Uloga gena KIR na ishod haploidentične transplantacije krvotvornih matičnih stanica

Gršković, Paula

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:217:630931

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Paula Gršković

Uloga gena KIR na ishod haploidentične transplantacije krvotvornih matičnih stanica

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

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

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Uloga gena KIR na ishod haploidentične transplantacije krvotvornih matičnih stanica

Paula Gršković

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Cilj ovog rada bio je istražiti polimorfizam i raspodjelu alela i haplotipova HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1, gena i genotipova KIR i utjecaj gena KIR na ishod haploidentične transplantacije krvotvornih matičnih stanica (TKMS) među bolesnicima u programu liječenja haploidentičnom TKMS. Istraživanje je obuhvatilo 33 para (primatelj/davatelj). Učestalosti alela HLA među bolesnicima u skladu su s učestalostima u kontroli, uz neke iznimke. Većina bolesnika imala je barem jedan rijetki alel HLA (18; 54,5%) ili neuobičajeni haplotip HLA-B~C (3; 9,1%) ili HLA-DRB1~DQB1 (4; 12,1%). Raspodjela gena KIR među bolesnicima odgovarala je raspodjeli među kontrolnim ispitanicima, pri čemu su geni *KIR2DS5* i *KIR3DS1* bili statistički značajno zastupljeniji u skupini bolesnika (P=0,0032, odnosno P=0,00229). Najčešće uočeni genotipovi KIR među bolesnicima bili su genotipovi AA1 i Bx2. Nije bila opažena statistički značajna razlika u preživljenju bolesnika ovisno o prisutnosti određenog aktivacijskog gena *KIR* u genotipu davatelja ni ovisno o genotipu KIR davatelja krvotvornih matičnih stanica.

(61 stranica, 11 slika, 10 tablica, 54 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.
Ključne riječi: geni KIR, stanice NK,
Voditelj: Dr. sc. Zorana Grubić, naslovna red. prof.
Ocjenitelji:

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology Graduation Thesis

The role of KIR genes on the outcome of haploidentical haematopoietic stem cell transplantation

Paula Gršković

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The aim of this thesis was to investigate the polymorphism and frequency of HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 alleles and haplotypes, the polymorphism and frequency of KIR genes and genotypes and the influence of KIR genes on the outcome of haploidentical haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in patients included in the haploidentical HSCT program. There were 33 patient/donor pairs included in the study. The frequency of HLA alleles among patients matched the frequency in the control group, with some exceptions. Most patients had at least one rare HLA allele (18; 54,5%) or an unusual HLA-B~C haplotype (3; 9,1%) or HLA-DRB1~DQB1 haplotype (4; 12,1%). The frequency of KIR genes among patients matched the frequency in the control group, although *KIR2DS5* and *KIR3DS1* genes were significantly more frequent among patients (P=0,0032 and P=0,00229 respectively). The most frequent KIR genotypes observed among patients were AA1 and Bx2. There was no statistically significant difference in the survival of the patients depending on the presence of any particular activating *KIR* gene in the genotype of the donor or on the KIR genotype of the donor of haematopoietic stem cells.

(61 pages, 11 figures, 10 tables, 54 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in the Central Biological Library.
Key words: KIR genes, NK cells
Supervisor: Dr. sc. Zorana Grubić, Prof.
Reviewers:

Thesis accepted:

Sadržaj:

1. UVOD.....1

1.1. Transplantacija krvotvornih matičnih stanica (TKMS).....1

1.2. Faktori koji imaju utjecaj na ishod TKMS.....1

1.2.1. Glavni sustav tkivne podudarnosti kod čovjeka (sustav HLA).....2

1.2.2. Građa i funkcija molekula HLA.....5

1.3. Imunološki odgovor.....6

1.4. Reakcija transplantata protiv primatelja u TKMS.....7

1.5. Tipizacija gena HLA.....7

1.6. Prednosti i nedostatci različitih oblika TKMS.....8

1.6.1. Transplantacija KMS sa srodnog davatelja.....8

1.6.2. Transplantacija KMS s nesrodnog davatelja.....8

1.6.3. Transplantacija KMS s umbilikalnom krvi.....9

1.6.4. Transplantacija KMS s haploidentičnog srodnog davatelja.....9

1.7. Prirodnoubilačke stanice – stanice NK.....10

1.8. Receptori prirodnoubilačkih stanica slični imunoglobulinima (KIR).....13

1.9. Ligandi receptora KIR.....15

1.10. Geni KIR.....16

2. CILJEVI RADA.....21

3. MATERIJALI I METODE.....22

3.1. Ispitanici.....22

3.2. Metode.....22

3.2.1. Izolacija DNA.....22

3.2.2. Određivanje gena HLA.....23

3.2.2.1. Tipizacija gena HLA metodom lančane reakcije polimerazom i oligonukleotidnim probama specifičnim za sekvencu – niska rezolucija.....23

3.2.3.2. Tipizacija gena HLA metodom lančane reakcije polimerazom s početnicama specifičnim za sekvencu – visoka rezolucija.....24

3.2.3. Određivanje gena KIR.....24

3.2.4. Statistička obrada podataka.....28

4. REZULTATI.....29

4.1. Raspodjela alela HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1 u skupini bolesnika u programu haploidentične TKMS i kontroli.....30

4.2. Raspodjela haplotipova HLA-A~B~C~DRB1~DQB1 u skupini bolesnika i njihovih haploidentičnih davatelja u programu TKMS.....35

4.3. Raspodjela gena KIR u skupini bolesnika i njihovih haploidentičnih davatelja u programu TKMS.....43

4.4. Raspodjela genotipova KIR u ispitivanoj skupini bolesnika i njihovih haploidentičnih davatelja u programu TKMS.....44

4.5. Utjecaj gena KIR na preživljenje bolesnika liječenih haploidentičnom TKMS.....48

5. RASPRAVA.....51

6. ZAKLJUČAK.....55

7. LITERATURA.....56

1. UVOD

1.1. Transplantacija krvotvornih matičnih stanica

Transplantacija je medicinski postupak kojim se stanice, tkivo ili organ prenose s jednog na drugo mjesto u organizmu (autologna) ili iz jednog organizma u drugi organizam (alogenična) s ciljem liječenja različitih vrsta malignih i nemalignih oboljenja koje onemogućavaju ispravnu funkciju određenog tjelesnog sustava (1). U slučaju transplantacije krvotvornih matičnih stanica (TKMS), transplantat su matične stanice sa sposobnošću samoobnavljanja i diferenciranja u sve zrele tipove krvnih stanica (2). Cilj TKMS je da krvotvorni sustav davatelja posve zamijeni nepopravljivo oštećeni krvotvorni sustav primatelja, no rekonstrukcija posve funkcionalnog krvotvornog sustava nakon TKMS je dugotrajan i često nepotpun proces. Prvo se obnavljaju stanice nespecifične imunosti: monociti, neutrofili i prirodnoubilačke stanice (engl. *natural killer cells* – stanice NK). Dendritičke stanice se obnavljaju s odgodom u odnosu na stanice nespecifične imunosti, ali brže od stanica specifične imunosti (limfociti B i T), u skladu sa svojom ulogom kao poveznica između specifične i nespecifične imunosti, odnosno kao antigen prezentirajuće stanice (engl. *antigen presenting cells* – APC) (3). Poznato je da su limfociti B stanična linija koja se najsporije obnavlja, a jedan od razloga je i spora obnova pomoćničkih CD4+ limfocita T, koji su nužni za aktivaciju limfocita B. Broj citotoksičnih CD8+ limfocita T brzo raste neposredno nakon TKMS, zbog čega raste omjer CD8+/CD4+ limfocita T, no tri do šest mjeseci nakon transplantacije ukupan broj limfocita T naglo opada. Tijekom faze prihvaćanja transplantata (engl. *engraftment phase* – prvih 100 dana nakon TKMS), organizam je u stanju stanične imunodeficijencije zbog smanjenog broja stanica NK (nespecifična imunost) i limfocita T (specifična imunost), zbog čega raste mogućnost virusnih infekcija (4).

1.2. Faktori koji imaju utjecaj na ishod TKMS

Uspješnost i brzina oporavka nakon TKMS ovise o različitim kliničkim i genskim faktorima. Klinički faktori koji utječu na ishod TKMS su tijek bolesti, vrsta kondicioniranja prije transplantacije te broj ukupnih nuklearnih stanica (engl. *total nucleated cells* dose – TNC dose) i stanica CD34+ (CD34 je biljeg koji se nalazi na endotelnim stanicama krvnih žila i krvotvornim matičnim stanicama, ali njegova točna uloga nije poznata) u uzorku davatelja (4). Najčešće metode kondicioniranja dijele se na mijeloablativne (engl. *myeloablative* –

MA), nemijeloablativne (engl. *non myeloablative* – NMA) i kondicioniranje smanjenog intenziteta (engl. *reduced intensity conditioning* – RIC).

Mijeloablativno kondicioniranje obuhvaća terapiju alkilirajućim agensima i zračenje cijelog tijela koje uzrokuje dugotrajnu i nepovratnu pancitopeniju i dovodi do smrti ukoliko se krvotvorni sustav ne obnovi infuzijom davateljevih krvotvornih matičnih stanica (KMS) (5).

Nemijeloablativno kondicioniranje obuhvaća terapiju uglavnom alkilirajućim agensima (vrlo rijetko postupak niskom količinom radijacije) koji uzrokuje minimalnu citopeniju i ne zahtijeva infuziju KMS za oporavak krvotvornog sustava bolesnika (5).

Sve vrste kondicioniranja koje se ne mogu jasno svrstati pod mijeloablativno ili nemijeloablativno kondicioniranje svrstane su u skupinu kondicioniranja smanjenog intenziteta (5).

Broj TNC i CD34+ stanica razlikuje se ovisno o vrsti izvora KMS (koštana srž, periferna krv ili umbilikalna krv), a osim po broju KMS, izvori se razlikuju i prema drugim svojstvima (dostupnost, brzina obnove krvotvornog sustava nakon transplantacije, i dr.). Genski faktor koji ima ključnu ulogu u ishodu TKMS su geni glavnog sustava tkivne podudarnosti (engl. *human leukocyte antigen* – HLA). Tek su otkrićem gena HLA i protutijela protiv antigena HLA u krvotoku pacijenata koji su primili transfuziju i višerotkinja postavljeni temelji mehanizama prihvaćanja, odnosno odbacivanja transplantata (6).

1.2.1. Glavni sustav tkivne podudarnosti (sustav HLA)

Sustav HLA sadrži više od 200 gena, a sama regija HLA je duljine oko 3600 kb i nalazi se na kraćem kraku kromosoma 6 (Slika 1). Geni HLA podijeljeni su u tri skupine: geni HLA razreda I, geni HLA razreda II i geni HLA razreda III.

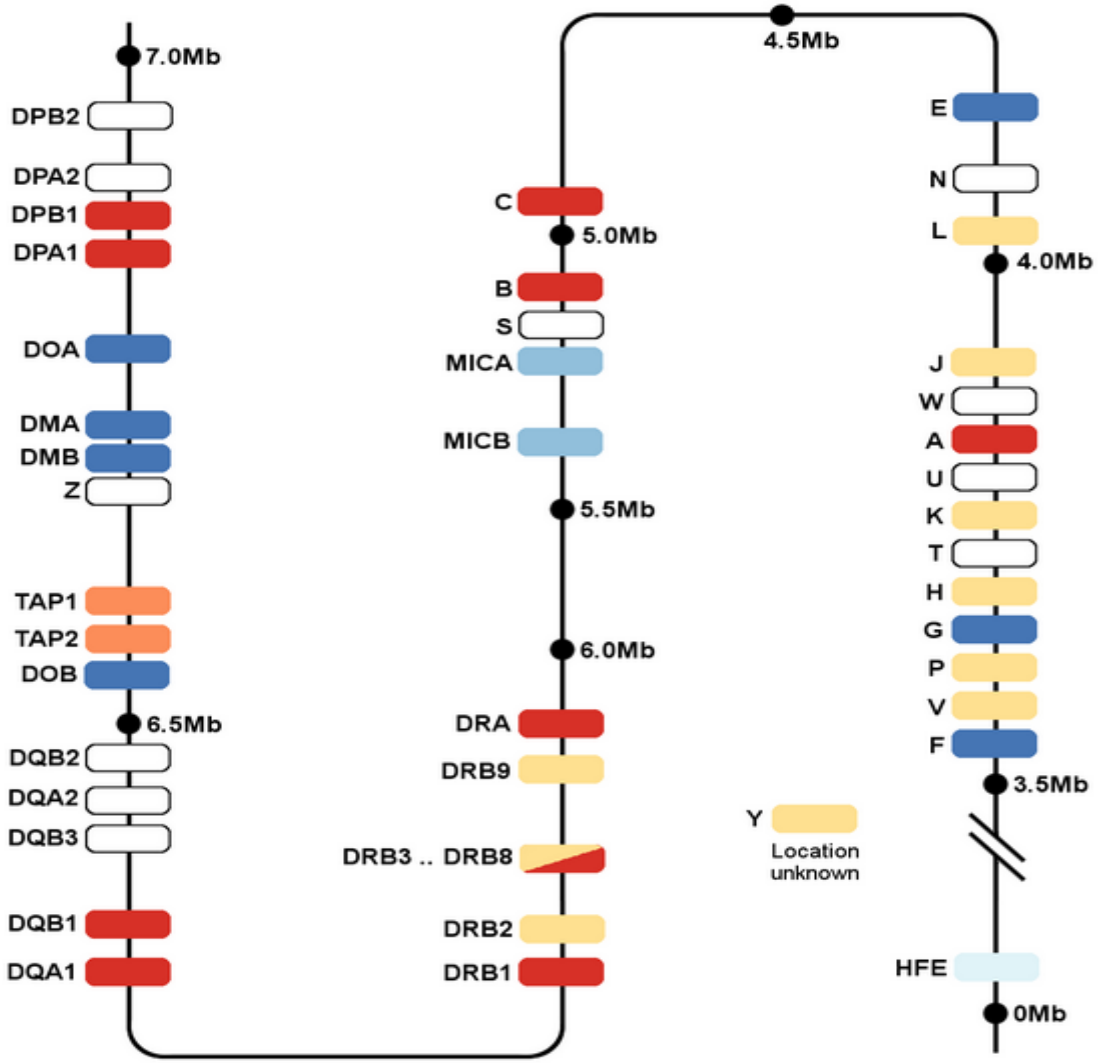
Geni HLA razreda I obuhvaćaju tri klasična gena (HLA-A, -B i -C) i tri neklasična gena HLA (HLA-E, -F i -G). Produkti klasičnih gena HLA razreda I nalaze se na svim stanicama koje sadrže jezgru, dok se ekspresija neklasičnih gena HLA razreda I razlikuje ovisno o vrsti tkiva. Sekvenciranjem RNA (engl. *RNA sequencing* – RNA seq) i metodom reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction* – RT-qPCR) pokazano je da je gen HLA-E najviše eksprimiran u plućima i slezeni, ali potvrđena je njegova ekspresija i u drugim tkivima (7). Slezena je uz limfne čvorove i mjesto najviše ekspresije gena HLA-F, koji je također u

različitoj mjeri eksprimiran i u drugim tkivima (8). Ekspresija HLA-G karakteristična je za stanice placente, iako su transkripcijski produkti gena HLA-G pronađeni i u drugim tkivima (npr. kolon) (9).

Geni HLA razreda II organizirani su u nekoliko subregija koje pripadaju određenim genskim porodicama. Genske porodice koje kodiraju klasične molekule HLA razreda II (HLA-DP, -DQ i -DR) sadrže gene A i B koji kodiraju α i β lance određene molekule HLA razreda II. Genske porodice HLA-DP i HLA-DQ sadrže po jedan eksprimirani gen A i B (HLA-DPA1/-DQA1 i HLA-DPB1/-DQB1) i dodatne pseudogene, dok genska porodica HLA-DR sadrži jedan gen HLA-DRA1 i različit broj gena HLA-DRB (DRB1 do DRB9). Funkcionalan gen HLA-DRB1 nalazi se u svim haplotipovima, a ovisno o alelu na lokusu HLA-DRB1 haplotip može sadržavati i neke od preostalih funkcionalnih gena HLA-DRB (DRB3, DRB4 ili DRB5) i/ili pseudogene (DRB2, DRB6, DRB7, DRB8 i DRB9). Neklasični geni HLA razreda II (HLA-DM i HLA-DO) sudjeluju u procesiranju stranih antigena i predstavljanju procesiranih peptida na površini antigen-prezentirajućih stanica (10). Geni HLA razreda II konstitutivno su eksprimirani na membrani limfocita B, „profesionalnih“ antigen prezentirajućih stanica (monociti, makrofagi i dendritičke stanice) i aktiviranih limfocita T, a fakultativno su eksprimirani na membrani Langerhansovih stanica, endotelnih i epitelnih stanica (11).

Regija HLA razreda III ne sadrži gene koji kodiraju molekule HLA, već sadrži gene za komponente komplementa (C2, C4, faktor B), enzim 21-hidroksilazu, faktore tumorske nekroze (engl. *tumor necrosis factors* – TNFs) i druge gene s ulogom u imunološkoj reakciji (10).

Geni HLA blisko su povezani zbog svoje lokacije na kromosomu 6, stoga se najčešće naslijeđuju zajedno kao set, odnosno haplotip HLA. Kombinacije alela na različitim lokusima HLA su brojne, no uočeno je da se kombinacije nekih alela HLA naslijeđuju češće zajedno u odnosu na njihovu pojedinačnu učestalost u populaciji, što se naziva neravnoteža udruživanja gena (engl. *linkage disequilibrium* – LD). Primjer neravnoteže udruživanja gena HLA je kombinacija alela HLA-A1, -B8, -DR3, koja je najčešći haplotip HLA među populacijama europskog podrijetla, unatoč tome što su drugi aleli na tim lokusima (npr. HLA-A2, najčešći alel HLA-A u populacijama europskog podrijetla) učestaliji u populaciji (12).



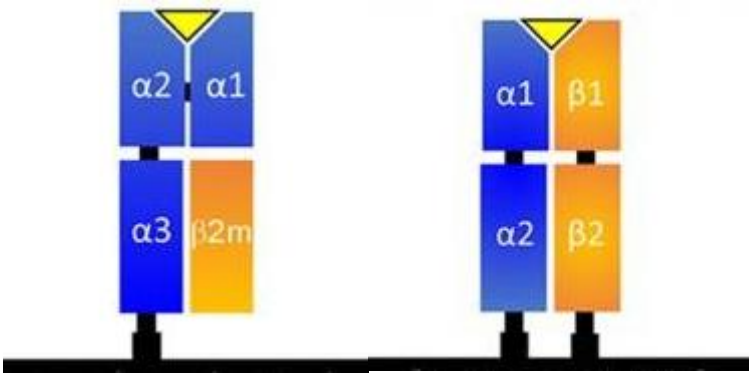
Slika 1. Shematski prikaz regije HLA na ljudskom kromosomu 6 s označenim položajem pojedinih gena HLA i drugih gena koji se nalaze unutar regije HLA. Kazalo: crveno – klasični geni HLA; tamnoplavo – neklasični geni HLA ; smeđe – pseudogeni HLA; narančasto – geni koji kodiraju transportne proteine koji vežu ATP (eng. ATP-binding cassette transporters – ABC transporters); svjetloplavo – geni nalik genima HLA razreda I (eng. MHC class I related chain genes – MICA i MICB); blijedoplavo – gen HFE (kodira membranski protein sličan proteinima HLA razreda I i također veže β2-mikroglobulin te ima ulogu u regulaciji unosa željeza u stanicu); bijelo – geni koji nisu zabilježeni u bazi (preuzeto iz reference 13)

1.2.2. Građa i funkcija molekula HLA

Geni HLA razreda I i razreda II kodiraju proteinske strukture visoke polimorfnosti koji se nalaze na površini stanica i osnovna im je uloga regulacija imunološkog odgovora. Molekule HLA prezentiraju strane antigene (peptide) limfocitima T interakcijom s receptorom T.

Molekule HLA razreda I dijele osnovnu strukturu koja se sastoji od jednog teškog lanca podijeljenog na tri domene (α1, α2 i α3) koji je kodiran određenim genom HLA i proteina β_2 mikroglobulin (gen za β_2 mikroglobulin nalazi se na kromosomu 15), međusobno povezanih nekovalentnom vezom. Domene α1 i α2 tvore udubljenje u kojem se nalazi prezentirani peptid kojeg prepoznaju limfociti T, domena α3 povezana je s membranom stanice, a β2 mikroglobulin služi kao stabilizator kompleksa (Slika 2a). Molekule HLA razreda II kodirane su genskim porodicama koje sadrže gene A i B, koji kodiraju redom lance α i β koji su podijeljeni na domene α1 i α2, odnosno β1 i β2. Domene α1 i β1 tvore udubljenje u kojem se nalazi prezentirani peptid, a domene α2 i β2 povezane su s membranom stanice i stabiliziraju kompleks na membrani (Slika 2b) (14).

a) **b)**



Slika 2. Shematski prikaz strukture molekula HLA razreda I (a) i molekula HLA razreda II (b). (preuzeto iz reference 17)

Ukoliko dođe do kontakta sa stranim antigenom HLA, imunološki sustav primatelja ga prepoznaje kao strani te se protiv stranog antigena HLA pokreće imunološki odgovor.

Komplekse koje produkti gena HLA razreda I tvore nekovalentnim vezanjem s proteinom β_2 mikroglobulinom na membrani stanica prepoznaju citotoksični CD8+ limfociti T, dok proteinsku strukturu koju tvore lanci α i β kodirani genima HLA razreda II prepoznaju

pomoćnički CD4+ limfociti T. Dva su puta prepoznavanja stranog antigena HLA: direktni put, u kojem limfociti T primatelja preko svojih T-staničnih receptora prepoznaju strane antigene HLA na APC davatelja, i indirektni put, u kojem APC primatelja procesiraju davateljeve antigene HLA i prezentiraju ih limfocitima T u obliku peptida na vlastitim molekulama HLA. Specifično prepoznavanje stranih antigena kontaktom HLA i T-staničnih receptora nije dovoljno da bi se potaknula aktivacija stanica medijatora imunološkog odgovora; nužan je i nespecifični kostimulacijski signal između kostimulacijskih molekula na membrani limfocita T i njihovih liganada na APC (10).

1.3. Imunološki odgovor

Kod staničnog oblika imunološkog odgovora, za oštećenje i eventualno odbacivanje transplantata odgovorna je suradnja aktiviranih CD8+ i CD4+ limfocita T, pri čemu CD4+ limfociti T direktnim kontaktom s CD8+ limfocitima T ili proizvodnjom citokina (npr. Interleukin 2 – IL-2, Interferon γ – INF-γ) potiču diferencijaciju i citotoksičnu aktivnost CD8+ limfocita T (10).

U humoralnom imunološkom odgovoru na strane antigene HLA glavnu ulogu imaju limfociti B. Kontaktom s CD4+ limfocitima T aktiviraju se limfociti B i kreću u diferencijaciju u efektorske stanice koje proizvode protutijela anti-HLA specifična za pojedini antigen HLA i memorijske stanice koje duže vremena zaostaju u krvotoku i omogućavaju brži odgovor specifične imunosti pri ponovnom kontaktu s istim antigenom (11).

Komponente komplementa imaju ulogu u regulaciji oba oblika imunološkog odgovora i prisutnost komponenti komplementa promovira odbacivanje transplantata. Utvrđeno je da blokiranje interakcije komponenti komplementa C5a/C5aR smanjuje patogeno djelovanje limfocita T i potiče duži opstanak transplantata te da vezanje komponente komplementa C3d na strani antigen smanjuje prag količine antigena nužan za aktivaciju limfocita B i time omogućuje brži sekundarni humoralni odgovor, što dovodi do proizvodnje veće količine protutijela i bržeg uništavanja transplantata. Svi su tipovi transplantata podložni staničnom odbacivanju, dok su humoralnom odbacivanju najviše podložni solidni organi (npr. bubreg, srce, pluća, jetra) zbog načina opskrbljivanja krvlju. Nakon transplantacije, krv se u transplantat dovodi krvožilnim sustavom nastalim nespontanom anastomozom krvnih žila primatelja i samog organa, što omogućuje protutijelima anti-HLA primatelja vezanje na

antigene HLA davatelja na krvnim žilama unutar transplantata, čime se uništava krvožilni sustav transplantata i sam transplantat (15).

1.4. Reakcija transplantata protiv primatelja u TKMS

Kod TKMS, imunokompetentni limfociti T davatelja prepoznaju antigene HLA na stanicama primatelja i pokreću imunološku reakciju. Imunološki sustav primatelja prethodno je posve uništen ili oslabljen kondicioniranjem pa nema reakcije primatelja protiv transplantata (engl. *host versus graft disease* – HvGD). Česta neželjena pojava nakon TKMS je reakcija transplantata protiv primatelja (engl. *graft versus host disease* – GvHD), najčešća komplikacija nastala uslijed TKMS i najčešći uzrok smrti povezan s transplantacijom. To je imunološka reakcija limfocita davatelja protiv primateljevih antigena, prepoznatih direktnim ili indirektnim putem, u okolišu koji potiče upalu. Pojavljuje se u približno 30% slučajeva kod TKMS sa srodnog davatelja (brat ili sestra) i u približno 45% slučajeva kod TKMS s nesrodnog davatelja (16). Budući da do pojave GvHD može doći i kod bolesnika koji su primili KMS od HLA podudarnog davatelja, pretpostavlja se da je jedan od faktora koji dovodi do GvHD razlika u alelima na lokusima koji nisu vezani uz gene HLA, kao što su slabi tkivni antigeni (engl. *minor histocompatibility antigens* – mHAgs) ili geni nalik genima HLA razreda I (engl. *MHC class I related chain genes* – MICA i MICB). Najveću imunogeničnost ipak pokazuju antigeni HLA, zbog čega su poznati i kao 'transplantacijski antigeni' i trenutno su geni HLA jedini geni koje se obavezno određuje (tipizira) prije TKMS.

1.5. Tipizacija gena HLA

Određivanje antigena HLA izvodi se serološkim metodama, dok se određivanje gena/alela HLA izvodi molekularnim metodama.

Serološka tipizacija temelji se na reakciji antigena HLA na limfocitima ispitanika s komplementom i poznatim specifičnim protutijelima anti-HLA koji se nalaze u serumima. Ukoliko je ispitanik pozitivan za antigen HLA za koji su specifična protutijela anti-HLA koja se nalaze u serumu, dolazi do nastanka pora na membranama limfocita, što omogućuje ulazak tripanskog modrila u stanice. Nakon bojanja, raspadnuti (mrtvi) limfociti obojani su modro, dok neoštećene (žive) stanice ostaju neobojane. Ovisno o udjelu modro obojenih limfocita

(broj obojenih stanica podijeljen s ukupnim brojem stanica), reakcija se smatra negativnom (0-20%, oznaka 1), slabo pozitivnom (21-50%, oznaka 2), srednje pozitivnom (51-80%, oznaka 3) i pozitivnom (81-100%, oznaka 4).

Molekularna tipizacija temelji se na lančanoj reakciji polimerazom (engl. *polymerase chain reaction* – PCR), odnosno određivanju alela HLA analizom na razini sekvence DNA. Tipizacija HLA na niskoj rezoluciji podrazumijeva određivanje gena HLA (npr. HLA-A*01). S druge strane, tipizacija HLA na visokoj rezoluciji podrazumijeva određivanje alela HLA (npr. HLA-A*01:01).

Polimorfizam alela HLA glavna je barijera za pronalazak pogodnog davatelja KMS. Pogodnim davateljem KMS smatra se davatelj koji je s bolesnikom HLA podudaran 10/10, 9/10 ili, u rijetkim slučajevima, 8/10 (podudarnost 10/10 smatra se podudarnost za oba alela lokusa HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1) (17).

1.6. Prednosti i nedostatci različitih oblika TKMS

1.6.1. Transplantacija KMS sa srodnog davatelja

U programu liječenja bolesnika TKMS, članovi uže obitelji bolesnika su prvi potencijalni davatelji KMS zbog dostupnosti i vjerojatnosti da su genotipski ili fenotipski HLA identični s bolesnikom. Genotipski HLA identični srodni davatelji su davatelji koji su naslijedili po jedan isti haplotip HLA od svakog roditelja kao i bolesnik (brat ili sestra). Vjerojatnost da je dvoje djece genotipski HLA identično je 25%. Članovi obitelji mogu biti i fenotipski identični bolesniku. U tom slučaju, bolesnik i potencijalni davatelj KMS imaju iste alele HLA, ali ne i iste haplotipove HLA. Približno 30% bolesnika koji idu u program TKMS uspijeva pronaći srodnog davatelja KMS (18).

1.6.2. Transplantacija KMS s nesrodnog davatelja

Sljedeća mogućnost za bolesnike koji nemaju srodnog davatelja jest pronaći HLA podudarnog nesrodnog davatelja u nacionalnom (Hrvatski registar dobrovoljnih darivatelja KMS) ili svjetskom registru dobrovoljnih darivatelja KMS (World Marrow Donor Association – WMDA). Približno 30% bolesnika i tada ne uspijeva pronaći odgovarajućeg davatelja; u nekim slučajevima zbog hitne potrebe za davateljem KMS, a u nekim slučajevima jer HLA podudaran davatelj ne postoji u registru.

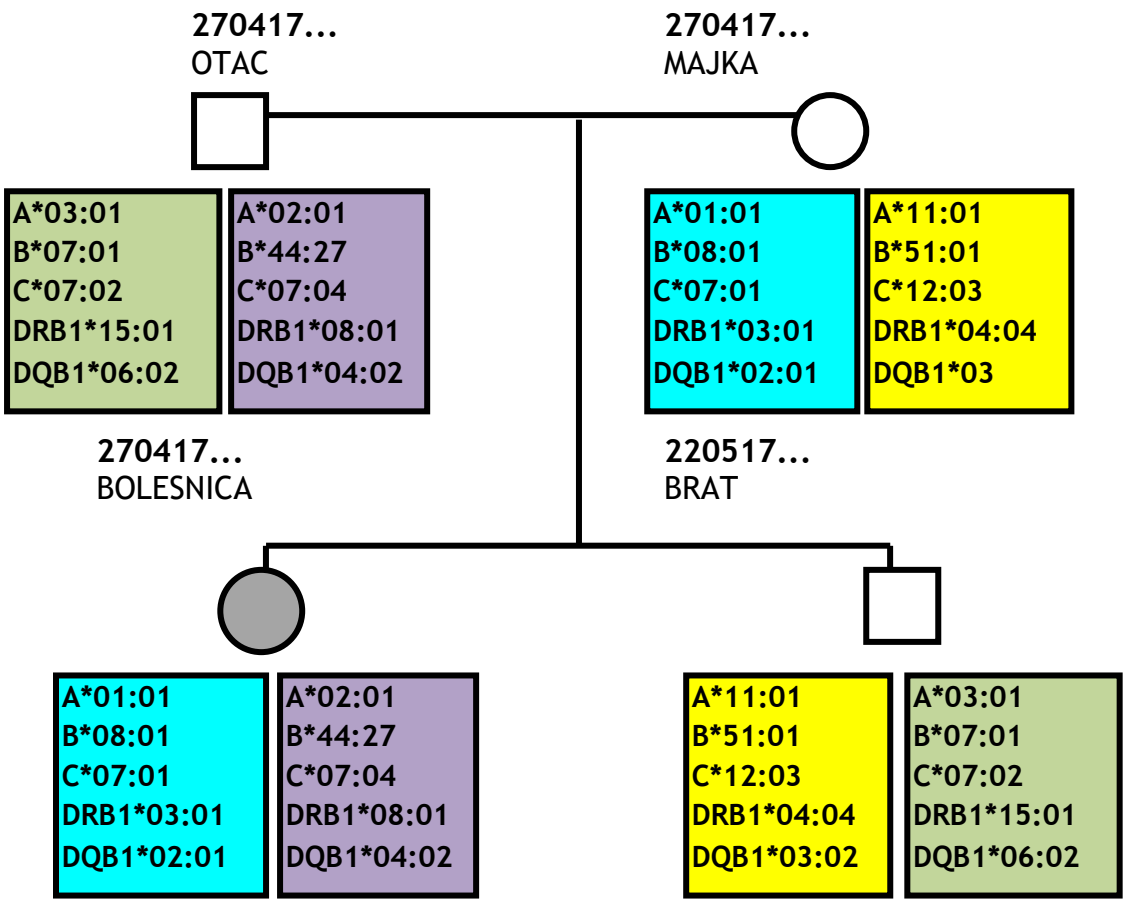
1.6.3. Transplantacija KMS s umbilikalnom krvi

Umbilikalna krv je krv koja preostane u krvnim žilama posteljice nakon rođenja djeteta, a koja sadrži KMS. Glavna prednost umbilikalne krvi kao izvora KMS jest dostupnost, budući da se pohranjuje i čuva u bankama umbilikalne krvi. S druge strane, uzorci umbilikalne krvi sadrže malu količinu KMS, zbog čega nisu moguće dodatne manipulacije imunološkog sustava nakon TKMS, npr. infuzija davateljevih limfocita. Također, pokazano je da je nakon TKMS s umbilikalnom krvi kao izvorom KMS potreban dulji vremenski period za obnovu imunološkog sustava u odnosu na TKMS sa srodnog, nesrodnog i haploidentičnog srodnog davatelja KMS (19).

1.6.4. Transplantacija KMS s haploidentičnog srodnog davatelja

Haploidentičan davatelj KMS jest davatelj koji s bolesnikom dijeli jedan zajednički haplotip HLA. Vjerojatnost da su braća i sestre HLA haploidentični je 50%, dok su roditelji i djeca u 100% slučajeva haploidentični (Slika 3). Veliki broj bolesnika (čak 95%) ima barem jednog haploidentičnog srodnog davatelja KMS, što je glavna prednost haploidentične TKMS u odnosu na TKMS sa srodnog ili nesrodnog davatelja (18). Prednost haploidentične TKMS u odnosu na TKMS s umbilikalnom krvi kao izvorom KMS jest mogućnost dodatnih imunoloških manipulacija, ukoliko su potrebne poslije transplantacije, te veći broj KMS po uzorku. Neka su istraživanja pokazala da nepodudarnost gena HLA između bolesnika i haploidentičnog davatelja može potaknuti reakciju transplantata protiv tumora (engl. *graft versus leukemia effect* – GvL) i time pridonijeti pozitivnom ishodu TKMS. Istovremeno, druga istraživanja povezuju nepodudarnost gena HLA u haploidentičnoj TKMS s pojavom GvHD, lošijim ishodom TKMS i smanjenim preživljenjem (19).

Obitelj: XXXXXXX Dijagnoza: HL

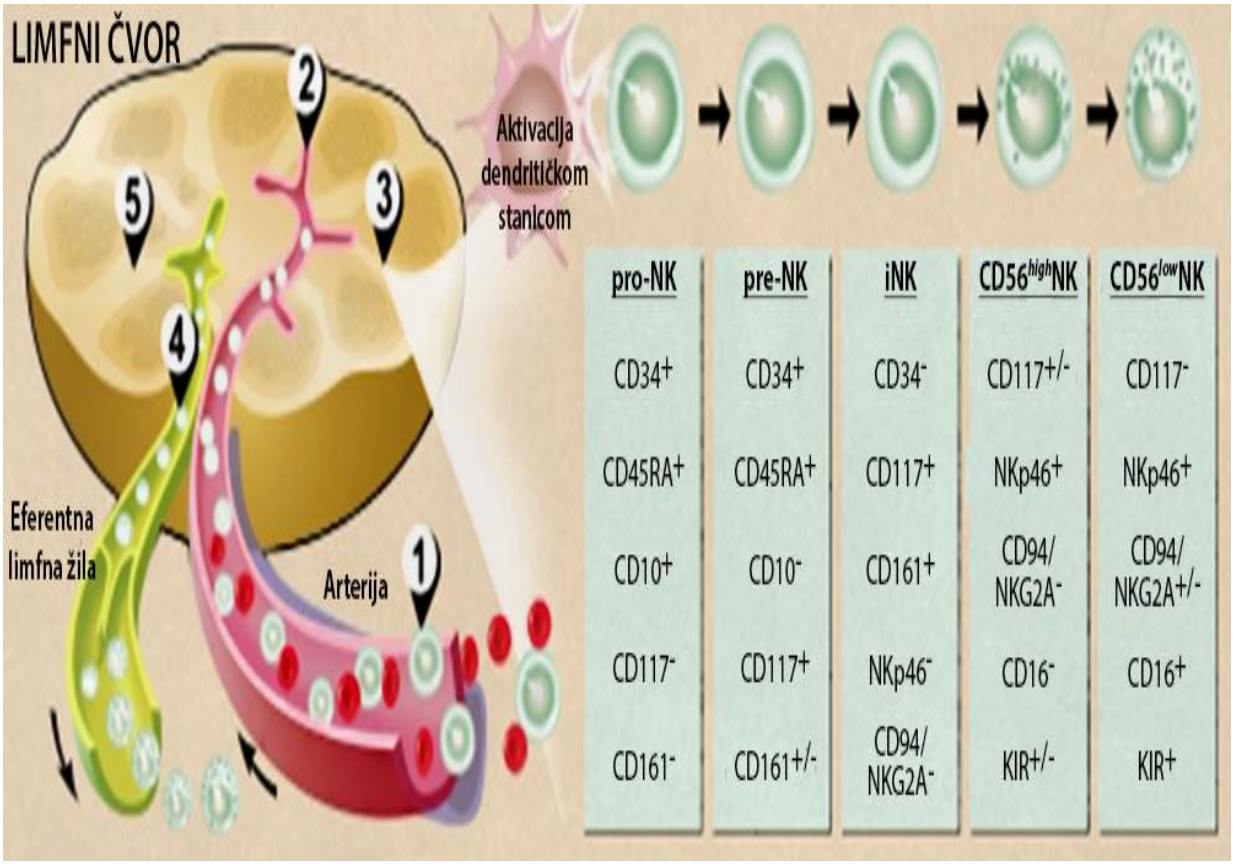


Slika 3. Primjer naslijeđivanja haplotipova HLA unutar obitelji.

1.7. Prirodnoubilačke stanice – stanice NK

Fokus znanstvenog interesa u nastojanju da se maksimalno poboljša ishod TKMS još je uvijek uglavnom usmjeren na istraživanje medijatora specifične imunosti (limfocita B i T), no sve se više pažnje pridaje i medijatorima nespecifične imunosti, pogotovo stanicama NK. Stanice NK otkrivene su 1975. godine u eksperimentu na *in vitro* uzgojenim leukemijskim stanicama miša, kojim je ustanovljeno da u uzorku krvi iz kojeg su uklonjeni limfociti B i T još uvijek postoje stanice sposobne citotoksičnim djelovanjem ubijati stanice leukemije bez prethodne senzibilizacije. Obilježja stanica NK su prisutnost biljega CD56 i odsutnost biljega CD3 karakterističnog za limfocite T. Stanice NK podijeljene su na dvije subpopulacije:

$CD56^{high}CD16^{neg}$ koje imaju ulogu u moduliranju imunološkog odgovora, uglavnom lučenjem INFγ, i $CD56^{low}CD16^{pos}$ koje preko receptora smrti (Fas, TRAIL) ili lučenjem citotoksičnih granula koje sadržavaju granzime i perforin liziraju ciljne stanice (Slika 4).



Slika 4. Prikaz razvojnog puta ljudske stanice NK. (1) Arterije dovode CD34+CD45RA+ (pro-NK) KMS iz koštane srži u limfni čvor, gdje stanice prelaze iz kapilara (2) u parafolikularni prostor (3). Ondje se stanice pro-NK aktiviraju kontaktom s dendritičkim stanicama i prolaze kroz različite faze sazrijevanja. Krajnji rezultati sazrijevanja su $CD56^{high}$ i $CD56^{low}$ stanice NK. Eferentna limfna žila odvodi zrele $CD56^{low}$ stanice NK iz limfnog čvora kako bi se ponovno pridružile krvotoku, a $CD56^{high}$ stanice NK ostaju u sekundarnim limfnim tkivima. (preuzeto iz reference 21)

Stanice NK čine između 5 i 15% limfocita u perifernoj krvi, većinom su $CD56^{low}CD16^{pos}$, dok se stanice NK $CD56^{high}CD16^{neg}$ uglavnom nalaze u tkivima (jetra, slezena, pluća, sekundarna limfatička tkiva). Stanice NK $CD16^{high}CD56^{neg}$ rijetko se pojavljuju u perifernoj

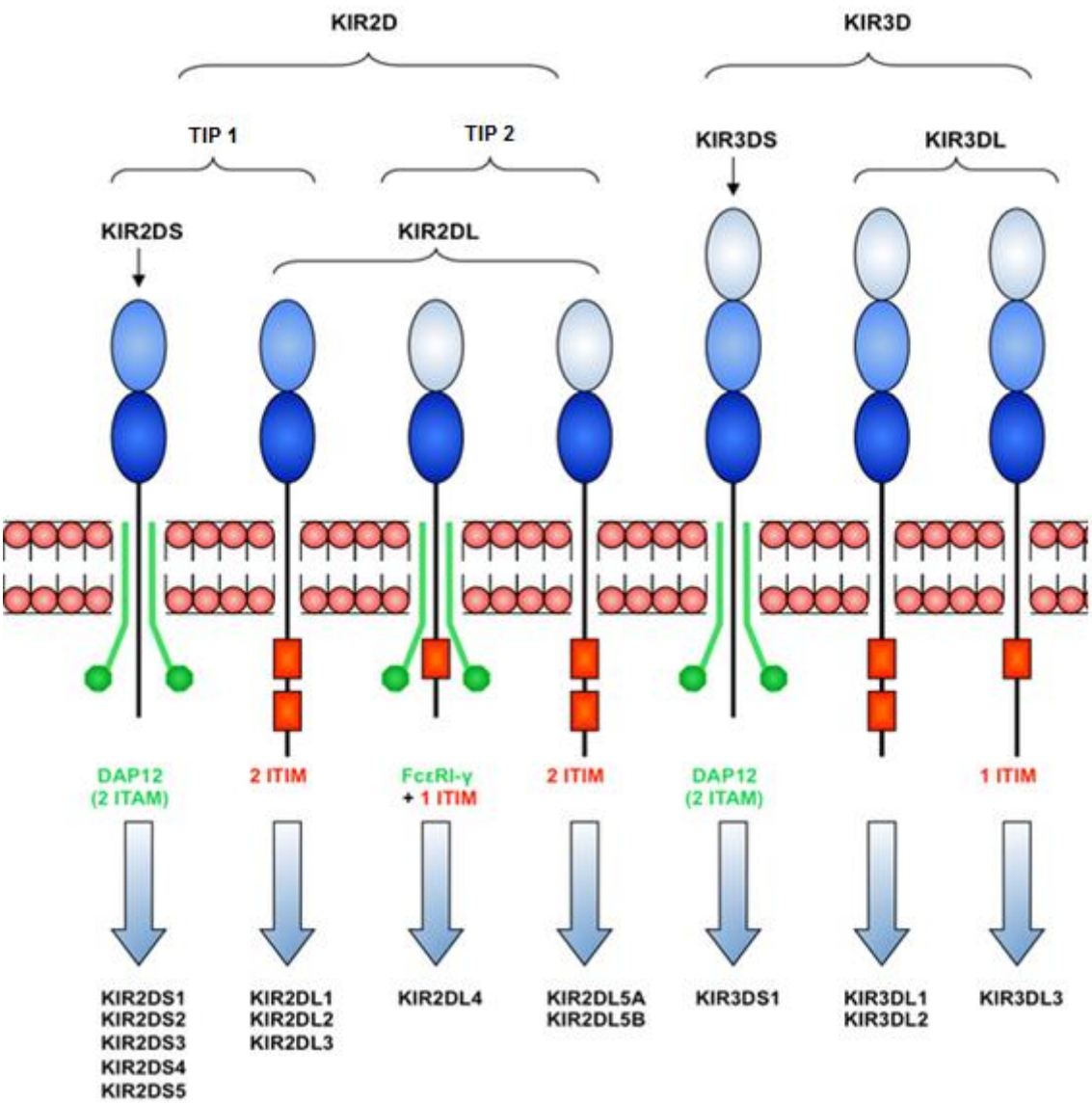
krvi, a njihov je broj povećan kod bolesnika s kroničnim infekcijama (npr. HIV-1). Poznato je da se rani razvoj stanica NK odvija u koštanoj srži (stanice NK sazrijevaju iz stanica CD34+, istih hematopoetskih progenitorskih stanica iz kojih sazrijevaju i limfociti T) te da je za njihov razvoj nužna izloženost IL-15, međutim, faze i mjesto kasnijeg razvoja stanica NK još uvijek nisu sasvim razjašnjeni. Do danas je samo za stanice NK $CD56^{high}CD16^{neg}$ ustanovljeno da sazrijevaju i zadržavaju se u sekundarnom limfatičkom tkivu (tonzile i limfni čvorovi). Stanice CD34+ koje su diferencirale u stanice NK pronađene su u perifernoj krvi, limfnim čvorovima, timusu, limfoidnom tkivu povezanom s crijevima (engl. *gut-associated lymphoid tissue* – GALT) i decidui. Još uvijek ostaje nerazjašnjeno pitanje ima li okoliš u kojem stanice NK potpuno sazrijevaju utjecaj na tip stanica u koje će one diferencirati ili je diferencijacija stanica NK već usmjerena u trenutku kad progenitorske stanice napuste koštanu srž i smještaju se u konačno mjesto sazrijevanja (21).

Za razliku od limfocita B i T, aktivacija stanica NK odvija se bez prethodne prezentacije antigena na stanicama APC i ovisi o kombinaciji signala primljenih preko aktivacijskih i inhibicijskih receptora (22). Tijekom sazrijevanja u koštanoj srži, stanice NK eksprimiraju inhibicijske receptore koji prepoznaju svoje ligande, čime se stanice NK 'educiraju', odnosno postavlja im se prag aktivacije. Ukoliko dođe do nestanka ili strukturne promjene liganda (uzrokovan malignom promjenom stanice ili infekcijom patogenom), stanice NK se aktiviraju zbog nedostatka inhibicijskih signala i reagiraju protiv ciljne stanice. Ustanovljeno je da tumorske stanice smanjuju ekspresiju molekula HLA razreda I kako bi izbjegle citotoksično djelovanje limfocita T, no nedostatak molekula HLA razreda I na membranama tumorskih stanica dovodi do aktivacije stanica NK (tzv. mehanizam *missing-self*). Daljnjim istraživanjima dokazano je da raniji zaključak kako je nedostatak molekula HLA jedini uzrok aktivacije stanica NK nije točan, već da i nepodudarnost receptora prirodnoubilačkih stanica sličnih imunoglobulinima (engl. *killer-cells immunoglobulin-like receptors* – KIR) na stanicama NK s molekulama HLA na ciljnim stanicama uzrokuje aloaktivaciju stanica NK zbog promjene kombinacije signala primljenih putem aktivacijskih i inhibicijskih receptora. Kod bolesnika koji su bili podvrgnuti TKMS, receptori KIR stanica NK davatelja dolaze u kontakt s nepodudarnim molekulama HLA primatelja, zbog čega se stanice NK aktiviraju i uzrokuju GvL, što pozitivno utječe na ishod TKMS. Neka istraživanja sugeriraju kako stanice NK i njihovi receptori KIR smanjuju pojavu GvHD nakon TKMS dok rezultati drugih istraživanja pokazuju suprotno, što onemogućuje donošenje jedinstvenog zaključka o točnoj ulozi i mehanizmu djelovanja receptora KIR u TKMS (23).

1.8. Receptori prirodnoubilačkih stanica slični imunoglobulinima (KIR)

Receptori KIR su transmembranski glikoproteinski receptori koji pripadaju imunoglobulinskoj superporodici (IgSF). Receptori KIR su prisutni na membranama stanica NK i manje subpopulacije limfocita T (CD4+CD28+ limfociti T) (24), međutim, neki receptori KIR (KIR2DS4 i KIR2DL4) pronađeni su i u topljivoj formi. Ustanovljeno je da cDNA tih molekula sadrži prerani stop kodon, što onemogućuje sintezu kompletnog receptora i njegovo izlaganje na membrani. Nije poznato imaju li topljivi oblici receptora KIR ulogu u imunološkoj reakciji. Ekspresija gena KIR prisutnih u genomu pojedinca je nasumična, stoga različiti klonovi stanica NK mogu na svojim membranama imati različite kombinacije receptora KIR. Iznimka je receptor KIR2DL4 koji je prisutan na svim stanicama NK (25).

Proteinski dio molekula KIR sastoji se od izvanstanične, transmembranske i citoplazmatske regije (Slika 5). Izvanstanična regija može se sastojati od domena D0 i D2 (receptori KIR2DL4 i KIR2DL5), D1 i D2 (ostali receptori KIR2D) ili sadržavati sve tri domene (D0, D1 i D2 u receptorima KIR3D). Uloga izvanstanične regije je prepoznavanje i vezanje liganda. Transmembranska regija, duljine oko 20 aminokiselina, kod svih aktivacijskih receptora KIR sadrži niz bazičnih aminokiselina nužnih za kontakt s pomoćnim proteinima DAP12 ili FcεRI-γ, a kod inhibicijskih receptora KIR sadrži relativno konzerviranu sekvencu hidrofobnih aminokiselina. Varijacije u slijedu aminokiselina u transmembranskoj regiji mogu utjecati na funkciju i ekspresiju proteina na membrani stanice, ali efekt varijacija razlikuje se među receptorima KIR. Receptori KIR s dugom citoplazmatskom regijom u kontaktu s odgovarajućim ligandom stvaraju inhibicijski signal, dok receptori KIR s kratkom citoplazmatskom regijom stvaraju aktivacijski signal. Receptori KIR imaju ili aktivacijsku ili inhibicijsku ulogu, s iznimkom KIR3DL1/S1, čija uloga ovisi o prisutnom alelu, i KIR2DL4, čija struktura ima sličnosti i s aktivacijskim i s inhibicijskim receptorima (26). Nakon vezanja liganda na inhibicijski receptor KIR, kinaza iz porodice Src fosforilira tirozin (Y) u sekvenci ITIM (engl. *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* - I/VxYxxL/V) u citoplazmatskoj regiji receptora KIR, čime se privlače inhibicijske fosfataze SHP-1 i SHP-2 koje sprječavaju nastanak aktivacijskog signala tako što defosforiliraju tirozinske fosfoproteine koji promoviraju aktivacijski signal. Ukoliko dođe do defosforilacije tirozina u sekvenci ITIM, nastaje aktivacijski signal. Nakon vezanja liganda na aktivacijski receptor KIR, sekvence ITAM (engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) u citoplazmatskim regijama aktivacijskih receptora KIR regrutiraju Syk/ZAP-70 tirozin kinaze, što omogućuje vezanje adaptorskog proteina DAP12 i inicijaciju aktivacijskog signala (27).



Slika 5. Shematski prikaz strukture receptora KIR. Receptori KIR koji sadrže imunoglobulinske domene D1 i D2 (KIR2D1-3 + KIR2DS4 i KIR2DS5) svrstani su u skupinu receptora KIR2D tipa 1, a receptori KIR koji sadrže Ig-domene D0 i D2 (KIR2DL4/5) u skupinu receptora KIR2D tipa 2. Kazalo: zeleno – aktivacijski receptori KIR koji sadrže sekvence ITAM; crveno – inhibicijski receptori KIR i njihove sekvence ITIM (iznimka je receptor KIR2DL4 koji može imati aktivacijsku i inhibicijsku ulogu). (preuzeto iz reference 28)

1.9. Ligandi receptora KIR

Poznati ligandi receptora KIR su molekule HLA razreda I (HLA-A, -B, -C i -G). Molekule HLA-C koje su ligandi receptora KIR mogu se podijeliti u dvije grupe ovisno o aminokiselini koja se nalazi na poziciji 80 (asparagin/lizin), za čije je prepoznavanje ključna aminokiselina na poziciji 44 u molekuli KIR u domeni D1. Molekule HLA-C grupe 1 (grupa HLA-C1 – C*01/*03/*07/*08/*12/*13/*14/*15:07/*16:01) su ligandi receptora KIR2DL2 i KIR2DL3, dok su molekule HLA-C grupe 2 (grupa HLA-C2 – C*02/*04/*05/*06/*12:42/*15/*16:02/*17) ligandi receptora KIR2DL1 (28). Ustanovljeno je da KIR2DL2 i KIR2DL3 vežu i molekule HLA grupe C2, ali slabijim intenzitetom nego molekule HLA grupe C1 (29). Također, molekule HLA-B46 i -B73 koje obje imaju valin na poziciji 76 i asparagin na poziciji 80, mogući su ligandi za receptore KIR2DL2 i KIR2DL3. Receptor KIR3DL1 prepoznaje epitop HLA-Bw4 prisutan kod približno 40% molekula HLA-B (molekule HLA-B koje imaju Ile/Thr na poziciji 80) i nekih molekula HLA-A (HLA-A23, -A24, -A25 i -A32) (30). Molekule HLA-A25 i HLA-B13 čine izuzetak među ligandima HLA-Bw4 jer, iako imaju epitop Bw4, ne vežu se s receptorom KIR3DL1 (31).

Produkti porodica alela HLA-A3 i HLA-A11 su ligandi receptora KIR3DL2, ali samo u prisutnosti peptida Epstein-Barr virusa (EBV) (32).

Poznato je i da je molekula HLA-G, prisutna najviše na stanicama fetalnog trofoblasta i posteljice, ligand receptora KIR2DL4 (33).

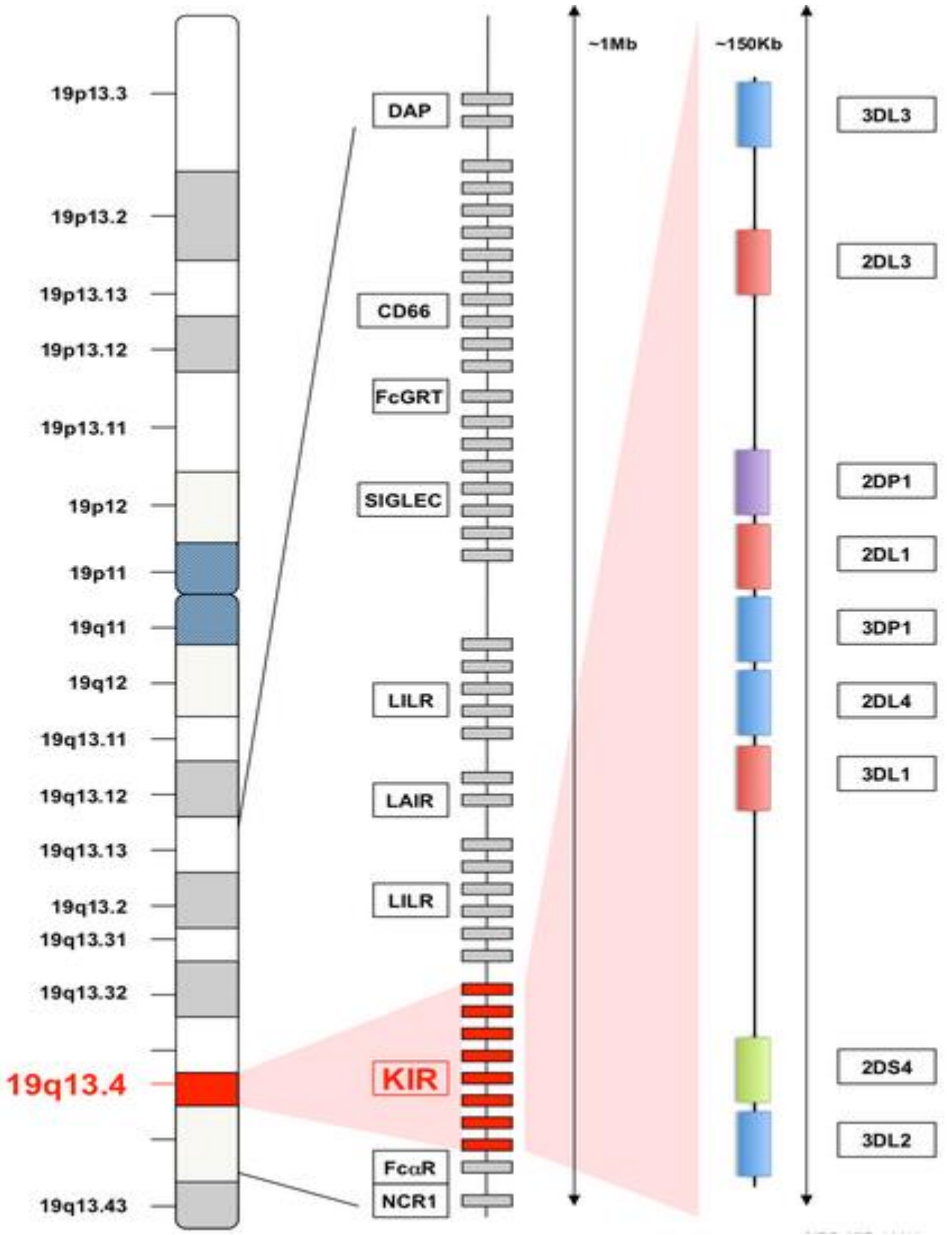
Manje su poznati ligandi za aktivacijske receptore KIR. Aktivacijski receptor KIR2DS1 koji je građom Ig-domena sličan inhibicijskom receptoru KIR2DL1 veže molekule skupine C2, ali sa znatno manjim afinitetom. Aktivacijski receptor KIR2DS2 je također građom Ig-domena nalik inhibicijskom receptoru KIR2DL2, ali nije sasvim razjašnjeno ima li KIR2DS2 afinitet za vezanje molekula skupine C1 (34). Receptor KIR2DS4 najzastupljeniji je aktivacijski receptor i ima specifičan afinitet samo za određene molekule HLA-C skupine C1 (HLA-C*01:02, -C*14:02 i -C*16:01) i C2 (HLA-C*02:02, -C*04:01 i -C*05:01), a dokazano je i da veže molekule HLA-A*11:01 i -A*11:02 (35). Iako su receptor KIR3DS1 i receptor KIR3DL1 vrlo slične strukture, još nije utvrđeno ima li KIR3DS1 afinitet za vezanje molekula HLA koje sadrže epitop Bw4, no dokazano je da su molekule HLA-F otvorene konformacije visoko afinitetni ligandi receptora KIR3DS1 (36).

Ligandi specifični za receptore KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS5 i KIR2DL5 još uvijek su nepoznati (25).

1.10. Geni KIR

Do danas je poznato 14 gena (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* i *KIR3DS1*) i 2 pseudogena *KIR* (*KIR2DP1* i *KIR3DP1*). Ovisno o prisutnom alelu, gen *KIR2DS4* kodira potpuni (engl. *full-length* – *KIR2DS4f*) ili deletirani (engl. *deleted* – *KIR2DS4d*) oblik receptora. Delecija 22 para baza u egzonu 5 deletiranog oblika dovodi do promjene okvira čitanja i preuranjenog stop-kodona, što rezultira proteinskim produktom kojem nedostaju transmembranska i citoplazmatska regija i koji se stoga ne može izložiti na membrani stanice.

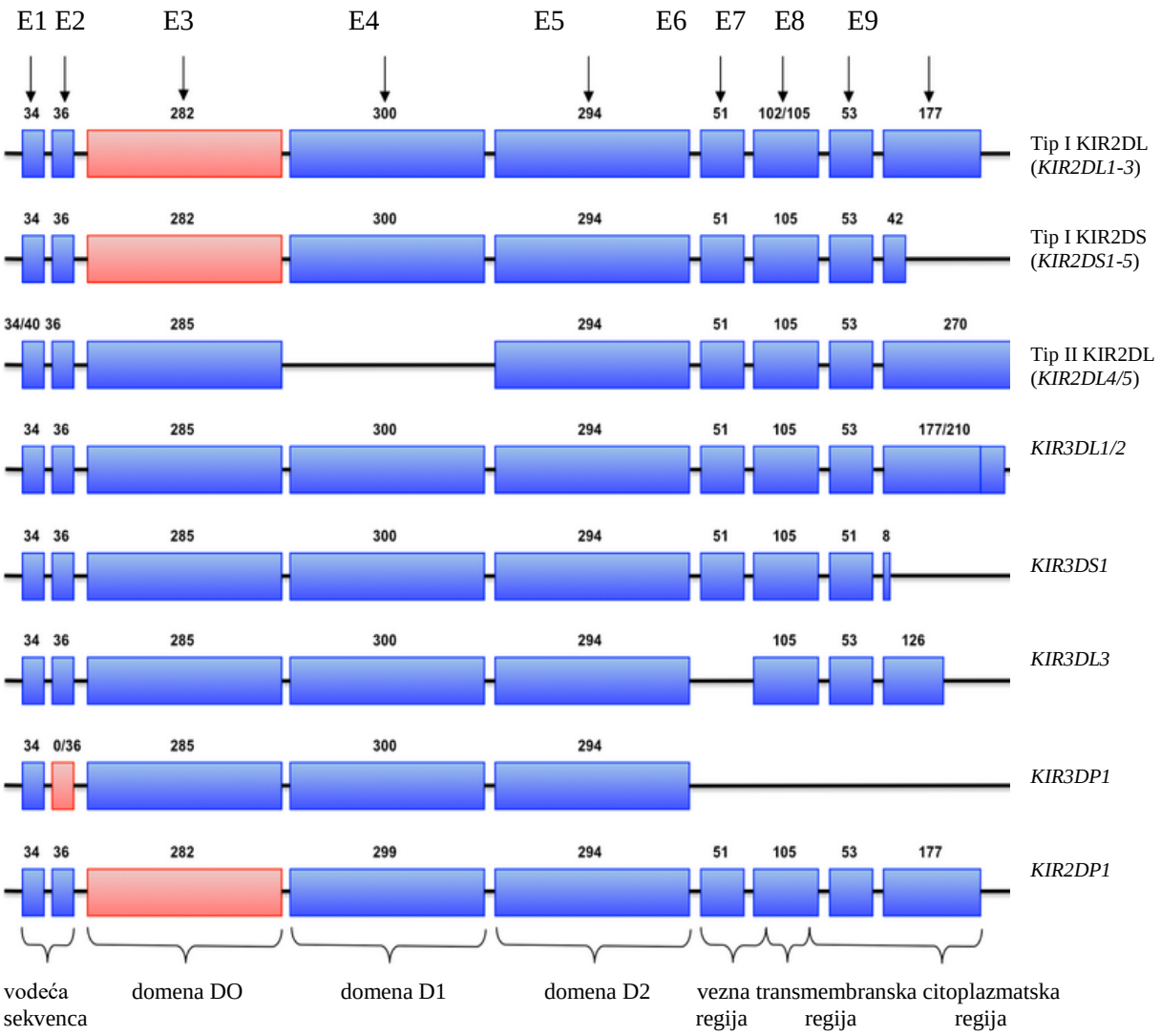
Geni *KIR* zauzimaju DNA duljine 150 Kb i dio su sustava leukocitnih receptora (engl. *leukocyte receptor complex* – LRC) duljine 1 Mb na kromosomu 19 (Slika 6).



Slika 6. Shematski prikaz kromosoma 19 (lijevo), uvećane regije sustava leukocitnih receptora (LRC) (sredina) i jednog od mogućih haplotipova KIR (desno). Osim gena *KIR*, regija LRC sadrži gene koji kodiraju adaptorske proteine DAP, antigen CD66 i receptore SIGLEC, FcGRT, LILR, LAIR, FcAlphaR i NCR1. Desno je prikazan karakteristični haplotip A (sadrži samo jedan aktivacijski receptor KIR2DS4). Kazalo: plavo – geni okvira čitanja (prisutni u svim haplotipovima KIR); ljubičasto – pseudogeni; crveno – geni koji kodiraju inhibicijske receptore KIR; zeleno – geni koji kodiraju aktivacijske receptore KIR. (preuzeto iz reference 28)

Geni i receptori KIR imenuju se na temelju proteinske strukture molekule KIR koju gen KIR kodira: prema broju imunoglobulinskih domena izvanstanične regije (dvije – 2D ili tri – 3D) te duljini citoplazmatske regije (L (engl. *long*) – duga citoplazmatska regija; S (engl. *short*) – kratka citoplazmatska regija ili P (engl. *pseudogene*) – nedostatak proteinskog produkta).

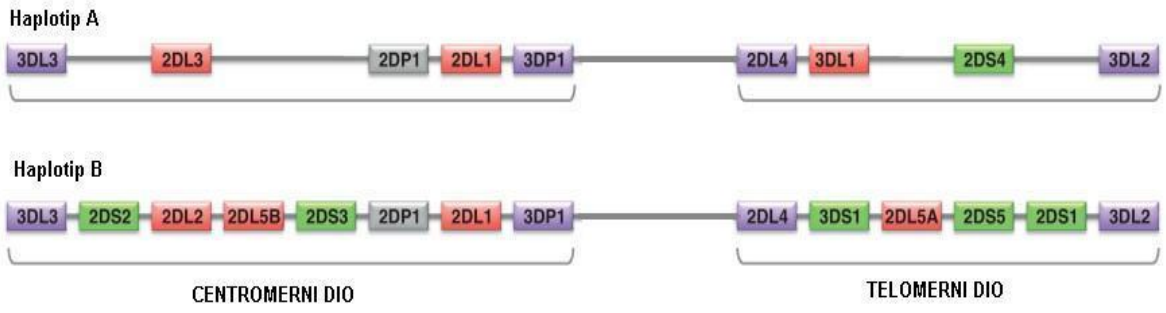
Geni *KIR* variraju u dužini od 4 do 16 kb i mogu sadržavati 4-9 egzona. Organizacija egzon-intron struktura uglavnom prati osnovni raspored: vodeća sekvenca kodirana je s prva dva egzona, imunoglobulinske domene (D0, D1 i D2) kodirane su egzonima 3-5, vezna regija i transmembranska regija kodirane su pojedinačno egzonima 6 i 7 i citoplazmatska regija je kodirana s posljednja dva egzona 8 i 9 (Slika 7).



Slika 7. Organizacija gena *KIR*. Geni *KIR* koji imaju sličnu strukturnu organizaciju grupirani su zajedno, dok su geni *KIR* sa strukturnim posebnostima prikazani zasebno. Na dnu slike označene su regije receptora KIR koje pojedini egzoni kodiraju. Kazalo: plavo – egzoni (E1-E9), brojevi iznad pojedinog egzona označavaju duljinu u parovima baza; crveno – pseudoegzon 3 (prisutan samo kod gena *KIR* koji sadrže sve tri imunoglobulinske domene) i deletirani egzon 2 gena *KIR3DP1* (preuzeto iz reference 28)

Svi geni *KIR* organizirani su na kromosomu po principu „glava-rep“ i međusobno su razdvojeni odsječkom DNA od 2,4 kb, osim gena *KIR3DP1* i *KIR2DL4* koji su odvojeni odsječkom DNA duljine 14 kb. Ovaj odsječak dijeli haplotip na centromerni i telomerni dio. Geni *KIR* organizirani su u dva osnovna haplotipa koji pokazuju izrazitu raznolikost u broju i vrsti prisutnih gena KIR, a nazvani su haplotip A i haplotip B (Slika 8) (25). Četiri gena KIR (*KIR2DL4*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* i *KIR3DP1*) prisutna su u svakom haplotipu i nazivaju se

geni okvira čitanja, dok je prisutnost preostalih gena *KIR* različita ovisno o haplotipu. Haplotip A je nevarijabilan haplotip i sastoji se od 9 gena *KIR*: *KIR3DL3-2DL3-2DP1-2DL1-3DP1-2DL4-3DL1-2DS4-3DL2*. Haplotip B značajno varira u sastavu gena i definira se prisutnošću različitih kombinacija gena *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5*, *KIR2DL2*, *KIR2DL5* i *KIR3DS1* koji nisu dio haplotipa A. Stoga haplotip B sadrži značajno više gena KIR koji kodiraju aktivacijske receptore KIR u odnosu na haplotip A, koji sadrži samo jedan gen za aktivacijski receptor, *KIR2DS4*. Genotipovi KIR se označavaju kao AA i Bx, pri čemu x može biti ili haplotip A ili haplotip B (26).



Slika 8. Prikaz primjera haplotipova KIR A i B. Haplotip A sadrži samo jedan gen koji kodira aktivacijski receptor KIR (*KIR2DS4*), dok haplotip B sadrži više gena koji kodiraju aktivacijske receptore KIR. Kazalo: ljubičasto – geni okvira čitanja; blijedo ljubičasto – pseudogeni (pseudogen *KIR2DP1* smatra se genom okvira čitanja); zeleno – geni koji kodiraju aktivacijske receptore KIR; crveno – geni koji kodiraju inhibicijske receptore KIR. (preuzeto iz reference 25)

2. CILJEVI RADA

1. Odrediti učestalost alela HLA među bolesnicima u programu liječenja haploidentičnom TKMS.

2. Istražiti učestalost haplotipova HLA-A~B~C~DRB1~DQB1 u analiziranoj skupini bolesnika

3. Istražiti učestalost gena KIR kod bolesnika i njihovih davatelja KMS

4. Odrediti genotipove KIR kod bolesnika i njihovih davatelja KMS

5. Analizirati utjecaj gena KIR na preživljenje bolesnika nakon liječenja haploidentičnom TKMS

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

Uzorci periferne krvi ispitanika koji su korišteni u ovom istraživanju uzeti su bolesnicima (N=33) i davateljima KMS (N=32) u svrhu tipizacije HLA prije TKMS. Geni KIR bili su određeni parovima bolesnik/davatelj koji su bili uključeni u program haploidentične TKMS. Kao kontrola korištene su standardne kontrolne skupine zdravih nesrodnih ispitanika Odjela za tipizaciju tkiva (37, 38). Geni HLA-A, -B i -DRB1 tipizirani su kod 4000 kontrolnih ispitanika, geni HLA-C i -DQB1 kod 215 kontrolnih ispitanika, a geni KIR kod 121 kontrolnog ispitanika.

3.2. Metode

3.2.1 Izolacija DNA

Izolacija DNA iz uzoraka krvi napravljena je prema navedenom protokolu dobivenom uz komercijalni set za izolaciju DNA (Nucleospin, Macherey Nagel, Duren, Njemačka). Komercijalni set sadrži NucleoSpin® kolone s kolektorskim epruveticama, kolektorske epruvetice (2 mL), pufere (B3 pufer za liziranje eritrocita (B3 Lysis Buffer), BW pufer za ispiranje (BW Washing Buffer), B5 pufer za ispiranje koji sadrži alkohol (B5 Washing Buffer), BE eluacijski pufer (BE Elution Buffer)) i proteinazu K.

1) Uzorak krvi (200 µL) pomiješan je s 25 µL proteinaze K i 200 µL pufera za liziranje eritrocita B3 (engl. *B3 Lysis Buffer*) otopina je izmiješana i kratkotrajno centrifugirana na 7000 okretaja te inkubirana 10 minuta u vodenoj kupelji na 70˚C

2) Nakon inkubacije, u otopinu je dodano 210 µL apsolutnog etanola, otopina je zatim izmiješana i kratkotrajno centrifugirana na 7000 okretaja te je prebačena u Nucleospin kolone i centrifugirana na 14000 rpm/1 min

3) Nucleospin kolona prebačena je u čistu epruveticu, u kolonu je naneseno 500 µL pufera za ispiranje BW (engl. *BW Washing Buffer*) te je centrifugirana na 14000 rpm/1 min

4) Kolona je ponovno prebačena u čistu epruveticu te je isprana sa 600 µL pufera za ispiranje u kojem se nalazi i alkohol (engl. *B5 Washing Buffer*) nakon čega je centrifugirana na 14000 rpm/1 min

5) Po završetku ispiranja, kolona je prebačena u eppendorf epruveticu, te je dodano 99 µL pufera za eluaciju (engl. *BE Elution Buffer*) prethodno zagrijanog na 70˚C, kolona je ostavljena jednu minutu na sobnoj temperaturi te centrifugirana na 14000 rpm/90 s

6) Izolirana DNA pohranjena je na +4˚C

3.2.2. Određivanje gena HLA

3.2.2.1. Tipizacija gena HLA metodom lančane reakcije polimerazom i oligonukleotidnim probama specifičnim za sekvencu – niska rezolucija

Ispitanici su tipizirani za gene HLA metodom lančane reakcije polimerazom i oligonukleotidnim probama specifičnim za sekvencu (engl. *Sequence-specific oligonucleotide primed polymerase chain reaction* – PCR-SSO) na niskoj rezoluciji. Ova se metoda temelji na umnožavanju regija gena HLA razreda I i razreda II sa specifičnim početnicama označenim biotinom i hibridizaciji amplikona s oligonukleotidnim probama specifičnim za sekvencu, što omogućuje detekciju prisutnosti, odnosno odsutnosti alela. Oligonukleotidne probe specifične za sekvencu vezane su na polistirenske Luminex mikrosfere, koje se međusobno razlikuju prema specifičnom obojenju dobivenom kombinacijom jedne crvene i jedne infracrvene fluorescentne boje. Denaturirani produkt PCR-a pomiješan je s mikrosferama i omogućena je hibridizacija. Prilikom analize produkta PCR-SSO koja se temelji na metodi protočne citometrije, crveni laser pobuđuje emisiju svjetlosti sa same mikrosfere, što omogućuje njenu identifikaciju. Zeleni laser pobuđuje emisiju svjetlosti fikoeritrina konjugiranog sa streptavidinom (engl. *Streptavidin – Phycoerythrin* – SAPE), što se događa samo ako se SAPE vezao na biotinizirani amplikon, odnosno ako je alel HLA za koji su oligonukleotidne sekvence vezane na mikrosferu specifične prisutan. Amplikoni su kvantificirani na uređaju Luminex LABScan^{TM} 100 (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) i analizirani programom MATCHIT! DNA, verzija 1.2, Immucor Transplant Diagnostics Inc., Stamford. (39).

3.2.2.2. Tipizacija gena HLA metodom lančane reakcije polimerazom s početnicama specifičnim za sekvencu – visoka rezolucija

Druga metoda kojom su ispitanici tipizirani za gene HLA je metoda lančane reakcije polimerazom s početnicama specifičnim za sekvencu (engl. *Polymerase chain reaction – sequence specific primers* – PCR-SSP). U ovom istraživanju korišteni su komercijalni testovi Olerup SSP HLA Typing Kits (Qiagen Vertriebs GmbH, Beč, Austrija) koji sadrže Olerup SSP PCR Master Mix i pločice s različitim liofiliziranim početnicama specifičnim za pojedine alele HLA na različitim lokusima HLA. Nakon lančane reakcije polimerazom i elektroforeze, dobiveni obrazac vrpca analiziran je programom Helmberg SCORE. Svaka PCR reakcija sadrži dva para početnica, za pozitivnu kontrolu i specifičnu reakciju. To znači da je nakon umnažanja u svakoj reakciji umnožena pozitivna kontrola (ako je test pravilno izveden), dok je specifična reakcija prisutna samo ukoliko je alel HLA za koji su specifične početnice u toj reakciji prisutan u uzorku.

3.2.3. Određivanje gena KIR

Za određivanje gena KIR također je korištena metoda PCR-SSP uz komercijalni test OlerupSSP^{TM}KIR Genotyping (Qiagen Vertriebs GmbH, Beč, Austrija). Komercijalni test sadrži Olerup SSP PCR Master Mix u pločici s 25 reakcija + negativna kontrola. U svakoj reakciji nalazi se različita kombinacija liofiliziranih početnica specifičnih za pojedine gene KIR.

1) Prema uputama priloženim uz test, Olerup SSP PCR Master Mix pomiješan je s vodom u količinama ovisno o broju uzoraka analiziranih jednim testom.

2) Mješavina pufera i vode dodana je u tubice s liofiliziranim početnicama (u svaku tubicu dodano je po 8 μL otopine).

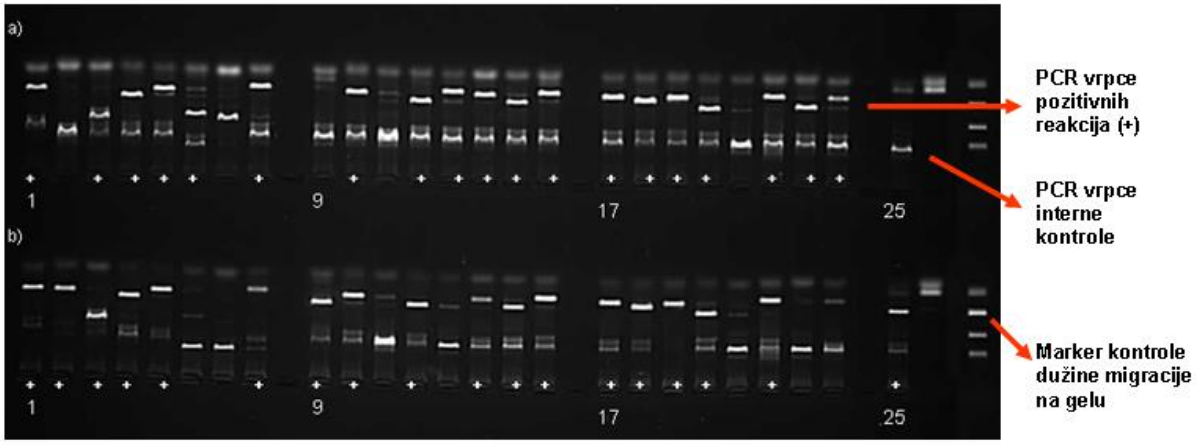
3) U tubice je dodan 1 μL DNA i tubice su zatim prekrivene ljepljivom folijom te centrifugirane na 1000 rpm/2 min kako bi se testirani uzorci dobro pomiješali s reagensima i kako ne bi zaostali na stijenkama tubica.

Lančana reakcija polimerazom provedena je u uređaju za automatsko umnažanje prema uputama proizvođača:

početna denaturacija (2 min, 94˚C) → denaturacija (10 s, 94˚C); prianjanje početnica i elongacija (1 min, 65˚C) – 10 ciklusa → denaturacija (10 s, 94˚C); prianjanje početnica (50 s, 61˚C); elongacija (30 s, 72˚C) – 20 ciklusa → završna elongacija (∞, 4˚C)

Nakon umnažanja PCR produkti analizirani su elektroforezom. U 200 mL 1%-tnog TBE (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA) pufera otopljena su 3 g agaroze i zagrijana dok se agaroza ne otopi u puferu. Otopina je kratko ohlađena stavljanjem tikvice pod mlaz hladne vode i zatim je u otopinu dodano 4 kapi otopine za bojanje Gel-Red. Otopina agaroze izlivena je na ploču za gel u koju su umetnuti češljevi i ostavljena 30 min kako bi gel polimerizirao. Nakon polimerizacije gela, češljevi su uklonjeni i ploča je postavljena u kadicu za elektroforezu. U jažice su naneseni PCR produkti, a u svakom redu je u zadnju jažicu nanesen DNA marker kontrole dužine migracije na gelu te je pokrenuta elektroforeza pod uvjetima određenim komercijalnim testom (20 minuta, 220 volti, 300 mA).

Po završetku elektroforeze, gel je dokumentiran UVG:BOX Syngene kamerom s tamnom komorom (Slika 9).



Slika 9. Slika agaroznog gela s rezultatima reakcija umnažanja gena KIR testom OlerupSSP^{TM}KIR Genotyping. Prikazane su PCR reakcije dva različita ispitanika (a, b). Pozitivne reakcije označene su znakom plus (+), a sadrže dvije vrpce (jedna kontrolna vrpca i vrpca koja predstavlja analizirani uzorak). Reakcije koje imaju samo vrpce interne kontrole smatrane su negativnima. Marker kontrole dužine migracije na gelu nalazi se uz svaki test kako bi se olakšalo određivanje dužine specifičnog PCR produkta prilikom interpretacije rezultata.

Uz svaki komercijalni set OlerupSSP^{TM}KIR Genotyping priložena je i tablica za interpretaciju pomoću koje se manualno radi analiza umnoženih vrpci na fotografiranom gelu (Tablica 1).

Tablica 1. Primjer tablice za interpretaciju reakcija na gelu i određivanje gena KIR.

Broj jažice / Alel KIR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
2DL1*001-034	1																									
2DL2*0010101-013[2]		2																								
2DL3*0010101-026, 028-034[2]			3																							
2DL4*00101-00602, 010, 01201-01202, 014-016, 018, 021-026, 028-034, 036-038				4																				24		
2DL4*007-00902, 011, 013, 017, 019, 020, 027, 035				4																						
2DL5A*0010101-00105, 0050101, 0050103-0050104, 01201-01202					5	6																				
2DL5A*0050102					5	6																				
2DL5A*014-015, 021-022					5	6																				
2DL5B*0020101-0020105, 0020107, 004, 00601, 00603-0070101, 0080101-00802, 009-01302					5		7																		25	
2DL5B*0020106, 00202, 0070102, 00803, 01303, 016-020					5		7																		?	
2DL5B*003, 00602					5		7																			
2DS1*001								8													21					
2DS1*0020101-009[4]								8														22				
2DS2*0010101-009									9																	
2DS3*00101-008										10																
2DS4*0010101-00104, 01101-01102, 014-017											11															
2DS4*0030101-0030104, 0040101-0040102, 0060101-0060102, 007-010, 012, 013, 018												12														
2DS5*001-016													13													
3DL1*0010101-002, 0050101-009, 01501-018, 020010-0200102, 022-035, 038, 040-044, 051-054, 057, 059-077, 079-081N, 086-090, 092-0103, 0109														14												
3DL1*00401-00403, 019, 021, 036, 037, 039, 056, 072, 91														14									23			
3DL2*0010101-0109															15											
3DL3*00101-057																16										
3DS1*010-014, 045-049N, 050, 055, 058, 078, 082-085																	17									
2DP1*00101-019																		18								
3DP1*001-002, 007, 0090101-00902[4]																			19			22			25	
3DP1*0030101-0030402, 005, 006, 008, 010																			19	20						
3DP1*004																			19			22			25	
3DP1*011-012																			19			22			?	
3DP1*013-015																			19	20					?	
Broj jažice	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26

Negativna kontrola

Kazalo: brojevi u tablici predstavljaju reakcije – pozitivna reakcija (prisutnost vrpce koja predstavlja određeni gen KIR) znači da je određeni gen KIR (naznačeni u prvom stupcu tablice) prisutan u analiziranom uzorku.

3.2.4. Statistička obrada podataka

Direktnim brojanjem utvrđen je broj uočenih alela HLA zasebno unutar svake analizirane skupine (bolesnici i kontrolne skupine) koji je podijeljen s ukupnim brojem alela HLA unutar analizirane skupine (ukupni broj alela u skupini dvostruko je veći od broja ispitanika – dva alela po ispitaniku) kako bi se dobila učestalost određenog alela HLA. Ukoliko je ispitanik homozigot za određeni lokus, računalo se kao da se alel pojavljuje dvaput. Učestalosti alela HLA unutar skupine bolesnika i kontrolne skupine uspoređeni su 2x2 kontingencijskom tablicom primjenom Fisherovog egzaktnog testa (GraphPad software, QuickCalcs, www.graphpad.com). Prihvaćena razina statističke značajnosti je $P<0.05$.

Učestalost gena KIR u analiziranim skupinama (bolesnici, haploidentični davatelji KMS i kontrolna skupina) određena je također direktnim brojanjem prisutnosti pojedinog gena KIR. Usporedba učestalosti gena KIR kod bolesnika i davatelja s kontrolnom skupinom provedena je Fisherovim egzaktnim testom (GraphPad software, QuickCalcs, www.graphpad.com). Statistički značajnom razlikom smatrali su se rezultati gdje je $P<0.05$. Haplotipovi KIR određeni su prema prisutnosti, odnosno odsutnosti određenih gena KIR. Ukoliko je u haplotipu bio prisutan barem jedan od gena *KIR2DL2*, *KIR2DL5*, *KIR3DS1*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3* ili *KIR2DS5*, haplotip je bio označen kao „Bx“. Ukoliko su svi navedeni geni bili odsutni, haplotip je bio označen kao „AA“. Nakon usporedbe opaženih kombinacija gena KIR u pojedinom haplotipu s podacima u bazi podataka AFND (engl. *The Allele Frequency Net Database*), genotipovi KIR označeni su odgovarajućim brojevima prema AFND (40).

Analiza utjecaja prisutnosti pojedinačnih aktivacijskih gena KIR u genotipu davatelja i utjecaja genotipa KIR davatelja na preživljenje bolesnika nakon TKMS provedena je Kaplan-Meier analizom (XLSTAT, verzija 2017.6.). Preživljenje je mjereno od dana TKMS do dana smrti ili zadnjeg dana praćenja bolesnika.

4. REZULTATI

Istraživanje je obuhvatilo 33 primatelja i 32 davatelja KMS (dvoje bolesnika imalo je istog davatelja) uključenih u program haploidentične TKMS. U Tablici 2 prikazani su opći podaci o bolesnicima i njihovim davateljima. Udio spolova bio je podjednak kod davatelja (16 muškaraca i 16 žena), dok je među bolesnicima bilo više muškaraca (19, naprema 14 žena). Najčešća dijagnoza bolesnika bila je akutna mijeloična leukemija (33,3%). S obzirom na srodstvo para primatelj/davatelj, u najvećem broju slučajeva dijete je bilo davatelj roditelju (13/33; 39,4%), a u najmanjem broju slučajeva davatelji su bili braća/sestre (9/33; 27,3%). Od 27 bolesnika kod kojih je bila napravljena križna proba u samo je jednom slučaju križna proba bila pozitivna. Većina bolesnika (20/33; 60,6%) bila je testirana na prisutnost DSA (engl. *Donor Specific Antibodies*) od kojih njih 16 (80,0%) nije imalo DSA. Tri bolesnika imala su pozitivna DSA protiv antigena HLA razreda I i negativna DSA protiv antigena HLA razreda II, dok je jedan bolesnik imao DSA za oba razreda HLA.

Tablica 2. Opći podaci o primateljima i njihovim haploidentičnim davateljima KMS

	N (%)		N (%)
N (bolesnici)	33	Srodstvo primatelj/davatelj	
srednja dob (raspon)	39,5 (5-63)	sin/majka	7 (21,2)
N (davatelji)	32	sin/otac	1 (3,0)
srednja dob (raspon)	39,1 (15-72)	kćer/majka	2 (6,1)
spol (pacijenti)		kćer/otac	1 (3,0)
M	19 (57,6)	otac/sin	7 (21,2)
Ž	14 (42,4)	otac/kćer	2 (6,1)
spol (davatelji)		majka/sin	1 (3,0)
M	16 (50,0)	majka/kćer	3 (9,1)
Ž	16 (50,0)	brat/brat	2 (6,1)
spol - pacijent/davatelj		sestra/sestra	4 (12,1)
M/M	10 (30,3)	brat/sestra	0
M/Ž	9 (27,3)	sestra/brat	3 (9,1)
Ž/Ž	9 (27,3)	CM	
Ž/M	5 (15,1)	POZ	1 (3,0)
Dijagnoza		NEG	26 (78,8)
ALL	3 (9,1)	NT	6 (18,2)
AML	11 (33,3)	DSA razred I/razred II	
CML	1 (3,0)	NT	13 (39,4)
HL	6 (18,2)	POZ/POZ	1 (3,0)
MDS	4 (12,1)	POZ/NEG	3 (9,1)
NHL	3 (9,1)	NEG/POZ	0 (0)
ostalo	5 (15,1)	NEG/NEG	16 (48,5)

N – broj ispitanika; M – muškarci; Ž – žene; ALL – akutna limfoblastična leukemija; AML – akutna mijeloična leukemija; CML – kronična mijeloična leukemija; HL – Hodgkinov limfom; MDS – mijelodisplastični sindrom; NHL – non-Hodgkinov limfom; CM – križna proba (engl. *crossmatch*); POZ – pozitivno; NEG – negativno; NT – nije testirano; DSA – davatelj-specifična protutijela HLA (engl. *Donor Specific Antibodies*)

4.1. Raspodjela alela HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1 u skupini bolesnika u programu haploidentične TKMS i kontroli

U Tablici 3 prikazane su učestalosti alela HLA-A i -B u analiziranoj skupini bolesnika (N=33) i kontrolnoj skupini (N=4000).

Najčešći alel HLA-A među bolesnicima bio je HLA-A*02:01 (25,8%), što je i najčešći alel HLA-A u kontrolnoj skupini (29,1%). Sedam alela HLA-A bilo je prisutno samo jednom, ali nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu. Aleli HLA-A*03:02 i HLA-A*24:03 bili su značajno više prisutni (P=0,0480, odnosno P=0,0279) među bolesnicima nego u kontroli, dok je povećana prisutnost alela HLA-A*02:05 i HLA-A*80:01 među bolesnicima bila na granici statističke značajnosti (P=0,0988, odnosno P=0,0559).

Od 28 alela HLA-B uočenih među bolesnicima najzastupljeniji je bio alel HLA-B*51:01 (15,2%), koji je bio najučestaliji alel i u kontrolnoj skupini (11,1%). Alel HLA-B*08:01, treći najčešći alel u kontrolnoj skupini (7,8%), imao je smanjenu učestalost među bolesnicima (1,5%) na granici statističke značajnosti (P=0,0609). Tri alela lokusa HLA-B (HLA-B*39:03, HLA-B*41:01 i HLA-B*51:08) bila su statistički značajno češće prisutna među bolesnicima nego u kontrolnoj skupini, dok su učestalosti alela HLA-B*47:01, HLA-B*48:01, HLA-B*55:01 i HLA-B*57:03 u skupini bolesnika, uz već spomenuti alel HLA-B*08:01, bile na granici statističke značajnosti.

Tablica 3. Učestalost alela HLA-A i -B kod bolesnika (N=33) i kontrolne grupe (N=4000)

Alel HLA-A*	bolesnici (N=33) n (%)	kontrola (N=4000) n (%)	P
01:01	5 (7,6)	995 (12,4)	0,3452
02:01	17 (25,8)	2330 (29,1)	0,5894
02:05	2 (3,0)	63 (0,8)	0,0988
02:06	1 (1,5)	13 (0,2)	0,1087
03:01	7 (10,6)	947 (11,8)	1,0000
03:02	2 (3,0)	41 (0,5)	0,0480*
11:01	5 (7,6)	553 (6,9)	0,8055
24:02	10 (15,2)	878 (11,0)	0,3192
24:03	2 (3,0)	30 (0,4)	0,0279*
25:01	1 (1,5)	250 (3,1)	0,7242
26:01	2 (3,0)	380 (4,8)	0,7704
30:01	2 (3,0)	105 (1,3)	0,2181
30:04	1 (1,5)	15 (0,2)	0,1233
31:01	1 (1,5)	185 (2,3)	1,0000
32:01	3 (4,5)	314 (3,9)	0,7448
33:01	1 (1,5)	164 (2,1)	1,0000
68:01	2 (3,0)	321 (4,0)	1,0000
68:02	1 (1,5)	48 (0,6)	0,3322
80:01	1 (1,5)	6 (0,07)	0,0559

* – statistički značajno (P<0,05); n – broj uočenih alela

Alel HLA-B*	bolesnici (N=33) n (%)	kontrola (N=4000) n (%)	P
07:02	4 (6,1)	545 (6,8)	1,0000
08:01	1 (1,5)	622 (7,8)	0,0609
13:02	2 (3,0)	301 (3,8)	1,0000
14:01	1 (1,5)	27 (0,3)	0,2058
14:02	3 (4,5)	170 (2,1)	0,1681
15:01	1 (1,5)	311 (3,9)	0,5207
15:17	1 (1,5)	34 (0,4)	0,2504
18:01	8 (12,1)	653 (8,2)	0,2542
35:01	4 (6,1)	489 (6,1)	1,0000
35:02	1 (1,5)	101 (1,3)	0,5697
35:03	3 (4,5)	465 (5,8)	1,0000
37:01	1 (1,5)	75 (0,9)	0,4660
39:01	1 (1,5)	205 (2,6)	1,0000
39:03	1 (1,5)	0 (0)	0,0082*
40:01	1 (1,5)	111 (1,4)	0,6041
40:02	1 (1,5)	182 (2,3)	1,0000
41:01	2 (3,0)	25 (0,3)	0,0203*
44:02g	5 (7,6)	471 (5,9)	0,5937
44:05	2 (1,5)	65 (0,8)	0,1040
47:01	1 (1,5)	11 (0,1)	0,0940
48:01	1 (1,5)	11 (0,1)	0,0940
50:01	2 (3,0)	117 (1,5)	0,6234
51:01	10 (15,2)	890 (11,1)	0,3225
51:08	2 (3,0)	10 (0,1)	0,0041*
55:01	3 (4,5)	100 (1,3)	0,0519
56:01	1 (1,5)	79 (1,0)	0,4834
57:01	1 (1,5)	201 (2,5)	1,0000
57:03	1 (1,5)	6 (0,08)	0,0559
58:01	1 (1,5)	84 (1,1)	0,5044

* – statistički značajno (P<0,05); n – broj uočenih alela; 44:02g – 44:02 ili 44:27

Učestalosti alela HLA-DRB1 u bolesničkoj i kontrolnoj skupini prikazane su u Tablici 4. Najučestaliji alel HLA-DRB1 među bolesnicima bio je HLA-DRB1*15:01 (13,6%), što je češće nego u kontroli (8,7%), ali razlika nije statistički značajna. Istovremeno, najzastupljeniji alel u kontrolnoj skupini bio je HLA-DRB1*03:01 (10,0%), što je dvostruko veća učestalost nego među bolesnicima (4,5%), razlika nije statistički značajna. Slična situacija bila je opažena i za alel HLA-DRB1*11:01. Jedino je alel HLA-DRB1*10:01 bio statistički značajno (P=0,0044) češće prisutan među bolesnicima nego među kontrolnim ispitanicima, a statistički

značajna razlika (P=0,0364) u učestalosti uočena je i kod HLA-DRB1*14:01g (HLA-DRB1*14:01/HLA-DRB1*14:54).

Tablica 4. Raspodjela alela HLA-DRB1 kod bolesnika (N=33) i kontrolne grupe (N=4000)

	bolesnici (N=33)	**kontrola (N=4000)**	
Alel HLA-DRB1*	**n (%)**	**n (%)**	**P**
01:01	4 (6,1)	782 (9,8)	0,4059
01:02	2 (3,0)	108 (1,4)	0,2271
03:01	3 (4,5)	800 (10,0)	0,2106
04:01	1 (1,5)	236 (3,0)	1,0000
04:02	2 (3,0)	203 (2,6)	0,6849
07:01	4 (6,1)	782 (9,8)	0,4059
08:01	2 (3,0)	235 (2,9)	0,7208
09:01	1 (1,5)	21 (0,3)	0,1656
10:01	4 (6,1)	83 (1,1)	0,0055*
11:01	2 (3,0)	630 (7,9)	0,1712
11:04	6 (9,1)	612 (7,7)	0,6391
12:01	2 (3,5)	123 (1,5)	0,2727
13:01	6 (9,1)	515 (6,4)	0,3195
13:02	3 (4,5)	353 (4,4)	0,7671
13:03	2 (3,0)	72 (0,9)	0,1226
13:05	1 (1,5)	23 (0,3)	0,1792
14:01g	6 (9,1)	296 (3,7)	0,0364*
15:01	9 (13,6)	697 (8,7)	0,1832
16:01	5 (7,6)	753 (9,4)	0,8315
16:02	1 (1,5)	81 (1,0)	0,4919

* – statistički značajno (P<0,05); n – broj uočenih alela; 14:01g – 14:01 ili 14:54

Učestalosti alela HLA-C i HLA-DQB1 prikazani su u Tablici 5. Raspodjela alela na navedena dva lokusa HLA prikazana je odvojeno od ostalih lokusa HLA zato što su 26 bolesnika i 215 kontrolnih ispitanika bili testirani za ove lokuse HLA.

Na lokusu HLA-C najčešći aleli među bolesnicima bili su HLA-C*06:02, HLA-C*07:01 i HLA-C*12:03 (13,5%), što je u skladu sa zastupljenošću tih alela u kontroli. Alel HLA-C*07:01 pokazao je najveću zastupljenost među zdravim ispitanicima (16,5%). Za alel HLA-C*16:01 i HLA-C*16:02 utvrđena je statistički značajna razlika (P=0,0319, odnosno

P=0,0188) u učestalosti između bolesnika (3,8%, odnosno 5,8%) i kontrolne skupine (0,2%, odnosno 0,7%).

Među alelima lokusa HLA-DQB1 u bolesničkoj skupini najzastupljeniji je bio alel HLA-DQB1*03:01 (21,2%), koji je najčešći alel na ovom lokusu i u kontroli (17,7%). Statistički značajno odstupanje (P=0,0463) bilo je uočeno za razliku u raspodjeli alela HLA-DQB1*02:01, dok su povećane učestalosti alela HLA-DQB1*05:02 i HLA-DQB1*05:03 među bolesnicima bile na granici statističke značajnosti (P= 0,0984, odnosno P= 0,0762).

Tablica 5. Učestalost alela HLA-C i -DQB1 kod bolesnika (N=26) i kontrolne grupe (N=215)

Alel HLA-C*	bolesnici (N=26) n (%)	kontrola (N=215) n (%)	P
01:02	2 (3,8)	23 (5,0)	1,0000
02:02	3 (5,8)	29 (7,0)	1,0000
03:03	4 (7,7)	16 (3,5)	0,2557
04:01	5 (9,6)	55 (13,0)	0,6582
05:01	2 (3,8)	17 (4,0)	1,0000
06:02	7 (13,5)	29 (7,0)	0,0928
07:01	7 (13,5)	71 (16,5)	0,6922
07:04	1 (1,9)	13 (3,0)	1,0000
08:01	1 (1,9)	0 (0)	0,1079
08:02	4 (7,7)	19 (4,5)	0,2960
12:03	7 (13,5)	54 (12,5)	0,8260
14:02	1 (1,9)	10 (2,0)	1,0000
15:02	2 (3,8)	12 (2,5)	0,6550
16:01	2 (3,8)	1 (0,2)	0,0319*
16:02	3 (5,8)	3 (0,7)	0,0188*
17:01	1 (1,9)	1 (0,2)	0,2043

* – statistički značajno (P<0,05); n – broj uočenih alela

Alel HLA-DQB1*	bolesnici (N=26) n (%)	kontrola (N=215) n (%)	P
02:01	1 (1,9)	47 (10,9)	0,0463*
02:02	3 (5,8)	36 (8,4)	0,7867
03:01	11 (21,2)	76 (17,7)	0,5669
03:02	1 (1,9)	28 (6,5)	0,3480
03:03	2 (3,8)	11 (2,6)	0,6406
04:02	1 (1,9)	7 (1,6)	0,6016
05:01	8 (15,4)	48 (11,1)	0,3613
05:02	9 (17,3)	42 (9,8)	0,0984
05:03	5 (9,6)	17 (4,0)	0,0762
06:02	5 (9,6)	31 (7,2)	0,5731
06:03	2 (3,8)	42 (9,8)	0,2066
06:04	4 (7,7)	21 (4,9)	0,3318

* – statistički značajno (P<0,05); n – broj uočenih alela

4.2. Raspodjela haplotipova HLA-A~B~C~DRB1~DQB1 u skupini bolesnika i njihovih haploidentičnih davatelja u programu TKMS

U Tablici 6 prikazani su haplotipovi prisutni kod parova primatelj/davatelj liječenih u programu haploidentične TKMS. Četiri su haplotipa HLA bila opažena dvaput među bolesnicima: HLA-A*02:01~B*51:01~C*15:02~DRB1*01:01~DQB1*05:01 (bolesnici 2 i 18), HLA-A*11:01~B*07:02~C*12:03~DRB1*15:01~DQB1*05:02 (bolesnici 13 i 17), HLA-A*24:03~B*55:01~C*03:03~DRB1*13:02~DQB1*06:04 i HLA-A*24:02~B*44:05~C*02:02~DRB1*14:01~DQB1*05:03 (bolesnici 32 i 33). Haplotip HLA-A*01:01~B*08:01~C*07:01~DRB1*03:01~DQB1*02:01 (najčešći haplotip u populacijama europskog podrijetla prema bazi HaploStats National Marrow Donor Program) bio je prisutan kod jednog bolesnika (par 6) i jednog davatelja (par 22); u oba slučaja primatelj/davatelj nisu dijelili ovaj haplotip HLA. Svi ostali haplotipovi HLA-A~B~C~DRB1~DQB1 pojavili su se samo jedanput.

Među primateljima, njih 18 imalo je barem jedan alel koji se u hrvatskoj populaciji pojavljuje s učestalošću ≤1%. Bolesnici broj 8, 10, 20, 22, 32 i 33 imali su po dva alela HLA s učestalošću <1%, dok je bolesnik broj 24 imao sveukupno četiri takva alela, odnosno po dva alela na svakom od haplotipova HLA.

Tablica 6. Prikaz haplotipova HLA-A~B~C~DRB1~DQB1 primatelja i njihovih davatelja u programu haploidentične TKMS

Par P/D	Haplotip HLA-A*~B*~C*~DRB1*~DQB1*						Haplotip HLA-A*~B*~C*~DRB1*~DQB1*				
1	80:01[#]	58:01		03:01		P	01:01	18:01		03:01	
	80:01	58:01		03:01		D	24:02	07:02		08:01	
2	02:01	51:01	15:02	01:01	05:01	P	02:01	39:03[#]	12:03	11:04	03:01
	02:01	51:01	15:02	01:01	05:01	D	24:02	44	05:01	07:01	02:02
3	02:01	39:01		13:01		P	32:01	13:02		10:01	
	02:01	39:01		13:01		D	32:01	07:02		15:01	
4	03:01	44:02	05:01	16:01	05:02	P	30:01	51:01	16:02	11:04	03:01
	03:01	44:02	05:01	16:01	05:02	D	03:01	07:02	07:02	11:04	03:01
5	02:01	44:27	07:04	14:54	05:03	P	24:02	48:01[#]	08:01	04:02	03:02
	02:01	44:27	07:04	14:54	05:03	D	02:01	39:01	12:03	16:01	05:02
6	25:01	18:01	12:03	15:01	06:02	P	01:01	08:01	07:01	03:01	02:01
	25:01	18:01	12:03	15:01	06:02	D	11:01	51:01	12:03	04:04	03
7	11:01	37:01[#]	06:02	10:01	05:01	P	24:02	50:01	06:02	07:01	02:02
	11:01	37:01	06:02	10:01	05:01	D	02:01	44:02	05:01	12:01	03:01
8	68:02[#]	15:17[#]	16:01	13:02	06:04	P	02:01	57:01	06:02	07:01	03:03
	68:02	15:17	16:01	13:02	06:04	D	02:01	27:05	02:02	01:01	05:01
9	24:02	18:01		15:01		P	26:01	51:01		13:01	
	24:02	18:01		15:01		D	24:02	50:01		07:01	

[#] – aleli HLA s učestalošću <1,0% u hrvatskoj populaciji; P – primatelj; D – davatelj

Nastavak Tablice 6

Par	P/D	Haplotip HLA-A*~B*~C*~DRB1*~DQB1*						Haplotip HLA-A*~B*~C*~DRB1*~DQB1*				
10		32:01	40:02	02:02	16:02	05:02	P	02:06#	40:01	04:01	09:01#	03:03
		32:01	40:02	02:02	16:02	05:02	D	03:01	51:01	12:03	11:04	03:01
11		03:02#	51:01		04:02		P	11:01	35:01		08:01	
		03:02	51:01		04:02		D	01:01	37:01		01:01	
12		02:01	18:01	07:01	11:01	03:01	P	01:01	44:02	07:01	16:01	05:02
		02:01	18:01	07:01	11:01	03:01	D	03:01	37:01	06:02	16:01	05:02
13		30:01	13:02	06:02	07:01	02:02	P	11:01	15:01	03:03	13:01	06:02
		30:01	13:02	06:02	07:01	02:02	D	01:01	08:01	07:01	04:02	03:02
14		24:02	18:01	12:03	11:04	03:01	P	02:01	51:01	14:02	08:01	04:02
		24:02	18:01	12:03	11:04	03:01	D	02:01	44:02	05:01	15:01	06:02
15		32:01	44:02	05:01	16:01	05:02	P	68:01	56:01	01:02	15:01	06:02
		32:01	44:02	05:01	16:01	05:02	D	25:01	40	02:02	11	03:01
16		24:02	35:01	04:01	11:04	03:01	P	02:05#	50:01	06:02	07:01	02:02
		24:02	35:01	04:01	11:04	03:01	D	25:01	49:01	07:01	11:04	03:01
17		24:02	07:02		15:01		P	02:01	51:01		11:04	
		24:02	07:02		15:01		D	03:01	07:02		11:04	
18		02:01	51:01	15:02	01:01	05:01	P	03:01	57:03#	07:01	14:54	06:02
		02:01	51:01	15:02	01:01	05:01	D	02:01	40:01	03:04	04:04	03:02

– aleli HLA s učestalošću <1,0% u hrvatskoj populaciji; P – primatelj; D – davatelj

Nastavak Tablice 6

Par	P/D	Haplotip HLA-A*~B*~C*~DRB1*~DQB1*						Haplotip HLA-A*~B*~C*~DRB1*~DQB1*				
19		02:01	51:01	12:03	01:01	05:01	P	01:01	35:02	06:02	13:03#	03:01
		02:01	51:01	12:03	01:01	05:01	D	26:01	15:01	03:01	04:01	03:02
20		01:01	41:01#	17:01	10:01	05:01	P	02:01	51:08#	16:02	12:01	03:01
		01:01	41:01	17:01	10:01	05:01	D	02:01	39:01	12:03	12:01	03:01
21		31:01	18:01	07:01	14:01	05:03	P	02:05#	14:02	08:02	13:01	06:03
		31:01	18:01	07:01	14:01	05:03	D	11:01	35:01	04:01	13:02	06:09
22		26:01	47:01#	06:02	11:04	03:01	P	03:02#	35:03	04:01	14:54	05:03
		26:01	47:01	06:02	11:04	03:01	D	01:01	08:01	07:01	03:01	02:01
23		24:02	55:01	03:03	16:01	05:02	P	02:01	51:08#	16:01	13:02	06:04
		24:02	55:01	03:03	16:01	05:02	D	32:01	27:05	02:01	15:01	06:04
24		30:04#	14:01#	08:02	15:01	05:02	P	24:02	41:01#	07:01	13:05#	03:01
		30:04	14:01	08:02	15:01	05:02	D	01:01	18:01	07:01	11:04	03:01
25		03:01	35:01	04:01	01:01	05:01	P	03:01	35:01	04:01	12:01	03:01
		03:01	35:01	04:01	01:01	05:01	D	11:01	52:01	12:03	15:02	06:02
26		02:01	51:01		10:01		P	03:01	35:03		13:03#	
		02:01	51:01		10:01		D	03:01	35		01:01	
27		03:01	14:02	08:02	01:02	05:01	P	11:01	07:02	12:03	15:01	05:02
		03:01	14:02	08:02	01:02	05:01	D	02:01	08:01	08:02	03:01	05:01

– aleli HLA s učestalošću <1,0% u hrvatskoj populaciji; P – primatelj; D – davatelj

Nastavak Tablice 6

Par P/D	Haplotip HLA-A*~B*~C*~DRB1*~DQB1*						Haplotip HLA-A*~B*~C*~DRB1*~DQB1*				
28	68:01	35:03		04:01		P	02:01	18:01		15:01	
	68:01	35:03		04:01		D	01:01	08:01		03:01	
29	02:01	44:02	01:02	13:01	06:03	P	02:01	51:01	16:02	16:01	05:02
	02:01	44:02	01:02	13:01	06:03	D	32:01	51:01	02:01	16:01	05:02
30	33:01	14:02	08:02	01:02	05:01	P	03:01	07:02	07:01	11:01	03:01
	33:01	14:02	08:02	01:02	05:01	D	02:01	35:03	12:03	16:01	05:02
31	02:01	18:01	12:03	15:01	06:02	P	11:01	07:02	12:03	15:01	05:02
	02:01	18:01	12:03	15:01	06:02	D	02:01	38:01	12:03	15:01	06:02
32	24:03[#]	55:01	03:03	13:02	06:04	P	24:02	44:05[#]	02:02	14:01	05:03
	24:03	55:01	03:03	13:02	06:04	D	02	51		11	
33	24:03[#]	55:01	03:03	13:02	06:04	P	24:02	44:05[#]	02:02	14:01	05:03
	24:03	55:01	03:03	13:02	06:04	D	02	51		11	

[#] – aleli HLA s učestalošću <1,0% u hrvatskoj populaciji; P – primatelj; D – davatelj

U Tablici 7 prikazane su učestalosti i poredak haplotipova HLA-A~B~C~DRB1~DQB1 u populacijama europskog podrijetla prema bazi HaploStats National Marrow Donor Program (41).

Od 62 haplotipa opaženih među bolesnicima, njih osam (12,9%) ulazi u skupinu 100 najčešćih haplotipova HLA-A~B~C~DRB1~DQB1 u populacijama europskog podrijetla. Kao što je već spomenuto, haplotip HLA-A*11:01~B*07:02~C*12:03~DRB1*15:01~DQB1*05:02 bio je prisutan kod dva bolesnika. Deset opaženih haplotipova (16,1%) HLA-A~B~C~DRB1~DQB1 po svojim učestalostima spadaju u skupinu haplotipova poretkom između 100.-og i 500.-og mjesta. Najveći broj uočenih haplotipova HLA-A~B~C~DRB1~DQB1, njih 19 (30,6%), u grupi je haplotipova na pozicijama između 500.-og i 5000.-og mjesta po učestalosti. Dvadeset i tri haplotipa HLA-A~B~C~DRB1~DQB1 (37,1%) po učestalostima u populacijama europskog podrijetla spada u rijetke haplotipove i nalazi se na pozicijama >5000. mjesta, dok za dva haplotipa (Tablica 7) nema podataka o njihovoj zastupljenosti u populacijama europskog podrijetla.

Najmanje zastupljen haplotip HLA-A~B~C~DRB1~DQB1 koji je bio prisutan među bolesnicima je HLA-A*30:04~B*14:01~C*08:02~DRB1*15:01~DQB1*05:02 (157700. pozicija). Bolesnik 24 imao je oba haplotipa HLA-A~B~C~DRB1~DQB1 s izrazito malom učestalošću.

Tablica 7. Učestalost i poredak haplotipova HLA-A~B~C~DRB1~DQB1 u populacijama europskog podrijetla#

Bolesnik		Haplotip HLA-A*~B*~C*~DRB1*~DQB1*	%	poredak
B1	Z	HLA-A*80:01~B*58:01~DRB1*03:01	9,90E-05	10122
	R	HLA-A*01:01~B*18:01~DRB1*03:01	3,31E-04	476
B2	Z	HLA-A*02:01~B*51:01~C*15:02~DRB1*01:01~DQB1*05:01	2,71E-01	522
	R	HLA-A*02:01~B*39:03~C*12:03~DRB1*11:04~DQB1*03:01	1,35E-04	63677
B3	Z	HLA-A*02:01~B*39:01~DRB1*13:01	4,61E-04	339
	R	HLA-A*32:01~B*13:02~DRB1*10:01	2,69E-02	3279
B4	Z	HLA-A*03:01~B*44:02~C*05:01~DRB1*16:01~DQB1*05:02	2,13E-02	4394
	R	HLA-A*30:01~B*51:01~C*16:02~DRB1*11:04~DQB1*03:01	4,06E-03	12248
B5	Z	HLA-A*02:01~B*44:02~C*07:04~DRB1*14:54~DQB1*05:03	1,15E-04	1195
	R	HLA-A*24:02~B*48:01~C*08:01~DRB1*04:02~DQB1*03:02	2,55E-03	15616

Nastavak Tablice 7

Bolesnik		Haplotip HLA-A*~B*~C*~DRB1*~DQB1*	%	poredak
B6	Z	HLA-A*25:01~B*18:01~C*12:03~DRB1*15:01~DQB1*06:02	5,04E-03	17
	R	HLA-A*01:01~B*08:01~C*07:01~DRB1*03:01~DQB1*02:01	5,98E-02	1
B7	Z	HLA-A*11:01~B*37:01~C*06:02~DRB1*10:01~DQB1*05:01	1,03E-04	1306
	R	HLA-A*24:02~B*50:01~C*06:02~DRB1*07:01~DQB1*02:02	1,78E-04	780
B8	Z	HLA-A*68:02~B*15:17~C*16:01~DRB1*13:02~DQB1*06:04	2,64E-06	15337
	R	HLA-A*02:01~B*57:01~C*06:02~DRB1*07:01~DQB1*03:03	5,42E-03	16
B9	Z	HLA-A*24:02~B*18:01~DRB1*15:01	2,12E-04	388
	R	HLA-A*26:01~B*51:01~DRB1*13:01	1,66E-04	871
B10	Z	HLA-A*32:01~B*40:02~C*02:02~DRB1*16:02~DQB1*05:02	2,21E-04	644
	R	HLA-A*02:06~B*40:01~C*04:01~DRB1*09:01~DQB1*03:03	1,68E-07	58071
B11	Z	HLA-A*03:02~B*51:01~DRB1*04:02	7,09E-05	1754
	R	HLA-A*11:01~B*35:01~DRB1*08:01	2,42E-04	628
B12	Z	HLA-A*02:01~B*18:01~C*07:01~DRB1*11:01~DQB1*03:01	1,06E-03	112
	R	HLA-A*01:01~B*44:02~C*07:01~DRB1*16:01~DQB1*05:02	8,82E-07	26700
B13	Z	HLA-A*30:01~B*13:02~C*06:02~DRB1*07:01~DQB1*02:02	6,68E-03	12
	R	HLA-A*11:01~B*15:01~C*03:03~DRB1*13:01~DQB1*06:02	nema podataka	
B14	Z	HLA-A*24:02~B*18:01~C*12:03~DRB1*11:04~DQB1*03:01	8,12E-04	157
	R	HLA-A*02:01~B*51:01~C*14:02~DRB1*08:01~DQB1*04:02	1,02E-03	120
B15	Z	HLA-A*32:01~B*44:02~C*05:01~DRB1*16:01~DQB1*05:02	5,33E-05	2273
	R	HLA-A*68:01~B*56:01~C*01:02~DRB1*15:01~DQB1*06:02	6,34E-06	9391
B16	Z	HLA-A*24:02~B*35:01~C*04:01~DRB1*11:04~DQB1*03:01	2,41E-04	593
	R	HLA-A*02:05~B*50:01~C*06:02~DRB1*07:01~DQB1*02:02	3,04E-03	32
B17	Z	HLA-A*24:02~B*07:02~DRB1*15:01	6,99E-03	12
	R	HLA-A*02:01~B*51:01~DRB1*11:04	5,17E-04	309
B18	Z	HLA-A*02:01~B*51:01~C*15:02~DRB1*01:01~DQB1*05:01	2,71E-04	522
	R	HLA-A*03:01~B*57:03~C*07:01~DRB1*14:54~DQB1*06:02	1,98E-06	17832
B19	Z	HLA-A*02:01~B*51:01~C*12:03~DRB1*01:01~DQB1*05:01	2,65E-05	3786
	R	HLA-A*01:01~B*35:02~C*06:02~DRB1*13:03~DQB1*03:01	1,45E-06	20899

Nastavak Tablice 7

Bolesnik		Haplotip HLA-A*~B*~C*~DRB1*~DQB1*	%	poredak
B20	Z	HLA-A*01:01~B*41:01~C*17:01~DRB1*10:01~DQB1*05:01	8,47E-05	1547
	R	HLA-A*02:01~B*51:08~C*16:02~DRB1*12:01~DQB1*03:01	1,10E-05	6769
B21	Z	HLA-A*31:01~B*18:01~C*07:01~DRB1*14:01~DQB1*05:03	2,18E-05	4335
	R	HLA-A*02:05~B*14:02~C*08:02~DRB1*13:01~DQB1*06:03	3,64E-06	12980
B22	Z	HLA-A*26:01~B*47:01~C*06:02~DRB1*11:04~DQB1*03:01	1,97E-06	17913
	R	HLA-A*03:02~B*35:03~C*04:01~DRB1*14:54~DQB1*05:03	1,71E-05	5072
B23	Z	HLA-A*24:02~B*55:01~C*03:03~DRB1*16:01~DQB1*05:02	1,39E-04	1010
	R	HLA-A*02:01~B*51:08~C*16:01~DRB1*13:02~DQB1*06:04	nema podataka	
B24	Z	HLA-A*30:04~B*14:01~C*08:02~DRB1*15:01~DQB1*05:02	4,71E-09	157700
	R	HLA-A*24:02~B*41:01~C*07:01~DRB1*13:05~DQB1*03:01	9,83E-06	7256
B25	Z	HLA-A*03:01~B*35:01~C*04:01~DRB1*01:01~DQB1*05:01	1,18E-02	6
	R	HLA-A*03:01~B*35:01~C*04:01~DRB1*12:01~DQB1*03:01	1,23E-04	1123
B26	Z	HLA-A*02:01~B*51:01~DRB1*10:01	1,13E-04	1199
	R	HLA-A*03:01~B*35:03~DRB1*13:03	6,38E-06	7281
B27	Z	HLA-A*03:01~B*14:02~C*08:02~DRB1*01:02~DQB1*05:01	1,17E-03	96
	R	HLA-A*11:01~B*07:02~C*12:03~DRB1*15:01~DQB1*05:02	9,21E-07	26091
B28	Z	HLA-A*68:01~B*35:03~DRB1*04:01	3,54E-04	449
	R	HLA-A*02:01~B*18:01~DRB1*15:01	1,03E-03	140
B29	Z	HLA-A*02:01~B*44:02~C*01:02~DRB1*13:01~DQB1*06:03	1,32E-05	6000
	R	HLA-A*02:01~B*51:01~C*16:02~DRB1*16:01~DQB1*05:02	3,11E-05	3443
B30	Z	HLA-A*33:01~B*14:02~C*08:02~DRB1*01:02~DQB1*05:01	4,93E-03	18
	R	HLA-A*03:01~B*07:02~C*07:01~DRB1*11:01~DQB1*03:01	1,79E-06	18801
B31	Z	HLA-A*02:01~B*18:01~C*12:03~DRB1*15:01~DQB1*06:02	3,84E-04	362
	R	HLA-A*11:01~B*07:02~C*12:03~DRB1*15:01~DQB1*05:02	9,21E-07	26091
B32	Z	HLA-A*24:03~B*55:01~C*03:03~DRB1*13:02~DQB1*06:04	7,56E-08	88050
	R	HLA-A*24:02~B*44:05~C*02:02~DRB1*14:01~DQB1*05:03	1,23E-05	6292
B33	Z	HLA-A*24:03~B*55:01~C*03:03~DRB1*13:02~DQB1*06:04	7,56E-08	88050
	R	HLA-A*24:02~B*44:05~C*02:02~DRB1*14:01~DQB1*05:03	1,23E-05	6292

[#] – prema bazi HaploStats National Marrow Donor Program; B – bolesnik; Z – haplotip HLA koji dijele bolesnik i davatelj; R – haplotip HLA koji ima bolesnik, a nema davatelj

4.3. Raspodjela gena KIR u skupini bolesnika i njihovih haploidentičnih davatelja u programu TKMS

Analiza učestalosti gena KIR obuhvatila je 33 primatelja i 32 davatelja KMS te usporedbu s kontrolnom skupinom ispitanika. Učestalosti gena KIR prikazani su u Tablici 8.

Geni okvira čitanja (*KIR2DL4*, *KIR2DL3*, *KIR3DL3* i *KIR3DP1*) prisutni su u svim ispitivanim skupinama sa 100%-tnom učestalošću. Najučestaliji geni za inhibicijske receptore KIR u skupini bolesnika su *KIR3DL1* i *KIR2DL1* (97,0%). Gen *KIR3DL1* također je najučestaliji gen za inhibicijske receptore KIR u skupini davatelja (100%), kao i u kontrolnoj skupini (95,9%). U svim ispitivanim skupinama najučestaliji gen za aktivacijske receptore KIR je *KIR2DS4*. Korišteni test za određivanje gena KIR omogućuje razlikovanje potpune (*KIR2DS4f*) i deletirane (*KIR2DS4d*) varijante gena *KIR2DS4*. Izračunate učestalosti alela u skupini bolesnika i davatelja ukazale su na znatno veću učestalost alela *KIR2DS4d* u odnosu na alel *KIR2DS4f*, što je u skladu s učestalostima u kontrolnoj skupini. Drugi najučestaliji gen za aktivacijske receptore KIR u skupini bolesnika i njihovih haploidentičnih davatelja je gen *KIR3DS1* (60,6%, odnosno 53,1%) što je statistički značajno više u usporedbi s kontrolnom skupinom (P=0,00229, odnosno P=0,0225).

Statistički značajno odstupanje u učestalosti gena KIR između skupine bolesnika i kontrolne skupine također je uočeno za gen *KIR2DS5* (P=0,0032), dok je za gen *KIR2DS1* uočena statistički značajna razlika u učestalosti između skupine haploidentičnih davatelja KMS i kontrole (P=0,0388), a razlika između skupine bolesnika i kontrolne skupine na granici je statističke značajnosti (P=0,0649).

Tablica 8. Učestalost gena KIR kod bolesnika (N=33), njihovih haploidentičnih davatelja (N=32) i kontrolnih ispitanika (N=121)

	bolesnici (N=33)	davatelji (N=32)	kontrola (N=121)		
Gen KIR	**n (%)**	**n (%)**	**n (%)**	**P1**	**P2**
3DL1	32 (97,0)	32 (100,0)	116 (95,9)	1,0000	0,5844
2DL1	32 (97,0)	30 (93,8)	115 (95,0)	1,0000	0,6732
2DL3	30 (91,0)	27 (84,4)	115 (95,0)	0,4042	0,0529
2DS4	31 (94,0)	31 (96,9)	117 (96,7)	0,6092	1,0000
2DS4f[#]	9 (27,3)	8 (25,0)	53 (43,8)	0,1096	0,0678
2DS4d[#]	26 (78,8)	28 (87,5)	101 (83,5)	0,7972	0,7856
2DL2	20 (60,6)	17 (53,1)	66 (54,5)	0,5599	1,0000
2DL5	21 (63,6)	17 (53,1)	59 (48,8)	0,1690	0,6949
3DS1	20 (60,6)	17 (53,1)	37 (30,6)	0,00229*	0,0225*
2DS1	17 (51,5)	15 (46,9)	39 (32,2)	0,0649	0,0388*
2DS2	19 (57,6)	16 (50,0)	66 (54,5)	0,8444	0,6931
2DS3	11 (33,3)	12 (37,5)	41 (33,9)	1,0000	0,8348
2DS5	16 (48,5)	10 (31,3)	25 (20,7)	0,0032*	0,2381
2DL4	33 (100,0)	32 (100,0)	121 (100,0)	1,0000	1,0000
3DL2	33 (100,0)	32 (100,0)	121 (100,0)	1,0000	1,0000
3DL3	33 (100,0)	32 (100,0)	121 (100,0)	1,0000	1,0000
2DP1	33 (100,0)	30 (93,8)	116 (95,9)	0,5853	0,6370
3DP1	33 (100,0)	32 (100,0)	121 (100,0)	1,0000	1,0000

* – statistički značajno (P<0,05); n – broj uočenih gena KIR; P1 – usporedba bolesnika s kontrolom; P2 – usporedba haploidentičnih davatelja s kontrolom; [#] – dvije alelne varijante gena *KIR2DS4* koje kodiraju potpuni (*KIR2DS4f*) ili deletirani (*KIR2DS4d*) oblik receptora

4.4. Raspodjela genotipova KIR u ispitivanoj skupini bolesnika i njihovih haploidentičnih davatelja u programu TKMS

U skupini bolesnika uočeno je 18 različitih genotipova KIR (Tablica 9). Učestalost genotipova skupine AA iznosi 21,2%, a skupine Bx 78,8%. Najčešći genotip KIR kod bolesnika bio je genotip AA1 (21,2%). Nije bio prisutan niti jedan drugi genotip KIR AA. Istovremeno, najčešći genotip KIR Bx je genotip Bx2 (12,1%). U skupini haploidentičnih davatelja određeno je 16 različitih genotipova KIR (Tablica 10), među kojima je učestalost genotipova skupine AA 31,2%, a skupine Bx 68,8%. Najčešći genotip KIR bio je AA1

(31,2%). Među genotipovima Bx najzastupljeniji je bio Bx7 (12,5%). Genotipovi KIR koji su uočeni i kod bolesnika i u skupini haploidentičnih davatelja su AA1, Bx2, Bx4, Bx5, Bx6, Bx73 i Bx188. Jedanaest genotipova KIR uočeno je samo kod bolesnika (Bx3, Bx9, Bx13, Bx17, Bx28, Bx68, Bx90, Bx93,Bx94, Bx336 i Bx391) dok je devet genotipova KIR (Bx7, Bx14, Bx15, Bx18, Bx64, Bx72, Bx76, Bx325 i Bx347) uočeno samo u skupini haploidentičnih davatelja, ne i kod bolesnika.

Tablica 9. Raspodjela genotipova KIR među bolesnicima u programu haploidentične TKMS (N=33)

																bolesnici (N=33)	
3DL1	*2DL1*	*2DL3*	*2DS4*	*2DL2*	*2DL5*	*3DS1*	*2DS1*	*2DS2*	*2DS3*	*2DS5*	*2DL4*	*3DL2*	*3DL3*	*2DP1*	*3DP1*	**Genotip**	**n (%)**
																AA1	7 (21,2)
																Bx2	4 (12,1)
																Bx3	3 (9,1)
																Bx4	2 (6,1)
																Bx5	2 (6,1)
																Bx6	3 (9,1)
																Bx9	1 (3,0)
																Bx13	1 (3,0)
																Bx17	1 (3,0)
																Bx28	1 (3,0)
																Bx68	1 (3,0)
																Bx73	1 (3,0)
																Bx90	1 (3,0)
																Bx93	1 (3,0)
																Bx94	1 (3,0)
																Bx188	1 (3,0)
																Bx336	1 (3,0)
																Bx391	1 (3,0)

n – broj uočenih genotipova; plavo – gen prisutan; bijelo – gen nije prisutan

Tablica 10. Raspodjela genotipova KIR među haploidentičnim davateljima KMS (N=32)

3DL1	*2DL1*	*2DL3*	*2DS4*	*2DL2*	*2DL5*	*3DS1*	*2DS1*	*2DS2*	*2DS3*	*2DS5*	*2DL4*	*3DL2*	*3DL3*	*2DP1*	*3DP1*	**Genotip**	**davatelji (N=32) n (%)**
																AA1	10 (31,2)
																Bx2	2 (6,3)
																Bx4	1 (3,1)
																Bx5	2 (6,3)
																Bx6	2 (6,3)
																Bx7	4 (12,5)
																Bx14	1 (3,1)
																Bx15	1 (3,1)
																Bx18	1 (3,1)
																Bx64	1 (3,1)
																Bx72	1 (3,1)
																Bx73	2 (6,3)
																Bx76	1 (3,1)
																Bx188	1 (3,1)
																Bx325	1 (3,1)
																Bx347	1 (3,1)

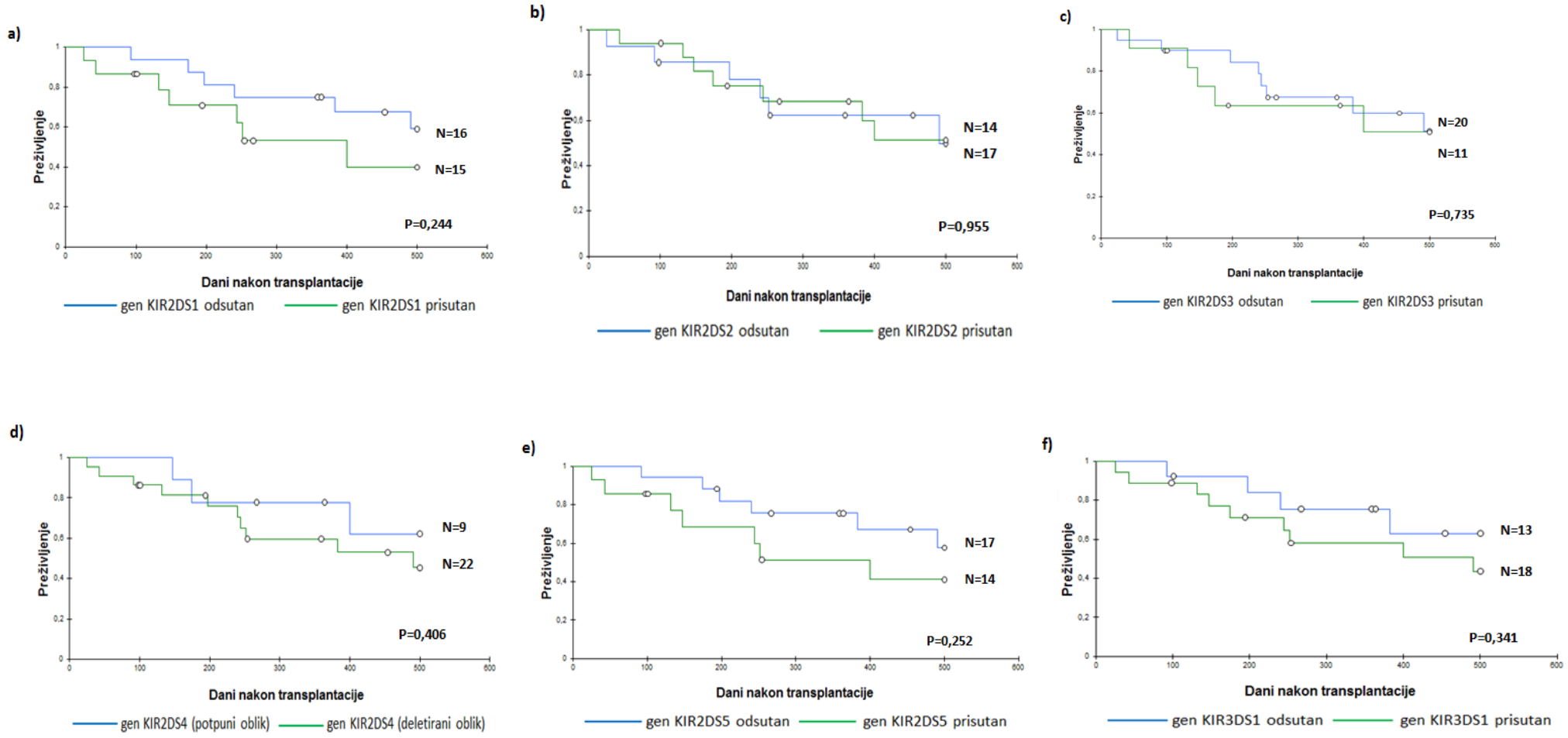
n – broj uočenih genotipova; plavo – gen prisutan; bijelo – gen nije prisutan

4.5. Utjecaj gena KIR na preživljenje bolesnika liječenih haploidentičnom TKMS

U analizu utjecaja gena KIR na ishod haploidentične TKMS bio je uključen samo 31 par primatelj/davatelj budući da kod dva para primatelj/davatelj nije prošao dovoljno dugi vremenski period između TKMS i procjene stanja bolesnika. S obzirom da nakon liječenja TKMS krvotvorni sustav davatelja zamjenjuje krvotvorni sustav primatelja, novonastale stanice NK koje se stvaraju u primatelju eksprimiraju receptore KIR davatelja. Iz tog razloga je rađena analiza utjecaja aktivacijskih gena KIR haploidentičnog davatelja na preživljenje primatelja. Prema dobivenim rezultatima, prisutnost ili odsutnost bilo kojeg aktivacijskog gena KIR u genotipu davatelja nije pokazala statistički značajan utjecaj na preživljenje bolesnika.

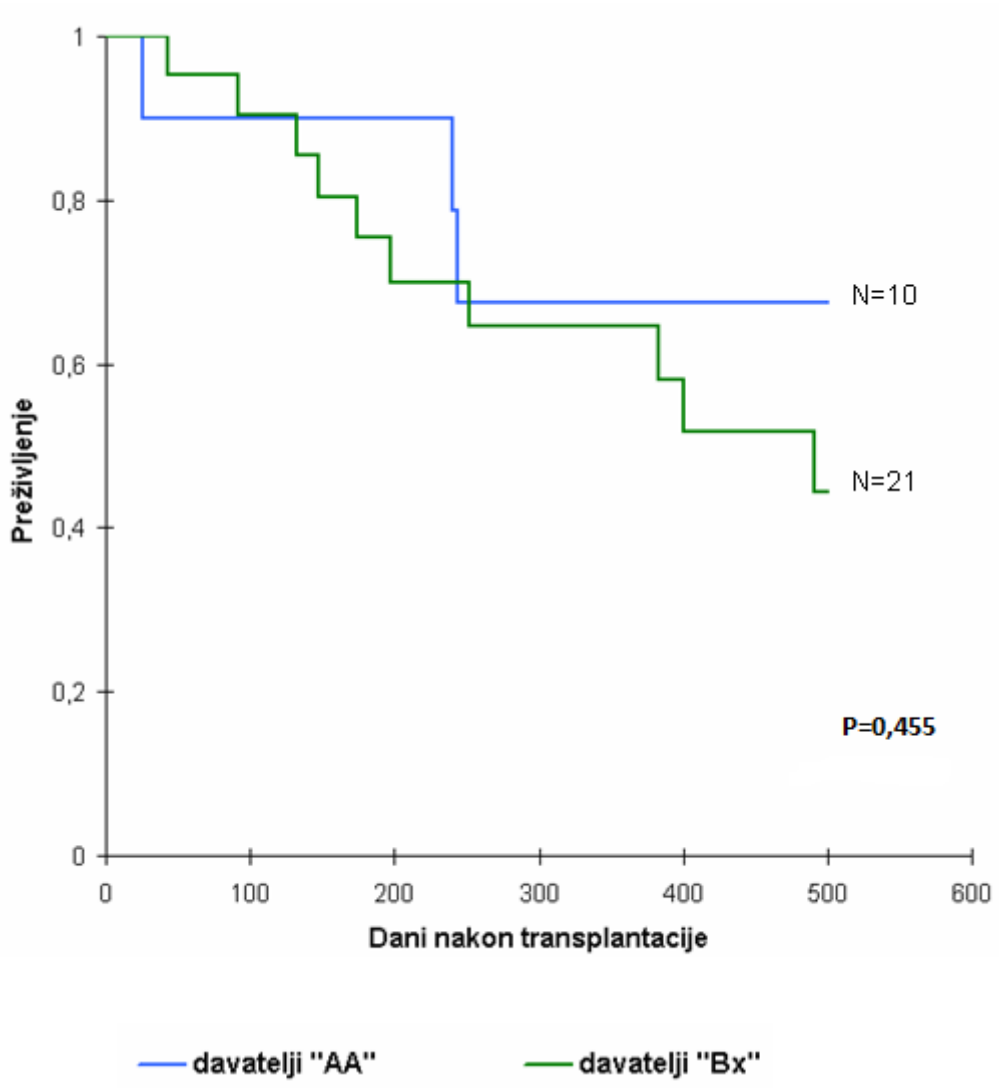
Stopa preživljenja bolesnika 500 dana nakon TKMS bila je podjednaka među bolesnicima čiji su davatelji bili pozitivni, odnosno negativni za gen *KIR2DS3* (Slika 10a). Prisutnost, odnosno odsutnost gena *KIR2DS2* (Slika 10b) u genotipu davatelja također nije imala utjecaja na preživljenje bolesnika u programu haploidentične TKMS. S druge strane, prisutnost gena *KIR2DS1* u genotipu davatelja ukazivala je na potencijalno lošije preživljenje u odnosu na bolesnike čiji su davatelji bili negativni za taj gen (Slika 10c). Slični rezultati dobiveni su i u slučaju gena *KIR3DS1* (Slika 10e) i gena *KIR2DS5* (Slika 10f).

Uočeno je da prisutnost potpunog oblika gena *KIR2DS4* u genotipu davatelja, iako nije statistički značajno, ukazuje na bolje preživljenje bolesnika 500 dana nakon TKMS nego u slučaju davatelja koji imaju deletirani oblik gena *KIR2DS4* (Slika 10d).



Slika 10. Grafički prikaz preživljenja bolesnika do 500 dana nakon haploidentične TKMS ovisno o prisutnosti aktivacijskih gena KIR kod davatelja. a) Gen KIR2DS1; b) Gen KIR2DS2; c) Gen KIR2DS3; d) Gen KIR2DS4; e) Gen KIR2DS5; f) Gen KIR3DS1

Analiza utjecaja genotipa KIR davatelja na preživljenje bolesnika 500 dana nakon haploidentične TKMS nije pokazala statistički značajnu razliku iako postoji tendencija boljeg preživljenja ukoliko je davatelj imao KIR genotip AA nego ako je davatelj imao KIR genotip Bx (Slika 11), odnosno ukoliko davatelj u genotipu KIR nije imao aktivacijskih gena KIR.



Slika 11. Grafički prikaz preživljenja bolesnika do 500 dana nakon haploidentične TKMS ovisno o genotipu KIR davatelja.

5. RASPRAVA

U nedostatku pogodnog davatelja KMS (genotipski HLA identičnog srodnog davatelja ili fenotipski HLA identičnog nesrodnog davatelja) sve se veći broj bolesnika liječi haploidentičnom TKMS sa srodnog davatelja, budući da virtualno svi bolesnici imaju barem jednog HLA haploidentičnog davatelja. Posljednjih nekoliko godina ovaj oblik TKMS je u porastu te je pretekao TKMS s umbilikalnom krvi zbog veće količine KMS u uzorku transplantata te bržeg oporavka krvotvornog sustava u primatelju. Nedostatak haploidentične TKMS sa srodnog davatelja je visoka stopa odbacivanja transplantata i pojava reakcije GvHD (42), zbog čega je broj bolesnika liječenih haploidentičnom TKMS još uvijek manji od broja bolesnika liječenih TKMS s genotipski HLA identičnog srodnog davatelja ili TKMS s fenotipski HLA identičnog nesrodnog davatelja.

Ovim retrospektivnim istraživanjem obuhvaćena je skupina od 33 bolesnika u programu liječenja haploidentičnom TKMS, od kojih je većina imala dijagnozu akutne mijeloične leukemije (AML) što je u skladu s podacima i za druga istraživanja ovog tipa (43). Naime, dijagnoze koje se najčešće liječe ovim oblikom TKMS su upavo AML i Hodgkinov limfom (HL), a često je biran i kao metoda liječenja mijelodisplastičnih sindroma (44).

Jedno od ograničenja haploidentične TKMS je prisutnost protutijela anti-HLA kod bolesnika i to ne svih već samo onih uperenih protiv davatelja, tzv. DSA. U slučaju prisutnosti DSA potrebno je ili izabrati drugog HLA haploidentičnog davatelja ili provesti desenzibilizaciju tj. plazmaferezu kod bolesnika. Uklanjanje DSA nužno je kako ne bi došlo do oštećenja novonastalih krvnih stanica zbog reakcije davateljevih antigena HLA i DSA, što bi onemogućilo pozitivan ishod TKMS. Među ispitivanim bolesnicima u ovom radu njih četiri imala su DSA te su prije TKMS podvrgnuti plazmaferezi. Kod jednog bolesnika su se i nakon opetovanih postupaka plazmafereze zadržala DSA, transplantacija je unatoč tome izvršena zbog stanja bolesnika i hitnosti.

Ovo istraživanje pokazalo je da je raspodjela alela HLA među bolesnicima (unatoč maloj skupini) u skladu s onom među kontrolnim ispitanicima uz prisutnost nekih razlika. Treba također spomenuti da uočene razlike u učestalosti alela HLA (Tablice 3 i 4) su i očekivane jer upravo zbog prisutnosti takvih manje zastupljenih ili rijetkih alela HLA bolesnici nisu mogli pronaći odgovarajućeg fenotipski HLA identičnog davatelja (10/10 ili 9/10) u hrvatskom registru (CBMDR), a ni u svjetskom registru (WMDA). Naime, veliki broj bolesnika u istraživanju imao je barem jedan manje zastupljen alel HLA (<1%), a neki od njih su imali

dva ili više manje zastupljenih alela HLA (37). Tako na primjer alel HLA-B*39:03 nije bio uočen unutar skupine nesrodnih davatelja (N=4000) iz CBMDR-a koji su analizirani za raznovrsnost alela lokusa HLA-A, -B i -DRB1 (37). Zanimljivo je spomenuti da je alel HLA-B*39:03 dosad opažen u 35 populacija u svijetu, uglavnom u populacijama Južne Amerike (40).

Poznato je da je prisutnost rijetkih i vrlo rijetkih alela HLA jedan od ograničavajućih faktora u pronalaženju podudarnog davatelja (17), ali isto tako i prisutnost neuobičajenih kombinacija alela tj. haplotipova HLA-B~C (37). Neravnoteža udruživanja između alela na bliskim lokusima HLA također ima utjecaj na pronalaženje podudarnog davatelja. Uobičajene kombinacije alela HLA na bliskim lokusima HLA su kombinacije koje se pojavljuju u >1% slučajeva u populaciji. Među bolesnicima obuhvaćenim ovim radom (prikazanim u Tablici 6), u slučaju bolesnika 10 (B*40:01~C*04:01), 19 (B*35:02~C*06:02) i 27 (B*07:02~C*12:03), upravo su neuobičajene kombinacije alela HLA-B~C onemogućile pronalaženje fenotipski HLA identičnog nesrodnog davatelja. Naime, alel B*40:01 u snažnoj je neravnoteži udruživanja s alelom C*03:04. Alel B*35:02 najčešće dolazi u kombinaciji s alelom C*04:01, a alel B*07:02 u kombinaciji s alelom C*07:02 (40). Također i neuobičajena kombinacija alela HLA-DRB1~DQB1 je razlog za izostanak idealnog davatelja s podudarnošću HLA 10/10 što je bio slučaj i kod četiri bolesnika u ovom istraživanju (bolesnici broj 13, 24, 27 i 31 prikazani u Tablici 6).

Analiza zastupljenosti haplotipova HLA-A~B~C~DRB1~DQB1 prisutnih među bolesnicima u usporedbi sa zastupljenošću navedenih haplotipova HLA u svijetu pokazala je da za neke od tih haplotipova nema podataka o zastupljenosti u drugim populacijama (Tablica 8). Iz tog je razloga izbor haploidentičnog davatelja logičan jer bi nastavak traženja podudarnog davatelja bio gubitak vremena.

Učestalost gena KIR među bolesnicima uglavnom je bila u skladu s učestalošću u hrvatskoj populaciji (38). Postoje statistički značajne razlike za gene *KIR2DS5* i *KIR3DS1*. U europskim populacijama gen *KIR2DS5* prisutan je kod oko 20-35% ispitanika (prisutan kod 48,5% bolesnika u ovom istraživanju), dok je gen *KIR3DS1* prisutan kod oko 30-45% ispitanika (prisutan kod 60,6% bolesnika u ovom istraživanju) (40).

Najučestaliji genotipovi KIR zajednički su skupini bolesnika i haploidentičnih davatelja, razlika je u manje učestalim genotipovima koji se pojavljuju samo jednom u skupini. To u konačnici rezultira i podjednakom učestalošću genotipova AA i Bx između ove dvije skupine.

Najčešći genotip KIR među bolesnicima i među davateljima bio je genotip AA1, koji je i najčešći genotip KIR u populacijama europskog podrijetla (40). Također, genotipovi KIR Bx2 i Bx7, najčešći genotipovi KIR Bx među bolesnicima, odnosno haploidentičnim davateljima, među šest su najčešćih genotipova KIR Bx u populacijama europskog podrijetla. Genotip KIR Bx2 opažen je u 161, a genotip KIR Bx7 u 123 populacije europskog podrijetla. U skupini haploidentičnih davatelja od najučestalijih genotipova KIR Bx nije bio opažen genotip KIR Bx3, dok je među bolesnicima bilo opaženo svih pet najčešćih genotipova KIR Bx u europskim populacijama (Bx2, Bx3, Bx4, Bx5 i Bx6) (40).

O utjecaju gena KIR na ishod TKMS postoje brojne studije i različiti pristupi istraživanja, ali još uvijek ne postoji jasan i klinički dokazan učinak njihove interakcije u TKMS. Rezultati u ovom radu nisu pokazali statistički značajnu razliku u preživljenju bolesnika ovisno o prisutnosti/odsutnosti ijednog aktivacijskog gena KIR u genotipu davatelja, ali za svaki od njih može se vidjeti potencijalna tendencija prema boljem ili lošijem preživljenju.

U ovom istraživanju, preživljenje je bilo lošije kod bolesnika čiji su davatelji u genotipu imali aktivacijski gen *KIR2DS1*, što je u suprotnosti s rezultatima istraživanja Venstorma i sur. (45) koje je pokazalo da prisutnost aktivacijskog gena *KIR2DS1* u genotipu davatelja značajno smanjuje stopu relapsa bolesti, ali samo kod bolesnika čiji davatelji na lokusu HLA-C imaju barem jedan alel koji pripada skupini alela HLA-C1 (homozigoti HLA-C1/C1 ili heterozigoti HLA-C1/C2). Stopa relapsa bolesti bila je niža kod bolesnika čiji su davatelji bili negativni za *KIR2DS1* nego kod bolesnika čiji su davatelji bili homozigoti za alele skupine HLA-C2 (45). Da bi se dobile potpunije informacije o preživljenju bolesnika ovisno o prisutnosti gena *KIR2DS1* u genotipu davatelja, potrebno je tipizirati sve davatelje za lokus HLA-C i uzeti u obzir kojoj skupini alela pripadaju te utvrditi je li lošije preživljenje u prisutnosti gena *KIR2DS1* u ovom istraživanju posljedica toga što su davatelji homozigoti za alele skupine HLA-C2.

Prisutnost aktivacijskog gena *KIR2DS2* u genotipu davatelja nije pokazala nikakav utjecaj na preživljenje bolesnika u ovom istraživanju, kao ni prisutnost gena *KIR2DS3*. Rezultati istraživanja Giebel i sur. (46), pokazali su lošije ukupno preživljenje i višu stopu pojave reakcije GvHD u prisutnosti gena *KIR2DS2* u genotipu davatelja, dok je s druge strane istraživanje Neuchel i sur. (47) pokazalo značajno bolje ukupno preživljenje i preživljenje bez povratka bolesti bolesnika u prisutnosti ovog gena u genotipu davatelja, ali u slučaju kad su bolesnik i davatelj bili HLA podudarni 9/10, s razlikom u jednom od gena HLA razreda I, a

bolesnik je bio negativan za skupinu alela HLA-C1. U slučaju kada su bolesnik i davatelj bili HLA podudarni 10/10, nije bilo razlike u preživljenju ovisno o prisutnosti gena *KIR2DS2* u genotipu davatelja. Istraživanje Wu i sur. (48) pokazalo je smanjeno ukupno preživljenje i veću stopu relapsa bolesti u prisutnosti gena *KIR2DS3* u genotipu davatelja unutar kineske populacije, što ne mora vrijediti za populacije europskog podrijetla.

Rezultati ovog istraživanja o utjecaju gena *KIR2DS4* (potpuni ili deletirani oblik) na preživljenje bolesnika nakon TKMS razlikuju se od rezultata Burek Kamenarić i sur. (49), gdje potpuni oblik gena *KIR2DS4f* u genotipu davatelja korelira s lošijim preživljenjem bolesnika, dok u ovom radu prisutnost potpunog oblika gena *KIR2DS4f* pokazuje vrlo malu tendenciju prema boljem preživljenju, iako razlika nije statistički značajna. Uzrok suprotnosti u rezultatima mogao bi biti mali broj ispitanika u ovom istraživanju, ali i razlika u tipu davatelja KMS. Prema literaturi, podudarnost genotipova KIR među srodnicima iznosi oko 51% dok samo 24% nesrodnih osoba ima isti genotip KIR (50). Ovim istraživanjem bili su obuhvaćeni samo haploidentični srodni davatelji, dok je istraživanje Burek Kamenarić i sur. obuhvatilo i nesrodne davatelje. Očekuje se da su razlike u učestalosti gena KIR između bolesnika i srodnih davatelja manje nego između bolesnika i nesrodnih davatelja, zbog čega je teže uočiti potencijalni utjecaj određenog gena KIR na ishod TKMS.

Ovo istraživanje ukazuje na lošije preživljenje bolesnika ukoliko je aktivacijski gen *KIR2DS5* i/ili *KIR3DS1* prisutan u genotipu davatelja, iako bez statističke značajnosti. U istraživanju Neuchel i sur. (47) stopa relapsa bolesti bila je statistički značajno manja u slučaju prisutnosti *KIR2DS5* u genotipu davatelja kod bolesnika koji su bili negativni za alele grupe HLA-C1. U istraživanju Venstrom i sur. (51), preživljenje je bilo bolje u prisutnosti gena *KIR3DS1* u genotipu davatelja, a ustanovljena je i smanjena stopa pojave reakcije GvHD. Ligand receptora KIR3DS1 još je uvijek nepoznat, no s obzirom na strukturne sličnosti s receptorom KIR3DL1, pretpostavlja se da KIR3DS1 također veže molekule HLA s epitopom Bw4. Ustanovljeno je da se kod bolesnika pozitivnih za epitop Bw4 GvHD rjeđe pojavljuje, što sugerira da epitop Bw4 ima zaštitničku ulogu i pridonosi smanjenoj pojavi GvHD, ali nije ustanovljeno sinergističko djelovanje epitopa Bw4 i receptora KIR3DS1 (51).

Dio istraživanja (52, 53) sugerira da je genotip KIR Bx kod davatelja povezan s boljim preživljenjem nakon TKMS i manjom stopom relapsa bolesti, no postoje i istraživanja koja sugeriraju suprotno (54). U ovom istraživanju nije bilo statistički značajne razlike u preživljenju bolesnika ovisno o genotipu KIR davatelja, no tendencija boljeg preživljenja

opažena je kod bolesnika s haploidentičnim davateljem KMS genotipa KIR AA, što je u skladu s opaženim boljim preživljenjem u odsutnosti aktivacijskih gena KIR.

Rezultate dobivene u ovom radu nužno je potvrditi na većem uzorku bolesnika kako u našoj populaciji, tako i u drugim populacijama u svijetu.

6. ZAKLJUČAK

1. Raspodjela alela na lokusima HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1 u ispitivanoj skupini bolesnika u programu liječenja haploidentičnom TKMS u skladu je s raspodjelom alela HLA u hrvatskoj populaciji.
2. Od ukupno 18 bolesnika (54,5%) koji su imali barem jedan rijetki alel HLA, kod njih 13 (72,2%) rijetki se alel nalazio na lokusu HLA-B. Deset bolesnika (55,6%) imalo je rijetki alel HLA-A, a četiri bolesnika (22,2%) na lokusu HLA-DRB1.
3. Neuobičajeni haplotipovi HLA-B~C bili su uočeni kod tri bolesnika (9,1%), dok je četvero bolesnika (12,1%) imalo neuobičajene haplotipove HLA-DRB1~DQB1.
4. Od 62 opažena haplotipa HLA-A~B~C~DRB1~DQB1, njih osam (12,9%) nalazi se u skupini 100 najučestalijih haplotipova u populacijama europskog podrijetla. Ukupno 16 (25,8%) haplotipova HLA bilo je između 100.-og i 1000.-og mjesta, dok je njih 36 (58,1%) bilo iznad 1000.-og mjesta u poretku najučestalijih haplotipova HLA.
5. Za dva (3,2%) uočena haplotipa HLA-A~B~C~DRB1~DQB1 ne postoje podaci o učestalosti u međunarodnim bazama podataka.
6. Učestalosti gena KIR među bolesnicima u skladu su s učestalostima u kontroli, osim učestalosti gena *KIR2DS5* i *KIR3DS1*. Najučestaliji geni za inhibicijske receptore KIR (ne računajući gene okvira čitanja) među bolesnicima bili su *KIR2DL1* i *KIR3DL1*, a najučestaliji gen za aktivacijske receptore KIR bio je *KIR2DS4*.
7. Među bolesnicima bilo je opaženo 18 različitih genotipova KIR, od kojih su najčešći bili genotipovi AA1 i Bx2.
8. Nije dokazan statistički značajan utjecaj gena i genotipova KIR davatelja na preživljenje bolesnika nakon liječenja haploidentičnom TKMS.

7. LITERATURA

1. http://www.who.int/topics/transplantation/en/ (03.04.2018.)
2. Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL (2006) Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. Am J Pathol. 169: 338–346.
3. Williams KM, Gress RE (2009) Immune reconstitution and implications for immunotherapy following haematopoietic stem cell transplantation. Best Pract Res Clin Haematol. 21(3): 579–596.
4. Ogonek J, Kralj Juric M, Ghimire S, Varanasi PR, Holler E, Greinix H, Weissinger E (2016) Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Front Immunol. 7: 507.
5. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giralt S, Lazarus H, Ho V, Apperley J, Slavin S, Pasquini M, Sandmaier BM, Barrett J, Blaise D, Lowski R, Horowitz M (2009) DEFINING THE INTENSITY OF CONDITIONING REGIMENS: working definitions. Biol Blood Marrow Transplant. 15(12): 1628–1633.
6. Dausset J (1958) Isoleuco-anticorps. Acta Haematol 20: 156–166.
7. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3133 (13.06.2018.)
8. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3134 (13.06.2018.)
9. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3135 (13.06.2018.)
10. Choo SY (2007) The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications. 48(1): 11–23.
11. Ingulli E (2010) Mechanism of cellular rejection in transplantation. Pediatr Nephrol. 25(1): 61–74.
12. Choo SY (2007) The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications. Yonsei Med J. 48(1): 11–23.
13. http://hla.alleles.org/alleles/index.html (25.05.2018.)
14. Wieczorek M, Abualrous ET, Sticht J, Álvaro-Benito M, Stolzenberg S, Noé F, Freund C (2017) Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. Front Immunol. 8: 292.
15. Changa AT, Plattb JL (2009) The Role of Antibodies in Transplantation. Transplant Rev (Orlando) 23(4): 191–198.
16. Choi SW, Levine JE, Ferrara JLM (2010) Pathogenesis and Management of Graft versus Host Disease. Immunol Allergy Clin North Am. 30(1): 75–101.

17. Tiercy JM (2016) How to select the best available related or unrelated donor of hematopoietic stem cells? Haematologica. 101(6): 680–687.
18. Fuchs EJ (2012) Haploidentical transplantation for hematologic malignancies: where do we stand? Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2012: 230–236.
19. Ballen KK, Gluckman E, Broxmeyer HE (2013) Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. Blood. 122(4): 491–498.
20. Zahid MF, Rizzieri DA (2016) Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Expanding the Horizon for Hematologic Disorders. Adv Hematol. 2016: 1423493.
21. Michael A. Caligiuri (2008) Human natural killer cells. Blood. 112(3): 461–469.
22. Bozzano F, Marras F, De Maria A (2017) Natural Killer Cell Development and Maturation Revisited: Possible Implications of a Novel Distinct Lin−CD34+DNAM-1brightCXCR4+ Cell Progenitor. Front Immunol. 8: 268.
23. Burek Kamenarić M (2014) Uloga gena KIR u transplantaciji krvotvornih matičnih stanica. Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu. Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek
24. Carrington M, Norman P (2003) The KIR gene cluster. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US)
25. Campbell KS, Purdy AK (2011) Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. Immunology. 132(3): 315–325.
26. Boyton RJ, Altmann DM (2007) Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leucocyte antigen class I in disease. Clin Exp Immunol. 149(1): 1–8.
27. Middleton D, Gonzelez F (2010) The extensive polymorphism of KIR genes. Immunology, 129: 8-19.
28. https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html (25.05.2018.)
29. Moesta AK, Norman PJ, Yawata M, et al. (2008) Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL1 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. J Immunol. 180: 3969–79.
30. Rajalingam R (2011) Human diversity of killer cell immunoglobulin-like receptors and disease. Korean J Hematol 46: 216-228.

31. Yawata M, Yawata N, Draghi M, Partheniou F, Little AM, Parham P (2008) MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK-cell repertoires toward a balance of missing self-response. Blood 112: 2369-2380.
32. Hansasuta P, Dong T, Thananchai H, et al. (2004) Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. Eur J Immunol. 34: 1673–1679.
33. Rajagopalan Long EO (2012) KIR2DL4 (CD158d): An activation receptor for HLA-G. Front Immunol. 3: 258.
34. Stewart CA, Laugier-Anfossi F, Vély F, Saulquin X, Riedmuller J, Tisserant A, Gauthier L, Romagné F, Ferracci G, Arosa FA, Moretta A, Sun PD, Ugolini S, Viviera E (2005) Recognition of peptide–MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 102(37): 13224–13229.
35. Graef T, Moesta AK, Norman PJ, Abi-Rached L, Vago L, Older Aguilar AM, Gleimer M, Hammond JA, Guethlein LA, Bushnell DA, Robinson PJ, Parham P (2009) KIR2DS4 is a product of gene conversion with KIR3DL2 that introduced specificity for HLA-A*11 while diminishing avidity for HLA-C. J Exp Med 206: 2557-2572.
36. Garcia-Beltran WF, Hölzemer A, Martrus G, Chung AW, Pacheco Y, Simoneau CR, Rucevic M, Lamothe-Molina PA, Pertel T, Kim TE, Dugan H, Alter G, Dechanet-Merville J, Jost S, Carrington M, Altfeld M (2016) Open conformers of HLA-F are high-affinity ligands of the activating NK-cell receptor KIR3DS1. Nat Immunol. 17(9): 1067–1074.
37. Grubic Z, Burek Kamenaric M, Mikulic M, Stingl Jankovic K, Maskalan M, Zunec R (2014) HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 allele and haplotype diversity among volunteer bone marrow donors from Croatia. Int J Immunogenet. 41(3): 211-215.
38. Burek Kamenaric M, Grubic Z, Stingl K, Zunec R (2013) Distribution of KIR genes in the Croatian population. Human Immunology 74: 952-956
39. http://www.histocompatibilityandimmunogenetics.com/fundamentals/chapter-5-laboratory-techniques/luminex/ (27.05.2018.)
40. www.allelefrequencies.net/ (15.05.2018.)
41. https://www.haplostats.org/ (17.05.2018.)
42. Parmesar K, Raj K (2016) Haploidentical Stem Cell Transplantation in Adult Haematological Malignancies. Adv Hematol. 2016: 3905907.
43. Babor F, Fischer JC, Uhrberg M (2013) The role of KIR genes and ligands in leukemia surveillance. Front Immunol. 4: 27.

44. Pasquini M., Zhu X. (2014) Current Use and Outcome of Hematopoietic Stem Cell Transplantation: CIBMTR Summary Slides. http://www.cibmtr.org. (08.08.2018.)
45. Venstrom JM, Pittari G, Gooley TA, Chewning JH, Spellman S, Haagenson M, Gallagher MM, Malkki M, Petersdorf E, Dupont B, Hsu KC (2012) HLA-C–Dependent Prevention of Leukemia Relapse by Donor Activating KIR2DS1. N Engl J Med. 367(9): 805–816.
46. Giebel S, Nowak I, Wojnar J, Markiewicz M, Dziaczkowska J, Wylezol I, et al. (2006) Impact of activating killer immunoglobulin-like receptor genotype on outcome of unrelated donor-hematopoietic cell transplantation. Transplant Proc 38(1): 287–91
47. Neuchel C, Fürst D, Niederwieser D, Bunjes D, Tsamadou C, Wulf G, Pfreundschuh M, Wagner E, Stuhler G, Einsele H, Schrezenmeier H, Mytilineos J (2017) Impact of Donor Activating KIR Genes on HSCT Outcome in C1-Ligand Negative Myeloid Disease Patients Transplanted with Unrelated Donors—A Retrospective Study. PLoS One. 12(1)
48. Wu GQ1, Zhao YM, Lai XY, Luo Y, Tan YM, Shi JM, Li L, Zheng WY, Zhang J, Hu XR, Jin AY, He JS, Xie WZ, Ye XJ, Cai Z, Lin MF, Huang H (2010) The beneficial impact of missing KIR ligands and absence of donor *KIR2DS3* gene on outcome following unrelated hematopoietic SCT for myeloid leukemia in the Chinese population. Bone Marrow Transplant. 45(10): 1514-21.
49. Burek Kamenarić M, Stingl Janković K, Grubić Z, Serventi Seiwerth R, Maskalan M, Nemet D, Mikulić M, Žunec R (2016) The impact of *KIR2DS4* gene on clinical outcome after haematopoietic stem cell transplantation. Human Immunology 78: 95-102
50. Palmer JM, Rajasekaran K, Thakar MS, Malarkannan S (2013) Clinical relevance of natural killer cells following hematopoietic stem cell transplantation. J Cancer 4: 25-35.
51. Venstrom JM, Gooley TA, Spellman S, Pring J, Malkki M, Dupont B, Petersdorf E, Hsu KC (2010) Donor activating KIR3DS1 is associated with decreased acute GVHD in unrelated allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Blood. 115(15): 3162–3165.
52. Veronika Bachanova, Weisdorf DJ, Wang T, Marsh SGE, Trachtenberg E, Haagenson MD, Spellman SR, Ladner M, Guethlein LA, Parham P, Miller JS, Cooley SA (2016) Donor KIR B Genotype Improves Progression-Free Survival of Non-Hodgkin

Lymphoma Patients Receiving Unrelated Donor Transplantation. Biology of Blood and Marrow Transplantation. 22: 1602-1607

53. Impola U, Turpeinen H, Alakulppi N, Linjama T, Volin L, Niittyvuopio R, Partanen J, Koskela S (2014) Donor Haplotype B of NK KIR Receptor Reduces the Relapse Risk in HLA-Identical Sibling Hematopoietic Stem Cell Transplantation of AML Patients. Front Immunol. 5: 405.
54. McQueen KL, Dorighi KM, Guethlein LA, Wong R, Sanjanwala B, Parham P (2007) Donor-Recipient Combinations of Group A and B KIR Haplotypes and HLA Class I Ligand Affect the Outcome of HLA-Matched, Sibling Donor Hematopoietic Cell Transplantation. Hum Immunol. 68(5): 309–323.