

Utjecaj polimorfizma HLA gama bloka na pojavu reakcije transplantata protiv primatelja u transplantaciji krvotvornih matičnih stanica od nesrodnog davatelja

Milošev, Zoe

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:911131>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Zoe Milošev

**Utjecaj polimorfizma HLA gama bloka na pojavu reakcije
transplantata protiv primatelja u transplantaciji krvotvornih
matičnih stanica od nesrodnog davatelja**

Diplomski rad

Zagreb, 2023.

Ovaj rad je izrađen u Odjelu za tipizaciju tkiva Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, Kliničkog bolničkog centra Zagreb, pod mentorstvom prof. dr. sc. Zorane Grubić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

Zahvale:

Najveće i iskreno hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Zorani Grubić na vodstvu tijekom izrade ovog diplomskog rada, na svim savjetima, kao i kritikama te ogromnom strpljenju i razumijevanju. Hvala Vam, posebno, i za priliku objavljivanja mog prvog znanstvenog članka i Vašem vremenu uloženom u našu suradnju.

Hvala i dr. sc. Mariji Maskalan na pomoći i velikoj potpori tijekom pisanja diplomskog rada. Hvala na svakom uzvraćenom mailu, poruci i vrhunskim kolačima.

Također, zahvaljujem se svim djelatnicima Odjela za tipizaciju tkiva KBC-a Zagreb, posebno dr. sc. Mariji Burek Kamenarić i doc. dr. sc. Katarini Štingl Janković, na stručnosti i svakom osmijehu u rano jutro.

Hvala mojim curama, društvu i cijeloj obitelji na ljubavi, podršci i motivaciji. Posebno hvala Mateju, Pepetu i Justini, najsretnija sam jer vas imam.

Hvala ti Joško, uvijek i zauvijek.

Mama i tata, volim vas najviše.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj polimorfizma HLA gama bloka na pojavu reakcije transplantata protiv primatelja u transplantaciji krvotvornih matičnih stanica od nesrodnog davatelja

Zoe Milošev

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Geni glavnog sustava tkivne podudarnosti (geni HLA) tipiziraju se u rutinskom postupku u pripremi za alogeničnu transplantaciju krvotvornih matičnih stanica (TKMS). To su geni HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1. Nepodudarnost u genima HLA glavni je rizični faktor za razvoj neželjenih ishoda nakon TKMS. Unatoč podudaranju u klasičnim genima HLA, moguće je nepodudaranje u drugim genima unutar regije HLA. U ovom istraživanju tipizirali smo skupinu od 33 para bolesnik-nesrodni davatelj (podudarnost HLA 9/10) za polimorfizam unutar gena C4 u regiji HLA gama bloka, smještenog u središnjoj regiji HLA te ispitali povezanost s pojavom reakcije presatka protiv primatelja (GvHD). Određivanje polimorfizama unutar HLA gama bloka napravljeno je pomoću komercijalnog seta za tipizaciju 25 polimorfizama jednog nukleotida (SNP) metodom lančane reakcije polimerazom i početnica specifičnih za određeni polimorfizam (PCR-SSP). Između 33 para primatelj-nesrodni davatelj, 25 (75,8%) parova imalo je nepodudarnost u HLA gama bloku. Veći broj nepodudarnosti (≥ 3) u HLA gama bloku između primatelja i nesrodnog davatelja pokazao je statistički značajno veću pojavu GvHD-a ($p=0,0231$). Pozicija SNP 11 u HLA gama bloku bila je najčešće uočena nepodudarnost (40,0%) i pokazala je značajan utjecaj na pojavu GvHD-a ($p=0,0189$).

Ključne riječi: alogenična TKMS, HLA gama blok, gen C4, GvHD, SNP
(53 stranica, 19 slika, 7 tablica, 47 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof.dr.sc. Zorana Grubić

Ocjenitelji:

Prof. dr. sc. Zorana Grubić
Izv. prof. dr. sc. Ana Galov
Prof. dr. sc. Mirta Tkalec

Zamjena: v. pred. dr. sc. Julija Erhardt

Rad prihvaćen: 07.09.2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

The impact of HLA gamma block polymorphism on the occurrence of graft versus host disease in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donor

Zoe Milošev

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Human Leukocyte Antigen (HLA) genes are routinely typed for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). For that purpose, HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 loci are tested. HLA gene mismatch is the main risk factor for undesirable HSCT outcomes. Despite classical HLA gene matching, mismatches are possible within other genes of the HLA region. In the present study, association between polymorphisms in the HLA gamma block and the occurrence of Graft versus Host Disease (GvHD) was studied within a group of 33 patient-unrelated donor pairs. All individuals were tested for 25 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) located in the C4 gene within HLA gamma block using Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers (PCR-SSP) method. Among 33 patient-unrelated donor pairs, 25 (75.8%) had a mismatch within the HLA gamma block. The higher number of mismatches (≥ 3) in the HLA gamma block showed a significantly higher risk of GvHD occurrence ($p=0,0231$). SNP position 11 appeared most often (40.0%) and showed a significant impact on GvHD occurrence ($p=0,0189$).

Keywords: allogeneic HSCT, HLA gamma block, C4 gene, GvHD, SNP
(53 pages, 19 figures, 7 tables, 47 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: prof. Zorana Grubić, PhD

Reviewers:

Prof. Zorana Grubić, PhD
Assoc. prof. Ana Galov, PhD
Prof. Mirta Tkalec, PhD

Replacement: Sen. Lec. Julija Erhardt, PhD

Thesis accepted: 07.09.2023.

Sadržaj:

1. Uvod.....	1
1.1. Glavni sustav tkivne podudarnosti	1
1.2. HLA gama blok	3
1.2.1. Citokin TNF- α	3
1.2.2. Sustav komplementa	5
1.2.3. Molekula C4.....	8
1.3. Transplantacija krvotvornih matičnih stanica (TKMS).....	9
1.3.1. Izvori matičnih stanica	11
1.3.2. Ishodi TKMS.....	13
1.3.3. Bolest presatka protiv primatelja (GvHD).....	14
1.4. Uloga HLA u TKMS	15
2. Cilj istraživanja	18
3. Materijali i metode	19
3.1. Ispitanici	19
3.2. Metode.....	20
3.2.1. Izolacija DNA	20
3.2.2. Umnažanje gena i alela HLA	21
3.2.3. Tipizacija HLA gama bloka	22
3.2.4. Statistička obrada podataka.....	24
4. Rezultati	25
4.1. Raspodjela parova primatelj-nesrodni davatelj s obzirom na podudarnost HLA	25
4.2. Raspodjela parova primatelj-nesrodni davatelj s obzirom na supratip HLA	27
4.3. Raspodjela parova primatelj-nesrodni davatelj s obzirom na supratip HLA i gama blok HLA.....	29
4.4. Raspodjela parova primatelj-nesrodni davatelj s obzirom na HLA gama blok.....	30
4.5. Analiza parova primatelj-nesrodni davatelj s obzirom na raspodjelu SNP nepodudarnosti	31
4.6. Istraživanja povezanosti GvHD-a i HLA	33

4.6.1.	Analiza povezanosti pojave GvHD-a i podudarnosti u HLA gama bloku.....	33
4.6.2.	Analiza povezanosti pojave GvHD-a i broja nepodudarnosti u HLA gama bloku.....	34
4.6.3.	Analiza povezanosti pojave GvHD-a i podudarnosti na SNP poziciji 11	37
4.6.4.	Analiza povezanosti pojave GvHD-a i podudarnosti u HLA gama bloku i supratipu HLA-A	40
5.	Rasprava.....	42
6.	Zaključci	46
7.	Literatura.....	47
8.	Životopis	53

1. Uvod

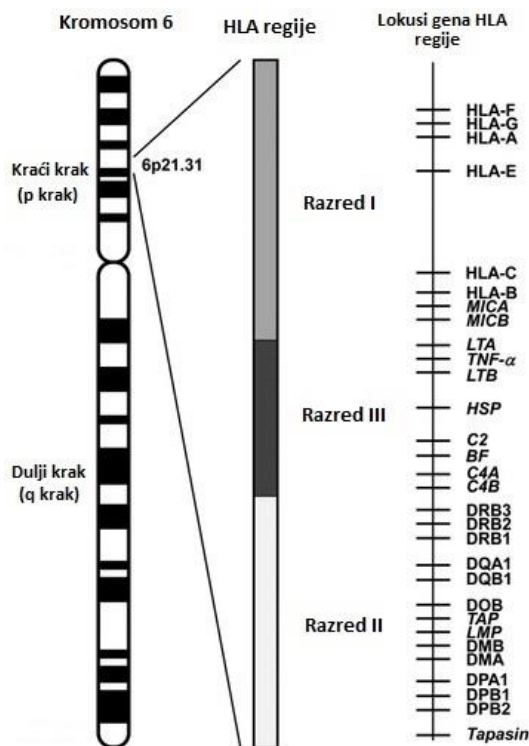
1.1. Glavni sustav tkivne podudarnosti

Imunološki sustav temeljen je na suradnji stanica i molekula koje prepoznaju i reagiraju na unos stranih tvari – antigena, a njihov udruženi i usklađen odgovor čini imunski odgovor organizma. Imunost može biti urođena ili stečena. Urođena ili prirodna imunost predstavlja prvu liniju obrane od patogena, a posredovana je fizičkim i kemijskim preprekama, stanicama koje vrše fagocitozu, dendritičkim i prirodnoubilačkim stanicama te krvnim proteinima (npr. sustav komplementa). Stečena ili adaptivna imunost dijeli se na humoralnu, posredovanu protutijelima koje proizvode limfociti B te staničnu, posredovanu limfocitima T. Dok limfociti B prepoznaju i proteinske i neproteinske antigene, receptori limfocita T prepoznaju isključivo prisutnost stranih proteina, putem molekula glavnog sustava tkivne podudarnosti (engl. *Major Histocompatibility Complex*, MHC) koje služe predočavanju tih stranih proteina, odnosno peptida. Sustav MHC kod ljudi naziva se sustavom HLA (engl. *Human Leukocyte Antigens*) jer je najprije otkriven na leukocitima, nalazi se na kraćem kraku kromosoma 6 (6p21.3) i obuhvaća oko 4 milijuna parova baza (pb) (Andreis i sur. 2010; Abbas i sur. 2018).

Glavno svojstvo sustava HLA je vrlo visoka genska raznolikost, a sami geni HLA su najpolimorfnije u cijelom ljudskom genomu. Prema IPD-IMGT/HLA bazi podataka - 3.50, regija HLA broji preko 35 000 različitih alela (Barker i sur. 2022). Regija HLA dijeli se na 3 razreda – HLA razred I, HLA razred II i HLA razred III. Poznato je da regija HLA razreda I sadrži tzv. klasične (i prvootkrivene) gene HLA-A, -B i -C, prisutne na membrani gotovo svih stanica s jezgrom. Molekule HLA razreda I građene su od teškog lanca (lanac α) građenog od 3 podjedinice te β_2 mikroglobulina, nekovalentno vezanog uz lanac α . Vezno mjesto, odnosno pukotinu na koju se veže peptid grade podjedinice α_1 i α_2 . Molekule HLA razreda I mogu se grupirati u skupine opisane kao supratipovi ili supergrupe, koje predstavljaju set molekula HLA koje dijele istu specifičnost za vezanje peptida. Klasifikacija molekula HLA u supratipove omogućava grupiranje velikog broja alela HLA u skupine sa zajedničkim svojstvom, što omogućuje stabilniju i reprezentativniju skupinu za razna istraživanja povezanosti bolesti i sustava HLA, kao i u transplantaciji tkiva i organa (Sidney i sur. 2008; Camacho-Bydume i sur. 2021). Regija HLA razreda II sadrži gene koji kodiraju molekule HLA-D (HLA-DR, -DQ i -DP), prisutne samo na nekim stanicama, poput limfocita B te antigen-predočnim stanicama. Molekule HLA razreda II

građene su od dva polipeptidna lanac (α i β), a vezno mjesto grade podjedinice α_1 i β_1 (Andreis i sur. 2010). Geni HLA razreda III kodiraju za proteine različitih funkcija, poput molekula sustava komplementa (C2 i C4) i citokina TNF- α (engl. *Tumor Necrosis Factor α*), a regija HLA razreda III smještena je između HLA razreda I i razreda II. Shema regije HLA prikazana je na slici 1.

Genski produkti gena HLA djeluju kao stanični biljezi i predočavaju stanične antigene limfocitima T koji na njih reagiraju i pokreću imunološku reakciju. Limfociti T CD8⁺ prepoznaju strane antigene prezentirane na molekulama HLA razreda I, a limfociti T CD4⁺ prepoznaju antigene uklopljene u molekule HLA razreda II. Geni HLA ujedno su i najistraživaniji dio ljudskog genoma zbog uloge u imunskim i upalnim odgovorima, transplantaciji tkiva i organa, raznim autoimunim bolestima te u populacijskim istraživanjima, identifikaciji osoba i isključivanju očinstva. Izražavaju se kodominantno, što znači da svaka osoba izražava alele naslijeđene od oba roditelja za svaki gen HLA. Set alela HLA prisutan na jednom kromosomu naziva se haplotip HLA (Andreis i sur. 2010; Abbas i sur. 2018).



Slika 1. Shema regije HLA na kraćem kraku kromosoma 6 (preuzeto i prilagođeno iz Invernizzi, 2011; <https://doi.org/10.1002/hep.24414>).

Genska neravnoteža vezanosti (engl. *Linkage Disequilibrium*, LD) je svojstvo sustava HLA koje opisuje vezanost pojedinog alela s 2 ili više susjednih alela HLA u zajednički haplotip HLA. Takvi aleli HLA pojavljuju se u istom haplotipu HLA češće nego što bi se moglo očekivati s obzirom na učestalost pojedinačnih alela (Slatkin 2008). Istraživanjem LD-a i haplotipova HLA, primijećeno je da se određeni haplotipovi održavaju nizom generacija zbog pozitivnog LD-a i stvaraju konzervirane regije genoma koje se još nazivaju ancestralnim haplotipovima (AH) (Degli-Esposti i sur. 1992). Struktura haplotipova AH nalikuje blokovima unutar kojih se rekombinacija gotovo uopće ne događa, a omeđeni su tzv. „vrućim“ točkama rekombinacije (engl. *hot-spots of recombination*) (Gabriel i sur. 2002). Različite etničke skupine nose haplotipove AH sa specifičnim genomskim sekvencama, različitim motivima, delecijama, insercijama i supstitucijama, odnosno razlikuju se u duljini LD blokova i lokaciji „vrućih“ točaka rekombinacije. S obzirom na očuvane sekvence, regije HLA u ljudskom genomu mogu se podijeliti na 4 velika bloka – alfa, beta, gama i delta. Alfa blok HLA sadrži gene HLA-A, beta blok HLA sadrži gene HLA-B i -C, delta blok HLA sadrži gene HLA-DR i -DQ, a gama blok HLA sadrži gene koji sudjeluju u upalnim procesima i različitih su funkcija (Gaudieri i sur. 1997). Blokovi HLA opisuju način nasljeđivanja alela HLA i uzorke u genomu koji stvaraju LD te područja visoke stope rekombinacije (Yunis i sur. 2003).

1.2. HLA gama blok

U središnjoj regiji HLA nalazi se HLA gama blok (GB), između beta i delta blokova. Sadrži više od 60 gena koji kodiraju proteine različitih funkcija od kojih mnogi imaju ulogu u imunskim i upalnim procesima, ali nemaju središnju imunoregulacijsku ulogu poput molekula HLA razreda I i II, odnosno alfa, beta i delta blokova (Andreis i sur. 2010). Neki od najistraživanijih gena među njima su faktor nekroze tumora- α (engl. Tumor Necrosis Factor, TNF- α) i molekule koje pripadaju sustavu komplementa – čimbenik B (engl. *factor B*, Bf) i komponente C2 i C4 (slika 2) (Milner i Campbell 2001).

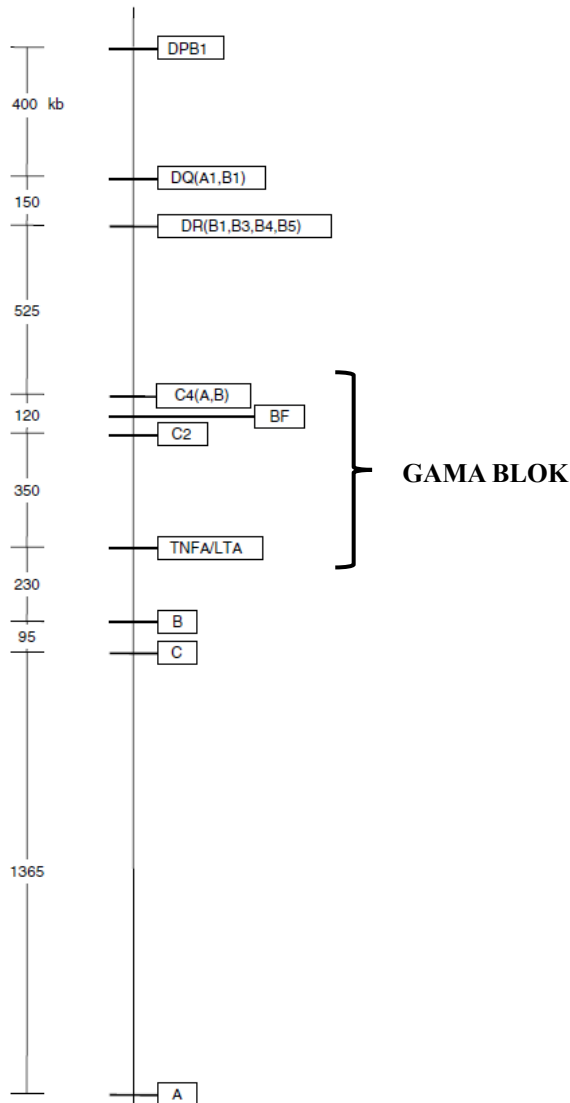
1.2.1. Citokin TNF- α

Jedan od prvih odgovora urođene imunosti na zarazu ili oštećenje tkiva je izlučivanje proupalnih citokina iz tkivnih stanica. Oni djeluju kao lokalni imunoregulatori, omogućavaju

komunikaciju između stanica imunskog sustava i pokreću akutnu upalu u svrhu obrane organizma (Abbas i sur. 2018).

Poznato je da je TNF- α jedan od najvažnijih citokina urođene imunosti i djeluje kao glavni posrednik akutnih i kroničnih upalnih reakcija. Primarno ga proizvode makrofagi i dendritičke stanice, ali može nastati i iz drugih stanica kao odgovor na upalu, zarazu mikroorganizmima i okolišni stres (Chu 2013). Gen za citokin TNF- α nalazi se unutar HLA gama bloka, vidljivo na slici 2. Postoji membranski i cirkulirajući oblik TNF- α . Makrofagi stvaraju TNF- α u obliku neglikoliziranog membranskog proteina, homotrimeru koji može vezati jedan od receptora za TNF. Membranski oblik molekule mogu cijepati membranske metaloproteinaze, pri čemu se odvaja polipeptidni lanac. Oslobođeni polipeptidni lanac polimerizira s još 2 lanca i stvara cirkulirajući oblik TNF- α , u obliku trostrane piramide, na čijoj se bazi nalazi vezno mjesto za receptor (Abbas i sur. 2018).

Osim što djeluje kao proupalni citokin, TNF- α uzrokuje nekrozu i apoptozu tumorskih stanica, a sudjeluje i u patogenezi autoimunih bolesti – reumatoidnog artritisa, upalnih bolesti crijeva, multiple skleroze i drugih. Djeluje kao endogeni pirogen (uzrokuje povišenu tjelesnu temperaturu) i stimulira izlučivanje drugih proupalnih citokina i kemokina (Chu 2013).

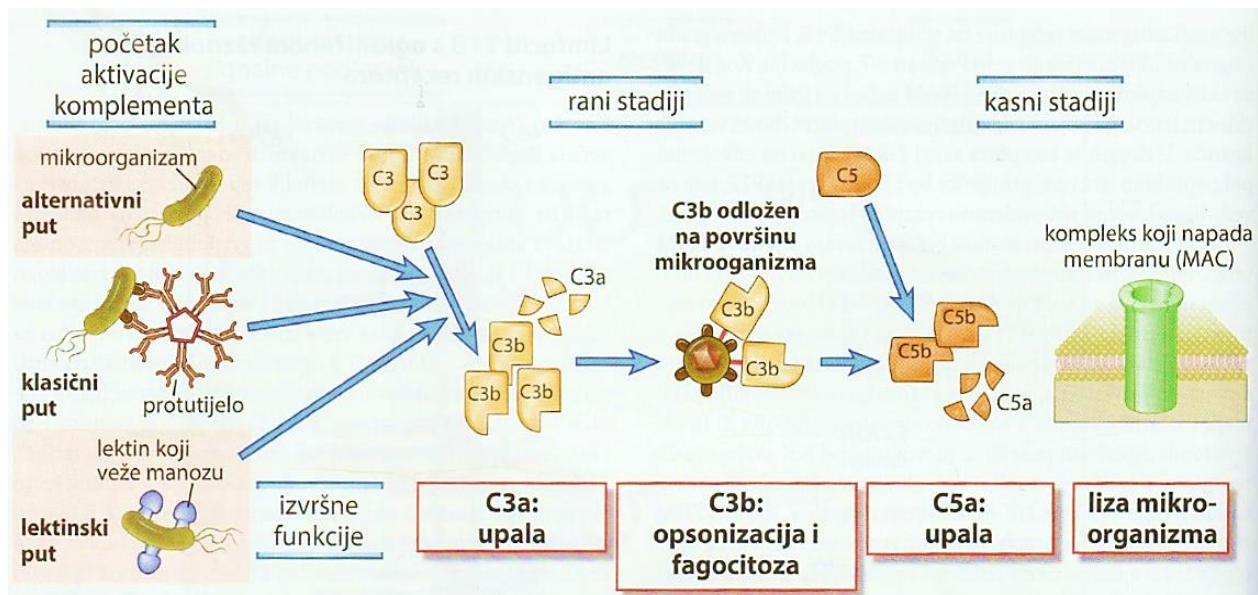


Slika 2. Prikaz rasporeda lokusa HLA, njihove međusobne udaljenosti i područja gama bloka (preuzeto i prilagođeno iz Yunis i sur., 2003).

1.2.2. Sustav komplementa

Sustav komplementa je glavni izvršni mehanizam humoralne imunosti (Abbas i sur. 2018). Sustav sadrži više od 30 proteina otopljenih u plazmi ili vezanih za membranu. Otkriven je 1890-ih godina kao „pomoć“, odnosno „komplement“ prirodnim protutijelima u borbi protiv patogena. Sustav komplementa važan je i za urođenu imunost, sudjeluje u regeneraciji tkiva, rastu tumora i nekim patološkim stanjima. Proteini komplementa obavljaju uloge opsonizacije patogena, potiču

upalu novačenjem fagocitnih stanica do mjesta zaraze i izravno ubijaju mikroorganizme. Ti proteini u ljudskom organizmu postoje u stanju inaktivnih zimogena, a aktiviraju se proteolitičkom kaskadom. Postoje 3 puta aktivacije sustava komplementa – klasični, alternativni i lektinski. Putevi se razlikuju po načinu prepoznavanja mikroorganizama, a nastavljaju se zajedničkim putem uklanjanja istih putem produkata aktivacije (slika 3). Produkti aktivacije komplementa kovalentno se vežu za površinu mikroorganizama, protutijela koja su dio imunokompleksa s mikroorganizmom, na apoptotička tjelešca i druge antigene (Abbas i sur. 2018).



Slika 3. Putevi aktivacije sustava komplementa (preuzeto i prilagođeno iz Abbas i sur. 2018).

Klasični put aktivacije sustava komplementa prvi je otkriven, a započinje vezanjem komponente komplementa C1 na protutijela IgM ili IgG koja su prepoznala strani antigen. Komponenta komplementa C1 je multimerni proteinski kompleks građen od podjedinica C1q, C1r i C1s. Podjedinica C1q prepoznaje protutijela na površini stranog antigena i veže se za ulomak Fc protutijela, pri čemu se aktivira proteazna aktivnost podjedinica C1r i C1s. Podjedinice C1r i C1s cijepaju komponente C2 i C4 na ulomke *a* i *b* (C2a, C2b i C4a, C4b). Manji ulomak se naziva ulomak *a*, a veći ulomak *b*. Ulomak C4a se oslobađa, a ulomak C4b se veže za kompleks antigena i protutijela (imunokompleks) ili direktno na površinu stanice prepoznatu od strane protutijela i pridružuje mu se ulomak C2a. Kompleks C4bC2a naziva se C3-konvertazom klasičnog puta aktivacije i djeluje proteolitički, cijepanjem komponente C3 na ulomke C3a i C3b. Ulomak C3b se pridružuje jedinicama vezanim za imunokompleks ili površinu mikroorganizma i stvara se

kompleks C4bC2aC3b koji djeluje kao C5-konvertaza klasičnog puta, koja cijepa komponentu C5, čime se započinju kasniji koraci aktivacije sustava komplementa (Abbas i sur. 2018).

Alternativni put aktivacije sustava komplementa otkriven je kasnije, iako je filogenetski stariji od klasičnog. U aktivaciji ne sudjeluju protutijela, već površinske strukture na mikroorganizmima (Sarma i Ward 2011). Komponenta komplementa C3 u plazmi se neprekidno u maloj količini hidrolizira, pri čemu nastaje ulomak C3b koji se kovalentno veže za površinu patogena i otvara vezno mjesto za faktor B. Faktor D, plazmatska serinska proteaza, cijepa faktor B vezan na komponentu C3b i nastaju ulomci Ba i Bb. Ulomak Bb ostaje vezan na staničnoj površini uz komponentu C3b, te djeluje kao C3-konvertaza alternativnog puta aktivacije, koja cijepa dodatne molekule C3 i pojačava nastajanje komponente C3b, odnosno aktivaciju komplementa i opsonizaciju patogena. Ulomak C3b ponovno se veže na kompleks C3bBb i nastaje C5-konvertaza alternativnog puta, kompleks C3bBbC3b (Abbas i sur. 2018).

U pokretanju lektinskog puta aktivacije sustava komplementa također ne sudjeluju protutijela, već započinje vezanjem cirkulirajućih lektina na polisaharide na površini mikroorganizama. Lektinski proteini koji sudjeluju u aktivaciji puta su lektin koji veže manozu (engl. *Mannose-Binding Lectin*, MBL) ili fikolini koji vežu glikane koji sadržavaju N-acetilglukozamin (Abbas i sur. 2018). MBL-u ili fikolinima vezanim za površinu patogena pridružuju se serinske proteaze udružene s MBL-om (engl. *MBL-Associated Serine Proteases*, MASP) i stvaraju kompleks. Vezanje proteaza MASP za membranu inducira konformacijske promjene koje rezultiraju auto-aktivacijom i cijepanjem komponenti C2 i C4, nakon čega se nastavlja put aktivacije istovjetan klasičnom putu (Sarma i Ward 2011).

Alternativni i lektinski put pripadaju izvršnim mehanizmima urođene imunosti, a klasični je dio stečene humoralne imunosti. Nakon prepoznavanja stranih antigena (bilo kojim od puteva aktivacije) nastavlja se zajednički put uklanjanja istih, uzastopnim novačenjem fagocitnih stanica i povezivanjem dodatnih komplementarnih proteina. Ulomak C5b, nastao cijepanjem C5 komponente, ostaje vezan za membranu mikroorganizma i pokreće stvaranje kompleksa s proteinima C6, C7, C8 i C9. Kompleks C5b-C9 naziva se kompleksom koji napada membranu (engl. *Membrane Attack Complex*, MAC). Kompleks MAC na površini stanica formira poru, odnosno kanal koji omogućuje ulazak vode, osmotsko bubrenje i lizu (Abbas i sur. 2018). Oslobođene komponente C3a i C5a djeluju kao anafilatoksini i potiču upalni odgovor, djeluju kao

kemoatraktanti za fagocite, induciraju vazodilataciju i kontrakciju glatkih mišića te izlučivanje histamina iz mastocita (Sarma i Ward 2011).

1.2.3. Molekula C4

Komponenta C4 je najpolimorfiji protein sustava komplementa. Homolog je komponenti C3 i kovalentno se veže za protutijela na patogenim stanicama ili imunokomplekse te pospješuje njihovo uklanjanje daljnjom aktivacijom sustava komplementa klasičnim ili lektinskim putem. Postoje dva lokusa gena za molekulu C4 (*C4A* i *C4B*). Broj kopija gena varira od jedne do četiri, a kod ljudi većina kromosoma 6 imaju dva gena koji su dio dupliciranog odsječka DNA (Milner, Campbell 2001; Yang i sur. 2007). Duplikacija se događa u „modulu“, zajedno sa susjednim genima RP, CYP21 te TNX, što se naziva RCCX modularnom duplikacijom (Yang i sur. 2003). Svaki gen *C4A* ili *C4B* postoji u dvije veličine – dugi i kratki. Dugi gen je veličine 21 kilobaze (kb), a kratki 14.6 kb, a razlikuju se po tome što dugi sadržava i endogeni retrovirus HERV-K (C4) umetnut unutar gena (Yang i sur. 2007). Bez obzira na veličinu, geni za komponentu C4 mogu kodirati ulomke C4a ili C4b, čiji se sastav razlikuje samo u 4 aminokiseline, ali pokazuju značajne razlike u funkciji (Milner, Campbell 2001). Ulomak C4a oslobađa se u tjelesne tekućine i, uz ranije spomenute anafilatok sine C3a i C5a, pokreće akutnu upalu aktivacijom mastocita, neutrofila i endotelnih stanica. Ulomak C4b sadržava unutarnju tioestersku vezu koja omogućava stvaranje kovalentne veze s kompleksom antigena i protutijela te osigurava nastavak aktivacije sustava komplementa na površini stanice ili imunokompleksu (Abbas i sur. 2018).

Broj izraženih gena za protein C4 varira, a česti su i nefunkcionalni aleli (Fielder i sur. 1983). Potpuni nedostatak komponente komplementa C4 jedan je od glavnih rizičnih faktora za razvoj sistemskog eritemskog lupusa (engl. *Systemic Lupus Erythematosus*, SLE), a ukupan broj kopija i polimorfizmi gena za C4 pokazali su povezanost s poremećajima imunološkog sustava i upalnim odgovorom, poput odbacivanja transplantata, odnosno razvitka bolesti presatka protiv primatelja uslijed transplantacije (Yang i sur. 2007; Park i sur. 2016).

1.3. Transplantacija krvotvornih matičnih stanica (TKMS)

Transplantacija je postupak zamjene nefunkcionalnih organa ili tkiva zdravim, provodi se u liječenju oštećenih vitalnih organa, kao i pri liječenju različitih zloćudnih i drugih bolesti. Transplantacija je danas, zbog napretka tehnologije i usavršavanja postupka, u primjeni kao rutinski postupak kojem je najveća prepreka reakcija odbijanja presatka, odnosno prepoznavanje presatka kao stranog i pokretanje imunskog odgovora u primateljevom organizmu. Bez obzira na vjerojatnost uspješnosti i rizik postupka, transplantacija je odabir liječenja kod pacijenata kojima je to jedini izbor, kada je pitanje života ili smrti, kao i onih kojima bi se tim postupkom poboljšala kvaliteta i dužina života ili smanjila ukupna cijena liječenja. Alogenična transplantacija je najčešće provedena metoda transplantacije, u kojoj se presadak iz jedne jedinke transplantira u drugu, genski različitu jedinku iste vrste. U singeničnoj transplantaciji presadak se transplantira između dviju genski istovjetne jedinke, u ksenogeničnoj između pripadnika različite vrste, a ponekad se provodi i autologna transplantacija uslijed koje se presadak unutar iste jedinke presađuje s jednog na drugo mjesto. Ključ uspješne transplantacije je kontrola reakcije imunskog sustava (Abbas i sur. 2018).

Transplantacija krvotvornih matičnih stanica (TKMS) je standardna metoda za liječenje velikog broja zloćudnih i drugih hematoloških i nehematoloških bolesti. Postoje dva tipa TKMS, ovisno o davatelju: autologna i alogenična. Autologna TKMS ima svrhu ponovnog pokretanja krvotvornog sustava bolesnika nakon visokih doza kemoterapije ili zračenja, a bolesnik prima vlastite, prethodno izolirane i zamrznute matične stanice. U alogeničnoj transplantaciji davatelj krvotvornih matičnih stanica (KMS) je najčešće član bolesnikove obitelji, ali može biti i nesrodni HLA podudarni davatelj, HLA haploidentični srodni davatelj ili krv iz pupkotine. Uz ponovno pokretanje hematopoetskog sustava, alogenična TKMS ima i imunosupresivni učinak na domaćina, imunološki posredovan učinak na tumore (engl. *Graft-versus-Leukaemia*, GvL), ali i rizik od reakcije presatka protiv primatelja, odnosno GvHD (engl. *Graft-versus-Host Disease*) (Grgičević i sur. 2006; Andreis i sur. 2010). Kod autologne TKMS nema rizika od GvHD-a, no zamijećen je češći povratak tumora ako se postupak koristi kod liječenja tumora limfo-hematopoetskog sustava, no učestalije se koristi za oporavak krvotvornog sustava nakon visokih doza zračenja i uporabe citostatika pri liječenju solidnih tumora. Cilj TKMS je nastanjivanje primateljeve koštane srži novim KMS koje će se diferencirati u sve krvotvorne loze i obnoviti imunološki sustav. Tako

obnovljeni imunološki sustav primatelja moći će se boriti protiv tumorskih stanica, prepoznati ih kao strane i uništiti (Abbas i sur. 2018).

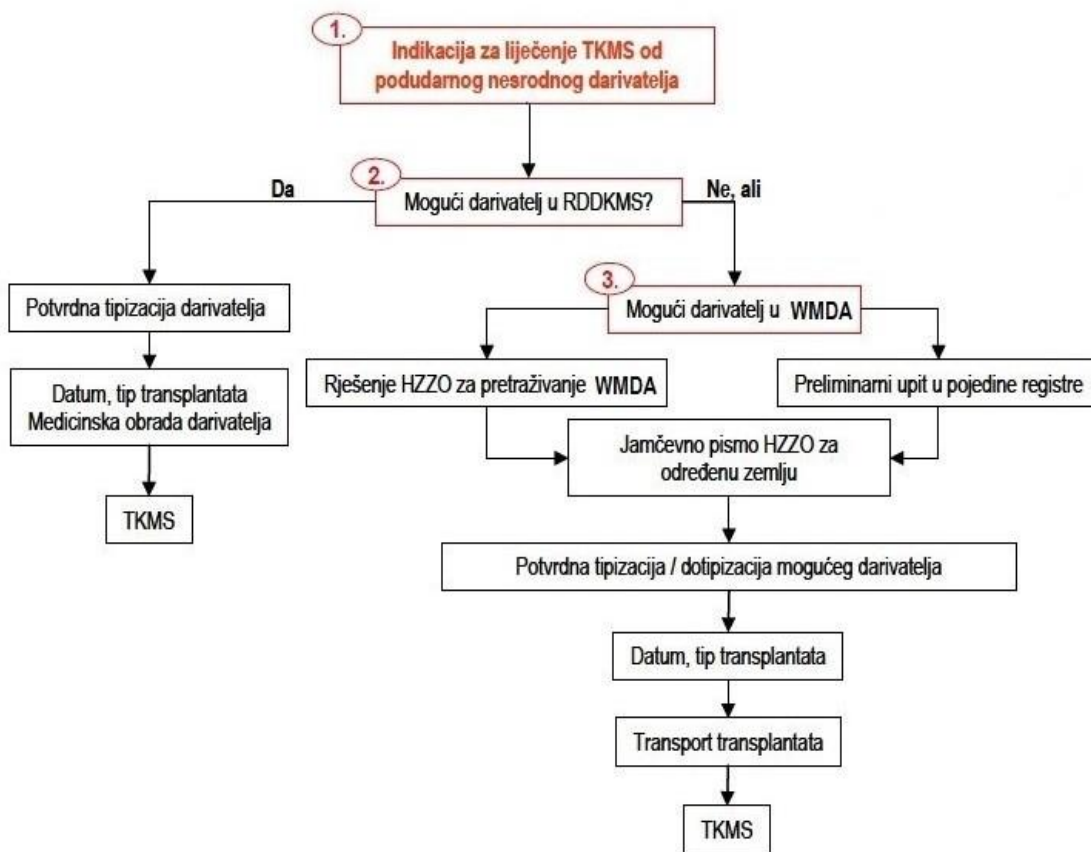
Postoje dvije vrste KMS (pluripotentne i hematopoetske) koje se razvijaju u žumanjčanoj vreći ili fetalnoj jetri kao totipotentne matične stanice koje imaju mogućnost samoobnavljanja i diferencijacije. Imaju veliku mogućnost stvaranja različitih vrsta krvnih stanica i razvijaju se u dvije loze – mijeloidnu, kojom nastaju granulociti, trombociti i eritrociti te limfoidnu, kojom nastaju limfociti T i B. Nakon rođenja, u primarnim limfnim organima dolazi do sazrijevanja limfocita – limfociti T dozrijevaju u timusu, a limfociti B u koštanoj srži (Andreis i sur. 2010). Dozrijevanje i diferencijacija stanica do zrelog oblika naziva se hematopoeza, a to je stupnjeviti i strogo kontroliran proces uvjetovan čimbenicima koje luče stromalne stanice koštane srži te citokinima i hormonima. Protoonkogeni imaju važnu ulogu u stvaranju čimbenika rasta, receptora za rast, signalnih puteva i transkripcijskih čimbenika koji uvjetuju hematopoezu. Mutacije na protoonkogenima, kojima nastaju onkogeni, dovode do promjena na KMS i gubitka kontrolnog mehanizma, čime je omogućena njihova stalna proliferacija i nastanak velikog broja nediferenciranih stanica koje nemaju obrambenu ulogu, već štete organizmu i imaju vlastitu regulaciju (Abbas i sur. 2018).

Prva uspješna transplantacija koštane srži provedena je 1959. godine u dva bolesnika, infuzijom koštane srži njihovih identičnih blizanaca. Nakon toga, uslijedio je period usavršavanja postupka i sve boljih rezultata TKMS, čemu je pridonijelo otkriće gena HLA i njihove uloge u transplantaciji (Copelan 2006).

1.3.1. Izvori matičnih stanica

Danas je najčešći izvor KMS periferna krv davatelja iz bolesnikove bliske obitelji ili od podudarnog nesrodnog davatelja. Matične stanice iz periferne krvi sakupljaju se staničnim separatorom, a davatelji imaju vrlo mali broj nuspojava i brzo se oporavljaju. Tako sakupljena krv sadržava velik broj limfocita T, što povećava rizik od razvoja kroničnog GvHD-a, no smanjuje vjerojatnost relapsa bolesti i pokazuje GvL učinak (Bleakley i Riddell 2004; Grgičević i sur. 2006). Prikupljanje koštane srži je, s druge strane, invazivan postupak koji nosi više nuspojava za davatelja, no sadržava manji broj limfocita T i manja je vjerojatnost razvoja GvHD-a (Amouzegar i sur. 2019). U odsustvu genotipski HLA podudarnog srodnika, potraga za nesrodnim davateljem kreće pretraživanjem registara dobrovoljnih davatelja KMS. Postupak pretraživanja započinje provjerom hrvatskog registra dobrovoljnih davatelja krvotvornih matičnih stanica (RDDKMS). Ukoliko u Hrvatskoj ne postoji odgovarajući davatelj, postupak pretraživanja se nastavlja putem organizacije WMDA (engl. *World Marrow Donor Association*). Prije samog postupka transplantacije, potrebno je napraviti potvrdnu tipizaciju i prikupiti, odnosno dostaviti transplantat. Shema postupka pretraživanja prikazana je na slici 4.

Prema podacima iz baze podataka WMDA-a, registri danas broje više od 40 milijuna registriranih davatelja KMS te preko 800 tisuća jedinica krvi iz pupkovine (WMDA (2023) <https://wmda.info/>, pristupljeno 5. 6. 2023). Hrvatski registar osnovan je 1994. godine, a od 1996. je dio WMDA i danas broji više od 60 tisuća upisanih davatelja. Zahvaljujući organizaciji registara za davatelje KMS, uvelike se olakšao proces pretraživanja za podudarnim nesrodnim davateljima.



Slika 4. Shema postupka pretraživanja i odabira davatelja krvotvornih matičnih stanica iz hrvatskog ili svjetskih registara dobrovoljnih davatelja. TKMS - Transplantacija krvotvornih matičnih stanica; WMDA - World Marrow Donor Association; RDDKMS - Hrvatski registar dobrovoljnih davatelja krvotvornih matičnih stanica; KP - krv iz pupkovine; HZZO - Hrvatski zavod za zdravstveno osiguranje.

Krv iz pupkovine ili umbilikalna krv prikuplja se neposredno nakon poroda i zamrzava te čuva u javnim ili privatnim bankama umbilikalne krvi. Razmjerno je bogata krvotvornim matičnim stanicama, a ne sadrži puno zrelih imunokompetentnih stanica i zahtijeva manje stroge uvjete podudarnosti s primateljevim genima HLA stoga je dobar izvor KMS u hitnim transplantacijama, kao i onima kada podudarni davatelj ne postoji (Copelan 2006; Grgičević i sur. 2006). Manji je rizik od razvoja GvHD-a, dok i dalje zadržava GvL učinak, no ograničenog je volumena koji se može nadoknaditi dodatnim jedinicama različitih davatelja (Copelan 2006).

Ukoliko je postupak TKMS hitan zbog stanja pacijenta i bolesti, a krv iz pupkovine, kao ni srodni ili nesrodni podudarni davatelj KMS nisu dostupni, moguće je ići u postupak haploidentične transplantacije. Taj postupak podrazumijeva TKMS s davateljem unutar bolesnikove obitelji, s kojim bolesnik dijeli samo jedan zajednički haplotip HLA (Velardi i sur. 2002; Copelan 2006). Postoji veliki rizik od odbijanja presatka ili reakcije presatka protiv primatelja, a kontrolira se uporabom imunosupresivnih lijekova ili deplecijom limfocita T iz presatka. Haploidentična transplantacija temelji se na učinku stanica NK (Copelan 2006). Stanice NK funkcijski pripadaju stanicama urođene imunosti, a izlučuju citokine kojima reguliraju upalni odgovor na zarazu i uništavaju vlastite promijenjene stanice. Na svojoj površini nose brojne receptore kojima mogu raspoznati zdrave i virusom zaražene ili tumorske stanice, od kojih su najbolje opisane skupine receptora KIR (engl. *Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors*), receptora sličnih lektinu te ILT receptora (engl. *Immunoglobuline-like Transcript Receptors*). Vlastite promijenjene stanice smanjuju sintezu klasičnih molekula HLA i postaju neosjetljive na učinak citotoksičnih limfocita T, ali ujedno postaju metom za djelovanje stanica NK. Aktivacija stanica NK ovisi o ravnoteži aktivacijskih i inhibicijskih signala (Andreis i sur. 2010). Ligandi receptora KIR su alotipske determinante zajedničke različitim alelima HLA razreda I, čijim se vezanjem prenosi inhibicijski signal u stanicu NK (Velardi i sur. 2002). Kod tumorskih (ili virusima zaraženih) stanica, u odsustvu površinskih molekula HLA, izostaje inhibicijski signal pa su kao takve osjetljive na lizu stanicama NK (Andreis i sur. 2010). Cilj u odabiru davatelja za haploidentičnu transplantaciju je postojanje aloreaktivnih stanica NK u transplantatu, za što je potrebno poznavanje tipa inhibicijskih receptora koji se nalaze na stanicama NK davatelja i njihova nepodudarnost između primatelja i davatelja (Velardi i sur. 2002). Aloreaktivnost stanica NK povezana je sa smanjenim relapsom bolesti u haploidentičnoj transplantaciji, kao i boljim preživljenjem kod akutne mijeloične leukemije (Ruggeri i sur. 2002).

1.3.2. Ishodi TKMS

Ishod TKMS ovisi o različitim genetičkim i kliničkim čimbenicima, od kojih je najvažnija podudarnost između primatelja i davatelja u genima HLA (Grgičević i sur. 2006). Relaps bolesti i GvHD su velike prepreke i komplikacije u postupku TKMS, a pokušavaju se spriječiti kondicioniranjem te uporabom imunosupresivnih lijekova (Bleakley i Riddell 2004). Kondicioniranje je postupak tretiranja bolesnika prije transplantacije s ciljem uništavanja

tumorskih stanica u krvotoku i supresije imunološkog sustava, kako bi se omogućilo uspješno primanje presatka (Aschan 2006). Mijeloablativno kondicioniranje podrazumijeva primjenu intenzivne kemoterapije, često u kombinaciji sa zračenjem (Bleakley i Riddell 2004). Takav postupak smanjuje rizik od relapsa bolesti, no visoko je toksičan za pacijentov organizam i povezan je s povećanom stopom smrtnosti uslijed transplantacije (engl. *Transplantation-Related Mortality*, TRM). Uvođenje kondicioniranja smanjenog intenziteta (engl. *Reduced-Intensity Conditioning*, RIC) smanjilo je pojavu TRM (Ferrara i sur. 2009), no ne uklanja tumorske stanice, već se oslanja na GvL učinak davateljevih limfocita T (Bleakley i Riddell 2004).

1.3.3. Bolest presatka protiv primatelja (GvHD)

Bolest presatka protiv primatelja (GvHD) razvija se kada postoje nepodudarnosti u antigenima između primatelja i davatelja čiji presadak sadržava imunokompetentne stanice, a primatelj ga ne može adekvatno odbaciti (Welniak i sur. 2007). U pripremi za transplantaciju, kondicioniranje pacijenata oštećuje njihovo tkivo i potiče lučenje upalnih citokina, najviše TNF- α , interleukina-6 i interleukina-1. Ti proupalni citokini potiču izražaj molekula HLA na primateljvim stanicama koje prepoznaju davateljevi zreli limfociti T. Njihovom aktivacijom pokreće se aktivacija niza izvršnih stanica koje uništavaju primateljeve epitelne i endotelne stanice, bogate tkivnim antigenima (Andreis i sur. 2010). Postoji akutni i kronični oblik GvHD-a. Akutni GvHD javlja se unutar 100 dana od postupka transplantacije, a obilježava ga propadanje epitelnih stanica kože, jetre i probavnog sustava. Kronični se razvija nakon više od 100 dana od transplantacije, a očituje se oštećenjem sluznica, fibrozom i atrofijom organa, a može dovesti i do zatajenja funkcije zahvaćenog organa (Welniak i sur. 2007; Andreis i sur. 2010; Abbas i sur. 2018). Liječenje akutnog i kroničnog GvHD-a odvija se uporabom jake immunosupresivne terapije na koju pacijenti često loše reagiraju zbog intenziteta tog postupka, a uslijed immunosupresije postaju podložni i raznim infekcijama i dodatnim komplikacijama (Abbas i sur. 2018).

Osim što posreduju razvoj GvHD-a, imunokompetentne stanice iz presatka prepoznaju i tumorske specifične antigene izražene na leukemijskim stanicama u primateljevom organizmu koje zatim uništavaju. To svojstvo davateljevih stanica se naziva učinkom presatka protiv leukemije (GvL) i željeni je terapijski ishod TKMS (Andreis i sur. 2010). Teško je uspostaviti ravnotežu između poželjnog GvL i vrlo nepoželjnog GvHD učinka, a razlika leži u vrsti antigena koji potaknu

odgovor limfocita T – ako se radi o antigenima specifičnim za tumorske stanice razvija se GvL učinak, a ako su prepoznati antigeni sa zdravih tkiva dolazi do razvoja GvHD-a (Copelan 2006).

1.4. Uloga HLA u TKMS

Sustav HLA čini najveću prepreku uspješnoj transplantaciji tkiva i organa. Zbog svojeg izrazitog polimorfizma unutar vrste, molekule HLA mogu djelovati kao aloantigeni i izazvati imunološki odgovor te uzrokovati odbacivanje transplantata ili razvoj GvHD-a. Iz tog razloga, prije postupka transplantacije potrebno je određivanje primateljevih i davateljevih tkivnih antigena, odnosno klasičnih gena HLA i stupnja podudarnosti među njima. Europski standard podrazumijeva podudarnost HLA 10/10, za gene HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1 (Lee i sur. 2007; Fürst i sur. 2019).

Brojna istraživanja su pokazala da nepodudarnosti u genima HLA između primatelja i davatelja povećavaju rizik od odbacivanja transplantata, razvoja GvHD-a i smrtnosti uslijed transplantacije (Petersdorf i sur. 2001; Lee i sur. 2007). Lee i suradnici (2007) su na 3857 nesrodnih parova primatelja i davatelja pokazali da podudaranja u genima HLA pogoduju boljem ishodu TKMS, no nisu pronašli statistički značajnu razliku u ishodu s obzirom na razinu nepodudarnosti HLA. Nepodudarnost u samo jednom lokusu HLA povezana je s povišenim rizikom od smrtnosti i razvojem akutnog GvHD-a u usporedbi s potpuno podudarnim parovima, a svaka dodatna nepodudarnost pokazala je značajno lošiji ishod TKMS i razliku u preživljavanju 9-10%. Osim HLA, za pacijentovo preživljenje značajnim su se pokazali pacijentova dob, stanje bolesti, citomegalovirus (CMV) status, spol i dob davatelja (Lee i sur. 2007). U velikom istraživanju grupe autora iz Japana (Morishima i sur. 2015) na gotovo 8 tisuća nesrodnih parova primatelj-davatelj u programu nesrodne TKMS, uočen je statistički značajno povišen rizik za smrtnost kod nepodudarnosti između primatelja i davatelja u genima HLA razreda I, i to najviše za gene HLA-A. Isto istraživanje pokazalo je povezanost nepodudarnosti na lokusima HLA-A i -B s razvojem akutnog GvHD-a i smanjene stope preživljavanja (Morishima i sur. 2015). Također, Camacho-Bydume i suradnici (2021) istražili su utjecaj supratipova HLA na ishode alogenične TKMS i uočili povezanost određenih supratipova HLA s preživljenjem, odnosno rizikom od smrtnosti uslijed TKMS.

Unatoč potpunoj podudarnosti HLA (10/10) u genima HLA između parova primatelj-davatelj, i dalje je moguć neuspješan ishod TKMS, a mnogobrojna istraživanja usmjerena su upravo na pronalazak načina kako poboljšati uspješnost transplantacija i smanjiti pojavu neželjenih komplikacija. Klasični geni HLA koji se rutinski tipiziraju predstavljaju samo mali dio cijele regije HLA u ljudskom genomu (Clancy i sur, 2019). Istraživanja produženih haplotipova HLA pokazala su njihovu važnost u ishodu TKMS. Petersdorf i suradnici (2007) istražili su povezanost podudaranja cijelih haplotipova HLA između primatelja i davatelja u TKMS i uočili povišen rizik od razvoja GvHD-a kod nepodudarnih parova, usporediv s povišenim rizikom u prisutnosti jedne nepodudarnosti u genima HLA. Također, istraživačka skupina predvođena s Petersdorf (2013) pokazala je da su HLA nepodudarni parovi češće nepodudarni i u haplotipu HLA, u usporedbi s HLA podudarnim parovima. S druge strane, genotipski HLA identične jedinice (npr. identični blizanci) od roditelja nasljeđuju i identičan haplotip HLA, stoga se preferiraju kao davatelji u postupku TKMS. Haplotipovi HLA koji dijele iste alele na nekom lokusu dijele i visoko-konzervirane dijelove ili blokove sekvenci u jakom LD-u s tim alelima i nasljeđuju se zajedno (Petersdorf i sur. 2013). Analiza haplotipova HLA provodi se putem biljega. To su najčešće polimorfizmi jednog nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs) koji se prenose zajedno s genima HLA u haplotipu i koriste u mapiranju gena unutar sustava MHC (Miretti i sur. 2005). Analiza SNP-ova omogućava uvid u gene kandidate i mehanizme uključene u nastanak komplikacija uslijed TKMS. Osim toga, SNP sadržaj haplotipova HLA specifičan je za različite etničke skupine pa je moguće prikupiti informacije bitne i za epidemiološka, populacijska i genomska istraživanja (Wennerstrom i sur. 2013). Prisutnost određenih SNP-ova povezana je s predispozicijom za razvoj određenih bolesti, a sve se više istražuje i utjecaj SNP-ova na ishod TKMS.

Polimorfizmi unutar HLA gama bloka nisu dio rutinske pripreme za TKMS, no novija istraživanja pokazala su da bi gen C4 mogao imati značajan utjecaj na ishod TKMS. Nadalje, gen C4 je u jakom LD-u sa susjednim genima HLA-B i -DRB1, koji se nalaze unutar HLA beta i delta blokova, te bi mogao služiti kao biljeg podudarnosti čitavog haplotipa HLA između primatelja i nesrodnog davatelja (Clancy i sur. 2019). Ne postoji velik broj istraživanja i dostupnih podataka na temu gama blok (GB) podudaranja u TKMS, no neka istraživanja su pokazala značajne rezultate u povezanosti GB podudarnosti i pojave GvHD-a. U istraživanju Hogan i sur. (2015) na 225 parova primatelja i nesrodnih davatelja pokazali su da je rizik od pojave kroničnog ili teškog akutnog

GvHD-a niži kod parova podudarnih za gene HLA i gama blok, u usporedbi s parovima podudarnim za gene HLA, ali nepodudarnim za gama blok (Hogan i sur. 2015). U istraživanju Maskalan i sur. (2020) u skupini od 51 HLA-podudarnog para primatelja i nesrodnih davatelja, rezultati su pokazali statistički značajno povišen rizik od razvoja GvHD-a kod parova s nepodudarnošću za GB.

2. Cilj istraživanja

Cilj ovog diplomskog rada je utvrditi povezanost podudarnosti u HLA gama bloku i rizika od pojave GvHD-a nakon TKMS od HLA 9/10 podudarnog nesrodnog davatelja. Hipoteza istraživanja je da nepodudarnost u HLA gama bloku povećava rizik od pojave GvHD-a nakon TKMS od nesrodnog davatelja.

3. Materijali i metode

3.1. Ispitanici

U istraživanje smo uključili 33 para primatelja i nesrodnih davatelja koji su bili u programu TKMS u periodu od 2011. do 2020. godine u Odjelu za tipizaciju tkiva, Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, KBC Zagreb, čije je Etičko povjerenstvo odobrilo istraživanje unutar kojeg se izradio ovaj diplomski rad. Svi uzorci su prethodno bili testirani za alele lokusa HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1. Odabrana skupina parova imala je podudarnost HLA 9/10, nepodudarnost je bila isključivo na lokusu HLA-A. Karakteristike pacijenata iz ispitivane skupine prikazane su u tablici 1.

Tablica 1. Osobine ispitivane skupine primatelja i njihovih nesrodnih davatelja (N=33).

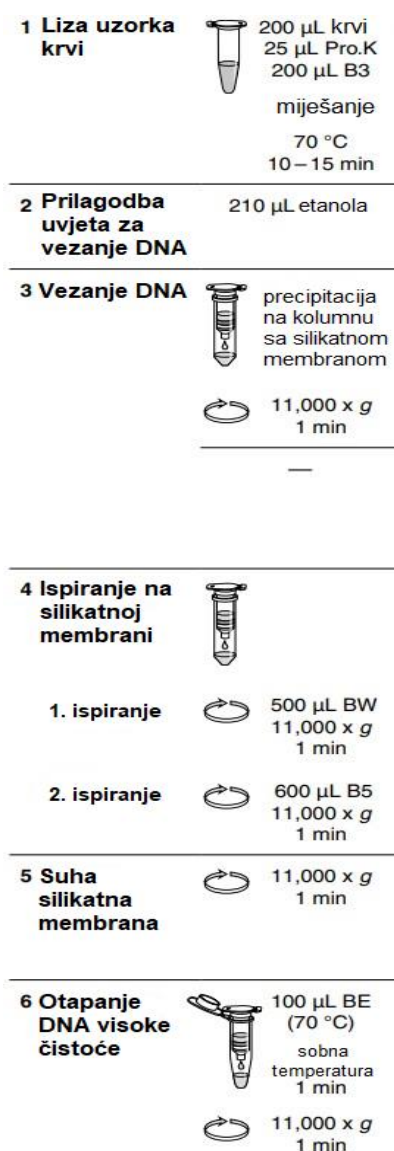
Osobine primatelja i nesrodnih davatelja		
Dob primatelja (godine): srednja vrijednost (raspon) 54 (20-66)		
Dob davatelja (godine): srednja vrijednost (raspon) 27 (19-50)		
Spol: primatelj-nesrodni davatelj	n	%
Ženski-ženski	5	15.1
Ženski-muški	6	18.2
Muški-ženski	13	39.4
Muški-muški	9	27.3
Dijagnoza		
AML+MDS	20	60.6
Ostalo	13	39.4
Tretman kondicioniranja		
Mijeloablativno	8	24.2
Kondicioniranje smanjenog intenziteta	25	75.8
Izvor matičnih stanica		
Koštana srž	6	18.2
Periferna krv	27	81.8

Legenda: **n** - broj parova; **%** - učestalost; **AML** - akutna mijeloična leukemija; **MDS** - mijelodisplastični sindrom

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija DNA

Iz 200 μL uzoraka periferne krvi izolirana je DNA korištenjem NucleoSpin Blood komercijalnog seta za izolaciju (Nucleospin, Macherey-Nagel, Duren, Njemačka). Metoda se temelji na uporabi kolumni sa silikatnom membranom za specifično vezanje DNA. DNA se inkubira s proteinazom K i puferom za lizu stanica. Lizatu se dodaje etanol koji pospješuje vezanje DNA za silikatnu membranu prilikom precipitacije. DNA se zatim ispire puferima za ispiranje pri čemu se uklanjaju proteini, a u zadnjem koraku se eluira s kolumne u puferu za otapanje (slika 5). Nakon postupka izolacije mjeri se čistoća i koncentracija izolirane DNA.



Slika 5. Shematski prikaz postupka izolacije DNA pomoću seta NucleoSpin Blood (preuzeto i prilagođeno iz Macherey-Nagel priručnika za korištenje, 2022).

3.2.2. Umnažanje gena i alela HLA

Korištena metoda za umnažanje gena i alela HLA je PCR-SSP (engl. *Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primers*). Metoda je temeljena na korištenju specifičnih oligonukleotidnih početnica (engl. *primers*) sa sekvencama koje su komplementarne slijedu određenog alela HLA. Set za PCR-SSP tipizaciju sastoji se od određenog broja reakcija za svaki pojedini lokus HLA. Svim ispitanicima napravljena je tzv. tipizacija visoke rezolucije (na četiri znamenke), odnosno tipizacija na razini alela HLA. Korišten je komercijalni set za tipizaciju OlerupSSP™ (CareDx, Stockholm, Švedska). Svaka reakcija PCR zasebno testira prisustvo jednog alela ili genske skupine HLA, uz prisutnost dvaju setova početnica u svakoj reakciji – kontrolni set koji umnaža kontrolni gen kao potvrdu uspješne reakcije i drugi koji umnaža specifičan gen ili alel HLA. U reakcijskoj smjesi, uz setove početnica nalaze se i komercijalni pufer sa smjesom deoksiribonukleotida (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), voda bez nukleaza, termostabilna Taq polimeraza i genomska DNA koncentracije 20-100 µg/mL. Uvjeti umnažanja u aparatu za automatsko umnažanje DNA prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Uvjeti PCR-SSP reakcije za umnažanje alela HLA.

Korak	Temperatura	Vrijeme inkubacije	Broj ciklusa
1	94 °C	2 min	1
2	94 °C	10 sec	10
	65 °C	60 sec	
3	94 °C	10 sec	20
	61 °C	50 sec	
	72 °C	30 sec	
4	4 °C	∞	

Umnoženi produkti PCR provjeravaju se elektroforezom na 1,5 %-tnom agaroznom gelu obojenom bojom GelRed (GenoVision Inc, West Chester, PA, SAD) u puferu 1xTBE (Tris-borate-EDTA). Nakon elektroforeze, gel se fotografira pomoću kamere s tamnom komorom UV G:BOX (Syngene, Cambridge, UK). Pozitivnom reakcijom označava se ona u kojoj se uz kontrolnu vrpce umnožila i vrpca specifičnog produkta reakcije PCR. Rezultati se analiziraju u programu Helmborg Score™ (Olerup i Zetterquist 1992).

3.2.3. Tipizacija HLA gama bloka

Za tipizaciju HLA gama bloka korišten je komercijalno dostupan set Olerup Gamma-Type PCR SSP typing kit (Olerup SSP AB, Švedska), koristeći prethodno izolirane uzorke DNA primatelja i nesrodnih davatelja. Set sadrži panel specifičnih početnica koje su komplementarne sekvencama određenih SNP-ova koji se nalaze na 25 različitih pozicija unutar gena *C4A/C4B* HLA gama bloka. Svaki set (za pojedini uzorak) sastoji se od 25 PCR reakcija, a u reakcijskoj smjesi nalaze se specifične početnice (engl. *Sequence Specific Primers*, SSP), pufer, deoksiribonukleotidi (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), MgCl₂, zeleni pufer za nanošenje i DNA pojedinog uzorka.

Na pločicu PCR s 96 jažica nanijela sam po 3,95 µL reakcijske smjese za svaku od 25 PCR reakcija po uzorku DNA. U 28 µL DNA dodala sam po 1,25 µL Taq polimeraze i smjesu resuspendirala. U jažice s PCR reakcijskom smjesom dodala sam po 1 µL smjese DNA i polimeraze. Pločicu sam prekrila ljepljivom prozirnom folijom i centrifugirala, kako bi se kapljica DNA i polimeraze spustila na dno jažice i pomiješala s reakcijskom smjesom za PCR. Pločicu PCR postavila sam u automatski uređaj za umnažanje, prema postavkama u tablici 3. Za detekciju produkata reakcije PCR, provela sam gel-elektroforezu na 2 %-tnom agaroznom gelu. Gel sam pripremila u 200 mL pufera 1xTBE, dodavši 4 g agaroze i 4 kapljice boje GelRed. Po završetku reakcije PCR, produkte sam nanijela na gel i provela elektroforezu, 19 min na 220 V. Nakon provedene gel-elektroforeze, gel sam fotografirala pomoću kamere s tamnom komorom UV G:BOX i očitala rezultate.

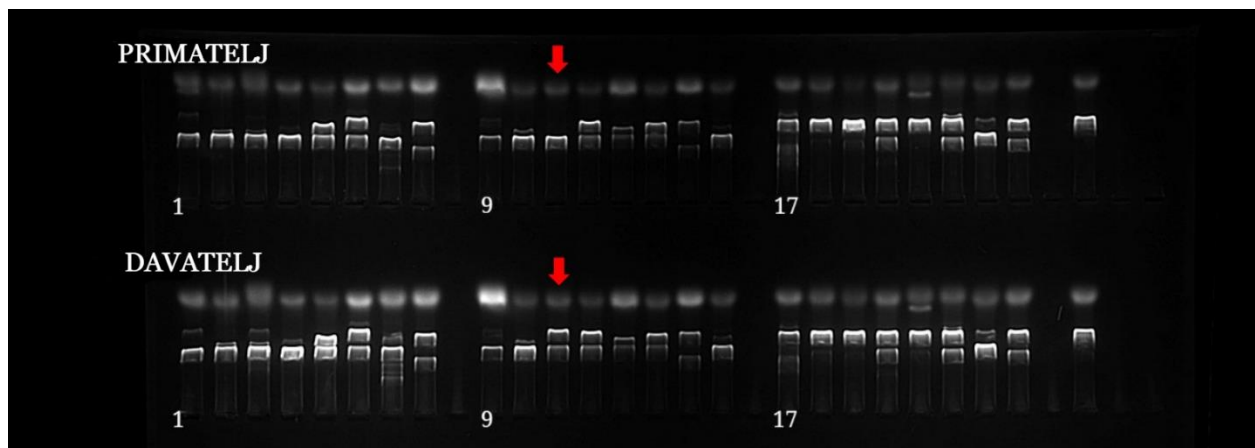
Tablica 3. Uvjeti PCR-SSP reakcije za umnažanje specifičnih polimorfizama HLA gama bloka.

Korak	Temperatura	Vrijeme inkubacije	Broj ciklusa
1	95 °C	10 min	1
2	96 °C	20 sec	28
	61 °C	30 sec	
	72 °C	3 min	
3	96 °C	20 sec	5
	56 °C	30 sec	
	72 °C	3 min	
4	15 °C	∞	

Pri očitavanju rezultata reakcije PCR koristila sam se tablicom očekivanih veličina specifičnih (ciljnih) amplikona i internih kontrola, dostupnom od strane proizvođača seta za gama blok tipizaciju, prikazanu na slici 6. Prema uputama proizvođača, pozitivnim reakcijama obilježila sam one u kojima su se prilikom reakcije PCR umnožili amplikon interne kontrole i ciljni amplikon određene pozicije SNP unutar gama bloka HLA. Negativnim reakcijama označila sam one u kojima se umnožio samo amplikon interne kontrole. Prikaz gela nakon gel-elektroforeze vidljiv je na slici 7. Rezultate tipizacija gama bloka unijela sam u *Gamma-Type Matching Pairs Worksheet*, tablicu dobivenu od strane proizvođača i odredila podudarnost u HLA gama bloku između parova primatelja i nesrodnih davatelja.

Reakcijska smjesa	Veličina specifičnog amplikona	Veličina amplikona interne kontrole
01	≈ 180 bp	≈ 450 bp
02	≈ 350 bp	≈ 450 bp
03	≈ 350 bp	≈ 450 bp
04	≈ 250 bp	≈ 450 bp
05	≈ 250 bp	≈ 450 bp
06	≈ 200 bp	≈ 450 bp
07	≈ 300 bp	≈ 450 bp
08	≈ 550 bp	≈ 300 bp
09	≈ 200 bp	≈ 450 bp
10	≈ 300 bp	≈ 450 bp
11	≈ 200 bp	≈ 450 bp
12	≈ 250 bp	≈ 450 bp
13	≈ 320 bp	≈ 450 bp
14	≈ 250 bp	≈ 450 bp
15	≈ 550 bp	≈ 300 bp
16	≈ 200 bp	≈ 450 bp
17	≈ 450 bp	≈ 300 bp
18	≈ 500 bp	≈ 300 bp
19	≈ 500 bp	≈ 300 bp
20	≈ 500 bp	≈ 300 bp
21	≈ 360 bp	≈ 300 bp
22	≈ 500 bp	≈ 300 bp
23	≈ 200 bp	≈ 450 bp
24	≈ 500 bp	≈ 300 bp
25	≈ 350 bp	≈ 300 bp

Slika 6. Očekivane veličine produkata reakcije PCR u tipizaciji gama bloka HLA (preuzeto iz *Gamma-Type™ Conexio Genomics priručnika za korištenje*, 2016).



Slika 7. Rezultat gel elektroforeze gama tipizacije para primatelj-nesrodni davatelj. Pozitivne reakcije su one u kojima su nastala 2 produkta reakcije PCR, interna kontrola i ciljni amplicon – na pozicijama 5, 6, 8, 12, 13, 14, 15, 20, 22 i 24. Crvene strelice pokazuju nepodudarnost u gama bloku HLA na poziciji 11, u kojoj je reakcija davateljevog uzorka pozitivna, a u primateljevom uzorku nije došlo do umnažanja ciljnog amplicona na istoj poziciji.

3.2.4. Statistička obrada podataka

Broj podudarnosti, odnosno nepodudarnosti između primatelja i nesrodnih davatelja određen je direktnim brojanjem i prikazan u brojevima i postocima. Ispitivana skupina od 33 para primatelja-nesrodnih davatelja je podijeljena u podgrupe i uspoređena uz pomoć Fischer-ovog egzaktnog testa. Povezanost rizika pojave GvHD-a i podudarnosti u HLA gama bloku izračunata je korištenjem Kaplan-Meier kalkulatora (MedCalc, verzija 19.2.6) i log-rank testa za očitovanje razlika između podgrupa i statističku značajnost (p) istih. Razina statističke značajnosti postavljena je na $p < 0,05$.

4. Rezultati

4.1. Raspodjela parova primatelj-nesrodni davatelj s obzirom na podudarnost HLA

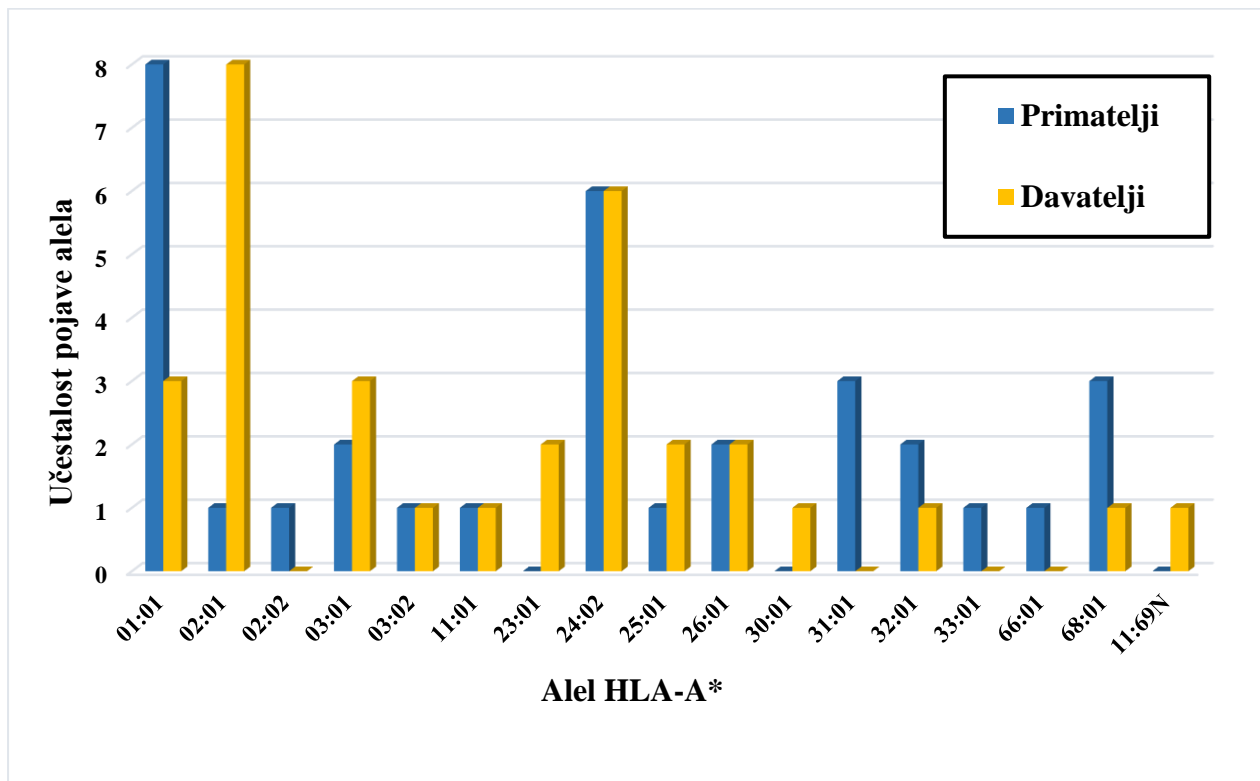
Parovi primatelja i nesrodnih davatelja imali su podudarnost HLA 9/10. Odabrani su prema tome da je prisutna nepodudarnost isključivo na lokusu HLA-A. Aleli i razina nepodudarnosti HLA u parovima primatelja i nesrodnih davatelja prikazana je u tablici 4. Pet parova imalo je isti fenotip HLA-A. Nepodudarnost je uglavnom bila prisutna na razini gena (93,94%), a samo dva para (6,06%) imali su isti gen HLA, a nepodudarnost na razini alela HLA. Na slici 8 prikazana je raspodjela primatelja i nesrodnih davatelja prema alelima HLA-A.

Tablica 4. Prikaz nepodudarnosti HLA-A parova primatelj-nesrodni davatelj (N=33).

	Primatelj	Nesrodni davatelj	Nepodudarnosti
Par P-ND	HLA-A*		
1	01:01	03:01	G
2	01:01	11:69N	G
3	01:01	23:01	G
4	01:01	24:02	G
5	01:01	24:02	G
6	01:01	25:01	G
7	01:01	26:01	G
8	01:01	26:01	G
9	02:01	01:01	G
10	02:02	02:01	A
11	03:01	02:01	G
12	03:01	68:01	G
13	03:02	03:01	A
14	11:01	02:01	G
15	24:02	01:01	G
16	24:02	02:01	G
17	24:02	02:01	G
Par P-ND	HLA-A*		
18	24:02	03:02	G
19	24:02	23:01	G
20	24:02	30:01	G
21	25:01	11:01	G
22	26:01	02:01	G
23	26:01	03:01	G
24	31:01	24:02	G
25	31:01	24:02	G
26	31:01	25:01	G
27	32:01	24:02	G
28	32:01	26:01	G
29	33:01	01:01	G
30	66:01	32:01	G
31	68:01	02:01	G
32	68:01	02:01	G
33	68:01	24:02	G

Legenda: P-ND – primatelj-nesrodni davatelj; G - razina gena; A - razina alela

U ispitivanoj skupini od 66 pojedinaca (33 para primatelj-nesrodni davatelj), uočeno je 17 različitih alela na lokusu HLA-A. Najveći broj primatelja (N=8; 24,24%) imao je alel HLA-A*01:01, a s istom učestalosti pojavio se alel HLA-A*02:01 kod davatelja KMS. Jedan od davatelja imao je nul alel tj. alel bez ekspresije (engl. *null allele*, N).



Slika 8. Raspodjela alela HLA-A među primateljima i njihovim nesrodnim davateljima (N=66). A*11:69N – nul alel bez ekspresije (engl. *null allele*).

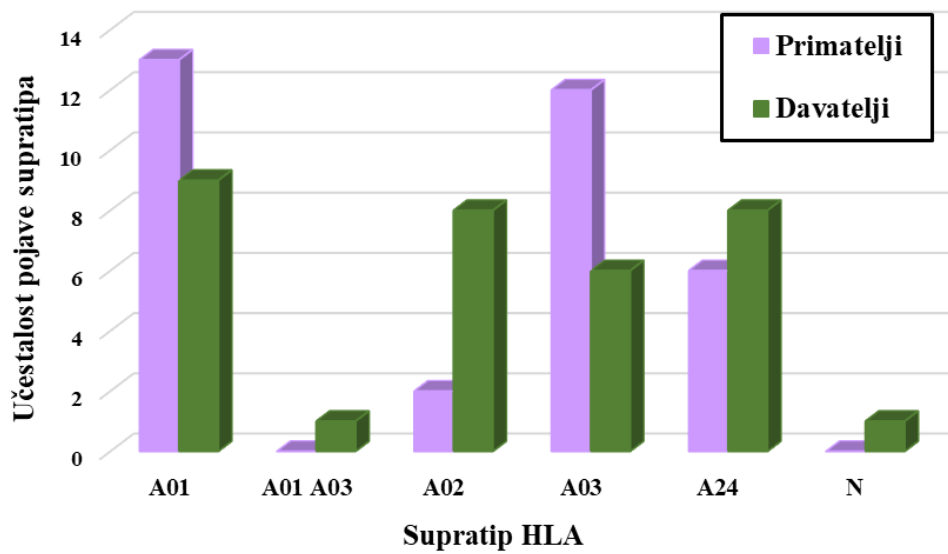
4.2. Raspodjela parova primatelj-nesrodni davatelj s obzirom na supratip HLA

Parove primatelj-nesrodni davatelj podijelili smo prema supratipu HLA-A (tablica 5). Osam (24,24%) parova primatelj-nesrodni davatelj bili su podudarni u supratipu HLA-A (slika 9).

Od ukupno četiri supratipa HLA-A uočena među primateljima najveću zastupljenost je pokazao supratip HLA-A01 (N=13; 39,39%), a zatim supratip HLA-A03 (N=12; 36,36%). Među davateljima je uočeno pet različitih supratipova HLA. Najveću zastupljenost također je pokazao supratip HLA-A01 (N=9; 27,27%), a potom supratip HLA-A02 (N=8; 24,24%) i supratip HLA-A24 (N=8; 24,24%).

Tablica 5. Raspodjela parova primatelj-nesrodni davatelj s obzirom na supratipove HLA.

Par P-ND	HLA-A supratip primatelja	HLA-A supratip davatelja	Par P-ND	HLA-A supratip primatelja	HLA-A supratip davatelja
1	A01	A03	20	A24	A01A03
2	A01	N	21	A01	A03
3	A01	A24	22	A01	A02
4	A01	A24	23	A01	A03
5	A01	A24	24	A03	A24
6	A01	A01	25	A03	A24
7	A01	A01	26	A03	A01
8	A01	A01	27	A01	A24
9	A02	A01	28	A01	A01
10	A02	A02	29	A03	A01
11	A03	A02	30	A03	A01
12	A03	A03	31	A03	A02
13	A03	A03	32	A03	A02
14	A03	A02	33	A03	A24
15	A24	A01	Legenda: P-ND – primatelj i nesrodni davatelj; N – alel bez ekspresije (engl. <i>null allele</i>)		
16	A24	A02			
17	A24	A02			
18	A24	A03			
19	A24	A24			



Slika 9. Raspodjela supratipova HLA kod primatelja i nesrodnih davatelja. N - alel bez ekspresije (engl. *null allele*).

4.3. Raspodjela parova primatelj-nesrodni davatelj s obzirom na supratip HLA i gama blok HLA

Parove primatelj-nesrodni davatelj podijelili smo prema podudarnosti u supratipu HLA i gama bloku HLA (tablica 6). Najviše parova (N=20; 60,61%) bilo je različitog supratipa HLA-A s prisutnom nepodudarnošću u gama bloku. Pet parova primatelj-nesrodni davatelj bilo je istog supratipa HLA i nepodudarni u gama bloku HLA, a po 4 para imala su podudarnost u HLA gama bloku, s istim ili različitim supratipom HLA-A. Nije uočena statistički značajna ($p=0,1695$) razlika u nepodudarnosti u HLA gama bloku između parova s istim ili različitim supratipom HLA.

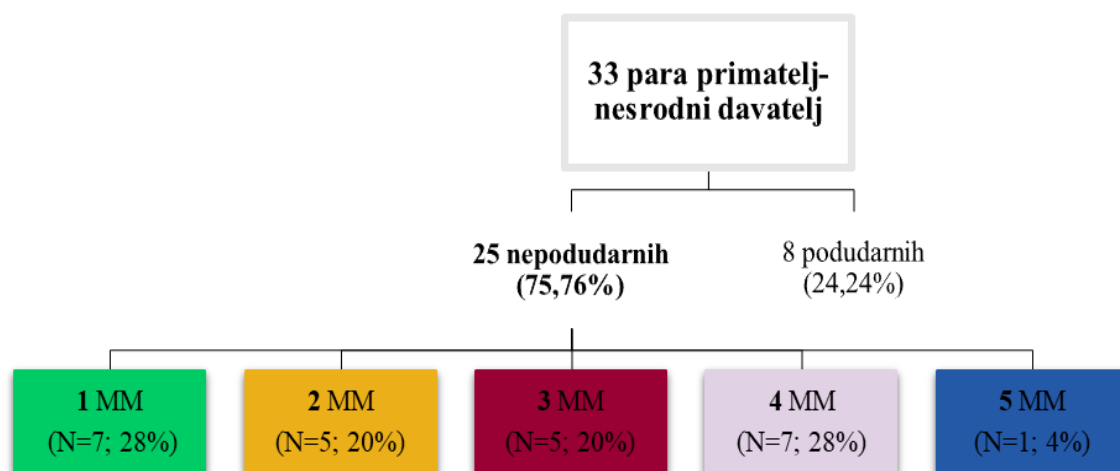
Tablica 6. Prisutnost nepodudarnosti u HLA gama bloku između parova s istim ili različitim supratipom HLA.

	Podudarnost u HLA gama bloku (N=8)	Nepodudarnost u HLA gama bloku (N=25)
Isti supratip HLA-A (N=9)	4	5
Različiti supratip HLA-A (N=24)	4	20

$p > 0,05$

4.4. Raspodjela parova primatelj-nesrodni davatelj s obzirom na HLA gama blok

Nepodudarnost u HLA gama bloku bila je prisutna kod 25 (75,76%) parova primatelja i nesrodnih davatelja. Broj nepodudarnosti između parova primatelja i nesrodnih davatelja kretao se od jedan do pet. Najveći broj parova (N=7; 28%) imao je jednu, odnosno četiri nepodudarnosti u gama bloku (slika 10). Pet parova (20%) primatelj-nesrodni davatelj imalo je po dvije, odnosno tri nepodudarnosti, dok je samo jedan par (4%) imao 5 nepodudarnosti u HLA gama bloku.



Slika 10. Podjela parova primatelj-nesrodni davatelj s obzirom na podudarnost/nepodudarnost u gama bloku. MM - nepodudarnost (engl. *mismatch*)

4.5. Analiza parova primatelj-nesrodni davatelj s obzirom na raspodjelu SNP nepodudarnosti

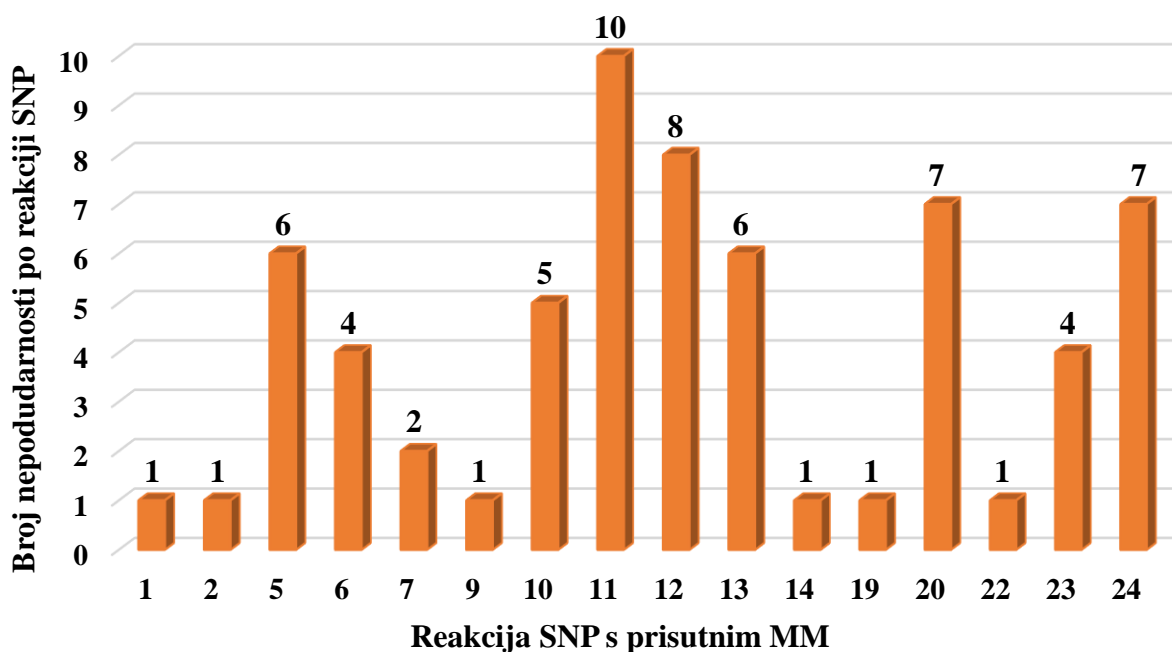
Analiza SNP nepodudarnosti parova primatelj-nesrodni davatelj pokazala je da su unutar skupine parova s jednom nepodudarnosti, dva para (broj 8 i broj 9) imala nepodudarnost za SNP na poziciji 13. Dva para (broj 3 i broj 11) također su imali istu nepodudarnost i to za SNP na poziciji 20 (tablica 7). Unutar skupine parova primatelj-nesrodni davatelj s dvije nepodudarnosti, samo su dva para pokazala kombinaciju istih SNP nepodudarnosti (par broj 1 i broj 24). U preostalim skupinama parova nije uočeno ponavljanje istih SNP nepodudarnosti.

Tablica 7. Analiza specifičnih polimorfizama jednog nukleotida (SNP) između parova primatelja i nesrodnih davatelja i broj nepodudarnosti.

	Par P-ND broj	SNP
1 MM	4	6
	26	11
	8 i 9	13
	23	19
	3 i 11	20
2 MM	10	5, 20
	31	6, 20
	2	10, 11
	1 i 24	11, 24
3 MM	25	5, 10, 11
	17	5, 10, 12
	5	5, 13, 20
	30	11, 12, 24
	6	11, 13, 23
4 MM	21	1, 6, 7, 23
	15	2, 12, 13, 24
	19	6, 9, 11, 13
	33	7, 12, 20, 23
	14	10, 11, 12, 24
	13	11, 12, 22, 24
	27	11, 12, 23, 24
5 MM	22	5, 6, 10, 13, 20

Legenda: P-ND - primatelj-nesrodni davatelj; SNP - polimorfizam jednog nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*); MM - nepodudarnost (engl. *mismatch*)

Na slici 11 prikazana je raspodjela nepodudarnosti između parova primatelj-nesrodni davatelj na svakom SNP-u. Najveći broj nepodudarnosti (N=10; 40%) uočen je u reakciji, tj. SNP-u broj 11, slijedio je SNP 12, u kojem je nepodudarno bilo ukupno 8 (32%) parova primatelj-nesrodni davatelj. Po 7 (28%) parova bilo je nepodudarno u reakcijama 20 i 24, a u SNP-ovima 5 i 13 bilo je nepodudarno po 6 (24%) parova primatelj-nesrodni davatelj. U 9 (36%) reakcija tj. SNP 3, 4, 8, 15, 16, 17, 18, 21 i 25, niti jednom nije uočena nepodudarnost između para primatelj-nesrodni davatelj.

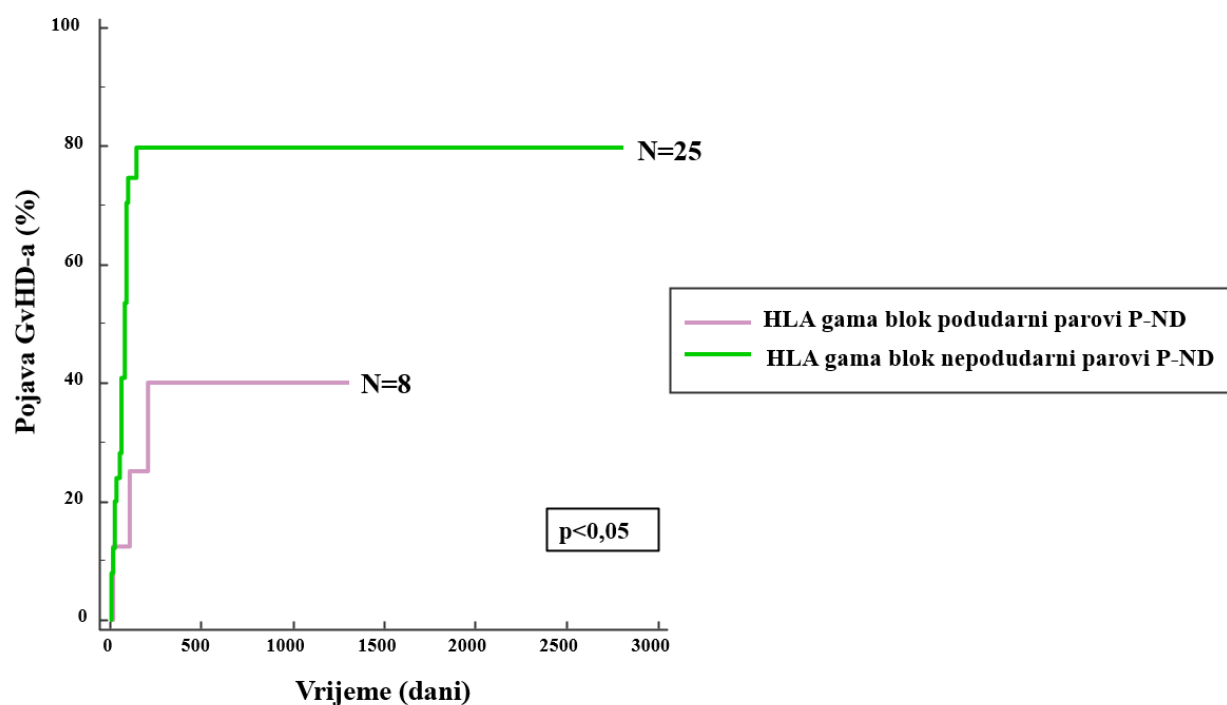


Slika 11. Raspodjela nepodudarnosti po SNP reakcijama (N=16). SNP - polimorfizam jednog nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*); MM - nepodudarnost (engl. *mismatch*)

4.6. Istraživanja povezanosti GvHD-a i HLA

4.6.1. Analiza povezanosti pojave GvHD-a i podudarnosti u HLA gama bloku

U ispitivanoj skupini od 33 para primatelj-nesrodni davatelj, njih 25 (75,76%) imalo je nepodudarnost u HLA gama bloku. Usporedba parova primatelja i nesrodnih davatelja s obzirom na podudarnost u HLA gama bloku prikazana je na slici 12. Uočena je statistički značajno češća pojava GvHD-a ($p=0,0302$) kod parova primatelj-nesrodni davatelj koji su imali nepodudarnost u HLA gama bloku.

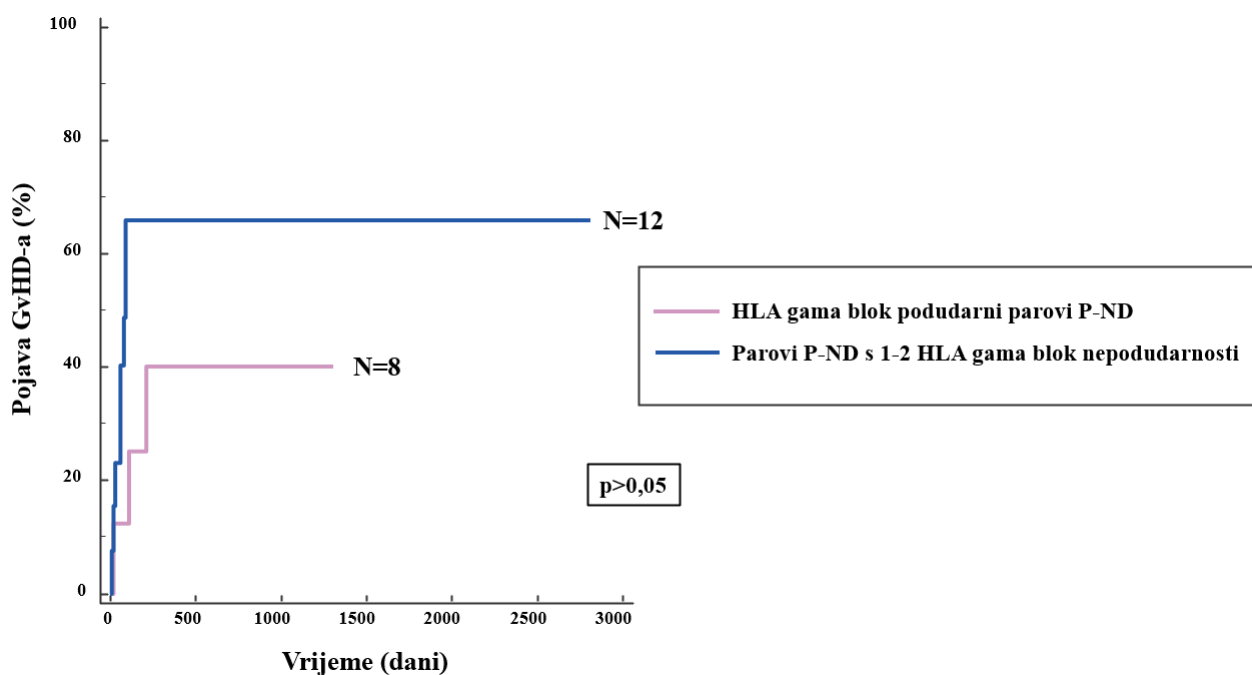


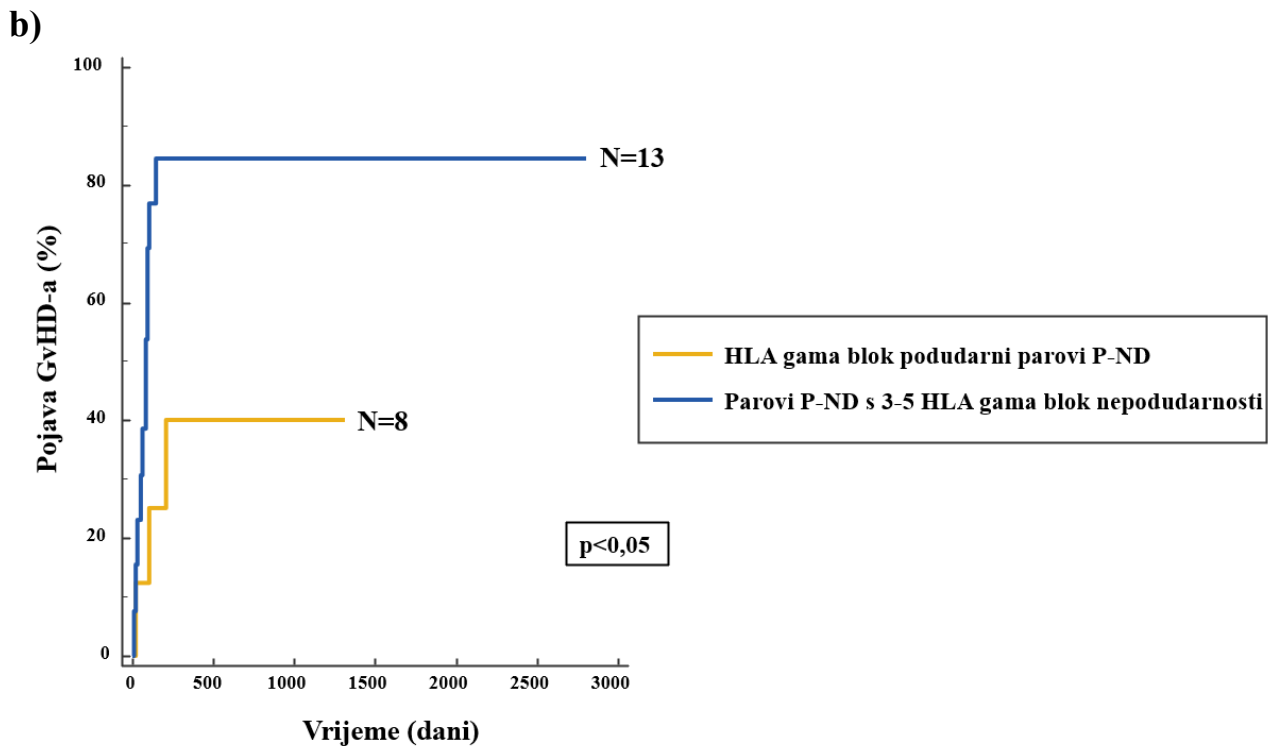
Slika 12. Prikaz pojave GvHD-a s obzirom na podudarnost u HLA gama bloku kod parova primatelj-nesrodni davatelj. GvHD - bolest presatka protiv primatelja (engl. *Graft-versus-Host Disease*); P-ND – primatelj i nesrodni davatelj

4.6.2. Analiza povezanosti pojave GvHD-a i broja nepodudarnosti u HLA gama bloku

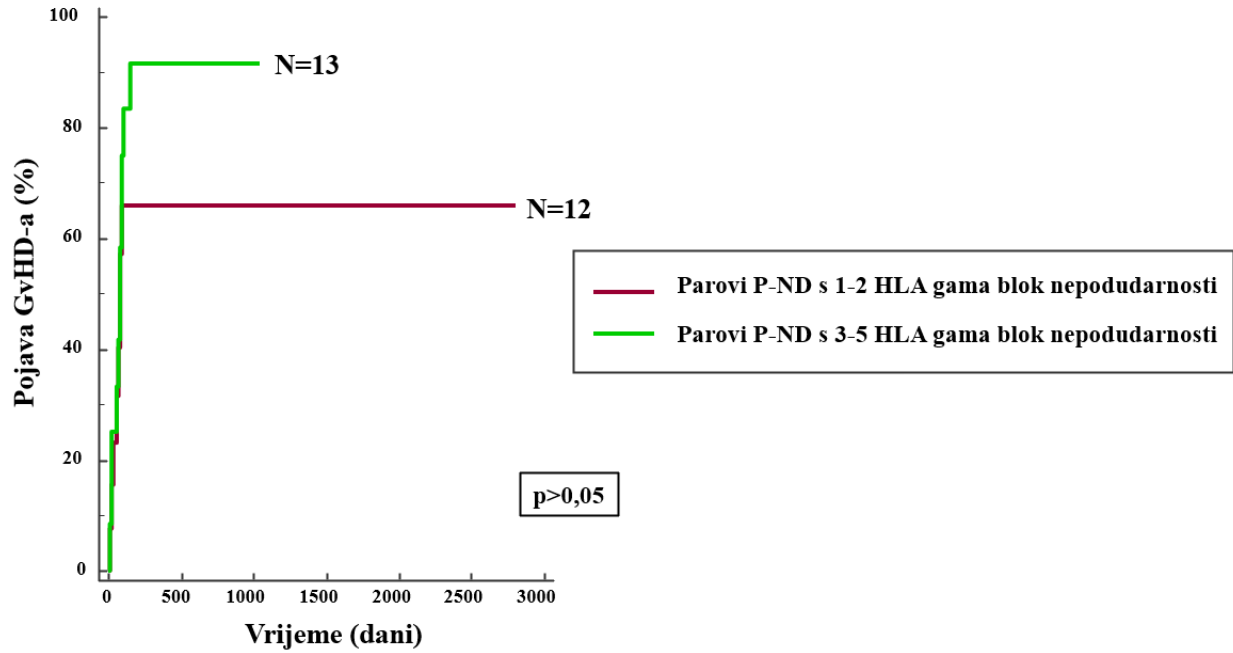
Analiza povezanosti pojave GvHD-a i podudarnosti u HLA gama bloku, s obzirom na broj uočenih nepodudarnosti prikazana je na slikama 13a i 13b. Sve parove primatelj-nesrodni davatelj podijelili smo u 3 skupine: (1) parovi primatelj-nesrodni davatelj podudarni u HLA gama bloku, (2) parovi primatelj-nesrodni davatelj s 1-2 nepodudarnosti u HLA gama bloku i (3) parovi primatelj-nesrodni davatelj s 3-5 nepodudarnosti u HLA gama bloku. Parovi primatelj-nesrodni davatelj s 3-5 nepodudarnosti u HLA gama bloku pokazali su statistički značajno ($p=0,231$) češću pojavu GvHD-a od parova primatelj-nesrodni davatelj podudarnih u HLA gama blok. Istovremeno nije uočena statistički značajna razlika u pojavi GvHD-a između parova podudarnih u HLA gama bloku i parova primatelj-nesrodni davatelj s 1-2 nepodudarnosti u HLA gama bloku. Međusobna usporedna parova primatelj-nesrodni davatelj s obzirom na broj nepodudarnosti u HLA gama bloku (slika 14) pokazala je tendenciju veće pojave GvHD-a u skupini parova s 3-5 nepodudarnosti, ali bez statističke značajnosti ($p=0,1554$).

a)





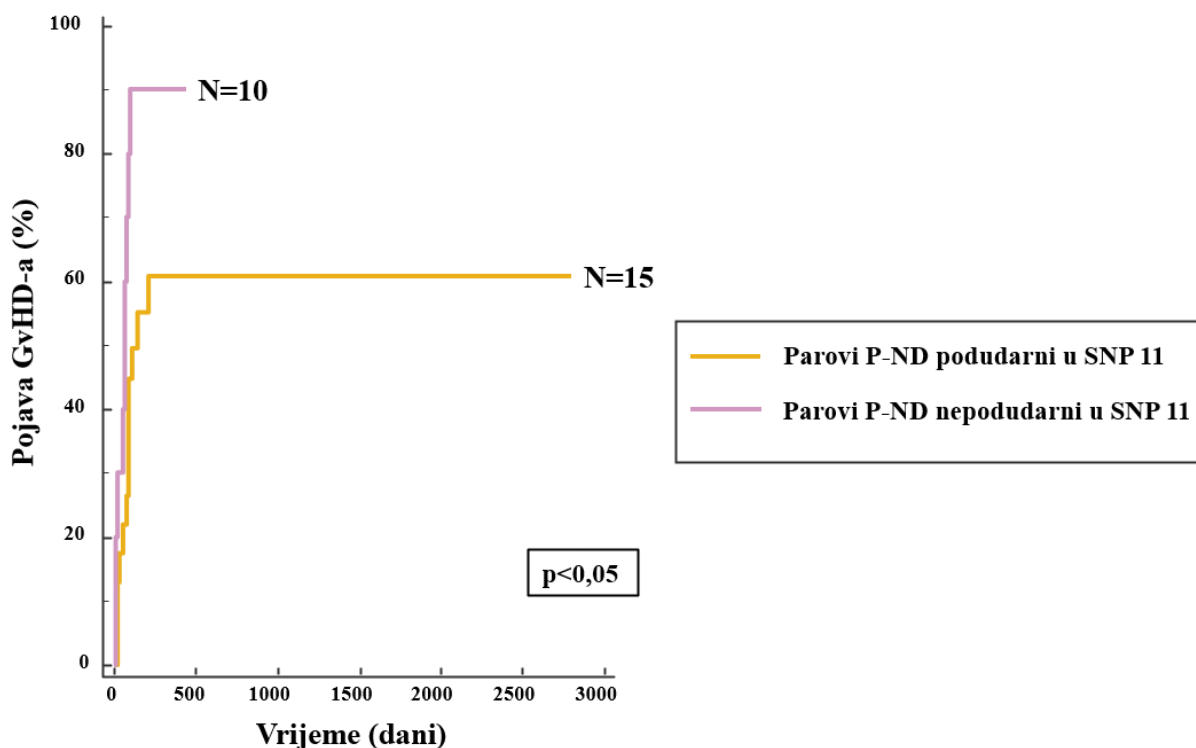
Slika 13. Usporedba pojave GvHD-a između parova primatelj-nesrodni davatelj podudarnih u HLA gama s parovima primatelj-davatelj s 1-2 nepodudarnosti u HLA gama bloku (a); i s parovima primatelj-nesrodni davatelj s 3-5 nepodudarnosti u HLA gama bloku (b). GvHD - bolest presatka protiv primatelja (engl. *Graft-versus-Host Disease*); P-ND – primatelj i nesrodni davatelj



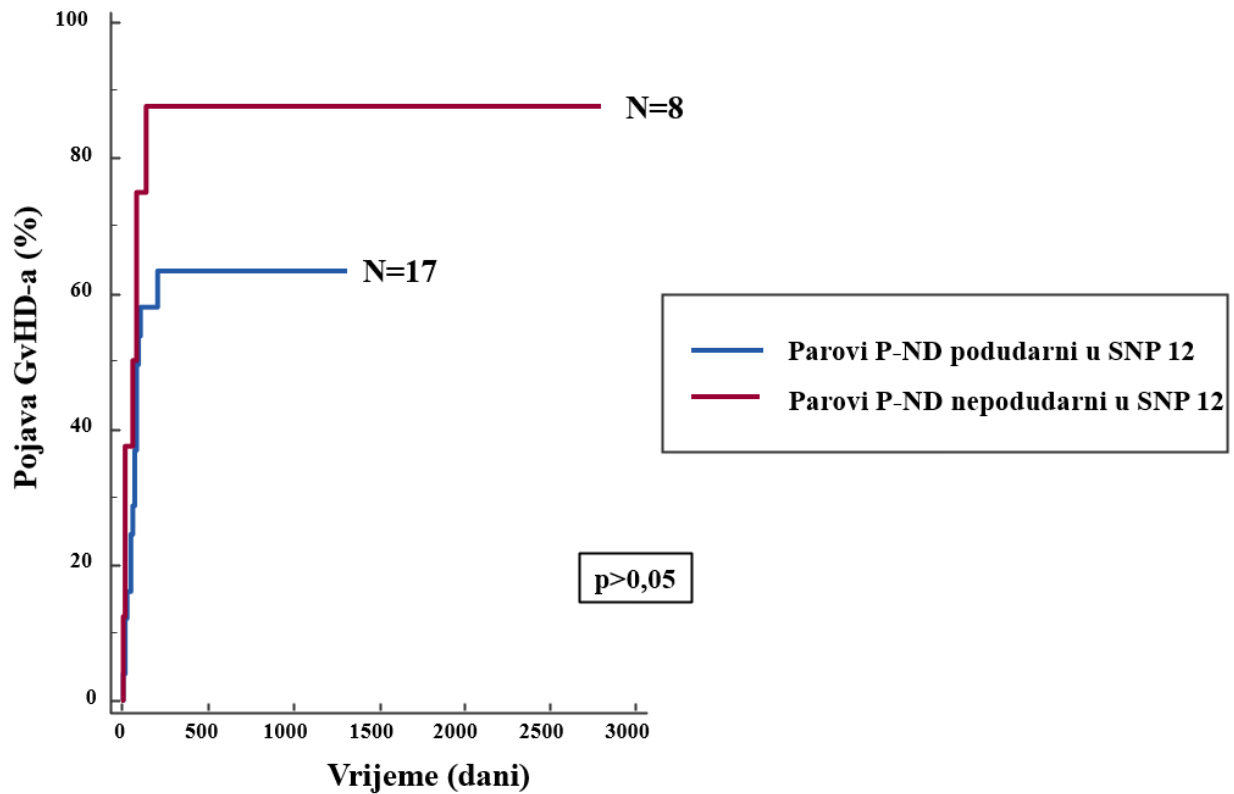
Slika 14. Prikaz pojave GvHD-a kod parova primatelja i nesrodnih davatelja s 1-2 i 3-5 nepodudarnosti u HLA gama bloku. GvHD - bolest presatka protiv primatelja (engl. *Graft-versus-Host Disease*); P-ND – primatelj i nesrodni davatelj

4.6.3. Analiza povezanosti pojave GvHD-a i podudarnosti na SNP poziciji 11

Unutar skupine od 25 parova primatelj-nesrodni davatelj s HLA gama nepodudarnošću, uočena je najčešće nepodudarnost za SNP na poziciji 11 (N=10; 40%), a zatim poziciji 12 (N=8; 32%). Istražili smo postoji li veća pojava GvHD-a u prisutnosti nepodudarnosti na SNP poziciji 11 (slika 15) i poziciji 12 (slika 16). Nepodudarnost za SNP na poziciji 11 pokazala je statistički značajno ($p=0,0189$) češću pojavu GvHD-a, dok je nepodudarnost za SNP na poziciji 12 pokazala tendenciju češće pojave GvHD-a, ali bez statističke značajnosti ($p=0,1899$).

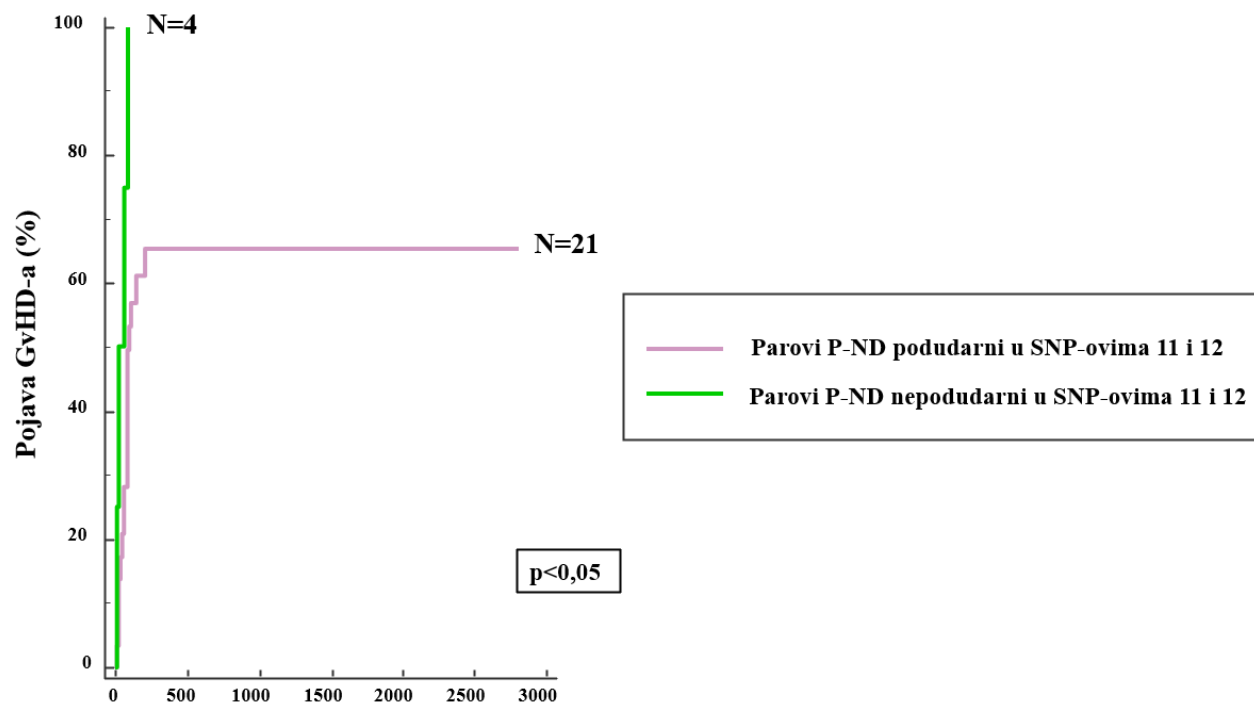


Slika 15. Vjerojatnost pojave GvHD-a s obzirom na prisutnost nepodudarnosti na SNP poziciji 11. GvHD - bolest presatka protiv primatelja (engl. *Graft-versus-Host disease*); SNP - polimorfizam jednog nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*); P-ND – primatelj i nesrodni davatelj



Slika 16. Prikaz pojave GvHD-a s obzirom na prisutnost nepodudarnosti na SNP poziciji 12. GvHD - bolest presatka protiv primatelja (engl. *Graft-versus-Host disease*); SNP - polimorfizam jednog nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*); P-ND - primatelj i nesrodni davatelj

Na slici 17 prikazana je analiza prisustva nepodudarnosti za SNP-ove na pozicijama 11 i 12 (N=4). Analiza je pokazala statistički značajno češću ($p=0,0201$) pojavu GvHD-a u prisutnosti nepodudarnosti na obje SNP pozicije.

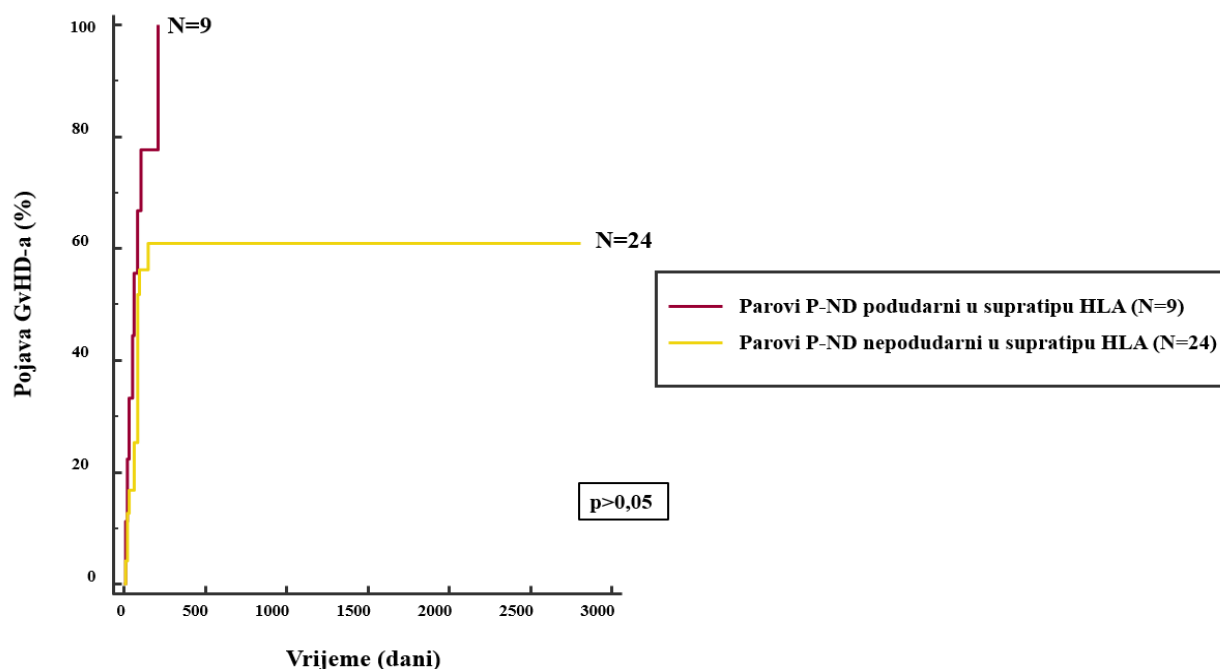


Slika 17. Prikaz pojave GvHD-a s obzirom na prisutnost nepodudarnosti na SNP pozicijama 11 i 12. GvHD - bolest presatka protiv primatelja (engl. *Graft-versus-Host disease*); SNP - polimorfizam jednog nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*); P-ND - primatelj i nesrodni davatelj

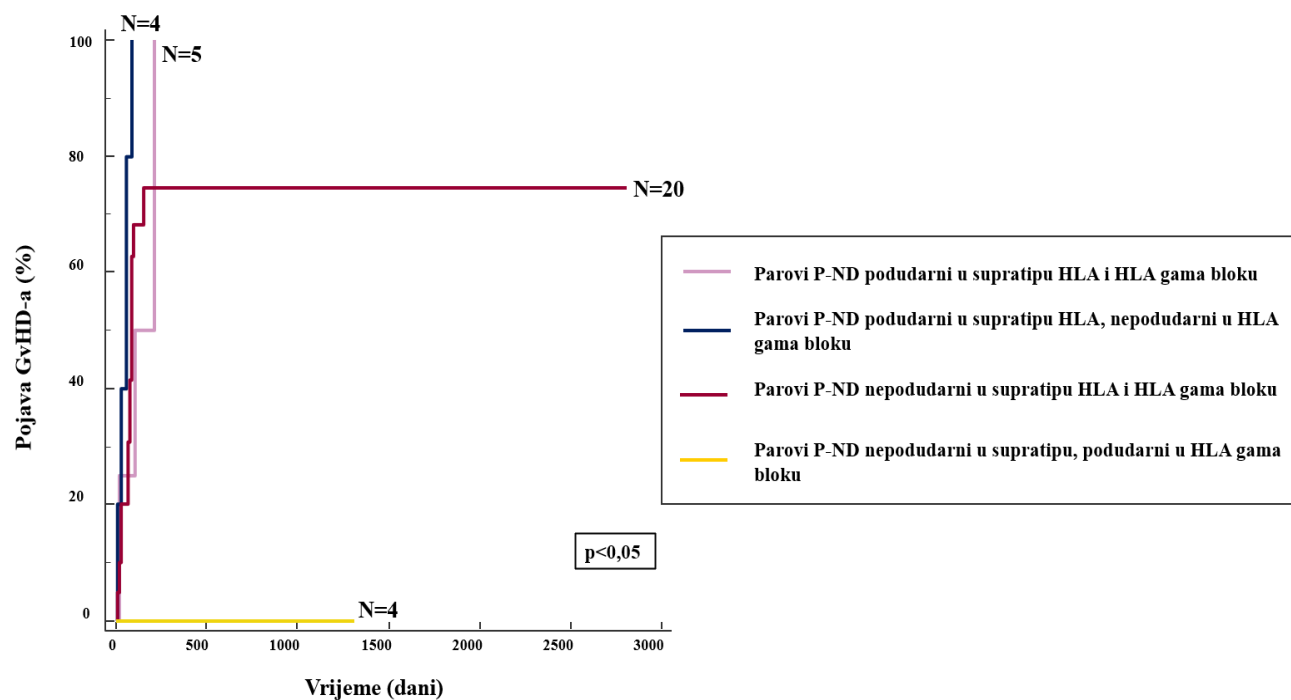
4.6.4. Analiza povezanosti pojave GvHD-a i podudarnosti u HLA gama bloku i supratipu HLA-A

Kada smo u analizu uključili i podudarnost u HLA gama bloku i supratipu HLA dobili smo sljedeće rezultate. Na slici 18 prikazana je analiza povezanosti podudarnosti u supratipu HLA s pojavom GvHD-a. Podudarnost u supratipu HLA nije pokazala statistički značajan utjecaj na pojavu GvHD-a, već tendenciju povećanog rizika za razvoj GvHD-a u skupini s podudarnim supratipom HLA ($p=0,0867$).

U analizi podudarnosti i supratipa HLA-A i HLA gama bloka zajedno uočili smo statističku značajnost za razvoj GvHD-a ($p=0,0057$) (slika 19). Skupine smo podijelili prema podudarnosti u supratipu HLA i HLA gama bloku, tj. (1) na parove s podudarnim supratipom HLA-A i podudarnim HLA gama blokom, (2) parove s podudarnim supratipom HLA-A i nepodudarnim HLA gama blokom, (3) parove s nepodudarnim supratipom HLA-A i nepodudarnim HLA gama blokom te (4) parove s nepodudarnim supratipom HLA-A i podudarnim HLA gama blokom. Skupine 2 i 3 pokazale su statistički značajno povećan rizik za razvoj GvHD-a.



Slika 18. Prikaz pojave GvHD-a s obzirom na podudarnost u supratipu HLA-A. GvHD - bolest presatka protiv primatelja (engl. *Graft-versus-Host disease*); P-ND - primatelj i nesrodni davatelj.



Slika 19. Prikaz pojave GvHD-a s obzirom na podudarnost u supratipu HLA-A i HLA gama bloku. GvHD - bolest presatka protiv primatelja (engl. *Graft-versus-Host disease*); P-ND - primatelj i nesrodni davatelj

5. Rasprava

U posljednjih nekoliko desetljeća, alogenična TKMS prerasla je iz eksperimentalne terapije u standardni postupak liječenja različitih hematoloških bolesti. Unatoč velikom napretku tehnologije, imunosupresivnih terapija, tipizacije HLA i pronalaska podudarnih srodnih ili nesrodnih davatelja, GvHD je i dalje jedan od glavnih uzroka smrtnosti bolesnika nakon TKMS. Glavni rizični čimbenik za razvoj GvHD-a je nepodudarnost u genima HLA između primatelja i davatelja, istodobno podudarnost u genima HLA se pokazala nedovoljnom za izbjegavanje neželjenih ishoda TKMS. Za razliku od srodne TKMS, podudarnost u genima HLA između primatelja i nesrodnog davatelja ne podrazumijeva i podudarnost u haplotipu HLA, odnosno ostalim genima koji se nalaze unutar regije tj. između gena HLA koji se određuju (regija između lokusa HLA-A i HLA-DPB1) u rutinskom postupku u pripremi za TKMS (Wennerstrom i sur. 2013; Fürst i sur. 2019). Iz tih razloga, postoji velika potreba za istraživanjem drugih genetskih čimbenika važnih za smanjenje rizika od razvoja GvHD-a, odnosno za pronalaskom biljega koji bi mogli poslužiti u još boljem, preciznijem odabiru nesrodnog davatelja i sprječavanju razvoja GvHD-a. Time bi se smanjila smrtnost bolesnika, ali i potreba za terapijom koja se koristi u liječenju GvHD-a. Stoga, naslijeđeni dijelovi genoma, SNP-ovi koji kodiraju razne citokine, kemokine i upalne regulatorne čimbenike postali su predmetom interesa genetičkih istraživanja s ciljem poboljšanja ishoda TKMS (Kuba i Raida 2018). U tu svrhu izrađen je i ovaj diplomski rad, kao dio većeg istraživanja utjecaja polimorfizma HLA gama bloka na pojavu GvHD-a u programu nesrodne TKMS.

Iz svega navedenog, cilj ovog istraživanja koje je obuhvatilo 33 para primatelj-nesrodni davatelj s podudarnošću HLA 9/10, bio je istražiti povezanost HLA gama bloka i pojave GvHD-a. Svi parovi su bili nepodudarni za jedan gen ili alel na lokusu HLA-A.

Unatoč malom broju ispitanika, učestalost alela HLA-A unutar skupina primatelja bila je u skladu s učestalošću uočenom u hrvatskoj populaciji na skupini od 4000 ispitanika (Grubić i sur. 2014) (podaci dostupni na zahtjev). Nije bilo moguće istražiti postoje li razlike u razini nepodudarnosti (razina gena ili razina alela) na lokusu HLA-A i pojave GvHD-a jer su samo 2 para primatelj-nesrodni davatelj imali nepodudarnost na razini alela HLA, te su oba bolesnika razvila GvHD (akutni ili kronični). Zanimljivo je spomenuti da za jednog od bolesnika s fenotipom HLA-A*01:01, A*11:01 pronađen nesrodni davatelj koji je na lokusu HLA-A imao kombinaciju alela

HLA-A*11:69N, A*11:01. Navedeni bolesnik razvio je GvHD, što je u skladu sa zaključcima istraživanja iz 2004. godine koje govori da transplant KMS s HLA null alelom i dalje prepoznaje primateljeve molekule HLA kao strane i može izazvati imunološku reakciju, odnosno GvHD, ali neće izazvati reakciju primatelja protiv davatelja (Elsner i Blasczyk 2004). Drugim riječima, HLA nepodudarnost postoji samo u jednom smjeru: nesrodni davatelj→primatelj, ali ne i u smjeru primatelj→nesrodni davatelj. Jedna od sugestija u programu nesrodne TKMS u slučaju da nema HLA podudarnog davatelja 10/10 je da se odabere, ako je moguće, davatelj homozigot na nepodudarnom lokusu HLA (Elsner i Blasczyk 2004).

Među HLA alelima, alel HLA-A*11:69N spada u rijetke alele, do sada je prijavljen samo četiri puta u bazi podataka Allele Frequency Net, što ne znači da nije prisutan i u drugim populacijama u svijetu (The Allele Frequency Net Database - Allele, haplotype and genotype frequencies in Worldwide Populations (2019) allelefrequencies.net, pristupljeno 25. 8. 2023.). Alel HLA-A*11:69N otkriven je prvi put 2014. godine, a od alela HLA-A*11:01:01 razlikuje se u jednoj aminokiselini (G→A) na poziciji 723, u egzonu 4 što je rezultiralo stop kodonom (Gao i sur. 2014). Do danas je poznato preko 30 HLA-A*11 null alela koji također nisu učestali, za razliku od nekih drugih null alela (npr. DRB4*01:03:01:02N) koji spadaju u česte, kao u primjeru navedeni alel koji je prisutan u hrvatskoj populaciji u haplotipima HLA-B*15(B62)~C*03(Cw9)~DRB1*04:02~DRB4*01:03:01:02N~DQB1*03:02 i HLA-B*57~C*06~DRB1*07:01~DRB4*01:03:01:02N~DQB1*03:03 s velikom učestalošću (Grubić i sur. 2018).

Ekspresija molekula HLA na površini stanica direktno utječe na jačinu imunološkog odgovora i klinički ishod TKMS. Iz tog razloga, napravili smo i analizu alela HLA-A klasificiranih u supratipove HLA-A, no nismo pronašli povezanost podudarnosti u supratipu HLA-A između parova primatelj-nesrodni davatelj s pojavom GvHD-a. Naši rezultati u skladu su s rezultatima skupine iz SAD-a (Camacho-Bydume i sur. 2021) koji su proveli istraživanje na preko 7000 HLA podudarnih parova primatelj-nesrodni davatelj, u kojem nisu pronašli povezanost između podudarnosti u supratipu HLA-A s ishodom TKMS, no pronašli su povezanost sa supratipom na lokusu HLA-B. Supratip HLA-B62, unutar kojeg prevladava alel HLA-B*15:01, pokazao je povezanost sa smanjenom pojavom smrtnosti uslijed TKMS i razvoja GvHD-a. Zbog male skupine parova primatelj-nesrodni davatelj u našem istraživanju, mi nismo mogli provesti takve analize.

Podudarnost u HLA gama bloku, odnosno genu C4, pokazala je povezanost s ishodom TKMS u nekim recentnim istraživanjima. Rad iz 2016. godine na 59 parova primatelj-podudarni nesrodni davatelj pokazao je da je nepodudarnost u genu C4 statistički značajno povezana s povišenim rizikom za nastanak akutnog GvHD-a (Park i sur. 2016). S druge strane, u istraživanjima znanstvenih grupa iz Finske (Clancy i sur. 2019) i Brazila (Getz i sur. 2020) nije uočena povezanost nepodudarnosti HLA gama bloka s razvojem GvHD-a. Međutim, oba istraživanja ukazala su na mogućnost korištenja gena C4 kao biljega za podudarnost u haplotipu HLA zbog iznimno jakog LD-a sa susjednim lokusima.

Hipoteza ovog istraživanja bila je da će nepodudarnost u HLA gama bloku imati utjecaj na ishod TKMS, odnosno na razvoj GvHD-a. Rezultati su pokazali statistički značajnu povezanost nepodudarnosti u HLA gama bloku s pojavom GvHD-a nakon TKMS. Od 25 parova koji su imali nepodudarnost u HLA gama bloku, 20 (80%) bolesnika razvilo je GvHD. Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima istraživanja iz 2020. godine na skupini od 51 para primatelj-nesrodni davatelj koji su imali podudarnost HLA 10/10 (Maskalan i sur. 2020). U navedenom istraživanju napravljena je analiza povezanosti podudarnosti u HLA gama bloku s dvogodišnjim preživljenjem, relapsom bolesti i pojavom GvHD-a. Dok za preživljenje i relaps nije pronađena statistički značajna povezanost s podudarnošću u HLA gama bloku, rizik od pojave GvHD-a pokazao se statistički značajno povišenim kod parova primatelj-nesrodni davatelj koji su imali nepodudarnost u HLA gama bloku.

S obzirom na broj nepodudarnosti između parova primatelj-nesrodni davatelj, uočili smo da su parovi primatelj-nesrodni davatelj s više od 3 nepodudarnosti u HLA gama bloku imali statistički značajno veću pojavu GvHD-a od parova podudarnih u HLA gama bloku, ali nismo pronašli statističku značajnost pri usporedbi s parovima primatelj-nesrodni davatelj s 1-2 nepodudarnosti u HLA gama bloku. Jedno od mogućih objašnjenja je mali broj parova u svakoj od navedenih skupina, ali i drugi čimbenici koji utječu na ishod TKMS (npr. način kondicioniranja, izvor KMS, profilaksa GvHD-a). Od 33 bolesnika, za njih 25 (75,75%) korišteno je kondicioniranje smanjenog intenziteta korištenjem antitimocitnih globulina (engl. *Anti-Thymocyte Globulin*, ATG), za koje je poznato pozitivno djelovanje na smanjenje rizika od razvoja GvHD-a (Baron i sur. 2017).

Najveći broj nepodudarnosti u SNP-ovima uočen je na pozicijama 11 (40%) i 12 (32%). U analizi utjecaja nepodudarnosti na SNP poziciji 12 nismo uočili statistički značajno češću pojavu GvHD-a, no SNP pozicija 11 pokazala je utjecaj na ishod TKMS, i samostalno i u zajedničkoj analizi sa SNP pozicijom 12. Dobivene rezultate nije moguće komentirati jer nije poznato o kojim je točno SNP-ovima riječ, jer podaci nisu dostupni od strane proizvođača. Utjecaj određenih SNP pozicija na ishod TKMS i pojavu GvHD-a uočen je i u drugim istraživanjima. Askar i suradnici su u svom istraživanju na 236 parova primatelj-nesrodni davatelj uočili 3 pozicije SNP (c.2918+98G, c.3316C i c.4385C) sa značajnim utjecajem na pojavu teškog akutnog GvHD-a (Askar i sur. 2015). Također, u istraživanju znanstvenika iz SAD-a 2018. godine na 66 parova primatelj-nesrodni davatelj, uočena je značajna povezanost nepodudarnosti na jednoj poziciji SNP i razvoja akutnog GvHD-a, no ni toj skupini istraživača nije bila poznata točna lokacija SNP-a (Moyer i sur. 2018).

Uočili smo šest pozicija SNP koje su imale samo po jednu nepodudarnost između parova primatelj-nesrodni davatelj. To su pozicije SNP 1, 2, 9, 14, 19 i 22, a pozicija SNP 19 bila je samostalno nepodudarna u samo jednom paru primatelj-nesrodni davatelj. Sve ostale navedene nepodudarne pozicije SNP-ova bile su dio višestrukih nepodudarnosti između parova primatelj-nesrodni davatelj. Njihovu ulogu, odnosno važnost potrebno je istražiti na većem uzorku parova kada će i veći broj parova biti nepodudaran za iste.

Analiza podudarnosti u HLA gama bloku zajedno s podudarnosti u supratipu HLA potvrdila je statistički značajan utjecaj HLA gama bloka na ishod TKMS. Sve skupine parova primatelj-nesrodni davatelj koji su imali nepodudarnost u HLA gama bloku pokazale su statistički značajno češću pojavu GvHD-a, bez obzira na to jesu li imali isti ili različiti supratip HLA. U skladu s ranije navedenim istraživanjima i njihovim rezultatima, naše analize ukazuju na važnost HLA gama bloka i potrebu za daljnjim istraživanjem ove teme na većem broju ispitanika. Broj radova i dostupnost podataka o utjecaju polimorfizma HLA gama bloka na ishod TKMS je i dalje vrlo niska, no tipizacija HLA gama bloka mogla bi doprinijeti boljem odabiru davatelja i smanjiti rizik od razvoja GvHD-a. Dodatna istraživanja mogla bi pomoći u razumijevanju složenih interakcija uključenih u reakcije imunološkog sustava pri TKMS i čimbenike koji utječu na razvoj GvHD-a.

6. Zaključci

- I. U skupini HLA 9/10 podudarnih parova primatelj-nesrodni davatelj (N=33) s nepodudarnošću na lokusu HLA-A, 93,94% parova je bilo nepodudarno na razini gena HLA, a 6,06% parova na razini alela HLA.
- II. Nepodudarnost parova primatelj-nesrodni davatelj u HLA gama bloku bila je očekivano visoka i iznosila je 75,75%.
- III. Od 25 SNP-ova uključenih u HLA gama blok, na poziciji SNP broj 11 uočen je najveći broj nepodudarnosti (40%).
- IV. Usporedba broja SNP nepodudarnosti u HLA gama bloku u parovima primatelj-nesrodni davatelj i pojave GvHD-a pokazala je statistički značajno češću pojavu GvHD-a ($p=0,0231$) među parovima s ≥ 3 nepodudarnosti.
- V. Među parovima primatelj-nesrodni davatelj s nepodudarnošću na SNP poziciji 11 uočena je statistički značajna ($p=0,0189$) povezanost za razvoj GvHD-a, što ukazuje na važnost ove pozicije za razvoj GvHD-a.
- VI. Nepodudarnost na SNP poziciji 12 između parova primatelj-nesrodni davatelj nije pokazala statistički značajnu ($p=0,1899$) povezanost za razvoj GvHD-a.
- VII. Usporedba podudarnosti u HLA gama bloku i podudarnosti u supratipu HLA za razvoj GvHD-a pokazala je važnost podudarnosti u HLA gama bloku ($p=0,0057$), ali ne i u supratipu HLA-A ($p=0,0867$).

7. Literatura

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Stanična i molekularna imunologija. Medicinska naklada. Zagreb, 2018.
- Amouzegar A, Dey BR, Spitzer TR. Peripheral blood or bone marrow stem cells? Practical considerations in hematopoietic stem cell transplantation. *Transfusion Medicine Reviews*. 2019;33(1):43-50.
- Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović Šudar V, Marušić M, Tardi M, Višnjić D. *Imunologija*. Medicinska naklada, Zagreb. 2010
- Aschan J. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: current status and future outlook. *British Medical Bulletin*. 2006;77(1):23-36.
- Askar M, Majhail NS, Rybicki L, Zhang A, Thomas D, Chen D, Abounader D, Bolwell B, Dean RM, Duong HK, Gerds A. Single Nucleotide gene polymorphisms (SNP) in the gamma block of the major histocompatibility complex (MHC) are independent risk factors for severe acute graft versus host disease (GVHD) in unrelated donor hematopoietic cell transplantation (HCT). *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2015;21(2):S326-7.
- Barker DJ, Maccari G, Georgiou X, Cooper MA, Flicek P, Robinson J, Marsh SG. The IPD-IMGT/HLA Database. *Nucleic Acids Research*. 2022.
- Baron F, Mohty M, Blaise D, Socié G, Labopin M, Esteve J, Ciceri F, Giebel S, Gorin NC, Savani BN, Schmid C. Anti-thymocyte globulin as graft-versus-host disease prevention in the setting of allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: a review from the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Haematologica*. 2017;102(2):224.
- Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nature Reviews Cancer*. 2004;4(5):371-80.
- Camacho-Bydume C, Wang T, Sees JA, Fernandez-Viña M, Abid MB, Askar M, Beitinjaneh A, Brown V, Castillo P, Chhabra S, Gadalla SM. Specific Class I HLA Supertypes but Not HLA Zygosity or Expression Are Associated with Outcomes following HLA-Matched

Allogeneic Hematopoietic Cell Transplant: HLA Supertypes Impact Allogeneic HCT Outcomes. *Transplantation and cellular therapy*. 2021;27(2):142-e1.

Chu WM. Tumor necrosis factor. *Cancer letters*. 2013;328(2):222-5.

Clancy J, Ritari J, Lobier M, Niittyvuopio R, Salmenniemi U, Putkonen M, Itälä-Remes M, Partanen J, Koskela S. Increased MHC matching by C4 gene compatibility in unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2019;25(5):891-8.

Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(17):1813-26.

Degli-Esposti MA, Leaver AL, Christiansen FT, Witt CS, Abraham LJ, Dawkins RL. Ancestral haplotypes: conserved population MHC haplotypes. *Human immunology*. 1992;34(4):242-52.

Elsner HA, Blasczyk R. Immunogenetics of HLA null alleles: implications for blood stem cell transplantation. *Tissue antigens*. 2004;64(6):687-95.

Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *The Lancet*. 2009;373(9674):1550-61.

Fielder AH, Walport MJ, Batchelor JR, Rynes RI, Black CM, Dodi IA, Hughes GR. Family study of the major histocompatibility complex in patients with systemic lupus erythematosus: importance of null alleles of C4A and C4B in determining disease susceptibility. *British Medical Journal (Clin Res Ed)*. 1983;286(6363):425-8.

Fürst D, Neuchel C, Tsamadou C, Schrezenmeier H, Mytilineos J. HLA matching in unrelated stem cell transplantation up to date. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2019;46(5):326-36.

Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero SN. The structure of haplotype blocks in the human genome. *science*. 2002;296(5576):2225-9.

- Gao SQ, Xu YP, Deng ZH. Full-length sequence of a novel null allele HLA-A* 11: 69N identified in a Chinese individual. *Tissue Antigens*. 2014;83(4):292-3.
- Gaudieri S, Leelayuwat C, Tay GK, Townend DC, Dawkins RL. The major histocompatibility complex (MHC) contains conserved polymorphic genomic sequences that are shuffled by recombination to form ethnic-specific haplotypes. *Journal of molecular evolution*. 1997;45(1):17-23.
- Getz J, Goldenstein M, Bonfim C, Funke VM, Colturato V, Hamerschlak N, Torres M, Sayer D, Boldt A, Pasquini R, Pereira NF. Investigation of MHC gamma block C4A and C4B polymorphisms in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*. 2020;42:221-9.
- Grgičević D, Čikeš N, Dobec M, Gašparović V, Golubić-Ćepulić B, Grubić Z. *Transfuzijska medicina u kliničkoj praksi*. Medicinska naklada. Zagreb, 2006.
- Grubić Z, Burek Kamenarić M, Mikulić M, Štingl Janković K, Maskalan M, Žunec R. HLA-A, HLA-B and HLA-DRB 1 allele and haplotype diversity among volunteer bone marrow donors from Croatia. *International journal of immunogenetics*. 2014;41(3):211-21.
- Grubić Z, Maskalan M, Radmanić L, Štingl Janković K, Burek Kamenarić M, Žunec R. The distribution of the DRB4* 01: 03: 01: 02N null allele in HLA-DRB1~ DQB1 haplotypes in the Croatian population. *HLA*. 2018;91(1):23-8.
- Hogan HM, Dimovski K, Goodridge DM, Sayer DC. LBP36: Matching for SNP's in the MHC Gamma block reduces the risk of GvHD and increases survival rates post HSCT. *Human Immunology*. 2015;76(4):238.
- Kuba A, Raida L. Graft versus host disease: from basic pathogenic principles to DNA damage response and cellular senescence. *Mediators of inflammation*. 2018.
- Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, Fernandez-Vina M, Flomenberg N, Horowitz M, Hurley CK, Noreen H. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2007;110(13):4576-83.

- Maskalan M, Grubić Z, Seiwert RS, Vrhovac R, Mikulić M, Burek Kamenarić M, Štingl Janković K, Đuraković N, Žunec R. The MHC gamma block matching: Impact on unrelated hematopoietic stem cell transplantation outcome. *Human Immunology*. 2020;81(1):12-7.
- Milner CM, Campbell RD. Genetic organization of the human MHC class III region. *Frontiers in Bioscience-Landmark*. 2001;6(3):914-26.
- Miretti MM, Walsh EC, Ke X, Delgado M, Griffiths M, Hunt S, Morrison J, Whittaker P, Lander ES, Cardon LR, Bentley DR. A high-resolution linkage-disequilibrium map of the human major histocompatibility complex and first generation of tag single-nucleotide polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*. 2005;76(4):634-46.
- Morishima Y, Kashiwase K, Matsuo K, Azuma F, Morishima S, Onizuka M, Yabe T, Murata M, Doki N, Eto T, Mori T. Biological significance of HLA locus matching in unrelated donor bone marrow transplantation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2015;125(7):1189-97.
- Moyer AM, Hashmi SK, Kroning C, De Goey SR, Patnaik M, Litzow M, Gastineau DA, Hogan WJ, Jacob EK, Kreuter JD, Wakefield LL. Does matching for SNPs in the MHC gamma block in 10/10 HLA-matched unrelated donor-recipient pairs undergoing allogeneic stem cell transplant improve outcomes?. *Human Immunology*. 2018;79(7):532-6.
- Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue antigens*. 1992;39(5):225-35.
- Park Y, Cheong JW, Park MH, Kim MS, Kim JS, Kim HS. Effect of major histocompatibility complex haplotype matching by C4 and MICA genotyping on acute graft versus host disease in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Human immunology*. 2016;77(2):176-83.
- Petersdorf EW, Hansen JA, Martin PJ, Woolfrey A, Malkki M, Gooley T, Storer B, Mickelson E, Smith A, Anasetti C. Major-histocompatibility-complex class I alleles and antigens in hematopoietic-cell transplantation. *New England Journal of Medicine*. 2001;345(25):1794-800.

- Petersdorf EW, Malkki M, Horowitz MM, Spellman SR, Haagenson MD, Wang T. Mapping MHC haplotype effects in unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2013;121(10):1896-905.
- Petersdorf EW, Malkki M, Gooley TA, Martin PJ, Guo Z. MHC haplotype matching for unrelated hematopoietic cell transplantation. *PLoS medicine*. 2007;4(1):e8.
- Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli MF. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002;295(5562):2097-100.
- Sarma JV, Ward PA. The complement system. *Cell and tissue research*. 2011;343(1):227-35.
- Sidney J, Peters B, Frahm N, Brander C, Sette A. HLA class I supertypes: a revised and updated classification. *BMC immunology*. 2008;9(1):1-5.
- Slatkin M. Linkage disequilibrium – understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nature Reviews Genetics*. 2008;9(6):477-85.
- Velardi A, Ruggeri L, Moretta L. NK cells: a lesson from mismatched hematopoietic transplantation. *Trends in immunology*. 2002;23(9):438-44.
- Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu. Rev. Immunol*. 2007;25:139-70.
- Wennerström A, Vlachopoulou E, Lahtela LE, Paakkanen R, Eronen KT, Seppänen M, Lokki ML. Diversity of extended HLA-DRB1 haplotypes in the Finnish population. *PloS one*. 2013;8(11):e79690.
- Yang Y, Chung EK, Zhou B, Blanchong CA, Yu CY, Füst G, Kovács M, Vatay Á, Szalai C, Karádi I, Varga L. Diversity in intrinsic strengths of the human complement system: serum C4 protein concentrations correlate with C4 gene size and polygenic variations, hemolytic activities, and body mass index. *The Journal of Immunology*. 2003;171(5):2734-45.
- Yang Y, Chung EK, Wu YL, Savelli SL, Nagaraja HN, Zhou B, Hebert M, Jones KN, Shu Y, Kitzmiller K, Blanchong CA. Gene copy-number variation and associated polymorphisms of complement component C4 in human systemic lupus erythematosus (SLE): low copy

number is a risk factor for and high copy number is a protective factor against SLE susceptibility in European Americans. *The American Journal of Human Genetics*. 2007;80(6):1037-54.

Yunis EJ, Larsen CE, Fernandez-Viña M, Awdeh ZL, Romero T, Hansen JA, Alper CA. Inheritable variable sizes of DNA stretches in the human MHC: conserved extended haplotypes and their fragments or blocks. *Tissue antigens*. 2003;62(1):1-20.

8. Životopis

Zoe Milošev (1998) upisuje Osnovnu školu Pantovčak i Glazbenu školu Blagoja Berse 2004. godine. Nakon osnovne škole upisuje II. Gimnaziju u Zagrebu, tijekom koje završava glazbeno obrazovanje. 2016. godine upisuje preddiplomski studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu, kojeg završava 2020. sa završnim radom pod mentorstvom prof. dr.sc. Dubravke Hranilović, pod naslovom „Utjecaj glazbe na razvoj i plastičnost mozga“. U rujnu 2020. upisuje diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu (PMF) u Zagrebu.

Tijekom studija, aktivna je članica Udruge studenata biologije (BIUS), unutar koje sudjeluje na projektima Noć biologije (ak. god. 17/18), „Mala škola mamalogije“ (2018-2020) i „Posjetitelji bez ulaznica“ (2018-2019). Također aktivno sudjeluje na Seminaru o invazivnim vrstama Srbije u Novom Sadu (2018) te Simpoziju studenata biologije (SISB), aktivno (2019) i pasivno (2017, 2021, 2022). Odrađuje laboratorijsku stručnu praksu na Zavodu za animalnu fiziologiju na PMF-u u Zagrebu (2021) i u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ (2021/2022). Stječe potvrdu LabAnim A kategorije osposobljenosti za rad s laboratorijskim životinjama.

2022. godine objavljuje znanstveni članak u web-časopisu Molecular and Experimental Biology in Medicine (MEBM), pod naslovom „HLA Gamma block matching in unrelated hematopoietic stem cell transplantation and the development of graft versus host disease“.

Govori hrvatski (materinski), engleski i francuski jezik. Poznaje Microsoft Office alate i posjeduje vozačku dozvolu B kategorije.