miggiano V, Scuddeler G, Serra A. Genetics of leukocyte antigens. A family study of segregation and linkage. In: *Histocompatibility testing*. Copenhagen 1967;149-187.
43. Cerdan C, Martin Y, Courcoul M et al. Prolonged IL-2 receptor alpha/CD25 expression after T cell activation via the adhesion molecules CD2 and CD28: demonstration of combined transcriptional and posttranscriptional regulation. *J.Immunol.* 1992;149:2255-61.
44. Chavin KD, Qin L, Lin J, Yagita H, Bromberg JS. Combined anti-CD2 and anti-CD3 receptor monoclonal antibodies induce donor-specific tolerance in a cardiac transplant model. *J.Immunol.* 1993;151:7249-7259.
45. Chertow GM, Milford EL, Mackenzie HS, Brenner BM. Antigen-independent determinants of cadaveric kidney transplant failure. *JAMA* 1996; 276:1732.
46. Chertow GM, Milford EL, Mori M, Mackenzie HS, Brenner BM. Antigen-independent determinants of graft survival in living related kidney transplantation. *Kidney Int* 1997;52:S-84
47. Cho JW and Cecka JM. Organ procurement organization and transplant centre effects on cadaver renal transplant outcomes. . In *Clinical transplant 1996*. Eds Cecka JM, Terasaki PI. UCLA Tissue typing Laboratory. USA 1997; 427-442.
48. Claas FHJ, Gijbels Y, Van der Veldende Munck JJ, Van Rood JJ. Induction of B cell unresponsiveness to non-inherited maternal HLA antigen during fetal life. *Science* 1988;241:1815-1817.
49. Clement MV, Haddad P, Legros-Maida S, Soulie A, Guillet J, Cesar E. Involvement of granzyme B and perforin gene expression in the lytic potential, of human natural killer cells. *Res.Immunol.* 1990;141:477-489.

50. Clement MV, Haddad P, Soulie A, Podack ER. Perforin and granzyme B as markers for acute rejection in heart transplantation. *International Immunol.* 1991; 3 (11): 1175.

51. Clement MV, Legros-Maida S, Israel-Biet D, Carnot F, Soulie A, Reynaud P, Guillet J, Gandjbakch I, Sasportes M. Perforin and granzyme B expression is associated with severe acute rejection. *Transplant.* 1994;57:322.

52. Conlon PJ, Morrissey PJ, Nordan RP, Grabstein KH, Prickett KS, Reed SG, Goodwin R, Cosman D, Namen AE. Murine thymocytes proliferate in direct response to interleukin-7. *Blood* 1989;74:1368-73.

53. Cosimi AB. Clinical development of Orthoclone OKT3 in renal transplantation. *Transpl.Proc.* 1987;19(1):7-16.

54. Cosio FG, Pelletier RP, Falkenhain ME, et al. Impact of acute rejection and early allograft function on renal allograft survival. *Transplantation* 1997;63(11):1611.

55. Cox DR. Regression models and life tables. *J.R.Stat.Soc. (B)* 1972;74:187.

56. Croker BP, Borowitz MJ. Cytotoxic T-cell allotaxis in human kidney rejection. *Am.J.Pathol.* 1982;78:707.

57. Cunningham AC, Zhang JG, Moy JV, Ali S, Kirby JA. A comparison of the antigen-presenting capabilities of class II MHC expressing human lung epithelial and endothelial cells. *Immunology* 1997;91:458.

58. Dalman MJ, Mason DW, Webb M. The roles of host and donor cells in the rejection of skin allografts by T-cell deprived rats injected with syngenic T cells. *Eur.J.Immunol.* 1982;12:511.

59. Danowitch GM. Immunosuppressive medications and protocols for kidney transplantation. U: Danowitch GM. Handbook of kidney transplantation, sec.ed. Boston, New York, Toronto, London: Little, Brown & Company, 1996:55-94.
60. Dausset J, Nenna A. Presence d un leuco-agglutinine dans le serum d un cas d agranulocytose chronique. C.R.Soc.Biol. 1952; 146:1539-1541.
61. Dausset J. Iso-leuco-anticorps. Acta Haemat.1958;20:156-166.
62. Dausset J, Ivanyi P, Ivanyi D. Tissue alloantigens in humans: Identification of a complex system (Hu-1). In Histocompatibility testing. Copenhagen 1965:51-62.
63. Dausset J. The mayor histocompatibility complex in man. Past, present and future concepts. Science 1981;213:1469-1474.
64. Davis MM, Chien Y. Issues concerning the nature of antigen recognition by alfa/beta and gamma/delta T cell receptors. Immunol.Today 1995;16:316-317.
65. Defrance T, Vanbervliet B, Briere F, Durand I, Rousset F, Banchereau J. Interleukin-10 and THF beta cooperate to induce anti-CD40-activated naïve human B cells to secrete IgA. J.Exp.Med.1992;175:671-682.
66. Demoulin JB, Renauld JC. Signalling by cytokines interacting with the IL-2R gamma chain. Cytokines-Cell-Mol\_Ther.1998;4:243-56.
67. Doherty PC. Cell-mediated cytotoxicity. Cell 1993;75:607-612.
68. Duke RC, Persechini PM, Chang S, Liu CC, Cohen JJ, Young JD. Purified perforin induces target cell lysis but not DNA fragmentation. J.Exp.Med.1989;170:1451-1457.
69. Dyer PA, Taylor C, Martin S. HLA and clinical solid organ transplantation: recent publications and novel approaches. In HLA 1998. Gjertson and Terasaki, Eds. American Society for histocompatibility and immunogenetics.

70. Dujvestin AM, van Brieda Vriesman PJC. Chronic renal allograft rejection. Selective involvement of the glomerular endothelium in humoral immune reactivity and intravascular coagulation. *Transplantation* 1991;52:195.
71. Ellis TM, Berry CR, Mendez-Picon G. Lack of association of human renal allograft rejection and circulating K-cell, NK-cell or total T-cell levels. *Clin. Immunol.* 1982;25:335.
72. Fabre J. Induction of MHC antigens in organ transplantation. In: *Organ transplantation: current clinical and immunological concepts*. Eds. L. Brent, A. Sells. Balliere Tindall, London. 1989.
73. Fauci AS. Mechanisms of the immunosuppressive and antiinflammatory effects of glucocorticoids. *J. Immunopharmacol.* 1979;1:1.
74. Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin WG, Lepper H. Differential production of interferon gamma and interleukin-4 in response to Th1 and Th2-stimulating pathogens by gamma/delta T cells in vivo. *Nature* 1995;373:255-257.
75. Festenstein H, Doyle P, Holmes J. Pretransplant transfusion, antibody status, sex and pregnancy in relation to HLA-A, B matching in London transplant group recipients of cadaver renal transplants. *Transplant. Proc.* 1985;17:2273-2276.
76. Frančišković V, Vlahović Š, Zec J, Orlić P, Peterković V. Transplantacija bubrega -prikaz jednog slučaja. *Lij. Vjes.* 1971;93:849.
77. Freeman GJ, Borriello F, Hodes RJ, et al. Uncovering of functional alternative CTLA-4 counter-receptor in B7-deficient mice. *Science* 1993;262:907-9.
78. Freeman GJ, Gribben JG, Boussiotis VA, et al. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 1993;262:909-11.

79. Fregona I, Guttman RD, Jean R. HNK-1+(Leu-7) and other lymphocyte subsets in long-term survivors with renal allotransplants. *Transplant*. 1985;39:25.
80. Frei U, Schindler R, Wieters D, Grouven U, Brunkhorst R, Koch KM. Pre-transplantation hypertension: a major risk factor for chronic progressive renal allograft dysfunction? *Nephrol.Dial.Transplant*. 1995;10(7):1206
81. French LE, Hahne M, Viard I et al. Fas and Fas ligand in embryos and adult mice: ligand expression in several immune-privileged tissues and coexpression in adult tissues characterized by apoptotic cell turn over. *J.Cell Biol*. 1996;133:335.
82. Gibson T, Medawar PB. The fate of skin homografts in man. *J.Anat*. 1942-43;77:299.
83. Gilks WR, Gore SM, Bradley BA. Renal transplant rejection. Transient immunodominance of HLA mismatches. *Transplantation* 1990;50:141.
84. Gillou PJ, Hegarty JH, Ramsden CW, Giles GR. The response to interferon of NK and K cells from conventionally immunosuppressed and cyclosporine-treated renal allograft recipients. *Transplant*. 1984;38:130.
85. Giri JG, Ahdieh M, Eisenman J, Shanebeck K, Grabstein K, Kumaki S, Namen A, Park LS, Cosman D, Anderson D. Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *Embo Journal* 1994;13:2822-2830.
86. Gjertson DW, Terasaki PI. The large center variation in half-lives of kidney transplants. *Transplantation* 1992;53:357.
87. Goes N, Urmson J, Ramassar V, Halloran PF. Ischaemic acute tubular necrosis induces an extensive local cytokine response: evidence for induction of interferon gamma, transforming growth factor beta-1, granulocyte-macrophage colony stimulating factor, interleukin-2 and interleukin-10. *Transplantation* 1995;59:565.



88. Goldstein G, Opelz G. Monoclonal antibody therapy with orthoclone OKT3 in renal transplantation. *Transpl.Proc.* 1986;18(4):925-956.

89. Goldman M, Velu T. Interleukin-10 and its implications for immunopathology, in *Advances in Nephrology*, edited by Grunfeld, Bach JF, Dreiss H, Maxwell MH, St.Louis, Mosgy Year Book 1995:79-85.

90. Gollob JA, Li J, Reinherz EL, Ritz J. CD2 regulates responsiveness of activated T cells to interleukin-12. *J.Exp.Med.* 1995;182:721-731.

91. Goodwin WE, Mims MM, Kaufman JJ. Human renal transplant III. Technical problems encountered in 6 cases of kidney transplantation. *J.Urol.* 1963;89:349.

92. Gorczynski RM, Wojcik D. A role for nesespecific (CsA) or specific (monoclonal antibodies to ICAM-1, LFA-1, and IL-10) immunomodulation in the prolongation of skin allografts after antigen-specific pretransplant immunization or transfusion. *J.Immunol.* 1994;152:2011-2019.

93. Griffiths GM, Mueller C. Expression of perforin and granzymes in vivo: Potential diagnostic markers for activated cytotoxic cells. *Immunol.Today* 1991;12:415.

94. Griffiths GM, Namikawa R, Mueller C, Lin CC, Young JD, Billingham M, Weissman J. Granzyme A and perforin as markers for rejection in cardiac transplantation. *European Journal of Immunol.* 1991, 21:687.

95. Griffiths GM, Cuturi M, Paineau J, Anegon J, Solillou JP Similar levels of granzyme A and perforin mRNA expression in rejected and tolerated heart allografts in donor specific tolerance in rats. *Transplant.* 1993;56:405.

96. Grosenth P; Diener S, Stahel R, Jost L, Kagi, Hengartner H. Morphological analysis of human lymphokine activated killer cells (LAK). *Int.J.Cancer.* 1990;45:694-698.

97. Guerette B, Gingras M, Wood K, Roy R, Tremblay JP. Immunosuppression with monoclonal antibodies and CTLA4-Ig after myoblast transplantation in mice. *Transplantation* 1996;62:962.

98. Guy-Grand D, Dallasia-Seris M, Briottet C, Vassali P. Cytotoxic differentiation of mouse gut thymodependent and independent intraepithelial T lymphocytes is induced locally. Correlation between functional assays, presence of perforin and granzyme transcripts and cytoplasmic granules. *J. Exp. Med.* 1991;84:788.

99. De Haan A, Van der Gun I, Van Dijk E, Hepkema BG, Prop J, De Leij LF. Activation of alloreactive T cells by allogeneic nonprofessional antigenpresenting cells and Interleukin-12 from bystander autologous professional antigenpresenting cells. *Transplantation* 2000;69:1637.

100. Hal BM. Cellular infiltrates in allografts. *Transpl. Proc.* 1987; 19:50.

101. Halloran PF, Schlaut J, Solez K, Scrivasa NS. The significance of the anti-class I response. Clinical and pathologic features of renal transplants with anti-class I-like antibody. *Transplant.* 1992;53(3):550.

102. Halloran PF. Rethinking immunosuppression in terms of the redundant and nonredundant steps in the immune response. *Transpl. Proc.* 1996;28:11-8.

103. Halloran PF, Melk A, Barth C. Rethinking chronic allograft nephropathy: the concept of accelerated senescence. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1999;10:167.

104. Hamilton D. Kidney transplantation. A history. U: Morris PJ ed. *Kidney transplantation*, sec. ed. Orlando: Grune & Stratton, 1984: 1-13.

105. Hammeed A, Olsen CJ, Lee MK, Lichtenheld MG, Podack ER. Cytolysis by Ca-permeable transmembrane channels. Pore formation caused extensive DNA degradation and cell lysis. *J. Exp. Med.* 1989;169:765-777.

106. Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulet DH, Allison JP. CD28-mediated signaling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 1992;356:607-9.
107. Hannock W, Thomson NM, Atkins RC. Composition of interstitial cellular infiltrate identified by monoclonal antibodies in renal biopsies of rejecting human renal allografts. *Transplant*. 1983;35:458.
108. Hannock W, Gee D, Moerloose P, Richler F. Immunohistological analysis of serial biopsies taken during human renal allograft rejection. *Transplant*. 1985, 39:430.
109. Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *New England Journal of Medicine* 2000;342(9):605-12.
110. Hayry P. Intragraft events in allograft destruction. *Transplant*. 1984;38:1.
111. Hayry P. Immunosuppressive drugs. U: Wood K, Morris P. *The handbook of transplant Immunology*. Med.Sci publications 1995:135-176.
112. Hendricks GFJ, D Amaro J, Persijn GG et al. Excellent outcome after transplantation of renal allografts from HLA DRw6-positive donors even in HLA-DR mismatches. *Lancet* 1983;ii:187-189.
113. Hendricks GFJ, Schreuder GMT, Claas FHJ et al. HLA-DRw6 and renal allograft rejection. *Br.J.Med.* 1983;286:85-87.
114. Hiroyuki Hino, Yusifumi T, Shoji S, Tadashi U, Yasumasa M. The expression of perforin and granzyme B in rat lung transplantation. 10th Congress of the European Society for organ transplantation; 1999. Book of abstracts:1363.

115. Herberman RB, Ortaldo JR, Mantovani A, Hobbs DS, Kung HF, Pestka S. Effect of recombinant interferon cytotoxic activity of NK cells and monocytes. *Cell.Immunol.* 1982;67:160.
116. Holter W, Schwarz M, Cerwenka A, Knapp W. The role of CD2 as a regulator of human T-cell cytokine production. *Immunol. Reviews* 1996;153:107-122.
117. Hornick P, Lechler R. Direct and indirect pathways of alloantigen recognition: relevance to acute and chronic allograft rejection. *Nephrol.Dial.Transplant.* 1997;12:1806.
118. Hricik DE. Steroid withdrawal in renal transplant recipients; pro point of view. *Transpl.Proc.* 1998;30(4):1380-1382.
119. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O Garra A, Murphy KM. Development of Th1 CD4+ T cells through IL-12 produced by listeria-induced macrophages. *Science* 1993;260:547-549.
120. Humar A, Johnson EM, Payne WD, et al. Effect of initial slow graft function on renal allograft rejection and survival. *Clin.Transpl.* 1997;11(6):623.
121. Humar A, Hassoun A, Kandaswamy R, Matas A. The questionable importance of nonimmunological risk factors in long-term graft survival. *Journal of the American Society of Nephrology* 1999;9:708A.
122. Hume DM, Merrill JP, Harrison JH, Guild WR. Experiences with renal homo transplantation in the human: Report of nine cases. *J.Clin.Invest.* 1955;34:327.
123. Hutchinson IV. Cellular mechanisms of allograft rejection. *Curr.Opinion Immunol.* 1992;4:561-6.
124. Inagaki Ohara, Nishimurs H, Mitani A, Yoshikai Y. Interleukin-15 preerentially promotes the growth of interstitial intraepithelial lymphocytes bearing gamma\*delta T cell receptor in mice. *European Journal of Immunology* 1997;27(11):2885-91.

125. Ito H, Kasagi N, Shomori K, Osaki M, Adachi H. Apoptosis in the human allografted kidney: Analysis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick and labeling. *Transplantation* 1995;60:794-798.
126. Jakobsen JK, Ryder LP, Ladefoged J et al. Strong impact of HLA-DR matching on graft survival in 413 consecutive cadaver kidney transplants performed in Copenhagen over an eight year period. *Transpl.Proc.*1995;27(6):3425-3453.
127. Janeway CA, Travers P. *Immunobiology. The immune system in health and disease.* Sec.ed. Current biology Ltd. and Garland Publish.Inc.1996:pp4:27,4:39-41.
128. Johnston JA, Bacon CM, Finbloom DS, Rees RC, Kaplan D, Shibuya K, Ortaldo JR, Giri JD, et al. Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. *Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America* 1995;92(19):8705-9.
129. Jollow KC, Sundstrom JB, Gravanis MB, Kanter K, Herskowitz A, Ansari AA. Apoptosis of mononuclear cells infiltrates in cardiac allograft biopsy specimens questions studies of biopsy cultured cells. *Transplantation* 1997;63:1482.
130. Judge TA, Wu Z, Zheng XG, Sharpe AH, Turka LA. The role of CD80, CD86 and CTLA4 in alloimmune responses and the induction on long-term allograft survival. *J.Immunol.*1999;162(4):1947-51.
131. Kabelitz D, Janssen O. Antigen-induced death of T-lymphocytes. *Front Biosci* 1997;2:61.
132. Kabelitz D. Apoptosis, graft rejection and transplantation tolerance, *Transplantation* 1998;65:869-875.

133. Kagi D, Lederman B, Burki K, Seiler P, Odermatt B, Olsen KJ, Podack ER, Zinkernagel RM, Hengartner H. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin deficient mice. *Nature* 1994; 369: 31-37.
134. Kagi D, Vignaux F, Lederman B, Burki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Golstein P. Fas and perforin pathways as major mechanism of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 1994;265:528-530.
135. Kahan B, Grevel J. Optimization of cyclosporine therapy in renal transplantation by a pharmacokinetic strategy. *Transpl. Proc.* 1988;46:31.
136. Kapur S, Khanna A, Sharma VK, Li B, Suthanthiran M. CD2 antigen targeting reduces intragraft expression of mRNA encoding granzyme B and IL-10 and induces tolerance. *Transplantation* 1996;62:249-255.
137. Kasiske B, Heime-Duthay K, Rao K, Awni W. The relationships between pharmacokinetic parameters and subsequent acute rejection in renal transplant recipients. *Transplant.* 1988;46:716.
138. Kataoka K, Naomota Y, Shiozaki S, Matsuno T, Sakagami K. Infiltration of perforin-positive mononuclear cells into rejected kidney allograft. *Transplant.* 1991;53:240.
139. Kato S, Akasaka Y, Kawamura S. Fas antigen expression and its relationship with apoptosis in transplanted kidney. *Pathol.Int.* 1997;47:230.
140. Keegen AD, Pierce JH. The interleukin-4 receptor: signal transduction by a hematopoietin receptor. *J.Leukoc.Biol.* 1994;55:272-279.
141. Kerr SR, Gillingham KJ, Johnson JM, Matas AJ. Living donors age >55 years: to use or not to use. *Transplantation* 1999;67:999.
142. King A, Birkly C, Loke W. Early human decidual cells exhibit NK activity against K562 cell line but not first trimester trophoblast. *Cell Immunol.* 1989;118:337-344.

143. Kirby JA, Givan AL, Shenton BK, Taylor RMR, et al. Renal allograft rejection. Possible involvement of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Transplantation* 1990;50:225.
144. Kirkpatrick CH, David T, Rowlands J. Transplantation immunology. *JAMA* 1992;268:2952.
145. Knight RJ, Burrows L. The combined impact of donor age and acute rejection on long-term cadaver renal allograft survival. (Abstracts) Presented at 23rd Annual meeting of the American Society of Transplant Surgeons, Chicago 1997,pp100.
146. Klein J. Evaluation and function of the major histocompatibility system: facts and speculation. In: Gotze D: The major histocompatibility system in man and animals. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1977:339-378.
147. Kobata T, Shinkai J, Lugo Y, Kawasaki A, Yagita H, Ito S, Shimada S, Katz S, Okumura K. Thy-1 positive dendritic epidermal cells contain a killer protein perforin. *Int. Immunol.* 1990;2:1113.
148. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256:495.
149. Koizumi H, Liu CC, Zheng LM, Joag SV, Bayne NK, Holoshitz J, Young JD. Expression of perforin and serine esterase by human gamma/delta T cells. *J. Exp. Med.* 1991;173:499-502.
150. Krams SM, Egawa H, Quinn MB, Villanueva JC, Garcia-Kennedy R, Martinez OM. Apoptosis as a mechanism of cell death in liver allograft rejection. *Transplantation* 1995;59:621.
151. Kremsky AM, Weiss A, Crabtree G, Davis MM, Parham P. T-lymphocyte antigen interactions in transplant rejection. *N. Engl. J. Med.* 1990;322:510.

152. Kriesche HU, Ojo OA, Cibrik DM, Leichtman AB, Magee JC, Port KF, Kaplan B. Relationship of recipient age and development of chronic allograft failure. *Transplantation* 2000; 70:306-310.
153. Kumar A, Verma BS, Srivastava A, Bhandari M, Gupta A, Sharma RK. Long-term followup of elderly donors in a live related renal transplant program. *Journal of urology* 2000;163(6):1654-8.
154. Lai KN, Lenng JCK, Mac-Monne Lai F. Cyclosporine A inhibits lymphocyte activation at more than one site in vivo. *Transpl.Proc.*1989;21:878.
155. Laine J, Etelaemaeki P, Holmberg C, Dunkel L. Apoptotic cell death in human chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 1997;63:101.
156. Lanier LL, An My Le, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF. Subpopulations of human NK cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NKP-15) antigens. *J.Immunol.* 1983; 131:1789.
157. Lanier LL. Natural killer cells: from no receptors to too many. *Immunity* 1997;6:371-378.
158. Larkin DFP, Alexander RA, Cree IA. Infiltrating inflammatory cell phenotypes and apoptosis in rejected human corneal allografts. *Eye* 1997;11:68.
159. Larsen CP, Alexander DZ, Hendrix R, Ritchie SC, Pearson TC. Fas-mediated cytotoxicity: an immunoeffector or immunoregulatory pathway in T cell-mediated response? *Transplantation* 1995;60:221.
160. Larsen CP, Elwood ET, Alexander DZ. Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature* 1996;381:434.
161. Lau HT, Yu M, Fontana A, Stoeckert CJ Jr. Prevention of islet allograft rejection with engineered myoblasts expressing FasL. *Transplantation* 1997;158:4654.



162. Lee RK, Spielman J, Zhao DY, Olsen KJ, Podack ER. Perforin, Fas ligand and tumor necrosis factor are the major cytotoxic molecules used by lymphokine-activated killer cells. *J.Immunol.*1996; 157:1919-1925.
163. Lee CM, Carter JT, Randall HG, Hiose R, Stock PG, Alfrey EL, et al. The effect of age and prolonged cold ischaemia times on the national cadaveric renal allografts. *Journal of surgical research* 2000;91(1):83-8.
164. Le Francois L, Bevan MJ. A reexamination of the role of Lyt2+ T cells in murine skin graft rejection. *J.Exp.Med.*1984;159:57.
165. Legendre CM, Guttman RD, Shu Hun Hou, Jean R. Two colour immunofluorescence and flow cytometry analysis of lymphocytes in long-term renal allotransplants recipients:identification of a major Leu-7+/Leu3+ subpopulation. *J.Immunol.*1985;135:1061.
166. Legendre CM, Guttman RD,Yip GH. Nk cell subsets in long- term renal allograft recipients: a phenotypic and functional study. *Transplant.* 1986; 42:347.
167. Legendre CM, Yip GH, Rodrigues GA, Forbes RD, Guttman RD. Abnormal expansion of a LGL subset that lacks NK activity in long-term renal allograft recipients. *Transpl.Proc.*1987;19:1575.
168. Legendre CM,Gwendolin H,Rodrigues GA,Forbes RD,Guttman RD. Characterization of an expanded LGL subset lacking NK activity present in renal allograft recipients. *Transplant.*1987;43:229.
169. Lehmann PV. Immunomodulation by proteolytic enzymes. *Nephrol. Dial. Transplant.*1996;11:953-955.
170. Lehmann M, Graser E, Risch K, Hancock WW, Muller A, Kuttler B, Hahn HJ, Kupiec-Weglinski JW, Brock J, Volk HD. Anti-CD4 monoclonal antibody-induced

allograft tolerance in rats despite persistence of donor reactive T cells. *Transplantation* 1997;64(8):1181-1187.

171. Lenschow DJ, Zeng Y, Thistlethwaite JR., et al. Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4Ig. *Science* 1992;257:789-92.

172. Lenschow DJ, Zeng Y, Hathcock KS. Inhibition of transplant rejection following treatment with anti-B7-2 and anti-B7-1 antibodies. *Transplantation* 1995;60:1171.

173. Leonard WJ, O'Shea JJ. JAKS and STATS: biological implications. *Annu . Rev.Immunol.* 1998;16:293.

174. Li XC, Roy-Chaudhury P, Hancock WW, et al. IL-2 and IL-4 double knockout mice reject islet allografts: a role for novel T cell growth factors in allograft rejection. *J.Immunol.* 1998;161:890.

175. Li XC, Ima A, Li Y, Zheng XX, Malek TR, Strom BT. Blocking the common gamma-chain of cytokine receptors induces T cell apoptosis and long-term islet allograft survival. *Journal of immunology* 2000;164(3):1193-9.

176. Lichtenheld GM, Olsen KJ, Lu P, Lowery DM, Hameed A, Hengerner H, Podack ER. Structure of the human perforin gene. *Nature* 1989;335:448.

177. De Ligny BH, Toupance O, Lavaud S, Touchard et al. Factors predicting the long-term success of maintenance cyclosporine monotherapy after kidney transplantation. *Transplantation* 2000; 69(7):1327-32.

178. Lin H, Bolling SF, Linsley PS, et al. Long-term acceptance of major histocompatibility complex mismatched cardiac allografts induced by CTLA4Ig plus donor-specific transfusion. *J.Exp.Med.* 1993;178:1801.

179. Lin Y, Proud G, Taylor RM, Kirby JA. Renal allograft rejection; protection of renal epithelium from NK cells by cytokine-induced up-regulation of class I major histocompatibility antigens. *Immunology*. 1993;79(2):290.

180. Linsley PS, Clark EA, Ledbetter JA. T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1990;87:5031-5.

181. Linsley PS, Brady W, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter JA. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J.Exp.Med*.1991;174:561-9.

182. Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Aruffo A, Damle NK, Ledbetter JA. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J.Exp.Med*.1991;173:721-730.

183. Linsley PS, Wallace PM, Johnson J, et al. Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science* 1992;257:792-5.

184. Lipinski M, Tursz T, Kreis K, Finale Y, Amiel JL. Dissociation of NK activity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in kidney allograft recipients receiving high dose immunosuppressive therapy. *Transplant*.1980;29:214.

185. Lipinski M, Braham K, Caillaud JM, Carlu O, Tursz T. HNK-1 antibody detects an antigen on neuroectodermal cells. *J.Exp.Med*.1983;158:1775.

186. Liu CC, Joag SV, Kwon BS, Young JD. Induction of perforin and serine esterase in murine cytotoxic T lymphocyte clone. *J.Immunol*.1990;144:1196-1201.

187. Liu CC, Walsh CM, Young JD. Perforin: structure and function. *Immunol.Today* 1995;16:4-25.

188. Loke YW, King A. Human Implantation, Cell biology and Immunology. Cambridge UK, Cambridge University press, 1995.

189. Lord RH, Hancock W, Colby AJ, Podberg W, Tilney NL. Effects of anti-IL2 receptor monoclonal antibody and cyclosporine on IL2 receptor positive cells infiltrating cardiac allografts in the rat. *Transpl.Proc.* 1987;19:354.
190. Loveland BE, McKenzie IFC. Which T cells cause graft rejection? *Transplant.* 1982;12:217.
191. Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 1994; 370:650-652.
192. Lufft V, Kliem V, Tusch G, Dannenberg B, Brunkhorst R. Renal transplantation in older adults. *Transplantation* 2000; 69:790-794.
193. Massy ZA, Guijarro C, Wiederkehr MR, Ma JZ, Kasiske BL. Chronic renal allograft rejection: immunologic and nonimmunologic risk factors. *Kidney Int.* 1996;49:518.
194. Matas AJ, Fryd DS. Renal transplantation: the importance of well-designed single-institution and multicenter studies. *Clin.Transplant.* 1989;3:63.
195. Matas AJ. Risk factor for chronic rejection: a clinical perspective. *Transpl.Immunol.* 1998;6:1.
196. Matas AJ, Gillingham KJ, Humar A, Sutherland DER, Najaria JS. Immunologic and nonimmunologic factors. *Transplantation* 2000; 69:54-58.
197. Mackenzie HS, Chertow GM, Brenner BM, Milford EL. Dual kidney transplantation in the US, 1987 to 1995. A review of the United Network of Organ Sharing (UNOS) database. *JASN* 1998. (Book of abstracts).
198. Maruya E, Takemoto S, Terasaki PI. HLA matching: identification of permissible HLA mismatches. In *Clinical transplants 1993*. Eds.PI Terasaki and JM Cecka. UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, USA, 1994; 511-520.

199. Matsuno T, Sakagami K, Saito S, Naomoto Y, Okumura K, Orita K. Does perforin mediate the direct injury of renal allograft in acute rejection? *Transpl.Proc.*1993;25:879.

200. Matsuno T, Saito S, Orita K, Sasaki H, Ishido N, Nakagawa K, Ishikawa T, Oishi A, Inagaki M, Yagi T, Haisa M, Tanaka N. Apoptosis in human kidney allografts. *Transpl.Proc.*1996;28:1226-1227.

201. Mayr WR, Bernoco D, De Marchu M, Ceppellini R. Genetic analysis and biological properties of products of the third SD (AJ) locus of the HL-A region. *Transpl. Proc.*1973;5:1581-11593.

202. McConnel P, Pacheco-Silva A, Nickerson P, Muggia RA, Bastos M, Rubin Kelley V, Strom TB. Unmodified pancreatic islet allograft rejection results in the preferential expression of certain T cell activation transcripts. *J.Immunol.*1993;150:1093-1104.

203. Medawer PB. The behavior and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits. A report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council 1945; 79: 157.

204. Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Cibrik DM, Leichtman AB, Magee JC, Port FK, Kaplan B. Relationship of recipient age and development of chronic allograft failure. *Transplantation* 2000; 70:306-310.

205. Meier-Kriesche HU, Vaghela M, Thambuganipalle R, Friedman G, Jacobs M, Kaplan B. The effect of body mass index on long-term renal allograft survival. *Transplantation* 2000;68(9):1294-7.

206. Merville P, Lambert C, Durand I, Pouteil-Noble C, Touraine JL, Berthoux F, Banchereau J. High frequency of IL-10-secreting CD4+ graft-infiltrating T lymphocytes in promptly rejected kidney allografts. *Transplantation* 1995;59:1113-1119.

207. Metchnikoff E. Etudes sur la resorption des cellules. *Ann.Inst. Pasteur.* 1988;13:737.

208. Michon L, Hamburger J, Oeconomos N, Delinotte P, Ricket G, Vaysse J, Antoine B. Une tentative de transplantation renale chez homme. Aspects medicaux et biologiques. *Presse Med.*1953;61:1419.

209. Moesseeu JG, Burman WA, Koostra G. Direct cytotoxic effect of cytokines in kidney parenchyma: a possible mechanisms of allograft destruction. *Transpl.Proc.*1989;21:309.

210. Monaco AP. Antilymphocyte serum, u: Najarian JS, Simmons RL. *Transplant. Urban and Schwarzenberg, Munchen-Berlin-Wien* 1972: 222.

211. Monaco AP, Wood ML, Maki T, Gozzo JJ. Posttransplantation donor-specific bone marrow transfusion in polyclonal antilymphocyte serum-treated recipients: the optimal cellular antigen for induction of unresponsivness to organ allografts. *Transplant.Proc.* 1988;20:1207.

212. Montagnino g, Tarantino A, Maccario M, Elli A, Cesana B, Ponticelli C. Long-term results with cyclosporine monotherapy in renal transplant patients: a multivariate analysis of risk factors. *American Journal of kidney diseases* 2000;35(6):1135-43.

213. Moore FD. Give and take. The development of tissue transplantation. Philadelphia, London: WB Saunders, 1964.

214. Moreau JF, Solillou JP, Ythier A, Hegart A, Fauconnier B. Decrease of NK cell activity (NKCA) in kidney recipients. *Ann.Pasteur.Immunol.*1983;134:191.
215. Moretta A, Vitale M, Sivori S. Human natural killer cell receptors for HLA class I molecules. Evidence that the Kp43 (CD94) molecule functions as a receptor for HLA-B allelas. *J.Exp.Med.*1994;180:545-552.
216. Moretta L, Ciccone, Moretta A, Hoglund P, Ohlen C, Karre K. Allorecognition by NK cells: non-self or no self? *Immunol.Today* 1992;13:300-304.
217. Morris PJ. Single or multiple drug therapy. *Transpl.Proc.* 1989; 21:820.
218. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: Different pattern of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann.Rev. Immunol.* 1989; 7:145-173.
219. Mottram PL, Han WR, Purcel LJ, McKenzie IFC, Hancock WW. Increased expression of IL-4 and IL-10 and decreased expression of IL-2 and interferon-gamma in long-surviving mouse heart allografts after brief CD4-monoclonal antibody therapy. *Transplantation* 1995;59:559-565.
220. Mueller DL, Jenkins MK, Schwartz RH. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signaling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu.Rev.Immunol.*1989;7:445.
221. Munoz de Bustillo E, Motellon JL, Alvarez-Chiva V. Adhesion molecules and the mechanisms of kidney rejection. New aprooach to therapy. *Nephrol.Dial. Transplant.* 1996;11:950-953.
222. Nagler A, Lanier L, Swirla S, Phillips JH. Comparative studies of human FcRIII-positive and negative NK cells. *J.Immunol.* 989; 143: 3183.

223. Najarian JS, Kjellstrand CM, Simmons RL. High risk patients in renal transplantation. *Transplant.Proc.*1977;9:107-111
224. Nakajima H, Tomiyama H, Takiguchi M. Inhibition of gamma/delta T cell recognition by receptors for MHC class I molecules. *J.Immunol.*1995;155:4139-4142.
225. Nakamura K, Tanigaki N, Pressmen D. Multiple common properties of human beta-microglobulin and the common portion fragment derived from HLA-antigen molecules. *Proc.Acad.Sci. USA* 1973;70:2863.
226. Nakamura K, Ebihara I, Tomio Y, Okumura K, Koide H. Perforin mRNA expression in the inflamed tissues of NZB/WFI lupus mice decreases with methylprednisolone treatment. *Ann.J. Pathol.* 1991;139:731.
227. Nakanishi H, Monden T, Kobayashi T, Shimano T, Mori T. Perforin expression in lymphocytes infiltrated to human colorectal cancer. *J.Cancer.*1991;64:239.
228. Nakata M, Smyth MJ, Norihisa Y, Kawasaki A, Shinkai Y, Okumura K, Yagita H. Constitutive expression of pore forming protein in peripheral blood T cells: implication for their cytotoxic role in vivo. *J.Exp.Med.*1990;172:1877.
229. Nathan C, Sporn M: Cytokine in context. *J.Cell.Biol.*1991;113:981-986.
230. Nicholson ML, Windmill DC, Horsburgh T, Harris KP. Influence of allograft size to recipient body-weight ratio on the long-term outcome of renal transplantation. *British Journal of surgery* 2000;87(3):314-9.
231. Nickerson P, Steurer W, Steiger J, Zheng X, Steele AW. Cytokines and the Th1/Th2 paradigm in transplantation. *Opin. Immunol.*1994;6:757-764.
232. Nonoyama S, Hollenbaugh D, Aruffo A, Ledbetter JA, Ochs HD. B cell activation via CD40 is required for specific antibody production by antigen-stimulated human B cells. *J.Exp.Med.*1993;178:1097-1102.



233. Ojcius DM, Persechini PM, Zheng LM, Motaroberto PC, Adeodante SC, Young JDE. Cytotoxic effector mechanisms, eds. E.R.Podack; Springer-Verlag 1991; Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, pp 587.

234. Ojcius DM, Persechini PM, Zheng LM, Motaroberto PC, Adeodante SC, Young JDE. Cytolytic and ion channel-forming properties of the N-terminus of lymphocyte perforin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991; 88: 4621.

235. Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schmouder RL. Delayed graft function, risk factors and implication for renal allograft survival. Transplantation 1997;63(7):968.

236. Ono Y, Mizutani K, Kamihira O, Hattori R, Ohshima S. Depressed expression of CD28 antigen on lymphocytes in long-term kidney transplant patients. Transpl.Proc.1998;30:1164-1166.

237. Okabayashi T,Horimi T,Hiramatsu S.Immunohistochemical analysis of mononuclear cells in rejected human renal allografts by monoclonal antibodies.Jpn.J.Transplant.1985;20:292.

238. Opelz G. Effect of HLA matching in 10000 cyclosporine treated kadaver kidney transplants. Transplant.Proc.1987;19:641.

239. Opelz G, Sengar DRS, Mickey MR, Terasaki PI. Effect of blood transfusions on subsequent kidney transplant. Transpl.Proc.1973;5:253-259.

240. Opelz G. Mickey MR, Terasaki PI. Blood transfusion and unresponsiveness to HLA. Transplantation 1973;16:649-654.

241. Opelz G. How unusual are the University of Minnesota HLA matching results? Transplantation 1992;53:694-696.

242. Opelz G. Wujciak T, Mytilineos J and Sherer S. Revisiting HLA matching for kidney transplantation. Transplant.Proc.1993;25:1173-1175.

243. Opelz G, Scherer S, Mytilineos J. Analysis of HLA-DR split specificity matching in cadaver kidney transplantation. *Transplantation* 1997;63:57-59.

244. Opelz G, Vanrenterghem Y, Kirste G, Gray DWR, Horsburgh T, Lachance JG, Largiader F, Lange H, Vujaklija-Stipanović K, Alvarez-Grande J, Schott W, Hoyer J, Schnueile P, Descoeudres C, Ruder H, Wujciak T, Schwarz. Prospective evaluation of pretransplant blood transfusion in cadaver kidney recipients. *Transplantation* 1997;63:964-967.

245. Opelz G. Impact of HLA compatibility on survival of kidney transplants from unrelated live donors. *Transplantation* 1997;64:1473-1475.

246. Opelz G. HLA compatibility and kidney grafts from unrelated live donors. *Transplant. Proc.* 1998;30:704-705.

247. Opelz G, Wujciak T, Ritz E. Association of chronic graft failure with recipient blood pressure: collaborative transplant study. *Kidney Int.* 1998;53(1):217.

248. Orlić P. Imunološko praćenje bolesnika s transplantiranim bubregom: pretransplantacijski status, procjena intenziteta imunosupresije i predviđanje krize odbacivanja. Doktorska disertacija 1984.

249. Orr HT, Lopez de Castro, Parham P, Ploegh PL, Strominger JL. Comparison of amino acid sequences of two human histocompatibility antigens, HLA-A2 and HLA-B7: location of putative alloantigenic sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979;76:4395.

250. Ortaldo JR, Herberman RB. Heterogeneity of NK cells. *Ann. Rev. Immunol.* 1984;2:359.

251. Ortho Multicenter Transplant Study Group. A randomized clinical trial of OKT3 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplants. *N. Engl. J. Med.* 1985;313:337.

252. Ostergard HL, Kane KP, Mescher MF, Clark WR. Cytotoxic T lymphocyte mediated lysis without release of serine esterase. *Nature* 1987;330:74-80.
253. Pantaleo G, Zocchi MR, Ferrini S, Poggi A, Tambussi G, Bottino C, Moretta L, Moretta A. Human cytolytic cell clones lacking surface expression of T cell receptor alfa/beta or gamma/delta. Evidence that surface structures other than CD3 or CD2 molecules are required transduction. *J.Exp.Med.* 1988;168:13-22.
254. Payne R. The association of febrile transfusion reactions with leukoagglutinins. *Vox Sang.* 1957;2:233-241.
255. Payne R, Rolfs MR. Fetomaternal leukocyte incompatibility. *J.Clin. Invest.* 1958; 37:1756-1763.
256. Pende D, Sinai S, Accame L, Pareti L, Falco M, Geraghty D, Le Bouteiller P, Moretta L, Moretta A. HLA-G recognition by human natural killer cells. Involvement of CD 94 both as inhibitory and as activating receptor complex. *Eur.J.Immunol.* 1997;27:1831-2122.
257. Persijn GG, Smits JMA, De Meester J. Nonimmunologic matching in renal transplantation. *Transplant.Proc.* 1999;31:1772.
258. Perussia B, Trinchieri G, Jackson A. The Fc receptor for IgG on human NK cells: phenotypic, functional and comparative studies with monoclonal antibodies. *J.Immunol.* 1984;133:180.
259. Pfeffer PF, Gjertsen HA, Gandersnack G, Lexow PB, Sodal G, Thorsby E. Analysis of infiltrating lymphocytes from FNAB in kidney transplant patients by a rapid and sensitive immunomagnetic method. *Transpl.Proc.* 1989;21:354.

260. Phillips JH, Lanier LL. Lectin-dependent and anti-CD3 induced cytotoxicity are preferentially mediated by peripheral blood cytotoxic T lymphocytes expressing Leu-7 antigen. *J.Immunol.* 1986; 136:1579.
261. Piccotti JR, Chan SY, VanBuskirk AM, Eichwald EJ, Bishop DK. Are Th2 helper T lymphocytes beneficial, deleterious, or irrelevant in promoting allograft survival? *Transplantation* 1997;63:619-624.
262. Platt JL, Le Bien TW, Michael AF. Interstitial mononuclear cell populations in renal graft rejection: identification by monoclonal antibodies in tissue sections. *J.Exp.Med.* 1982;155:17.
263. Pober JS, Orosz CG, Rose ML, Savage COS. Can graft endothelial cells initiate a host anti-graft immune response? *Transplantation* 1996;61:343.
264. Podack ER, Dennert G. Assembly of two types of tubules with putative cytolytic function by cloned natural killer cells. *Nature* 1983;302:442-445.
265. Podack ER, Konigsberg PJ. Cytolytic T-cell granules: isolation, structural, biochemical and functional characterisation. *J.Exp.Med.* 1984;160:695-710.
266. Podack ER. Lymphocyte mediated cytotoxicity. U: Preissner KT, Rosenblatt S, Kost C, Weferhoff J, Mosher DF. *Biology of Vitronectins and their receptors*, izd. Elsevier Science 1993;237-242.
267. Podack ER. Functional significance of two cytolytic pathways of cytotoxic T lymphocytes. *Leukocyte Biol.* 1995;57:548-552.
268. Portales P, Djamali A, Tinland O, Clot J, Mourad G. Perforin intracytoplasmic expression by peripheral blood lymphocytes in renal transplantation. *Transpl.Proc.* 1997;29:2315-2317.

269. Porter CJ, Ronan JE, Cassidy JD. Fas-Fas ligand antigen expression and its relationship to increased apoptosis in acute renal transplant rejection. *Transplantation* 2000;69(6):1091.
270. Quinton W, Dillard D, Scribner BH. Cannulation of blood vessels for prolonged haemodialysis. *Trans.Am.Soc.Artif.Intern. Organs.*1960;6:104.
271. Qian Jx, Lee SM, Suen Y, Knoppel E, Cairo MS. Decreased IL-15 from activated cord versus adult peripheral mononuclear cells and the effect of IL-15 in upregulating antitumor immune activity and cytokine production in cord blood. *Blood* 1997; 90(8):3106.
272. Raftery MJ, Seron D, Harley B, Koffman G, Cameron JS. Immunohistological analysis of the early renal allograft biopsy. *Transpl.Proc.*1989;21:280.
273. Ramirez F, Fowell DJ, Puklavec M, Simmonds S, Mason D. Glucocorticoids promote a Th2 cytokine response by CD4+ T cells in vitro. *J.Immunol.*1996;156:2406-2412.
274. Ramsey MK, Djeu YJ, Rook AH. Decreased circulating LGL associated with depressed NK cell activity in renal transplant recipients. *Transplant.*1984;38:351.
275. Ratner LE, Hadley GA, Hanto DW, Mohanakumar T. Immunology of renal rejection. *Arch.Pathol.Lab.Med.*1991;115:283.
276. Rea IM, McNerlan SE, Alexander HD. CD69, CD25, and HLA-DR activation antigen expression on CD3+ lymphocytes and relationship to serum TNF-alfa, IFN-gamma and sIL-2R levels in aging. *Exp.Gerontol.*1999;34:79.
277. Reasvald MH, Bloemena E, Suraccho S, Berge RJ .T gamma/delta lymphocytes in renal transplant recipients. *Nephrol. Dial. Transplant.*1992;7:530.

278. Remuzzi G, Rugginenti P, Locatelli G et al. Double transplant of marginal kidneys is safe and allows a faster function recovery than single transplant of optimal kidneys. JASN 1998. (Book of abstracts).

279. Richard K, Silbey MD. Pathology and immunopathology of solid organ rejection. Transpl.Proc.1989;21:14.

280. Robertson H, Wheeler J, Kirby JA, Morley AR. Renal allograft rejection: In situ demonstration of cytotoxic intratubular cells. Transplantation 1996;61:1546-1549.

281. Robertson H, Morley AR, Talbot D, Callanan K, Kirby JA. Renal allograft rejection. Transplantation 2000;69:684.

282. Robertson SA, Seamark RF. Uterine granulocyte-macrophage colony stimulating factor in early pregnancy: Cellular origin and potential regulators. Mol.Biol. of the feto-maternal relationship. Colloque INSERM 212 Edited by Mowbray, Chaquat G. Paris.1991; Editions John Librey Eurotext.

283. Rogers CA, Belger MA, Bawden RJ, et al. Effect of HLA mismyatching and other donor factors on renal allograft survival: analysis of 12,287 UK and Republic of Ireland transplants. Transplant.Proc1996;28(1):118-120.

284. Roths JB, Murphy ED, Eicher EM. A new mutation, *gld*, that produces lymphoproliferation and autoimmunity in C3/HaJ mice. J.Exp.Med.1984;159:1-20.

285. Ruiz-Torres MP, Bosch RJ, O'Valle F, et al. Age-related increase in expression of TGF-beta in the rat kidney: relationship to morphological changes. J.Am.Soc. Nephrol. 1998; 9: 782

286. Sad Subash, Kagi D, Mosmann TR. Perforin and Fas killing by CD8+T cells limits their cytokine synthesis and proliferation. J.Exp.Med.1996;184:1543-1547.

287. Salcedo TW, Azzoni L, Wolf SF, Perussia B. Modulation of perforin and granzyme messenger RNA expression in human natural killer cells. *J.Immunol.*1993;151:2511-2520.

288. Sandberg L, Thorsby E, Kissmeyer-Nielsen F, Lindholm A. Evidence of a third sublocus within the HL-A chromosomal region. *Histocompatibility testing, Copenhagen 1970*:165-169.

289. Sankaran D, Asderakis A, Ashraf S, Roberts IS, Short CD, Dyer PA, Sinnot PJ. Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation. *Kidney Int.*1999;56(1):281-8.

290. Sceinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK. Role of transcriptional of cytokines in a mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 1995;270:283-286.

291. Schwartz RH. Acell structure model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 1990; 248:1349-56.

292. Schwartz RH. T cell anergy. *Sci.Am.*1993;269:62-71.

293. Schweitzer EJ, Matas AJ, Gillingham KJ, et al. Causes of renal allograft loss: progress in the 1980's, challenges for the 1990s. *Ann.Surg.*1991;214:679.

294. Schreirer MH, Baumann G, Zenke G. Inhibition of T-cell signaling pathways by immunophilin drug complexes: are side effects inherent to immunosuppressive properties? *Transpl.Proc.*1993;25:502-507.

295. Scott P. IL-12: Initiation cytokine for cell mediated immunity. *Science* 1993; 260: 496-497.

296. Seder RA, Germain RN, Linsley PS, Paul WE. CD28-mediated costimulation of interleukin 2 (IL-2) production plays a critical role in T cell priming for IL-4 and interferon gamma production. *J.Exp.Med.*1994;179:299-304.

297. Seko Y, Shinkai Y, Kawasaki A, Yagita H, Okumura K, Takaku F, Yazaki Y. Expression of perforin in infiltrating cells in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus B3. *Circulation* 1991;84:788.
298. Sedmark DD, Orosz CG. The role of vascular endothelial cells in transplantation. *Arch.Pathol.Lab.Med.*1991;115:260.
299. Selvaggi G, Ricordi C, Podack ER, Inverardi L. The role of perforin and Fas pathways of cytotoxicity in skin graft rejection. *Transplantation* 1996; 62: 1912-15.
300. Shackleford DA, Kaufman JF, Korman AJ, Strominger JL. HLA-DR antigens: structure, separation of subpopulations, gene-cloning and function. *Immunol. Rev.* 1982;66:133.
301. Sharma VK, Bologa RM, LI B, Xu GP, Lagman M, Hiscock W, Mouradian J, Wang J, Serur D, Rao VK, Suthanthiran M. Molecular executors of cell death-differential intrarenal expression of Fas ligand, Fas, granzyme B and perforin during acute and/or chronic rejection of human renal allografts. *Transpl.*1996;62:1860-1866.
302. Shinakai Y, Tokio K, Okumura K. Homology of perforin to the ninth component (C9). *Nature* 1988;334:525.
303. Shirwan H, Barwari L, Whan NS. Predominant expression of T helper2 cytokines and altered expression of T helper 1 cytokines in long-term allograft survival induces by intrathymic immune modulation with donor class I major histocompatibility complex peptides. *Transplantation* 1998;66(12):1802-1809.
304. Sibille C, Gould K, Hammerling G, Townsend A. A defect in the presentation of intracellular viral antigens is restored by interferon-gamma in cells impaired major histocompatibility complex class I assembly. *Eur.J.Immunol.*1992;22:433-440.



305. Sirak JH, Orosz CG, Roopenian DC, Wakely E, VanBuskirk AM. Cardiac allograft tolerance; failure to develop in interleukin-4-deficient mice correlates with unusual allo-sensitization patterns. *Transplantation* 1998;65(10):1352-1356.
306. Sirchia G, Polli F, Cardillo M, Scalamogna M, Rebutta P, Taioli E, Remuzzi G, Nocera A. Cadaver kidney allocation in the North Italy Transplant Program on the Eve of the new millennium. In *Clinical transplants 1998*, Cecka and Terasak, Eds. UCLA Tissue typing Laboratory, Los Angeles, California.
307. Sirchia G, Polli F, Cardillo M, Scalamogna M, Rebutta P, Taioli E. Effect of HLA matching on cadaver kidney survival in the North Italy Transplant Program. *Transpl. Proc.* 1998;30:1735.
308. Smits JMA, Claas FHL, Van Houwelingen, Persijn GG. Do noninherited maternal antigens (NIMA) enhance renal graft survival? *Transpl.Int.* 1998; 11:82-88.
309. Smolen JS, Tohidast-Akrad M, Gal A, Kunaver M, Eberl G, Zene P, Falus A, Steiner G. *Scand.J.Rheumatol.* 1996;25:1-4.
310. Smyth MJ, Ortaldo JR, Bere W, Yakita H, Okumura K, Young HA. IL-2 and IL-6 synergize to augment the pore-forming protein gene expression and cytotoxic potential of human peripheral blood T cells. *J.Immunol.* 1990;145:1159.
311. Smyth MJ, Ortaldo JR, Shinkai Y, Yagita H, Nakata M, Okumura K, Young HA. Interleukin-2 induction of pore-forming protein gene expression in human peripheral blood CD8+ T cells. *J.Exp.Med.* 1990;171:1269.
312. Smyth MJ, Strobl SL, Young HA, Ortaldo JR, Ochoa AC. Regulation of lymphokine-activated killer activity and pore forming protein gene expression in human peripheral blood CD8+ lymphocytes. *J.Immunol.* 1991;146:3289.

313. Smits JMA, Persijn GG, De Meester J. Living unrelated renal transplantation: the new alternative? *Transpl.Int.* 1996;9:252..

314. Smits JMA, De Meester J, Persijn GG, et al. Long-term results of solid organ transplantation. Report from the Eurotransplant International Foundation. In *Clinical transplant 1996*. Eds Cecka JM, Terasaki PI. UCLA Tissue typing Laboratory. USA 1997;109-128

315. Smits JMA, De Meester J, Persijn GG, Claas FHJ, Vanrenterghem Y. Long-term results of solid organ transplantation. *Eurotransplant newsletter* 1997; 141: 10.

316. Smits JMA, Houwelingen HC, De Meester J, Saskia le Cessie, Persijn GG, Claas FHJ, Frei U. Permanent detrimental effect of nonimmunological factors on long-term renal graft survival. *Transplantation* 2000; 70:317-323.

317. Snell GD, Dausset J, Nathenson S. *Histocompatibility* Academic Press, New York, 1976:181-247.

318. Solheim BG, Thorsby E. Evidence of a third HL-A locus. *Transplant. Proc.* 1973; 5: 1579-1580.

319. Solillou JP, Moreau JF. NK cells activity in allograft immunity. *Heart Transplant.* 1982;2:52.

320. Solillou JP, Vil H, Moreau JF, Peyrot MA, Blandin F. Increased NK activity in rats rejecting heart allograft. *Transplant.* 1983;36:726.

321. Starzl TE, Marchioro TL, Hutchinson De, Porter KA, Cerrilli GJ, Brettschneider L. The clinical use of antilymphocyte globulin in renal homotransplantation. *Transplant.* 1967;5:1100.

322. Starzl TE, Brettschneider L, Penn I, Schmidt RW, Bell P, Kashiwagi N, Townsend CM, Putnam CW. A trial with heterologous antilymphocyte globulin in man. *Transpl.Proc.*1969;1:448.
323. Starzl TE, Demetris AJ, Ricordi C, Trucco M et al. Cell migration, chimerism and graft acceptance. *Lancet* 1992;339:1579.
324. Starzl TE. Cell migration and chimerism - A unifying concept in transplantation - with particular reference to HLA matching and tolerance induction. *Transplant.Proc.*1993;25:8-12.
325. Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, Zeevi A, Ramos H, Terasaki P, Rudert WA, Kocova M, Ricordi C, Ildstad S, Murase N. Chimerism and donor-specific nonreactivity 27-29 years after kidney allotransplantation. *Transplantation* 1993;55:1272-77.
326. Starzl TE and Fung JJ. The politics of grafting cadaver kidneys. *Lancet* 1996;348:454-455.
327. Stavy L, Cohen IR, Feldman M. The effect of hydro cortisone on lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Cell. Immunol.* 1973; 7: 302.
328. Steiger J, Nickerson PW, Steurer W, Lopatin M, Strom TB. IL-2 knockout recipient mice reject islet cell allografts. *J.Immunol.*1995;155:489.
329. Sternberg IA, Klein T, Narinsky R, Yussim A. Peripheral microchimerism in living donor kidney transplantation-correlation with posttransplantation course and long term graft survival. *Transpl.Proc.*2000;32:690-691.
330. Straub RH, Konecna L, Hrach S, et al. Serum dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate are negatively correlated with serum interleukin-6 (IL-6) and

DHEA inhibits IL-6 secretion from mononuclear cells in man in vitro; possible link between endocrinosenescence and immunosenescence. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 1998;83:2012.

331. Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, Shapiro M, Vasconcellos L, Harmon W, Strom TB. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 1997;94:695-700.

332. Strominger JL, Mann DL, Parham P, Robb R, Springer T, Terhorst T. Structure of HLA-A and B antigens isolated from cultured human lymphocytes. *Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.* 1977;41:323.

333. Stuart PM, Griffith TS, Usui N, Pepose J, Yu X, Ferguson TA. CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis is necessary for corneal allograft survival. *J.Clin.Invest.* 1997;99:396.

334. Suci-Foca N, Cohen DJ, Benvenisty AI, et al. Influence of HLA matching on kidney allograft survival. *Transplant.Proc.* 1996;28(1):121-122.

335. Schwarz R, Kohlhaw K, Wenzke M, Lubke P, Hauss J, et al. Monitoring of peripheral blood lymphocyte subsets after renal transplantation. 9<sup>th</sup> Congress of the European Society for Organ Transplantation, Book of abstracts, 1402.

336. Szkeres-Bartho J, Falkay G, Torok A, Pacsa AS. The mechanism of the inhibitory effect of progesterone on lymphocyte cytotoxicity: II. Relationship between cytotoxicity and cyclooxygenase pathway of arachidonic acid metabolism. *Am.J.Reprod.Immunol .Microbiol.* 1985;9:19-22.

337. Szkeres-Bartho J, Auran B, Debre P, Andreu G, Denver L, Chaouat G. The mechanism of the inhibitory effect of progesterone on lymphocyte cytotoxicity: I. Immunoregulatory effects of a suppressor factor from healthy pregnant women's lymphocytes after progesterone induction. *Cell.Immunol.* 1989;122:281-294.

338. Swenson KM, Wang T, Markowitz JS, Maggard M, Spear GS, Imagawa DK, Goss J, Busutill R, Seu P. Fas ligand gene transfer to renal allografts in rats. *Transplant.* 1998;65:155-160.

339. Shen Y, Lipman ML, Jeffery JR, Gough J, McKenna RM, Grimm PC, rush DN. Immune-activation gene expression in clinically stable renal allograft biopsies:molecular evidence for subclinical rejection. *Transplantation* 1998;27;66(12):1673-81.

340. Tagaya Y, Bamford RN, DeFilippis AP, Waldmann TA. IL-15: a pleiotropic cytokine with diverse receptor/signaling pathways whose expression is controlled at multiple levels. *Immunity* 1996.;4:329-336.

341. Takedo I, Horimi T, Okabayashi T, Nagae S, Kaneda M, Mukai M, Shimayama H, Chono S, Orito K. Double staining analysis of mononuclear cells infiltrating rejected kidneys:immunohistochemical investigation of rejection mechanisms. *Transpl.Proc.* 1987;19:372.

342. Takedo I. Immunological analysis of mononuclear cells infiltrating into rejected kidneys-using ABC method and double staining method. *Jpn.J. Transplant.* 1988;23:181.

343. Takeuchi T, Lowry RP, Konieczny B. Heart allografts in murine systems. The differential activation of Th2-like effector cells in peripheral tolerance. *Transplantation.* 1992;53:1281-1294.

344. Tan LC, Howell WM, Smith JL, Sadek SA. Monitoring peripheral T lymphocyte cytokine gene expression in renal transplatation. 9<sup>th</sup> Congress of the European Society for Organ Transplantation, Book of abstracts, 160.

345. Targau S, Darey F. Interferon activation of "prespontaneous killer" (Pre-SK) cells and alteration in kinetics of lysis of both "pre-SK" and active SK cells. *J.Immunol.* 1980;124:2157.
346. Tyler JD, Galli SJ, Sinder ME, Dvorak AM, Steinmuller D. Cloned Lyt2+ cytolytic T lymphocytes destroy allogenic tissue in vivo. *J.Exp.Med.* 1984;159:234.
347. Terasaki PI. A ten year prediction for transplant survival. U Terasaki PI, Cecka JM. *Clinical Transplant.* Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory, 1992: 501-512.
348. Terasaki PI, Koyama H, Cecka JM, Gjertson DW. The hyperfiltration hypothesis in human renal transplantation. *Transplantation* 1994;57:1450.
349. Terasaki PI, McClelland JD. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 1964;204:998-1000.
350. Thomas J, Carver M, Cunningham P, Park K, Gonder J. Promotion of incompatible allograft acceptance in rhesus monkeys given posttransplant ATG and donor bone marrow: in vivo parameters and immunohistological evidence suggesting microchimerism. *Transplantation* 1987;43:332.
351. Thomson AW. FK-506: profile of an important new immunosuppressant. *Transplant.Rew.* 1990;4:1.
352. Thorogood J, Persijn GG, van Rood et al. The effect of HLA matching on kidney graft survival in separate post-transplantation intervals. *Transplantation* 1990;50:146.
353. Thorogood J, Van Houwelingen JC, van Rood JJ, et al. Factors contributing to long-term kidney graft-survival in Eurotransplant. *Transplantation* 1992;54:152-158.
354. Ting A, Morris PJ. Matching for B-cell antigens of HLA-DR series in cadaver renal transplantation. *Lancet* 1978;1:575.

355. Ting A, Morris PJ. Powerful effect of DR matching on survival of cadaveric renal allografts. *Lancet* 1980;ii:1278.
356. Tilney NL, Kupiec-Weglinski JW: Advances in understanding of rejection mechanisms. *Transpl.Proc.* 1989;21:10.
357. Toledo-Pereyra LH, Wohlman MH, Priestley JC, Baskin S, McNichol LJ, Whitten J. Long-term use of antilymphoblast globulin(ALG) as a maintenance immunosuppressant: A new approach. *Dialysis and transplant.* 1981; 10:12.
358. Tomura M, Nakatani I, Murachi M, Tai XG, Toyooka K, Fujiwara H. Suppression of allograft responses induced by interleukin-6, which selectively modulates interferon-gamma but not interleukin-2 production. *Transplantation* 1997;64(5):757-763.
359. Totterman TH, Hanas E, Larsson E, Sjoberg G, Tufveson G. Regulation of human allograft rejection: kidney-infiltrating suppressor inducer and suppressor effector T-cells are reduced during rejection. *Transpl.Proc.* 1989;21:359.
360. Traeger J, Carraz M, Fries D, Perrin J, Saubier E, Bernhardt JP, Revillard JP, Bonnet P, Archimbaud JP, Brocher J. Studies of antilymphocyte globulins made from thoracic duct lymphocytes. *Transplant.Proc.* 1969, 1:455.
361. Traeger J, Touraine JL, Fries D, Berthoux F. Evaluation of intravenous route for administration of antilymphocyte globulins in humans. *Transpl.Proc.* 1971;3:749.
362. Trenn G, Takajama H, Sitkovsky MV. Exocytosis of cytolytic granules may not be required for target cells lysis by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 1987; 330:72-74.
363. Trinchieri G, Perussia B. Human NK cells, biologic and pathologic aspects. *Lab.Invest.* 1984;50:489.

364. Tscopp J, Masson D, Stanley KK. Structural/functional similarity between proteins involved in complement and cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Nature* 1986; 322:831.
365. Tscopp J, Schafer S, Masson D, Peitsch MC, Heusser C. Phosphorylcholine acts as a Ca<sup>2+</sup> dependent receptor molecule for lymphocyte perforin. *Nature* 1989;337:272.
366. Tullius SG, Reutzel-Selke A, Egermann F, Nieminen-Kelha M, Jonas S, Wolk HD, Neuhaus P. Contribution of prolonged ischaemia and donor age to chronic renal allograft dysfunction. *Journal of the American Society of nephrology* 2000;11(7):1317-24.
367. Turka LA, Linsley PS, Lin H, et al. T-cell activation by the CD28 ligand B7 is required for cardiac allograft rejection in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1992;89:1102-05.
368. Tyler JD, Galli SJ, Sinder ME, Dvorak AM, Steinmuller D. Cloned Lyt2+ cytolytic T lymphocytes destroy allogenic tissue in vivo. *J.Exp.Med.*1984;159:234.
369. Twuyver E, De Hoop J, Ten Berge RJM, Wilmiink JM, Lems SPM, Van de Berg AP, Slooff MJH, De Waal LP. Comparison of T cell responses in patients with long-term surviving liver allograft. *Transplantation* 1996;61:1392-97.
370. Valderrabano F, Jones EHP, Mallik NP. Report on management of renal failure in Europe, XXIV, 1993. *Nephrol.Dial.Transplant.*1995; 10:1.
371. Vanrenterghem YF. Approaches to improving long-term allograft outcome. *Transpl.Proc.*1998;30 (suppl.8A):2S.
372. Van Rood JJ, Eernisse JG, Van Leuwen A. Leukocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature* 1958;181:1735-1736.
373. Van Rood JJ, Van Leeuwen A. Leukocyte grouping. A method and its applications. *J.Clin.Invest.*1963;42:1382-1390.



374. Van Rood JJ, Van Leeuwen A, Shippers HMA, Ceppellini R, Matiuiz PL, Curtoni S. Leucocyte group and their relation to homotransplantation. *Ann.N Y Acad.Sci.*1966;129:467.
375. Van Rood JJ, Persijn GG, Cohen B, Lansbergen Q, Schuurman RKB. Hierarchy of factors influencing kidney graft survival. *Dialysis and transplantation* 1982;11: 111-118.
376. Vasconcellos L, Harmon W, Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, Shapiro M, Strom TB. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl.Acad.Sci USA* 1997;21;94:695-700.
377. Vujaklija-Stipanović K. Transfuzija krvi u transplantaciji bubrega. Doktorska disertacija, 1989. Sveučilište "Vladimir Bakarić" u Rijeci, Medicinski fakultet
378. Waiser J, Budde K, Katalinic A, Kuerzdorfer M, Riess R, Neumayer HH. Interleukin-6 expression after renal transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1997; 12(4): 753 -759.
379. Wang J, Nonomura N, Ichiamaru N, et al. Expression of Fas ligand in renal grafts with acute and chronic rejection in the rat model. *J.Interferon Cytokine Res.*1997;17:369.
380. Watanabe FR, Brannan CI, Itoh N, et al. The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J.Immunol.*1992;148:1274.
381. Wecker H, Auchincloss H. Cellular mechanisms of allograft rejection. *Curr.Opinion Immunol.*1991;3:722-8.
382. Wei X, Smith G, Bolton EM, Ruchatz H, Liew FY, Bradley JA. Selective blockade of IL-15 by soluble IL-15 receptor alpha-chain enhances cardiac allograft survival. *J Immunol.* 2000;15:3444-50.

383. Weihs KL, Kimmel PL, Phillips TM, Simmens SJ, Peterson RA, Alleyne S, Cruz I, Yanovski JA, Veis JH. Immunologic function and survival in hemodialysis patients. *Kidney Int.*1998;54:236-44.

384. Weimer W, Baumgartner D, Hendriks GF. The prophylactic use of Ortochoclone OKT3 in kidney and heart transplantation *Transpl.Proc.*1988;20:96.

385. Weimer W, Baan CC, van Gelder T, Balk AH, Knoop CJ, Holweg CT, Maat LP. Functional responses of T cells blocked by anti-CD25 antibody therapy during cardiac rejection. *Transplantation* 2000; 15:69:331-6.

386. Weimer R, Zipperle S, Daniel V, Carl S, Stroehler G, Opelz G. Superior 3-year kidney graft function in patients with impaired pretransplant Th2 responses. *Transpl.Int.*1998;11:350-356.

387. Weimer R, Zipperle S, Daniel V, Carl S, Stroehler G, Opelz G. Pretransplant CD4 helper function and interleukin-10 response predict risk of acute kidney graft rejection. *Transplantation* 1996;62:1601.

388. Weintraub BC, Jackson MR, Hedrick SM. Gamma/delta T cells can recognize nonclassical MHC in the absence of conventional antigenic peptides. *J.Immunol*1994;153:3051-3058.

389. Weiss A. Structure and function of the T cell antigen receptor. *J.Clin. Invest.* 1990;86:1015-22.

390. Weiss A. T lymphocyte activation. Paul W, ed. *Fundamental immunology.* Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999:411.

391. Wever PC, Boonstra JG, Laterveer JC, Hack CE, Van der Woude FJ, Daha MR, Berge IJ. Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity in acute renal allograft rejection. *Transplantation* 1998;66(2):259-264.

392. Williams NS, Engelhard VH. Identification of a population of CD4+ CTL that utilizes a perforin rather than a Fas ligand-dependent cytotoxic mechanism. *J.Immunol.* 1996; 156:153-159.
393. Wood KJ, Dalman JM, Morris JP. Cytotoxic cells alone are not sufficient to mediate renal graft function. *Transpl. Proc.* 1989;21:338.
394. Woodward JE, Qin L, Chavin KD. Blockade of multiple costimulatory receptors induces hyporesponsiveness: inhibition of CD2 plus CD28 pathways. *Transplantation* 1996;62:1011.
395. Wu Y, Guo Y, Liu Y. A major costimulatory molecule on antigen-presenting cells, CTLA4 ligand A, is distinct from B7. *J.Exp.Med.* 1993;178:1789.
396. Wu CY, Warrior RR, Wang X, Presky DH, Gately MK. Regulation of interleukin-12 receptor beta1 chain expression and interleukin-12 binding by human peripheral blood mononuclear cells. *Eur.J.Immunol.* 1997;27:147-154.
397. Yagita H, Nakata M, Kawasaki A, Shinkai Z, Okumura K. Role of perforin in lymphocyte mediated cytotoxicity. *Advances in Immunol.* 1992;51:215.
398. Yang Y, Mercep M, Worel CF, Ashwell JD. Fas and activation-induced Fas ligand mediate apoptosis of T cell hybridomas: inhibition of Fas ligand expression by retinoic acid and glucocorticoids. *J.Exp.Med.* 1995;181:1673-1682.
399. Yard B, Spruyt-Geertse M, Claas F, Thorogood J, Bruijn JA, Paape ME, Stein SY, Van Bachel JH, Kooyman CM. The clinical significance of allospecific antibodies against endothelial cells detected with an antibody-dependent cellular cytotoxicity assay for vascular rejection and graft loss after renal transplantation. *Transplant.* 1993;55:1287.
400. Yip GH, Legendre C, Rodrigues GA, Guttman RD. LGL subsets in long-term renal allograft recipients. *Transpl. Proc.* 1987;19:3396.

401. Young JDE, Cohn ZA, Clark WR, Liu CC. A calcium and perforin independent pathway of killing mediated by murine cytolytic cells. *J.Exp.Med.* 1987;166:1894-1899.

402. Young JDE, Hengartner H, Cohn ZA, Podack ER. Purification and characterisation of a cytolytic pore-forming protein from granules of cloned lymphocytes with natural killer activity. *Cell* 1986;44:849-859.

403. Young JDE, Cohn ZA, Podack ER. The ninth component of complement and the pore-forming protein (perforin 1) from cytotoxic T cells: Structural, immunological and functional similarities. *Science* 1986;233:184.

404. Young JDE, Damiano A, Di Nome MA, Leong LG, Cohn ZA. Dissociation of membrane binding and lytic activities of the lymphocyte pore-forming protein (perforin). *J.Exp.Med.* 1987; 165: 1371.

405. Young LH, Peterson LB, Wicker LS, Persechini PM, Young JDE. In vivo expression of perforin by CD8+ lymphocytes in autoimmune disease: studies on spontaneous and adoptively transferred diabetes in nonobese diabetic mice. *J.Immunol.* 1989;143:3994.

406. Young LH, Joag SV, Zheng LM, Lee CP, Lee YS, Young JDE. Perforin-mediated myocardial damage in acute myocarditis. *Lancet* 1990;336:1019.

407. Yun S, Sawyer GJ, Zhang X, Gustafsson K, and Fabre JW. The role of IL-2 in allograft rejection-a lesson learned from experimental work. *Transplantation* 2000;69:2480.

408. Yun S, Sawyer GJ, Zhang X, Gustafsson K, and Fabre JW. Specific suppression of IL-2 biosynthesis by synthetic antisense oligodeoxynucleotides does not influence allograft rejection. *Transplantation* 2000;69:2586.

409. Zamaukaite A, Perez-Cruz I, Yagoob MM, Madrigal JA, Cohen SB. Effects of renal dialysis therapy modality on T cell cytokine production. *Nephrol.Dial.Transplant.* 1999;14:49-55.

410. Zarling JM, Eshra L, Barden EC, Hroszewicz J, Carter WA. Activation on human NK cell cytotoxic for human leukemia cells by purified interferon. *J.Immunol.* 1979;123:63.

411. Zester U, Sester M, Hauk M, Kaul H, Kohler H, Girndt M. T-cell activation follows Th1 rather than Th2 pattern in haemodialysis patients. *Nephrol.Dial.Transplant.* 2000;15:1217-23.

412. Zheng XX, Li XC, Schachter AD, Zand MS, Li Y, Harmon WE, Strom TB. Differential expression of T cell growth factors in rejecting murine islet and human renal allografts: conspicuous absence of interleukin -9 (IL-9) despite expression of IL-2, IL-4, IL-7 and IL-15. *Transplantation* 1998;27;66:265-8.

413. Zheng XX, Li XC, Ima A, Li Y, Malek TR, Strom B. Blocking the common gamma-chain of cytokine receptors induces T cell apoptosis and long-term islet allograft survival. *J.Immunol.* 2000;164:1193-9.

414. Ziegelbaum M,Valenzuela R,Hayes JM,Graneto DD,Strem SB,Novick AC.The identification of lymphocyte phenotypes in peripheral blood of long-term renal allograft patients. *Transpl.Proc.* 1989;21:373.

415. Zlabinger GJ, Kudlacek S, Pohanka E, Franz M,Hamilton G,Rosenmayr A,Kavorik J.Evidence that sensitivity to cyclosporine is influenced by the HLA-DR phenotype of kidney graft recipients.*Transplant.* 1992;53:758.

416. Zondervan P, Baan CC, Holweg CH, van Gelder T, Knoop CJ, Niesters HG, Mochtar B, Balk AH, Weimar W. Redundancy of the cytokine network in the development of rejection after clinical heart transplantation. *Transplant.Int.* 1998;11;Suppl.1:S512-4.

417. Zondervan P, Baan CC, Holweg CH, van Gelder T, Knoop CJ, Niesters HG, van der Meer P, Mochtar B, Balk AH, Weimar W. Blockade of the interleukin (IL)-2 receptor pathway with a monoclonal anti-IL-2 receptor antibody (BT563) does not prevent the development of acute heart allograft rejection in humans. *Transplantation* 1998;15;65(3):405-10.

418. Zuki S, Daichou Y, Kurashige S, Hashimoto S, Suzuki S. Characteristic cytokine products of Th1 and Th2 cells in hemodialysis patients. *Nephron* 1999;83(3):237-45.

419. Zukoski CF, Calaway JM, Rhea WG. Tolerance to a canine renal homograft induced by prednisolone. *Surg.Forum* 1963;14:208.

420. Zukowska-Szezechowska E, Grzeszczak W, Moczulski D, Religa Z. Natural killer cell count in hemodialysis patients. *Pol.Arch.Med.Wewn.* 1998;100:9-18.

421. Xu GP, Sharma VK, Li B et al. Intragraft expression of IL-10 messenger RNA: a novel correlate of renal allograft rejection. *Kidney Int.* 1995;48:1504.

422. X.C.A. Li, Zheng XX, Strom TB. T-cell growth factors in allograft rejection and tolerance. *Transplant.Proc.* 1999;31:342-3.

## ŽIVOTOPIS

Rođena sam 8.11.1964. u Rijeci, gdje sam se školovala i završila Medicinski fakultet u siječnju 1989.g. Iste godine sam upisala poslijediplomski studij i 1994.g. obranila magistarski rad "Značaj ekspresije perforina u kliničkoj transplantaciji bubrega". Zaposlena sam na Zavodu za transfuziologiju KBC Rijeka od 1992.g, a 1997.g. sam položila specijalistički ispit i stekla zvanje spec. transfuziologa. Posljednjih godinu dana radim kao pročelnica Odjela Sušak Zavoda za transfuziologiju. Bavim se transplantacijskom imunologijom i imunohematologijom, a član sam Hrvatskog društva hematologa i transfuziologa i Evropske federacije imunogenetike (EFI). Sudjelovala sam u Internacionalnom medicinskom programu St. Luke s Episcopal Hospital u Houstonu, od 22.3. do 2.4.1997.g. Kao stipendist Primorsko-goranske županije provela sam mjesec dana u Padovi 1998.g. (Azienda Ospedaliera) u Centru za transfuziologiju, imunologiju i anesteziologiju, sa svrhom praćenja transplantacije jetre. Godinu dana kasnije boravila sam dva tjedna u Centru za transplantacijsku imunologiju u Milanu (Ospedale Maggiore).

### Objavljeni radovi:

- 1) Rukavina D, Balen Marunić S, Rubeša G, Orlić P, Vujaklija Stipanović K, Podack ER: Perforin expression in peripheral blood lymphocytes in rejecting and tolerant kidney transplant recipients. *Transplantation* 61: 285-291, 1996.
- 2) Rukavina D, Balen Marunić S: Perforin mediated natural killer cytotoxicity. In *Life science* 1996, Ed: Erzen I, Society for Stereology and Quantitative Image Analysis, Gozd Martuljek, Slovenia 1996, pp 99-101.
- 3) Rukavina D, Balen Marunić S: Cellular and molecular mechanisms in allograft rejection. *Acta Facultatis Med. Fliminensis* ( u tisku).

4) Balen Marunić S, Podack ER, Rubeša G, Orlić P, Vujaklija Stipanović K, Rukavina D: Perforin expression in PBL in kidney transplant recipients. *Periodicum Biologorum*, Vol.97, Supp 1; 15; 1995.

Sa radovima sudjelovala na:

1) Prvom hrvatskom kongresu za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju, 1994.g. u Zagrebu: S.Balen-Marunić, G.Rubeša, G.Gulan, K.Vujaklija-Stipanović, P.Orlić, D.Rukavina Značenje perforina u kliničkoj transplantaciji bubrega (usmena prezentacija, knjiga sažetaka 156).

2) Četvrtom internacionalnom simpoziju kliničke imunologije i imunoematologije 1994.g. u Austriji: D.Rukavina, S.Balen, G.Rubeša, R.E.Podack. Clinical significance of perforin expression in human kidney transplant patients.

3) Četvrtoj konferenciji Internacionalne Udruge za pulmologiju, alergologiju i imunološki uzrokovane poremećaje (IFPAIRD) 1997.g. u Debreceenu, u Mađarskoj: D.Rukavina, I.Bedenicki, G.Laškarin, S.Balen-Marunić, I.Vlastelić. Physiology and patophysiology of perforin mediated cytotoxicity.

4) Prvom Internacionalnom Alpe-Adria Simpoziju Transfuziologa i Imunoematologa Slovenije, Austrije, Bavarske, Hrvatske, Italije i Mađarske: K.Vujaklija-Stipanović, M.Crnić-Martinović, M.Fučak, S.Balen-Marunić, Đ.Matić-Glažar. The safe transfusion in dialysis patients (knjiga sažetaka str.38.

5) Prvom hrvatskom kongresu hematologa i transfuziologa 1995.g. u Zagrebu:

- K.Vujaklija-Stipanović, M.Crnić-Martinović, T.Puškarčić-Razlag, S.Balen-Marunić, E.Miculinić-Ivančić, N.Vukelić-Damiani, N.Lukežić. Učestalost iregularnih antitijela među bolesnicima, trudnicama i darovateljima krvi (knjiga sažetaka J-10).

- M.Crnić-Martinović, E.Miculinić-Ivančić, N.Lukežić, S.Balen-Marunić, K.Vujaklija-Stipanović. Serološke pretrage kod darovatelja krvi na području grada Rijeke (knjiga sažetaka H-5).



6) Drugom hrvatskom kongresu hematologa i transfuziologa 1999.g. u Dubrovniku:

- S.Balen-Marunić, L.Caser, K.Vujaklija-Stipanović. Iregularna antitijela u hematoloških bolesnika. Liječnički vjesnik str. 184.

- L.Caser , S.Balen-Marunić, K.Vujaklija-Stipanović. Liječenje svježe smrznutom plazmom. Liječnički vjesnik str. 189.

TRVAĆI SMA KLUZNIKA  
D I E K A

## I AUTOR

---

Ime i prezime : Sanja Balen-Marunić

Datum i mjesto rođenja.: 8. studenog 1964. Rijeka

Završeni fakultet : Medicinski fakultet Rijeka, 1989.

Posdiplomski studij: Medicinski fakultet u Rijeci, 1994

Sadašnje zaposlenje: K B C Rijeka, Zavod za transfuziju

---

## II PODACI O DISERTACIJI I MENTORIMA

---

Naslov rada: ULOGA IMUNOLOŠKIH I NEIMUNOLOŠKIH ČIMBENIKA U DUGOROČNOM PREŽIVLJAVANJU ALOGENIČKIH BUBREŽNIH TRANSPLANTATA

Broj str.233,sl.35,tab.27, bibliografskih podataka: 422

Ustanova ili mjesto gdje je disertacija izrađena: Medicinski fakultet Rijeka i KBC Rijeka

Znanstvena disciplina: BIOMEDICINA I ZDRAVSTVO

Mentori: akademik Daniel Rukavina i prof.dr.sc. Ksenija Vujaklija-Stipanović

Fakultet na kojem je obranjena: Medicinski fakultet Rijeka

---

## III OCJENA I OBRANA

---

Datum prijave teme: 5. rujna 2000.

Datum predaje rad: 3. siječnja 2001.

Datum sjednice Vijeća na kojoj je rad prihvaćen: 20. ožujka 2001.

Sastav Povjerenstva koje je rad ocijenilo

prof.dr.sc. Petar Orlić, prof.dr.sc. Franjo Čohar, akademik Daniel Rukavina i

prof.dr.sc. Ksenija Vujaklija-Stipanović

Datum obrane : 3. travnja 2001.

Sastav Povjerenstva pred kojim je rad obranjen: I s t i

---