

# Utjecaj podudarnosti u sustavu HLA na ishod transplantacije krvotvornih matičnih stanica

---

Hukelj, Marina

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:014516>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-20**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Marina Hukelj

**Utjecaj podudarnosti HLA na ishod  
transplantacije krvotvornih matičnih  
stanica**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Marina Hukelj

**The impact of HLA matching on outcome  
of hematopoietic stem cell transplantation**

Master thesis

Zagreb, 2022.

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

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Utjecaj podudarnosti HLA na ishod transplantacije krvotvornih matičnih stanica

Marina Hukelj

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Transplantacija krvotvornih matičnih stanica (TKMS) koristi se u terapiji raznih malignih i nemalignih oboljenja. Glavni ograničavajući čimbenik u ishodu alogenične TKMS su geni glavnog sustava tkivne podudarnost (engl. *Human Leukocyte Antigens*, HLA). TKMS od nesrodnog davatelja povećava rizik reakcije transplantata protiv primatelja (engl. *Graft versus Host Disease*, GvHD), odbacivanja transplantata te smanjuje preživljavanje. Cilj rada bio je odrediti razinu i smjer nepodudarnosti HLA na lokusima HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 i -DPB1 u skupini bolesnika (N=54) koji su liječeni alogeničnom TKMS od 9/10 HLA podudarnog nesrodnog davatelja, utvrditi utjecaj HLA i ne-HLA čimbenika na ishod TKMS, odnosno, na pojavu GvHD-a, povrata bolesti te na preživljenje bolesnika. Svi ispitanici testirani su za lokuse HLA jednom od molekularnih metoda temeljenih na lančanoj reakciji polimerazom. Većina nepodudarnosti na lokusu HLA-A bila je na razini gena (85,00%), dok su nepodudarnost na lokusu HLA-DRB1 najčešće bile na razini alela (76,92%). Nepodudarnost na lokusu HLA-DPB1 (87,04%) bila je u skladu s literaturom. Bolesnici s dva nepodudarna alela HLA-DPB1 imali su češću pojavu GvHD-a nego bolesnici s jednom ili nijednom nepodudarnošću (P=0,0280). Kod bolesnika kojima je izvor krvotvornih matičnih stanica bila periferna krv, pojava GvHD-a bila je veća nego kod bolesnika kojima je izvor bila koštana srž (P=0,0190).

Ključne riječi: alogenična transplantacija krvotvornih matičnih stanica, GvHD, HLA-DPB1

(60 stranica, 11 slika, 10 tablica, 70 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Voditelj: prof. dr. sc. Zorana Grubić

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Zorana Grubić

izv. prof. dr. sc. Duje Lisičić

izv. prof. dr. sc. Perica Mustafić

Rad prihvaćen: 8.9.2022.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master Thesis

## **The impact of HLA matching on outcome of hematopoietic stem cell transplantation**

Marina Hukelj

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is used for treatment of various malignant and non-malignant diseases. Allogeneic HSCT outcome is highly influenced by genes pertaining to Human Leukocyte Antigens (HLA) complex. HSCT from unrelated donor increases risk of Graft versus Host Disease (GvHD), transplant rejection and reduces survival rate. Aims of the study were: to determine level and direction of HLA mismatch at HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 and -DPB1 loci among patients (N=54) who were treated with HSCT from 9/10 HLA-matched unrelated donor; and to determine influence of HLA and non-HLA factors on HSCT outcome by investigating their association with GvHD occurrence, disease relapse and overall survival. All individuals were analyzed for HLA loci by one of molecular methods based on polymerase chain reaction technology. Majority of detected HLA-A mismatches were at gene level (85.00%), while HLA-DRB1 mismatches were found mostly at allelic level (76.92%). HLA-DPB1 mismatch frequency (87.04%) correlated well with literature data. GvHD occurrence was higher among patients with mismatch for both HLA-DPB1 alleles in comparison to patients who had one or no mismatch ( $P=0.0280$ ). GvHD occurred more frequently among patients transplanted with HSC from peripheral blood as opposed to those with bone marrow as HSC source ( $P=0.0190$ ).

Keywords: allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT), GvHD, HLA-DPB1

(60 pages, 11 figures, 10 tables, 70 references, original in: croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Supervisor: Prof. Zorana Grubić, PhD

Reviewers: Prof. Zorana Grubić, PhD  
Asst. Prof. Duje Lisičić, PhD  
Asst. Prof. Perica Mustafić, PhD

Thesis accepted: 8.9.2022.

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Glavni sustav tkivne podudarnosti.....	2
1.2. Geni HLA .....	5
1.2.1. Obilježja gena HLA.....	7
1.3. Molekule HLA.....	11
1.3.1. Molekule HLA razreda I.....	13
1.3.2. Molekule HLA razreda II .....	14
1.4. Transplantacija krvotvornih matičnih stanica.....	16
1.4.1. Autologna transplantacija krvotvornih matičnih stanica.....	20
1.4.2. Alogenična transplantacija krvotvornih matičnih stanica .....	20
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	26
3. MATERIJALI I METODE .....	27
3.1. Ispitanici.....	27
3.2. Metode .....	29
3.2.1. Izolacija DNA.....	30
3.2.2. Metoda PCR-SSO.....	30
3.2.3. Metoda PCR-SSP .....	31
3.2.4. Statistička obrada podataka .....	33
4. REZULTATI.....	35
4.1. Analiza nepodudarnosti HLA para primatelj-nesrodni davatelj za lokuse HLA-A, -B, -C, DRB1 i -DQB1.....	35
4.2. Analiza nepodudarnosti HLA para primatelj-nesrodni davatelj kad je uključen i lokus HLA-DPB1 .....	37
4.3. Analiza nepodudarnosti epleta HLA para primatelj-nesrodni davatelj.....	39
4.4. Analiza utjecaja različitih čimbenika na ishod TKMS .....	41
4.4.1. Utjecaj različitih čimbenika na pojavu GvHD nakon TKMS.....	41
4.4.2. Utjecaj različitih čimbenika na pojavu relapsa nakon TKMS.....	42
4.4.3. Utjecaj različitih čimbenika na preživljenje nakon TKMS .....	43
5. RASPRAVA .....	46
6. ZAKLJUČAK .....	51

7. LITERATURA.....	52
ŽIVOTOPIS .....	60



## POPIS KRATICA

aGvHD	akutna reakcija transplantata protiv primatelja engl. <i>acute Graft versus Host Disease</i>
cDNA	komplementarna DNA engl. <i>complementary DNA</i>
cGvHD	kronična reakcija transplantata protiv primatelja engl. <i>chronic Graft versus Host Disease</i>
c. o.	genska rekombinacija engl. <i>crossing over</i>
EBMT	Europska udruga za transplantaciju krvotvornih matičnih stanica engl. <i>European Group for Blood and Marrow Transplantation</i>
EST	ekspimirana oznaka slijeda nukleotida engl. <i>expressed sequence tag</i>
G-CSF	granulocitni čimbenik rasta engl. <i>granulocyte colony stimulating factor</i>
GM-CSF	granulocitno-makrofagni čimbenik rasta engl. <i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
GvHD	reakcija transplantata protiv primatelja engl. <i>Graft versus Host Disease</i>
GvH	transplantat protiv primatelja engl. <i>Graft versus Host</i>
GvT	transplantat protiv tumora engl. <i>Graft versus Tumor</i>
HFE	engl. <i>Homeostatic Iron Regulator</i>
HLA	humani leukocitni antigeni engl. <i>Human Leukocyte Antigens</i>

HvG	primatelj protiv transplantata engl. <i>Host versus Graft</i>
IPD	baza podataka imunopolimorfizma engl. <i>Immunopolymorphism Database</i>
KIR	imunoglobulinu slični receptori stanica ubojica engl. <i>Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors</i>
KMS	krvotvorne matične stanice
KPS	krvotvorne progenitorske stanice
LD	neravnoteža udruživanja engl. <i>Linkage Disequilibrium</i>
MHC	glavni sustav tkivne podudarnosti engl. <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIC	porodica gena MHC povezanih s HLA razredom I engl. <i>MHC class I-related Chain</i>
MiHA	slabi antigeni tkivne podudarnosti engl. <i>Minor Histocompatibility Antigens</i>
NCBI	Nacionalni centar za biotehnoške informacije engl. <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NIH	Nacionalni institut za zdravlje engl. <i>National Institutes of Health</i>
NK	engl. <i>natural killer</i>
NMDP	Nacionalni program doniranja koštane srži engl. <i>National Marrow Donor Program</i>
OS	ukupno preživljenje engl. <i>overall survival</i>
PCR-SSO	metoda lančane reakcije polimerazom i oligonukleotidima specifičnim za određenu sekvencu HLA engl. <i>Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Oligonucleotids</i>

PCR-SSP	metoda lančane reakcije polimerazom i početnicama specifičnim za određenu sekvencu HLA engl. <i>Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Primer</i>
PGF	placentni čimbenik rasta engl. <i>placental growth factor</i>
RDDKMS	Hrvatski registar dobrovoljnih darivatelja krvotvornih matičnih stanica
TAP	engl. <i>Transport Associated with antigen Processing</i>
TKMS	transplantacija krvotvornih matičnih stanica
xMHC	prošireni glavni sustav tkivne podudarnost engl. <i>extended Major Histocompatibility Complex</i>
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija engl. <i>World Health Organization</i>
WMDA	Svjetski registar dobrovoljnih davatelja krvotvornih matičnih stanica engl. <i>World Marrow Donor Association</i>

## 1. UVOD

Imunološki sustav je vrlo složen biološki sustav (Phillips i Callaghan, 2017) koji se u osnovi može podijeliti na urođeni i stečeni (Ayala García i sur., 2012). Svrha imunološkog sustava jedinke je očuvanje njezinog biološkog integriteta što se postiže kontrolom i regulacijom visokospecifičnih odgovora na strane antigene uz istodobnu nereaktivnost na vlastite antigene, odnosno, sposobnošću razlikovanja vlastitog od tuđeg (Žunec i sur., 2011). Imunološki sustav prema vlastitim antigenima pokreće tolerogenu reakciju, odnosno, reakciju tolerancije, dok prema stranim antigenima pokreće imunosnu reakciju, odnosno, transplantacijsku reakciju. Opseg složenosti odražava se na razini genoma, pri čemu je više od 5% svih izraženih gena dio imunološkog sustava (Horton i sur., 2004). U ispunjenju svrhe imunološkog sustava ključnu ulogu ima jedinstven, visoko specijaliziran genski sustav otkriven kod svih čeljustoustih kralježnjaka (riba, gmazova, ptica i sisavaca) koji se naziva glavnim sustavom tkivne podudarnosti ili sustavom MHC (engl. *Major Histocompatibility Complex*) (Žunec i sur., 2011).

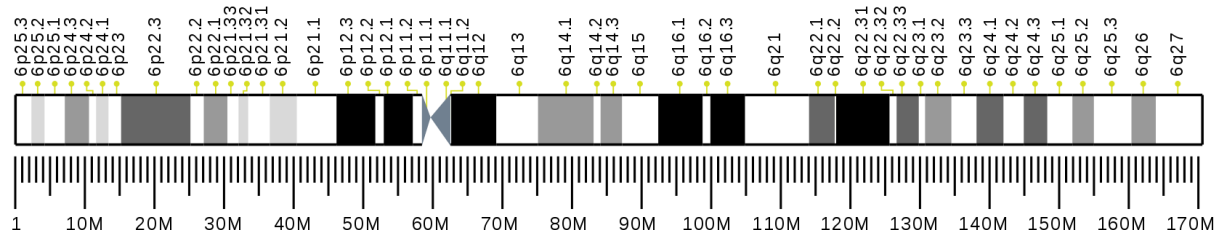
Sustav MHC predstavlja područje gena tkivne podudarnosti čiji se produkti u obliku membranskih bjelančevina izražavaju na površini gotovo svih stanica organizma. Njihova biološka uloga je predstavljanje peptida, malih dijelova proteina, receptorima stanica imunološkog sustava pri čemu u organizmu djeluju kao antigeni. Kod čovjeka je sustav takvih antigena nazvan sustavom humanih leukocitnih antigena, odnosno sustavom HLA (engl. *Human Leukocyte Antigens*) (Phillips i Callaghan, 2017) zbog otkrića na površini bijelih krvnih stanica (leukocita) (Choo, 2007). Govoreći o ljudskom organizmu, sustav MHC i HLA pojmovi su koji se često upotrebljavaju kao istoznačni, međutim, strogo gledano, MHC se odnosi na područje genoma, a HLA na strukturu ljudskog proteina (Phillips i Callaghan, 2017).

Dok su neki geni MHC predaka stekli ulogu i u urođenom i u stečenom imunološkom odgovoru, mnogi geni MHC koji sudjeluju u prezentaciji antigena, uključujući gene HLA razreda I i razreda II, pojavili su se tek kasno u evoluciji kao dio stečenog imunološkog sustava (Horton i sur., 2004; Cruz-Tapias i sur., 2013). Urođeni imunološki sustav filogenetski je stariji u odnosu na stečeni (Ayala García i sur., 2012), a evolucijski gledano, geni sustava MHC imali su ulogu u njihovom povezivanju (Horton i sur., 2004). Na temelju sličnosti slijeda nukleotida utvrđeno je da u genima beskrležnjaka nekoliko sintetičkih gena MHC ukazuju da porijeklo lokusa MHC prethodi nastanku stečenog imunološkog

sustava prije otprilike 400 milijuna godina (Borchers i sur., 2014). Ovaj kasni evolucijski napredak imunološkog sustava pokazuje važnost veće složenosti i potrebe za imunološkim odgovorom koji nije samo raznolikiji već i specifičniji (Cruz-Tapias i sur, 2013).

### 1.1. Glavni sustav tkivne podudarnosti

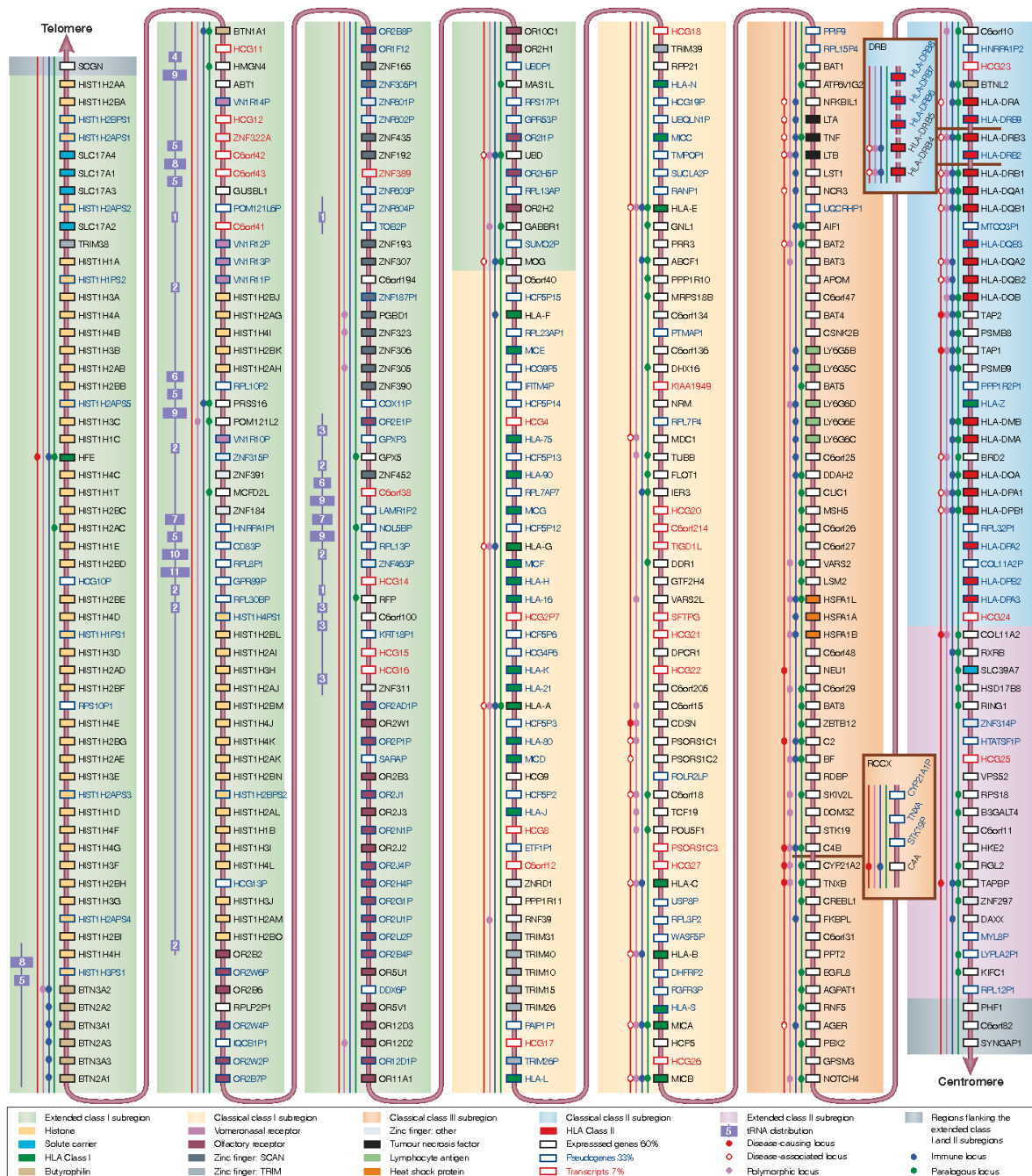
Kromosom 6, metacentrični kromosom (Strachan i Read, 2010) duljine 170, 81 Mb, čini približno 5,5-6% ukupnog ljudskog genoma (izvedeno prema *web1*) (*slika 1*). Prema podacima objavljenim od strane Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (engl. *National Center for Biotechnology Information*, NCBI), genomskim sekvenciranjem utvrđeno je da kromosom 6 sadrži 1053 kodirajućih gena, 1188 nekodirajućih gena i 911 pseudogena (*web2*). Od nekoliko genomskih regija unutar kromosoma 6, najpoznatija je regija glavnog sustava tkivne podudarnosti, odnosno, sustava MHC, mapirana na odsječku 21.31 kraćeg kraka kromosoma 6 (6p21.31) (Beck i sur., 1999).



**Slika 1.** Ideogram G-pojava ljudskog kromosoma 6 u rezoluciji 850 bphs (*bendova po haploidnom skupu*) (preuzeto s *web3*)

Neprekidan genomski slijed nukleotida klasičnog sustava MHC obuhvaća regiju DNA od 3,6 Mb (Beck i sur., 2004). Međutim, u usporedbi s njom, potvrda velike genetske neravnoteže udruživanja (engl. *Linkage Disequilibrium*, LD) (Horton i sur., 2004), očuvana ko-lokalizacija genskih lokusa istog kromosoma između miša i čovjeka (Yoshino i sur., 2004) te lokalizacija MHC relevantnih gena izvan granica klasične regije MHC, doveli su do definiranja integrirane genske mape proširenog sustava MHC (xMHC) kod ljudi (Horton i sur., 2004). Genomski slijed nukleotida regije MHC koja se koristi za sadašnje potrebe je homozigotni haplotipni slijed nukleotida izvedena iz stanične linije placentnog čimbenika rasta (engl. *placental growth factor*, PGF) i nosi kombinaciju antigena HLA-A3, -B7, -Cw7, -DR15 (Shiina i sur., 2009).

Genomski slijed nukleotida sustava xMHC obuhvaća regiju DNA od 7,6 Mb, čime čini udio od približno 0,23% u cjelokupnom ljudskom genomu (izvedeno prema *web1*). Regija xMHC podijeljena je na pet podregija: proširena podregija razreda I (3,9 Mb), klasična podregija razreda I (1,9 Mb), klasična podregija razreda III (0,7 Mb), klasična podregija razreda II (0,9 Mb) te proširena podregija razreda II (0,2 Mb). Podregije se protežu od gena HIST1H2AA, smještenog telomerno, do gena RPL12P1, smještenog centromerno (Horton i sur., 2004). Na *slici 2* zelenom bojom označeno je područje proširene podregije razreda I; žutom bojom označeno je područje klasične podregije razreda I; narančastom bojom označeno je područje klasične podregije razreda III; plavom bojom označeno je područje klasične podregije razreda II; te je ružičastom bojom označeno područje proširene podregije razreda II.



**Slika 2.** Shematski prikaz genske mape sustava xMHC kod čovjeka (preuzeto i prilagođeno prema Horton i sur., 2004)

Osnovno obilježje sustava xMHC je velika poligenost, odnosno, pojava da slični geni kodiraju proteine koji obavljaju istu funkciju. S 421 otkrivenih lokusa, sustav xMHC predstavlja jednu od genima najbogatijih regija u ljudskom genomu. Lokusi su podijeljeni u tri glavne kategorije s obzirom na njihov biološki značaj: 252 lokusa (59,86%) označeni su kao eksprimirani geni na temelju dokaza komplementarne DNA (engl. *complementary DNA*,

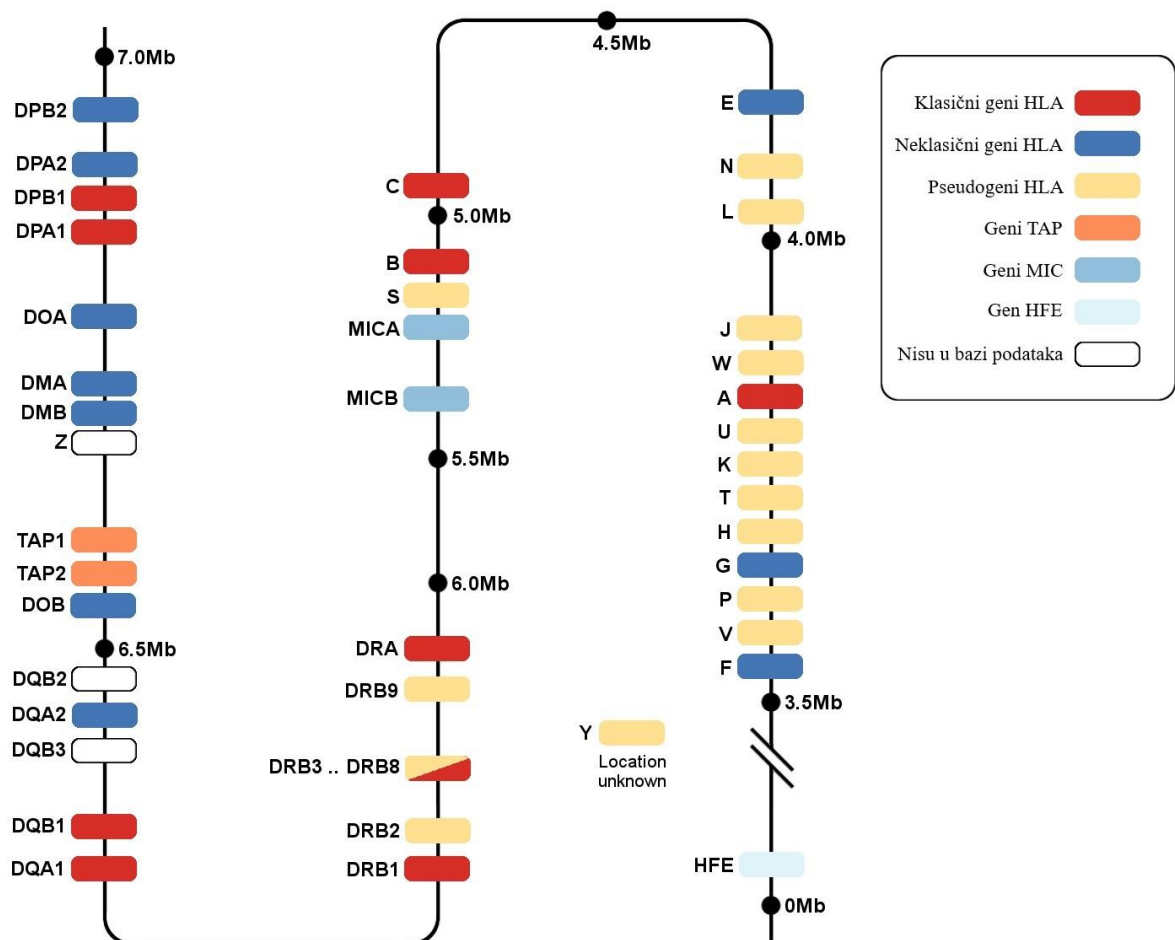
cDNA) i/ili eksprimirane oznake slijeda nukleotida (engl. *expressed sequence tag*, EST); 30 lokusa (7,13%) označeni su kao obrađeni transkripti na temelju dokaza EST; 139 lokusa (33,02%) označeni su kao pseudogeni na temelju homologije s poznatim proteinima (Horton i sur., 2004). Na *slici 2* crnom bojom okvira pravokutnika i naziva gena označeni su eksprimirani geni; crvenom bojom okvira pravokutnika i naziva gena označeni su obrađeni transkripti; te su plavom bojom okvira pravokutnika i naziva gena označeni pseudogeni.

Procjenjuje se da oko 28% od ukupnog broja eksprimiranih gena sustava xMHC ima ulogu u imunološkom odgovoru, uključujući gene HLA te njima srodne gene (Horton i sur., 2004). Grupiranje gena povezanih s imunološkim sustavom, kakvo je prisutno u regiji MHC, čini se malo vjerojatno kao slučajno (Beck i sur., 1999). Prvotno bi moglo biti rezultat pozitivne selekcije koja je okupljala gene, nakon čega je uslijedila konzervativna selekcija koja je sprječavala njihovo razdvajanje (Danchin i sur., 2004). Iako je najvažnija poznata funkcija genskih produkata sustava xMHC obrada i prezentacija antigena receptorima stanica imunološkog sustava (Janeway i sur., 2001), utvrđeni imunološki lokusi mogu imati uloge u sazrijevanju leukocita, imunološkoj regulaciji, odgovoru na stres, kaskadi komplementa te upali (Horton i sur., 2004). Na *slici 2* plavom točkom označeni su lokusi koji kodiraju gene koji sudjeluju u imunološkim reakcijama.

## 1.2. Geni HLA

Skupina gena HLA i njima sličnih gena uključuje 49 lokusa unutar sustava xMHC. Na temelju njihove strukture i funkcije, podijeljeni su u dvije osnovne genske skupine: gene HLA razreda I i gene HLA razreda II – koji pripadaju imunoglobulinskoj genskoj porodici (Williams, 2001). Geni HLA, stabilni u strukturi i organizaciji (Robinson i sur., 2020), građeni su od različitog broja kodirajućih sljedova nukleotida DNA, odnosno, egzona, međusobno odvojenih nekodirajućim sljedovima nukleotida različitih duljina, odnosno, intronima (Malissen i sur., 1988). Njihova ključna uloga očitovana je kodiranjem sinteze lanaca dviju skupina građom različitih, ali homolognih bjelančevina, njihovih najvažnijih produkata – molekula HLA (Abbas i sur., 2018). Na *slici 2* pravokutnici zelene boje označavaju gene HLA razreda I, dok pravokutnici crvene boje označavaju gene HLA razreda II. Također, na *slici 3* prikazana je mapa gena HLA raspoređenih unutar sustava xMHC.





Slika 3. Mapa gena HLA raspoređenih unutar sustava xMHC (preuzeto i prilagođeno prema Robinson i sur., 2015)

Skupina gena HLA razreda I, smještena na telomernom kraju, sadrži: tri klasična gena HLA razreda I (HLA-A, -B i -C); tri neklasična gena HLA razreda I (HLA-E, -F i -G); te dvanaest nekodirajućih gena ili pseudogena HLA razreda I (HLA-H, -J, -K, -L, -N, -P, -S, -T, -U, -V, -W i -Y) čiji proteinski produkti ili nisu poznati ili nisu do kraja razjašnjeni (Horton i sur., 2004). U području klasične podregije HLA razreda I nalazi se i porodica gena MHC povezanih s HLA razredom I, odnosno, geni MIC (engl. *MHC class I-related Chain*). Obuhvaća skupinu od sedam gena od kojih su MICA i MICB aktivni geni, dok su MICC, MICD, MICE, MICF i MICG pseudogeni. Za razliku od produkata gena HLA, produkti aktivnih gena MIC nisu uključeni u obradu i prezentaciju antigena receptorima stanica imunološkog sustava, već imaju druge uloge u imunološkom odgovoru (Baranwal i Mehra, 2017). Daleko izvan granica područja klasične podregije HLA razreda I, u području proširene podregije HLA razreda I nalazi se gen nalik na gene HLA razreda I – gen HFE (engl. *Homeostatic Iron Regulator*). Iako njegov produkt u mnogočemu nalikuje produktima

gena HLA, njegova je uloga u metabolizmu željeza. Postoje i mnogi drugi geni koji su slični genima HLA razreda I (Horton i sur., 2004).

Skupina gena HLA razreda II, smještena na centromernom kraju, dio je skupine gena HLA-D koja obuhvaća pet usko povezanih genskih obitelji (HLA-DR, -DQ, -DP, -DM, -DO) podijeljenih na: devet klasičnih gena HLA razreda II (HLA-DRA, -DRB1, -DRB3, -DRB4, -DRB5, -DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1); sedam neklasičnih gena HLA razreda II (HLA-DQA2, -DPA2, -DPB2, -DMA, -DMB, -DOA, -DOB); te sedam pseudogena HLA razreda II (HLA-DRB2, -DRB6, -DRB7, -DRB8, -DRB9, -DQB2, -DQB3) (Robinson i sur., 2015). U području klasične podregije HLA razreda II nalaze se i dva gena TAP (engl. *Transport Associated with antigen Processing*) potrebna za konačni ustroj molekula HLA razreda I (Janeway i sur., 2001).

### 1.2.1. Obilježja gena HLA

Kombinacija usko povezanih varijantnih oblika gena HLA razreda I i razreda II, odnosno, alela HLA, prisutnih na određenom mjestu (lokusu) homolognog para kromosoma 6, tvori haploidni set ili haplotip HLA (Janeway i sur., 2001). Budući da se po jedan haplotip HLA nasljeđuje od svakog roditelja, svaki pojedinac ima po dva ista lokusa HLA za koje može biti ili homozigot, ukoliko sadrži dva ista gena (npr. HLA-A\*02, -), ili heterozigot, ukoliko sadrži dva različita oblika gena određenog lokusa (npr. HLA-A\*02, \*03) (Rosenberg i Rosenberg, 2012). Pri nasljeđivanju haplotipa, segregacija gena HLA je pravilna, što znači da postoji 50%-tna šansa za nasljeđivanje određenog gena HLA od roditelja heterozigota na tom lokusu. Značajno obilježje gena HLA je i kodominantna ekspresija (Howell i sur., 2010), odnosno, istovremena ekspresija oba naslijeđena oblika HLA, što za posljedicu ima prisutnost dva kompletna seta molekula HLA na staničnoj membrani (Janeway i sur., 2001).

Za vrijeme profaze I mejoze, može doći do izmjene slijeda nukleotida DNA, odnosno, rekombinacije genetskog materijala između homolognih kromosoma, što se naziva *crossing over* (c.o.). Rezultat c.o.-a je nova kombinacija gena HLA u haplotipu HLA čime se povećava genetska raznolikost. Vjerojatnost pojave c.o. između dva lokusa HLA na istom kromosomu odraz je njihove međusobne udaljenosti – što je veća udaljenost, veća je i mogućnost nastanka c.o. Zbog velike gustoće gena unutar sustava xMHC, udaljenost između pojedinih lokusa HLA vrlo je mala (Mungall i sur., 2003). Samim time, pojava c.o. između

lokusa HLA vrlo je rijetka, odnosno, događa se u svega 1-2% mejoza. Analiza slijeda nukleotida alela HLA pokazuje da bi mnogi različiti aleli mogli predstavljati događaje rekombinacije slijeda nukleotida DNA koji su se događali mnogo puta tijekom evolucije HLA između relativno malog skupa alela predaka (Janeway i sur., 2001).

Osim genskom rekombinacijom, raznolikost gena HLA ostvaruje se i različitim drugim genskim mehanizmima, primjerice zamjenom dijelova gena ulomcima drugih gena, što se naziva genska konverzija, te promjenama na razini nukleotida koje su uzrokovane točkastim mutacijama (Williams, 2001). Genska konverzija događa se kao posljedica pogrešnog poravnanja dva uparena homologna kromosoma tijekom mejoze te je posljedica sličnosti gena HLA i njihove uske međusobne povezanosti. Tipičan dokaz su često mijenjani sljedovi nukleotida alela HLA koje potječu od drugih gena HLA na istom kromosomu. Točkaste mutacije označavaju se ili kao zamjenske supstitucije, koje mijenjaju aminokiselinu, ili kao tihe supstitucije, koje mijenjaju kodon, a aminokiselinu ostavljaju istom. S obzirom na učestalost, zamjenske supstitucije javljaju se većom učestalošću u genima HLA nego tihe supstitucije (Janeway i sur., 2001). Uz tako snažne mehanizme koji su stvorili izuzetno veliku raznolikost alela u organizmima koji se sporo razmnožavaju poput ljudi (Janeway i sur., 2001), morala je postojati dodatna sila koja bi omogućila očuvanje veće nego što se očekivalo od genetskog zanosa (Alter i sur., 2017).

U evolucijskom procesu očuvanja skupa funkcionalnih alela i haplotipa, ključno je bilo uravnoteženje selekcije na razini alela te pročišćavanje selekcije na razini haplotipa (Alter i sur., 2017). Selekcija je tim putem mogla osigurati prednost imunološkog sustava u odnosu na različite patogene organizme (Shiina i sur., 2009). Naime, povećanjem broja alela HLA malo je vjerojatno da će sve jedinke u populaciji biti osjetljive na određeni patogen čime se osigurava kontinuitet vrsta u prisutnosti pandemijske infekcije (Phillips i Callaghan, 2017). Iz tog razloga selekcija favorizira nove, odnosno, rjeđe alele koji se pojavljuju i zadržavaju u populacijama, a imaju mogućnost predstavljanja peptida i u mutiranih oblika patogena. Još jedan od dokaza uravnoteženosti selekcije je i nizak postotak homozigotnosti HLA (Alter i sur., 2017). Homozigoti su u značajno nepovoljnijem položaju jer na svojoj staničnoj membrani izražavaju samo jedan set molekula HLA čime je ograničen raspon stranih antigena koje mogu predstaviti receptorima stanica imunološkog sustava (Janeway i sur., 2001).

Analiza i imenovanje novih sljedova nukleotida alela HLA te njihova kontrola odgovornost je Odbora za nomenklaturu Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World*

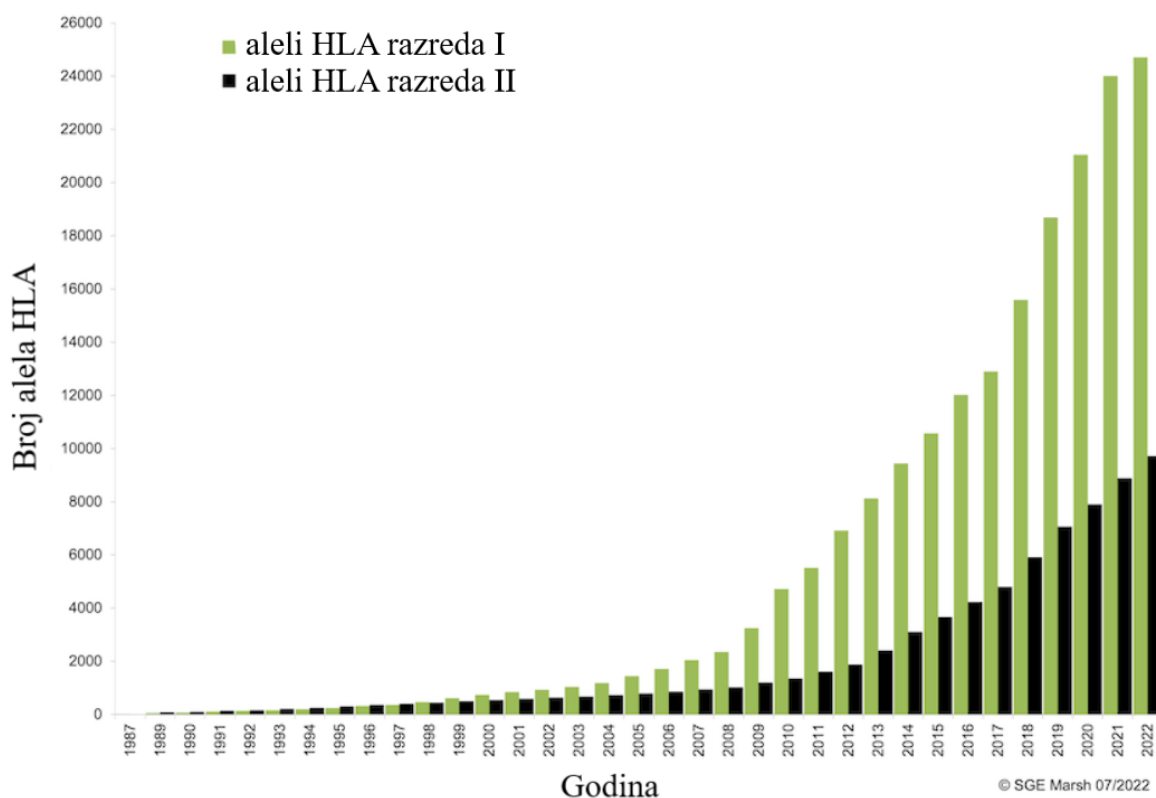
*Health Organization, WHO*) za čimbenike sustava HLA. Takav rad zahtijevao je internacionalnu bazu podataka specifičnu za alelne sekvence gena HLA. Baza podataka za imunogenetiku IMGT/HLA prvi je put objavljena 1998. godine (Robinson i sur., 2015) i od tad prikuplja i pohranjuje podatke svih poznatih alela HLA. Godine 2003. baza IMGT/HLA uključena je u projekt baze podataka imunopolimorfizma (engl. *Immunopolymorphism Database, IPD*) (Robinson i sur., 2020), a zatim je 2012. godine postala i sastavni dio jedinstvene baze IPD-IMGT/HLA (Robinson i sur., 2015). Novi sljedovi nukleotida obrađuju se mjesečno i svaka tri mjeseca baza IPD-IMGT/HLA se ažurira (Robinson i sur., 2015).

Razina uočene raznolikosti alela HLA opisana je kao „hiperpolimorfna“ (grč. *hyper* – iznad; *poly* – mnogo; *morphe* – oblik ili struktura) (Robinson i sur., 2020). Ostali genski sustavi koji imaju usporedive razine raznolikosti uključuju njušne receptore i imunoglobulinu slične receptore stanica ubojica (engl. *Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors, KIR*) (Alter i sur., 2017). Trenutno se u bazi podataka IPD-IMGT/HLA nalazi preko 35 tisuća alela HLA. Dostupni podaci ukazuju da velika raznolikost koja karakterizira sustav xMHC nije homogena u cijeloj regiji (Borchers i sur., 2014). Klasični geni HLA, s približno 25 tisuća alela gena HLA razreda I i približno 10 tisuća alela gena HLA razreda II (Robinson i sur., 2015), najpolimorfniiji su u ljudskom genom (Park i Seo, 2012), s izuzetkom gena HLA-DRA. U *tablici 1* nalazi se pregled broja alela pojedinih klasičnih gena HLA. Vidljivo je da je gen HLA-B s devet tisuća alelnih varijanti najpolimorfniiji gen sustava xMHC (Robinson i sur., 2015) te općenito cijelog ljudskog genoma (Mungall i sur., 2003). Broj novootkrivenih alela HLA ima tendenciju eksponencijalnog rasta (*slika 4*), naročito uz napredak tehnologije i upotrebe novih metoda te tipiziranje, odnosno, određivanje specifičnosti HLA (Grubić, 2018).

**Tablica 1.** Broj poznatih alela\* klasičnih gena HLA

Lokus	N
HLA-A	7562
HLA-B	9000
HLA-C	7513
HLA-DRA	32
HLA-DRB1	3298
HLA-DQA1	483
HLA-DQB1	2278
HLA-DPA1	455
HLA-DPB1	2067

Kazalo: n – broj uočenih alela; \* – prema bazi podataka IPD-IMGT/HLA (verzija 3.49, lipanj, 2022. godine)



**Slika 4.** Grafički prikaz eksponencijalnog rasta broja otkrivenih alela HLA razreda I i alela HLA razreda II u razdoblju od 1987. godine do danas prema bazi podataka IPD-IMGT/HLA (verzija 3.49, lipanj, 2022. godine)

Uz iznimnu alelnu raznolikost, geni HLA imaju i karakteristične obrasce haplotipske raznolikosti (Alter i sur., 2017). Dinamika ili učestalost kojom će se pojedini alel HLA pojavljivati u određenom haplotipu HLA u populaciji predstavlja genetsku frekvenciju alela. Poznato je da u ljudskom genomu postoji korelacijska struktura između alela dvaju ili više različitih lokusa (Calabrese, 2018), odnosno, haplotipova, nastala kao posljedica populacijskih genetskih sila koje strukturiraju genom (Slatkin, 2008). Takva korelacijska struktura nazvana je genska neravnoteža udruživanja (engl. *Linkage Disequilibrium*, LD) i odnosi se na preferencijalnu povezanost između alela različitih lokusa koji tvore haplotip (Calabrese, 2018).

Vrijednost LD-a očituje se ukoliko je učestalost povezanosti između alela veća ili manja od one koja bi se očekivala s obzirom na pojedinačne genetske frekvencije alela (Costantino i sur., 2017). S obzirom na to, vrijednost LD-a može biti ili pozitivna, ukoliko se aleli javljaju zajedno u istom haplotipu češće od očekivanog, ili negativna, ukoliko se aleli javljaju zajedno u istom haplotipu rjeđe od očekivanog. Važno je napomenuti da je LD svojstvo dvaju ili više lokusa HLA, a ne njihovih alela (Calabrese, 2018). Hoće li vrijednost koeficijenta LD-a biti pozitivna ili negativna, direktno je povezano s udaljenošću između pojedinih lokusa HLA. Vrijednost koeficijenta LD-a veća je što su lokusi HLA smješteni bliže na kromosomu 6 te obrnuto – manja je što su lokusi HLA međusobno udaljeniji (Grubić, 2018). Iz ovoga vidimo da su pojava LD-a i genetičke rekombinacije obrnuto proporcionalni te će prema tome snažan LD rezultirati minimalnom vjerojatnošću genetičke rekombinacije među lokusima HLA.

### **1.3. Molekule HLA**

Unutarstaničnom razgradnjom stranih antigena na peptidne ulomke, odnosno, njihovom preradom, dolazi do sinteze molekula HLA u endoplazmatskom retikulumu što je kodirano genima HLA (Hoek i sur., 2021). Trodimenzionalna građa molekula HLA razreda I i II u osnovi je slična i ona je ta koja je ključna za njihovu ulogu. Molekule HLA membranski su glikoproteini građeni kao heterodimeri dvaju polipeptidnih lanca – teškog i lakog – međusobno povezanih nekovalentnim vezama, a strukturno su podijeljene na izvanstaničnu, transmembransku i citoplazmatsku regiju (Mutar Mahdi, 2019).

Izvanstanična regija molekule HLA funkcionalno se dijeli na dio koji veže i stanicama imunološkog sustava prezentira prerađeni peptidni antigen – pukotinu koja je najvažniji dio molekule HLA; te na dio sličan konstantnoj domeni imunoglobulina (Choo i sur., 2007). N-terminalni krajevi izvanstanične regije oblikuju jedinstveno građenu pukotinu izgrađenu od osmerostrukih  $\beta$ -nabranih ploča kao podnice pukotine koju podupiru dvije  $\alpha$ -uzvojnice kao postranične stijenke pukotine. Na C-terminalni kraj izvanstanične regije nastavlja se niz od oko 25 hidrofobnih aminokiselina koje prolaze kroz lipidni dvosloj stanične membrane i čine transmembransku regiju te potom niz od oko 30 hidrofilnih aminokiselina koje prolaze citoplazmom i čine citoplazmatsku regiju. Transmembranska i citoplazmatska regija zajedno sidre molekule HLA u stanicu (Abbas i sur., 2018).

Iz razloga što je većina raznolikosti gena HLA smještena u egzonima koji kodiraju dijelove pukotine, upravo se na tim mjestima pojavljuju razlike među molekulama HLA koje određuju različiti aleli određenog gena HLA. Za razliku od većine polimorfnih gena koji kodiraju molekule koje se razlikuju samo za jednu ili nekoliko aminokiselina, molekule HLA mogu se razlikovati do dvadeset aminokiselina (Janeway, 2001). Takva varijabilnost aminokiselinskih ostataka molekula HLA uzrokuje promjene u elektrostatskom naboju, hidrofobnosti i trodimenzionalnoj strukturi pukotine čime se mijenja specifičnost vezanja peptidnih ulomaka (Cruz-Tapias i sur., 2013), što predstavlja evolucijsku prednost jer se na taj način osigurava prezentacija širokog spektra različitih stranih antigena stanicama imunološkog sustava (Williams, 2001).

Da bi se osigurala prezentacija nekog stranog antigena, prvo je potrebno da se peptidni ulomak nastao unutarstaničnom razgradnjom tog antigena transportira u endoplazmatski retikulum i veže u pukotinu novosintetizirane molekule HLA (Williams, 2001). Budući da posjeduje samo jedno vezno mjesto, molekula HLA u jednom će trenutku vezati samo jedan prerađeni peptidni antigen. Vezanjem peptidnog ulomka nastaje kompleks dvaju antigena: prerađenog stranog antigena i antigena tkivne podudarnosti. Vezani peptidni ulomak stabilizira međudjelovanje teškog i lakog lanca molekule HLA, dok međudjelovanje lanaca učvršćuje peptidni ulomak u pukotini molekule HLA. Takav novonastali heterotrimer moći će se izraziti na površini stanica kao ligand kojeg specifično prepoznaje receptor stanica T (Abbas i sur., 2018).

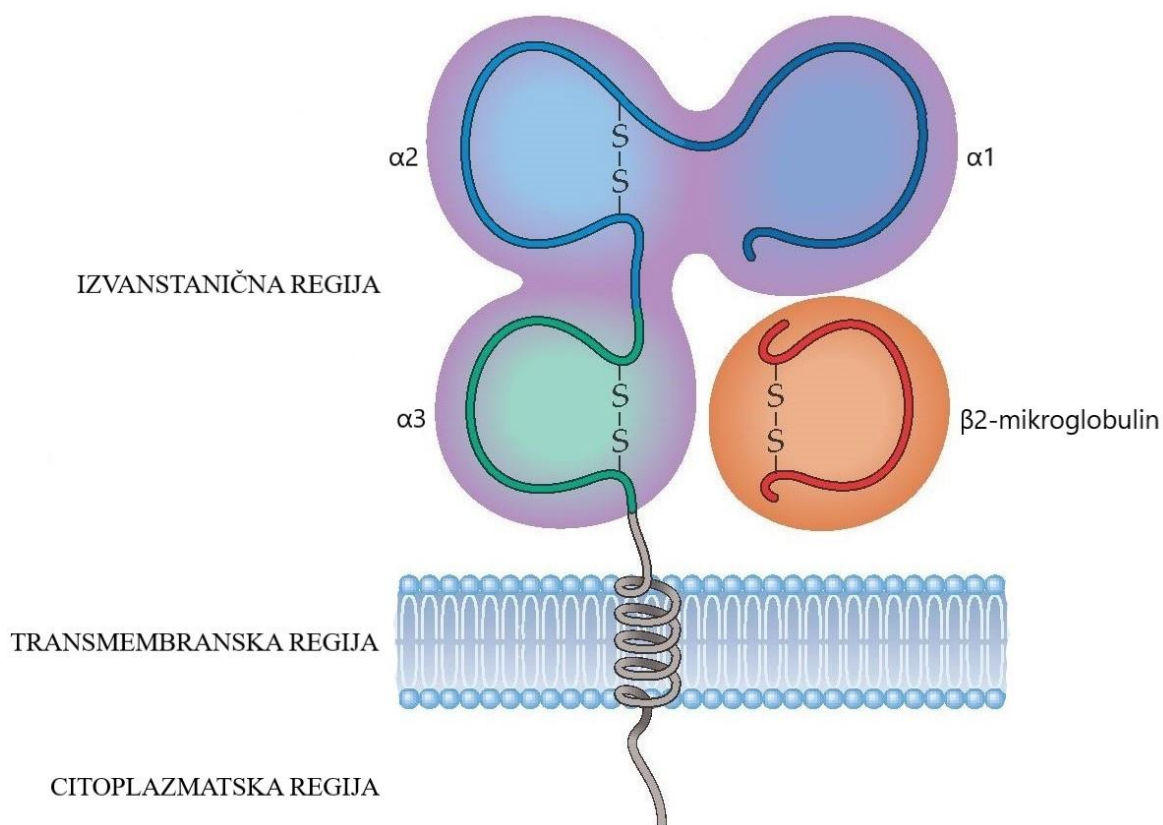
### 1.3.1. Molekule HLA razreda I

Molekule HLA razreda I građene su od 44-47 kD teškog lanca  $\alpha$  kodiranog genima HLA razreda I i usidrenog u membrani stanice te od 12 kD lakog lanca, odnosno, podjedinice  $\beta$ 2-mikroglobulina kodirane izvan regije HLA – genom na kromosomu 15. Sami  $\beta$ 2-mikroglobulin ne prolazi kroz staničnu membranu, već se u cijelosti nalazi izvan stanice. Lanac  $\alpha$  čine tri glikozilirane domene:  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 i  $\alpha$ 3. Geni HLA razreda I građeni su od osam egzona koji kodiraju različite domene za sintezu teškog lanca molekule HLA razreda I. Vodeći slijed nukleotida molekule HLA razreda I kodira egzon 1, egzoni 2, 3 i 4 kodiraju domene  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 i  $\alpha$ 3 izvanstanične regije molekule HLA I. Izvanstanična regija čini 3/4 molekule HLA razreda I (Cruz-Tapias i sur., 2013; Abbas i sur., 2018).

Domene  $\alpha$ 1 i  $\alpha$ 2 su domene koje oblikuju pukotinu zatvorenih krajeva čija je veličina dovoljna za smještanje peptida duljine 8-11 aminokiselinskih ostataka, nastalih razgradnjom unutarstaničnih (endogenih) virusnih ili drugih patogenih te vlastitih tumorskih antigena. Ostatak lanca čini evolucijski konzervirana domena  $\alpha$ 3, a jedan njezin odsječak savija se u nabor sličan konstantnoj domeni imunoglobulina koji sadržava vezno mjesto za molekulu CD8+ – površinski glikoprotein, odnosno, koreceptor citotoksičnih limfocita T – koja selektivno veže molekulu HLA razreda I i tako pomaže u prepoznavanju kompleksa HLA-peptid. Transmembransku regiju domene  $\alpha$ 3 kodira egzon 5, dok egzoni 6 i 7 kodiraju citoplazmatsku regiju. Egzon 8 kodira završni dio molekule HLA I – netranslatirajući 3' kraj citoplazmatske regije domene  $\alpha$ 3 (Cruz-Tapias i sur., 2013; Abbas i sur., 2018).

Laki lanac  $\beta$ 2-mikroglobulin je, baš poput domene  $\alpha$ 3, nepolimorfan i građom homologan konstantnoj domeni imunoglobulina. Upravo se preko  $\beta$ 2-mikroglobulina i domene  $\alpha$ 3 nekovalentnim interakcijama međusobno povezuju teški i laki lanac molekule HLA razreda I (Abbas i sur., 2018). Funkcija  $\beta$ 2-mikroglobulina je učvršćivanje molekule HLA te, iako ne sudjeluje u prezentaciji antigena (CD8+ citotoksičnim) limfocitima T, nužan je za izražavanje molekule HLA razreda I na staničnoj površini. Molekule HLA razreda I izražavaju se na gotovo svim stanicama s jezgrom, s iznimkom endotela rožnice, egzokrinog dijela gušterače i neurona središnjeg živčanog sustava, te na trombocitima (Cruz-Tapias i sur., 2013). Na svakoj od tih stanica izražene su tri vrste molekula HLA razreda I čiji su lanci  $\alpha$  kodirani s dva naslijeđena alela od gena HLA-A, HLA-B i HLA-C (Janeway i sur., 2001). Shematski prikaz građe molekule HLA razreda I nalazi se na *slici 5*.





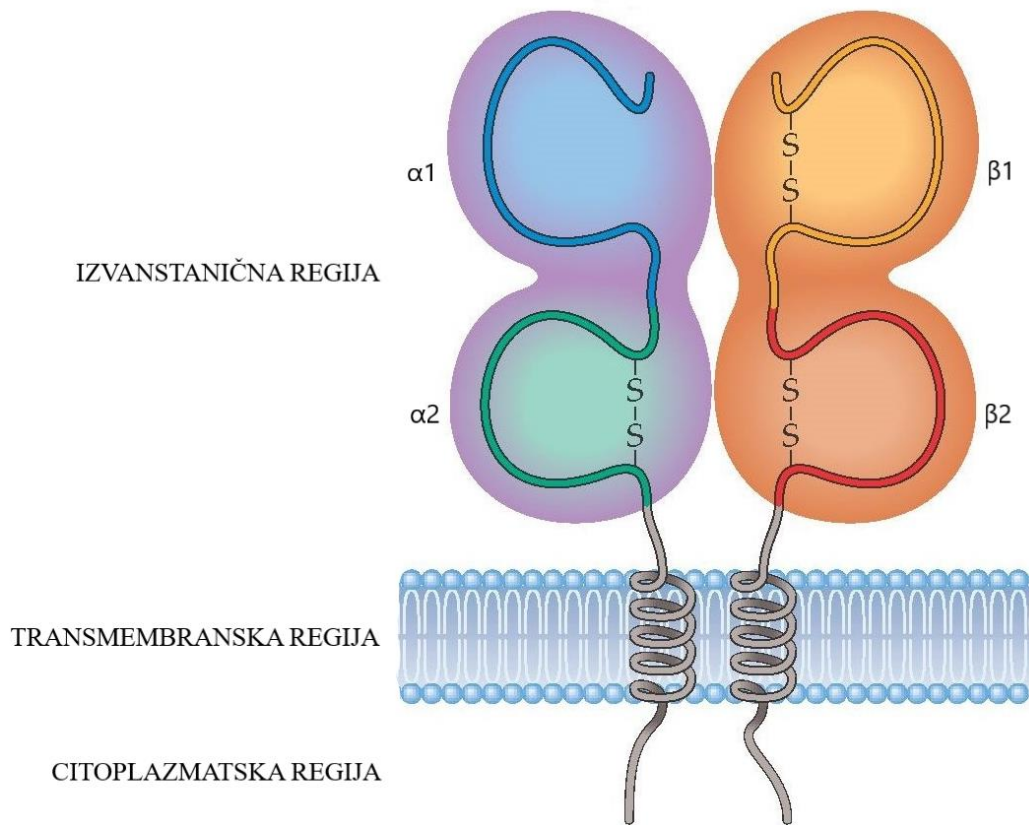
**Slika 5.** Shematski prikaz građe molekule HLA razreda I (preuzeto i prilagođeno prema *web4*)

### 1.3.2. Molekule HLA razreda II

Molekule HLA razreda II svojom strukturom nalikuju molekulama HLA razreda I. Građene su od 32-34 kD težeg lanca  $\alpha$  kodiranog genima A (npr. HLA-DRA) HLA razreda II te od 29-32 kD lakšeg lanca  $\beta$  kodiranog genima B (npr. HLA-DRB1) HLA razreda II. Oba su lanca usidrena u membrani stanice. Svaki se lanac sastoji od po dvije glikozilirane domene – lanac  $\alpha$  čine domene  $\alpha1$  i  $\alpha2$ , dok lanac  $\beta$  čine domene  $\beta1$  i  $\beta2$  (Abbas i sur., 2018). Egzon-intronska organizacija gena HLA razreda II također nalikuje organizaciji gena HLA razreda I po tome što različiti egzoni gena HLA razreda II kodiraju različite domene za sintezu teškog ( $\alpha$ ) i lakog ( $\beta$ ) lanca molekula HLA razreda II (Cruz-Tapias i sur., 2013). Geni A, građeni od pet egzona, kodiraju različite domene za sintezu teškog lanca molekula HLA razreda II, dok geni B, građeni od šest egzona, kodiraju različite domene za sintezu lakog lanca molekula HLA razreda II. Unutar pojedine obitelji, geni A i B izraženi su kao parovi gena HLA razreda II (Horton i sur., 2004).

Kao i kod gena HLA razreda I, vodeći slijed nukleotida molekule HLA razreda II kodira egzon 1. Egzoni 2 i 3 kodiraju domene  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$ , odnosno  $\beta 1$  i  $\beta 2$  izvanstanične regije molekule HLA I (Cruz-Tapias i sur., 2013). Izvanstanična regija čini 2/3 molekule HLA razreda II. Domene  $\alpha 1$  i  $\beta 1$  oblikuju pukotinu koja je za razliku od molekula HLA razreda I otvorenih krajeva čija veličina omogućuje smještanje peptida duljine i veće od 30 aminokiselinskih ostataka, nastalih razgradnjom izvanstaničnih (egzogenih) antigena. Domene  $\alpha 2$  i  $\beta 2$  homologne su domeni  $\alpha 3$  i lancu  $\beta 2$ -mikroglobulina molekula HLA razreda I te su kao i one evolucijski konzervirane i savijene u nabor sličan konstantnoj domeni imunoglobulina. Njihovim nekovalentnim interakcijama međusobno se povezuju teški i laki lanac molekule HLA razreda II, a molekula HLA razreda II se učvršćuje u stanici. Domena  $\beta 2$  važna je i iz razloga jer sadržava vezno mjesto za molekulu CD4+ – površinski glikoprotein, odnosno, koreceptor pomoćničkih limfocita T – koja selektivno veže molekulu HLA razreda II i tako pomaže prepoznavanju kompleksa HLA-peptid (Abbas i sur., 2018).

Transmembranska i citoplazmatska regija domene  $\alpha 2$  kodirana je egzonom 4. Budući da gen B sadrži egzon više nego gen A, kod domene  $\beta 2$ , transmembranska regija kodirana je egzonom 4, dok je citoplazmatska regija kodirana egzonom 5. Završni dio molekule HLA II – netranslatirajuće 3' krajeve citoplazmatskih regija domena  $\alpha 2$  i  $\beta 2$  – kodiraju posljednji egzoni gena A i B – egzon 5 gena A te egzon 6 gena B (Cruz-Tapias i sur., 2013). Za razliku od molekula HLA razreda I, molekule HLA razreda II izražavaju se na ograničenom rasponu stanica – prvenstveno su prisutne na stanicama limfatičkog tkiva: stanicama B, membranama profesionalnih antigen predočnih stanica (dendritičkih stanica i linije stanica monocita/makrofaga) te aktiviranim CD4+ pomoćničkim limfocitima T; a mogu se pojaviti i na endotelnim stanicama tijekom upalnih odgovora te epitelnim stanicama timusa (Ayala García i sur., 2012). Na svakoj od tih stanica izražene su najmanje tri vrste molekula HLA razreda II čiji su lanci  $\alpha$  kodirani sa šest naslijeđenih alela od gena HLA-DRA1, HLA-DPA1 i HLA-DQA1, a lanci  $\beta$  kodirani sa šest naslijeđenih alela od gena HLA-DRB1, HLA-DPB1 i HLA-DQB1. U pojedinim slučajevima prisustva dvaju funkcionalnih gena HLA-DRB, npr. ako je na kromosomu 6 uz gen HLA-DRB1 prisutan i gen HLA-DRB3, a na drugom kromosomu 6 uz gen HLA-DRB1 prisutan i gen HLA-DRB5, na stanici će biti prisutne četiri molekule HLA-DR (Janeway i sur., 2001). Shematski prikaz građe molekule HLA razreda II nalazi se na slici 6.

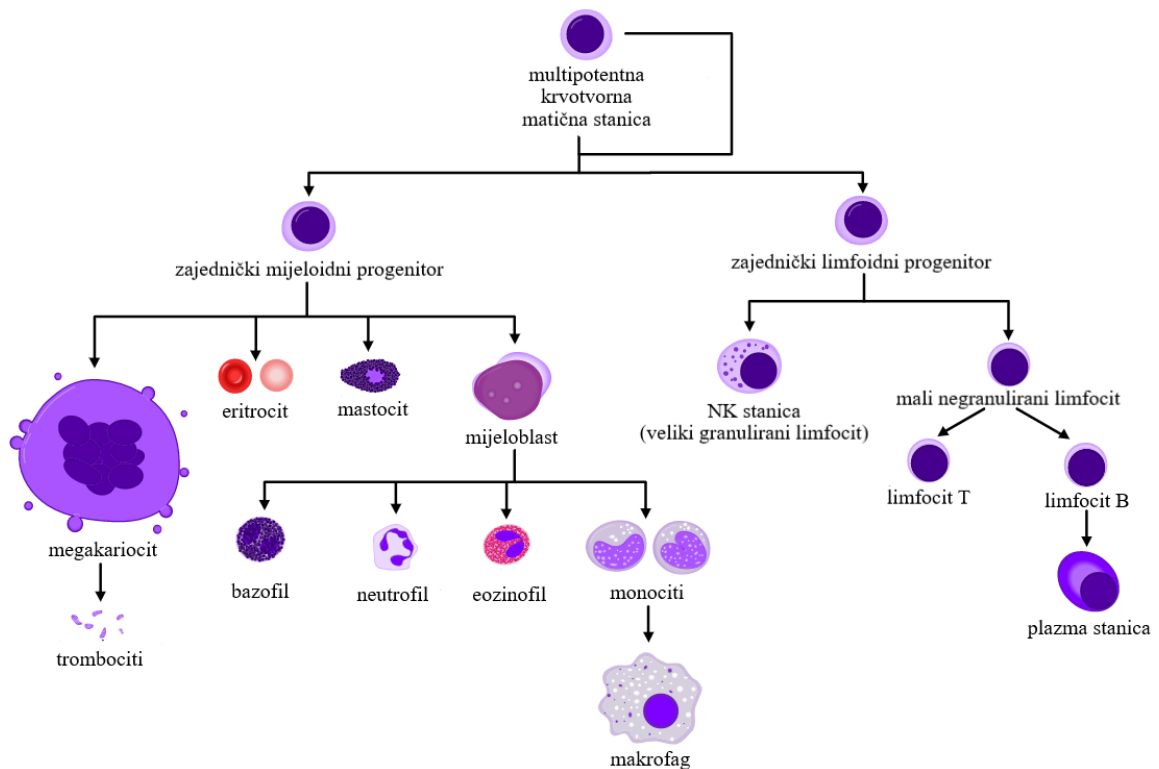


**Slika 6.** Shematski prikaz građe molekule HLA razreda II (preuzeto i prilagođeno prema *web4*)

#### 1.4. Transplantacija krvotvornih matičnih stanica

Krvotvorne matične stanice (KMS) su odrasle nespecijalizirane matične stanice (Kalra i Tomar, 2014) koje se razvijaju iz embrionalnih matičnih stanica (Bhatia, 2007) na nekoliko anatomskih mjesta, uključujući žumanjčanu vrećicu, aortu-gonadu-mezonefros, posteljicu i fetalnu jetru (Kanji i Pompili, 2011). Postnatalno se smještaju unutar specijaliziranog mikrookruženja koštane srži, nazvanog nišom, gdje dolazi do njihove proliferacije (Abbas i sur., 2018). Posredstvom okolišnih, odnosno, signala niše, nastaju zrele KMS koje karakterizira izrazita sposobnost samoobnavljanja, dok posredstvom unutarnjih, odnosno, transkripcijskih signala, nastaju krvotvorne progenitorske stanice (KPS) koje karakterizira svojstvo multipotentnosti. Budući da KMS imaju ograničen životni vijek, održavanje stanja njihove homeostaze dinamičan je proces koji se postiže ravnotežom između proliferacije samoobnavljajućih i multipotentnih stanica (Bhatja, 2007; Bojanić i sur., 2009).

Zrele KMS procesom samoobnavljanja, odnosno, mitotičkim diobama stanica (Kalra i Tomar, 2014), stvaraju stanice-kćeri koje zadržavaju svojstva matičnih stanica te na taj način osiguravaju opstanak (Aiuti i sur., 2019). S druge strane, multipotentnost KMS označava sposobnost multilinijske diferencijacije stanica (Bojanić i sur., 2009) koja predstavlja temelj hematopoeze (Lim i sur., 2013) – višeslojnog procesa stvaranja specijaliziranih linija stanica krvotvornog sustava. Diferencijacijom KMS gube sposobnost samoobnavljanja, a istovremeno se njihova potencija smanjuje diferencirajući u smjeru nastanka dva oligopotentna progenitora – zajedničkog mijeloidnog progenitora te zajedničkog limfoidnog progenitora (Kanji i Pompili, 2011). Daljnjom diferencijacijom mijeloidnog progenitora naposljetku će nastati trombociti, eritrociti, bazofili, neutrofil, eozinofili, makrofagi i mijeloidne dendritičke stanice, dok će daljnjom diferencijacijom limfoidnog progenitora naposljetku nastati prirodne stanice ubojice, odnosno, stanice NK (engl. *natural killer*), limfociti B i T te limfoidne dendritičke stanice (Abbas i sur., 2018). U homeostatskom stanju, većina KMS miruje u G<sub>0</sub>-fazi staničnog ciklusa, dok samo manji broj stanica obavlja proces hematopoeze (Bojanić i sur., 2009). U patološkom stanju, od KMS nastaju maligne matične stanice koje zadržavaju mehanizam samoobnavljanja te se, kao i normalne KMS, sastoje od hijerarhije stanica na različitim razinama diferencijacije (Copelan, 2006). Na slici 7 detaljnije je prikazan proces hematopoeze kod ljudi.



**Slika 7.** Hematopoetski hijerarhijskih dijagram (preuzeto i prilagođeno prema web5)

Budući da tumorske terapije prvenstveno djeluju na stanice koje se diferenciraju, maligne matične stanice ostaju pošteđene što omogućuje da tumor ponovno raste (Aiuti i sur., 2019). Takve se maligne matične stanice mogu eliminirati transplantacijom KMS koje se mogu koristiti u nizu terapijskih postupaka i to ili zasebno ili kao dio terapije. Cilj svake terapije KMS je obnova ili zamjena, odnosno, rekonstrukcija oštećenog krvotvornog i/ili imunosnog sustava (Chivu-Economescu i Rubach, 2017). Hematološke maligne bolesti – leukemije, limfomi i multipli mijelomi, od kojih su najčešće akutne mijeloidne i limfoblastične leukemije te non-Hodgkinovi limfomi; i nemaligni poremećaji, uključujući poremećaje hematopoeze (aplastična anemija), sindrome imunodeficijencije, kongenitalne poremećaje eritropoeze (talasemije) i nasljedne poremećaje metabolizma (mukopolisaharidoze) – indikacija su za liječenje transplantacijom KMS (TKMS). Prema izvješću Europske udruge za transplantaciju krvotvornih matičnih stanica (engl. *European Group for Blood and Marrow Transplantation*, EBMT), u 2019. godini u Europi i suradničkim zemljama izvedeno je preko 48 tisuća TKMS (Passweg i sur., 2021).

Prema podrijetlu KMS, razlikuju se dvije osnovne vrste TKMS – autologna i alogenična (Bojanić i sur., 2009). Autologna TKMS koristi primateljeve vlastite KMS za transplantaciju (Khaddour i sur., 2022), dok alogenična TKMS koristi stanice drugog pojedinca. Odabir vrste transplantacije između ostalog ovisi o vrsti, stadiju i statusu liječene bolesti, dobi primatelja, dostupnosti odgovarajućeg davatelja, mogućnosti prikupljanja KMS nekontaminiranih tumorom te osjetljivosti tumora na imunološki posredovane učinke transplantata protiv tumora (engl. *Graft versus Tumor*, GvT) (Champlin, 2003). Od ukupnog broja izvedenih TKMS u 2019. godini u Europi i suradničkim zemljama, približno je 59% bilo autolognih TKMS, dok je približno 41% bilo alogeničnih TKMS (Passweg i sur., 2021).

Iako KMS primarno naseljavaju koštanu srž, odgovorom na specifične signale u procesu mobilizacije mogu izaći iz koštane srži u perifernu krv ili se u procesu udomljavanja vratiti iz periferne krvi u koštanu srž. Za potrebe TKMS, kao izvori koriste se KMS iz koštane srži, mobilizirane periferne krvi i krvi iz pupkovine. Iako se oštećeni krvotvorni i/ili imunosni sustav može obnoviti iz svih navedenih izvora, postoje brojne kvantitativne i kvalitativne razlike između KMS prikupljenih iz različitih izvora (Bojanić i sur., 2009). Naime, poznato je da tumori mnogih hematoloških malignih bolesti zahvaćaju koštanu srž – štoviše, koštana srž je primarno mjesto nastanka tumora kod leukemija (Peters i sur., 2000). U vezi s tim, korištenje koštane srži kao izvora za TKMS može dovesti do kontaminacije

transplantata malignim stanicama što je glavni razlog sve češće primjene KMS iz mobilizirane periferne krvi.

U perifernoj krvi nalazi se značajno manji broj KMS nego u koštanoj srži (McCarthy i sur., 1984). Međutim, taj se broj može ciljano povećati *in vivo* postupkom mobilizacije primjenom mijelosupresivne kemoterapije u slučaju autologne TKMS i/ili određenih citokina – najčešće granulocitnog čimbenika rasta (engl. *granulocyte colony stimulating factor*, G-CSF) ili granulocitno-makrofagnih čimbenika rasta (engl. *granulocyte macrophage colony stimulating factor*, GM-CSF), u slučaju alogenične TKMS. Citotoksični lijekovi koji se koriste prilikom mijelosupresivne kemoterapije oštećuju stanice koštane srži čime se pokreće proces samoobnavljanja KMS. Na taj se način povećava broj KMS i u ranoj fazi oporavka hematopoeze dolazi do njihovog izlaska iz koštane srži u perifernu krv. Mobilizacija KMS primjenom mijelosupresivne terapije najučinkovitija je u ranoj fazi liječenja bolesti, prije nego što kod bolesnika dođe do oštećenja hematopoeze nastalog prethodnim liječenjem radioterapijom i kemoterapijom (Bojanić i sur., 2009).

S druge strane, učinak G-CSF na mobilizaciju KMS neizravan je i ne zahtjeva specifičan odgovor pojedinačnih KMS na G-CSF. Primjena G-CSF pokrenut će na staničnoj razini niz potencijalno paralelnih mehanizma koji će promijeniti privlačnost niše za KMS. Rezultat toga je prekid veze između KMS u koštanoj srži što predstavlja ključan događaj za izlazak KMS u perifernu krv. Mehanizmi koji to dokazano omogućuju – uključuju: širenje neutrofila i njihovih prekursora, gubitak osteoblasta, stimulaciju bioaktivnog lipida sfingozin-1-fosfata (S1P) te stimulaciju perifernog simpatičkog živčanog sustava. Proteolitički enzimi neutrofila i njihovih prekursora cijepaju ključne čimbenike zadržavanja KMS u niši, dok su osteoblasti potrebni za optimalno zadržavanje KMS u niši. Nadalje, sfingozin-1-fosfatni receptor 1 (S1P1) nalazi se na KMS, a prisutan je u visokim koncentracijama u perifernoj krvi te niskim koncentracijama u koštanoj srži. Njegove početne koncentracije u perifernoj krvi osiguravaju usmjeren gradijent mobilizacije KMS što će reći da djeluje kao kemoatraktant za KMS (Bendall i Bradstock, 2014).

U oba navedena postupka mobilizacije, izlazak KMS iz koštane srži u perifernu krv ujedno je i trenutak u kojem se KMS staničnim separatorom u procesu leukaferenze skupljaju iz davatelja (Peters i sur., 2000) te se pohranjuju i zamrzavanjem čuvaju do same TKMS. Transplantacija uključuje transfuziju davateljevih KMS u primatelja čime se događa proces udomljavanja KMS iz periferne krvi u koštanu srž sa svrhom ponovne uspostave funkcije KMS u krvotvornom i/ili imunološkom sustavu primatelja (Bojanić i sur., 2009). Od

ukupnog broja izvedenih TKMS u 2019. godini u Europi i suradničkim zemljama, u približno 8% TKMS izvor je bila koštana srž, u približno 91% TKMS izvor je bila mobilizirana periferna krv, dok je u manje od 1% TKMS izvor bila krv iz pupkovine (Passweg i sur., 2021). Navedeno potvrđuje činjenicu kako je korištenje periferne krvi kao izvora za TKMS potisnulo primjenu tradicionalnog izvora KMS – koštane srži.

#### **1.4.1. Autologna transplantacija krvotvornih matičnih stanica**

Za razliku od alogenične TKMS, autologna TKMS lako je dostupna jer nema potrebe za pronalaženjem HLA podudarnog davatelja, pogodnija je za starije primatelje te je brži oporavak oštećenog krvotvornog i/ili imunskog sustava zbog bržeg udomljavanja KMS iz periferne krvi u koštanu srž. Nadalje, neuspjeh autologne transplantacije događa se rijetko, a smrtnost povezana s liječenjem u većini je istraživanja niža od 5% – ne postoji rizik za pojavu reakcije transplantata protiv primatelja (engl. *Graft versus Host Disease*, GvHD) pa prema tome ne postoji ni potreba za imunosupresivnom terapijom nakon transplantacije (Champlin, 2003).

Međutim, kao i kod alogenične TKMS, postoji opasnost od komplikacija uzrokovanih predtransplantacijskim postupcima. Osim toga, nakon autologne TKMS veća je učestalost pojave povrata bolesti (relapsa) nego nakon alogenične TKMS. Naime, KMS transplantirane autolognom TKMS mogu sadržavati maligne matične stanice, što je jedan od uzroka pojave relapsa (Khaddour i sur., 2022), te se prilikom autologne TKMS ne događa imunološki posredovan GvT koji se javlja nakon alogenične TKMS (Champlin, 2003).

#### **1.4.2. Alogenična transplantacija krvotvornih matičnih stanica**

Različiti genetički i klinički čimbenici utječu na uspješnost alogenične TKMS. Ukoliko davatelj KMS nije HLA identičan srodni davatelj, odnosno, jednojajčani blizanac koji je genotipski HLA identičan primatelju, postoji mogućnost da imunološki sustav pokrene imunosnu, odnosno, transplantacijsku reakciju. Transplantacijska reakcija oblik je specifične imunosti posredovan limfocitima T koji migriraju u presadak i oštećuju ga (Žunec i sur., 2011). Može biti usmjerena prema antigenima krvnih grupa AB0, stranim molekulama HLA (druge vrste iste jedinice) te slabim antigenima tkivne podudarnosti (engl. *Minor Histocompatibility Antigens*, MiHA, ili *H Antigens*).

S obzirom na to da su molekule HLA poznate kao jaki transplantacijski antigeni, stupanj podudarnosti HLA između primatelja i davatelja glavni je ograničavajući čimbenik prilikom alogenične TKMS (Žunec i sur., 2011). Imunološka barijera, koju predstavljaju molekule HLA, prisutna prije same alogenične TKMS ključna je za uspješan ishod same transplantacije. Budući da su molekule HLA glavna meta imunološkog odgovora, preživljenje alogeničnog transplantata prvenstveno ovisi o stupnju podudarnosti HLA između primatelja i davatelja (Phillips i Callaghan, 2017).

Prije standardnih postupaka, u predtransplantacijsku pripremu primatelja potrebno je uključiti imunogenetske testove tipizacije alela HLA primatelja i davatelja, određivanja broja i vrste protutijela HLA u serumu primatelja te test križne reakcije između primatelja i davatelja (potvrдна tipizacija HLA) (Žunec i sur., 2011). Kriteriji EBMT i Nacionalnog programa doniranja koštane srži (engl. *National Marrow Donor Program*, NMDP) temelje se na podudarnosti na lokusima HLA-A, -B, -C i -DRB1 (podudarnost 8/8) ili podudarnosti na lokusima HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1 (podudarnost 10/10) na razini alela. S obzirom na podudarnost HLA između primatelja i davatelja, davatelj može biti genotipski HLA podudaran srodni davatelj, fenotipski HLA podudaran nesrodni davatelj ili HLA haploidentičan srodni davatelj (Grubić, 2018).

Genotipski HLA podudaran srodni davatelj predstavlja najbolji izbor prilikom alogenične TKMS i to prvenstveno zbog podudarnosti u svim genima koji se nasljeđuju u bloku na jednom kromosomu 6 (haplotip HLA). Najčešće su to brat ili sestra primatelja s istim naslijeđenim haplotipovima HLA po majci i ocu pa su prema tome genotipski HLA podudarni s primateljem. Zbog pravilne segregacije gena HLA, vjerojatnost nasljeđivanja istih haplotipova HLA, odnosno, podudarnost HLA između potomaka istih roditelja iznosi 25%. U slučaju kad primatelj nema genotipski HLA identičnog brata ili sestru, moguće je pronaći fenotipski HLA podudarnog davatelja među srodnim članovima šire obitelji. Također, u slučaju kad primatelj nosi vrlo čest haplotip HLA, postoji mogućnost da je jedan od roditelja fenotipski HLA podudaran davatelj (Grubić, 2018).

Budući da približno samo trećina od ukupnog broja bolesnika koji su u programu alogenične TKMS ima HLA podudarnog srodnog davatelja, za preostale primatelje potrebno je putem Svjetskog registra dobrovoljnih davatelja KMS (engl. *World Marrow Donor Association*, WMDA) pronaći fenotipski HLA podudarnog nesrodnog davatelja. WMDA najveća je svjetska baza podataka o dobrovoljnim davateljima KMS i jedinicama krvi iz pupkovine. Čini ju više od 39 milijuna dobrovoljnih davatelja KMS iz 53 zemlje s ukupno



73 nacionalnih registara dobrovoljnih davatelja KMS te više od 804 tisuće jedinice krvi iz pupkovine iz 36 zemalja s ukupno 53 banke krvi iz pupkovine (*web6*). Hrvatski registar dobrovoljnih darivatelja KMS (RDDKMS) uključen je u rad WMDA s više od 62 tisuće upisanih potencijalnih dobrovoljnih davatelja KMS te s više od 3600 jedinica krvi iz pupkovine darovanih u javnu Banku krvi iz pupkovine Ana Rukavina (*web7*). Ishodi bolesnika liječenih alogeničnom TKMS od HLA podudarnog nesrodnog davatelja podjednaki su ishodima transplantacije bolesnika liječenih alogeničnom TKMS od HLA podudarnog srodnog davatelja (Robin i sur., 2013).

Unatoč toliko velikom broju potencijalnih davatelja KMS u WMDA, procjenjuje se da se za svega 50-70% bolesnika uspije pronaći potpuno HLA podudaran nesrodan davatelj KMS u bazi (Little i sur., 2021). Za primatelje s učestalim alelima HLA i/ili visoko konzerviranim haplotipovima HLA vjerojatnost pronalaska HLA podudarnog nesrodnog davatelja puno je veća nego za primatelje s rijetkim alelima i haplotipovima HLA. Primatelji koji nemaju genotipski ili fenotipski HLA podudarnog srodnog davatelja te fenotipski HLA podudarnog nesrodnog davatelja, ovisni su o alternativni davateljima što podrazumijeva različite stupnjeve nepodudarnosti HLA između primatelja i davatelja. Takvi davatelji su HLA nepodudarani (haploidentični) srodni davatelji ili HLA nepodudarani nesrodni davatelji koji se od primatelja razlikuju u jednom ili dva alela na lokusima HLA (Grubić, 2018).

Najbolji rezultati liječenjem alogeničnom TKMS postižu se liječenjem u ranoj fazi razvoja ili povrata bolesti, liječenjem nakon neuspjeha ili djelomičnog odgovora na početno liječenje te liječenjem bolesti s visokim rizikom povrata ili prelaska u agresivni oblik (Champlin, 2003). Alogenična TKMS s povećanjem stupnja nepodudarnosti HLA općenito je povezana s lošijim ukupnim ishodima liječenja (Jorge i sur., 2018). Unatoč tome odluka o liječenju alogeničnom TKMS od HLA nepodudarnog davatelja opravdana je jer u tim slučajevima rizik same bolesti koja uzrokuje liječenje alogeničnom TKMS nadvlada rizik učinka nepodudarnosti HLA (Nowak, 2008). Od ukupnog broja izvedenih alogeničnih TKMS u 2019. godini u Europi i suradničkim zemljama, u približno 31% alogeničnih TKMS davatelji su bili HLA podudarni srodni davatelji, 51% HLA podudarni nesrodni davatelji, dok su za ostatak alogeničnih TKMS davatelji bili HLA nepodudarni davatelji ili neki drugi izvor (npr. krv iz pupkovine) (Passweg i sur., 2021).

Za razliku od transplantacije solidnih organa u kojoj presađeni organ sadrži malo imunološki aktivnih stanica te je glavni problem odbacivanje organa davatelja, alogeničnom

transplantacijom obnavlja se ili zamjenjuje, odnosno, rekonstruira aktivni imunski sustav dobiven od davatelja unutar primatelja (Kolb, 2008). Imunološki aktivne stanice dobivene od davatelja povezane su s intenzivnom dvosmjernom aloreaktivnošću koja će pozitivno ili negativno djelovati na ishod TKMS (Jorge i sur., 2018). Jedan od najsnažnijih oblika stanične imunoterapije u liječenju alogeničnom TKMS upravo je aloreaktivnost posredovana davateljevima citotoksičnim limfocitima T koji uzrokuju učinak GvT. Također, u alogeničnim TKMS s osiromašenim limfocitima T, pojavljuje se uloga stanica NK kao zasebnog efektorskog dijela u učinku GvT (Kolb, 2008). Učinak GvT usmjeren je na maligne stanice primatelja i kao takav može proizvesti trajnu imunološku kontrolu nakon alogenične TKMS ili iskorjenjivanje inače neizlječivih hematoloških malignih bolesti (Falkenburg i Jedma, 2017).

Međutim, pozitivni učinci GvT na ishod TKMS, često su praćeni štetnom aloreaktivnošću na normalno, zdravo tkivo primatelja, što se očituje kao imunološki posredovani učinci GvHD-a (Kolb, 2008). Nacionalni institut za zdravlje (engl. *National Institutes of Health*, NIH) sporazumom iz 2014. godine podijelio je GvHD na akutni GvHD (engl. *acute* GvHD, aGvHD) i na kronični GvHD (engl. *chronic* GvHD, cGvHD). S obzirom na vrijeme i specifične značajke pojave GvHD, aGvHD se dalje dijeli na: klasični aGvHD – javlja se unutar 100 dana od alogenične TKMS sa značajkama aGvHD; te prisutni, ponavljajući ili odgođeni aGvHD – javlja se nakon 100 dana nakon alogenične TKMS sa značajkama aGvHD; dok se cGvHD dalje dijeli na: klasični cGvHD – javlja se u bilo kojem trenutku nakon alogenične TKMS sa značajkama cGvHD; te „sindrom preklapanja“ (engl. „*overlap syndrome*“) – javlja se u bilo kojem trenutku nakon TKMS sa jednom ili više značajkama aGvHD kod primatelja koji ima dijagnostičke i karakteristične značajke cGvHD (Jagasia i sur., 2015). Uz povrat i progresiju bolesti te teške infekcije, GvHD predstavlja glavnu komplikaciju nakon alogenične TKMS te je glavni uzrok smrti bolesnika.

Brojna istraživanja o povezanosti nepodudarnosti na pojedinom lokusu HLA s ishodom nakon TKMS, pokazala su da su bolesnici transplantirani od HLA nepodudarnog nesrodnog davatelja izloženi većem riziku za pojavu GvHD-a, povećanoj učestalosti relapsa, kao i smrtnošću povezanom sa samom TKMS (Khaddur i sur., 2022). Istraživana je i povezanost svakog pojedinog lokusa HLA s ishodom TKMS, a zbirni rezultati prikazani su u *tablici 2*. Bez obzira na velik broj takvih istraživanja, ne postoji jedinstven stav koja se nepodudarnost HLA prihvaća kao najbolja, odnosno, nepodudarnost kojeg će lokusa HLA rezultirati najmanjim rizikom. Odluka ovisi o protokolu svakog pojedinog transplantacijskog

centra te o nekim drugim čimbenicima (brzina dostupnosti davatelja, spol, dob, krvna grupa) (Little i sur., 2021). Međutim, jedinstven je stav da se uvijek (kad je to moguće) prije izabere onaj nepodudarni davatelj koji je s bolesnikom nepodudaran na razini alela HLA.

**Tablica 2.** Povezanost podudarnosti HLA s ishodom TKMS

Nepodudarni lokus HLA	GvHD	GvT	OS
HLA-A	↑		↓
HLA-B	↑		↓
HLA-C	↑	Uočen	↓
HLA-DRB1	↑↓		↓
HLA-DQB1	↓		↑
HLA-DPB1	↑	Uočen	↓

Kazalo: GvHD – reakcija transplantata protiv primatelja (engl. *Graft versus Host Disease*); GvT – transplantat protiv tumora (engl. *Graft versus Tumor*); OS – ukupno preživljenje (engl. *overall survival*); ↑ – povećan rizik; ↓ – smanjen rizik (preuzeto i prilagođeno prema Petersdorf, 2016)

S obzirom da do navedenih komplikacija dolazi i kod (naizgled) potpuno podudarnih HLA parova primatelja i davatelja, podudarnost molekula HLA između primatelja i davatelja može se procijeniti i na strukturnoj razini. Na površini molekula HLA nalazi se više epitopa HLA, odnosno, više antigenskih determinanti koje određuju specifičnost promatrane molekule. Epitopi HLA određeni su površinski izloženim polimorfnim aminokiselinskim ostatcima nazvanim epletima HLA. Eplete HLA određuje položajni broj u aminokiselinskom slijedu i polimorfni ostatak te su prema tome mnogi epleti HLA identificirani kao tripleti (slijed od tri nukleotida), dok ostali uključuju duže sljedove nukleotida i polimorfne ostatke. Na strukturnoj razini epleti HLA parova primatelja i davatelja uspoređuju se unutar i između određenog lokusa HLA čime se utvrđuje koji se epitopi na molekulama HLA dijele ili razlikuju između parova (Duquesnoy, 2008). Klinički značajno se pokazalo izbjegavanje nepodudarnosti epleta HLA visoke ekspresije, okarakteriziranih kao „žarišne točke“, dok se epleti niske ekspresije mogu smatrati dozvoljenim nepodudarnostima (Bezstarosti i sur., 2022). Sličan model dozvoljenih i

nepodudarnosti HLA, temeljen na jačini ekspresije, razvio se i među alelima HLA-DPB1, te je nazvan algoritmom TCE3/TCE4 (Crocchiolo, 2009).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

U skupini parova primatelj-nesrodni davatelj u programu alogenične TKMS odrediti razinu nepodudarnosti HLA (niska rezolucija – razina gena, visoka rezolucija – razina alela) za lokuse HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1.

Tipizirati parove primatelj-nesrodni davatelj za alele lokusa HLA-DPB1 te utvrditi broj i smjer nepodudarnosti za alele lokusa HLA-DPB1 para primatelj-nesrodni davatelj.

Istražiti broj nepodudarnosti u epletima HLA razreda I, razreda II, kao i sveukupan broj nepodudarnosti u epletima HLA para primatelj-nesrodni davatelj.

Utvrditi utjecaj nepodudarnosti HLA, kao i drugih čimbenika (spol, dob, dijagnoza, izvor KMS), na pojavu GvHD-a, povrata bolesti te na preživljenje bolesnika.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Ispitanici**

Istraživanje je provedeno na skupini od 54 bolesnika prosječne životne dobi od 41 godine koji su u razdoblju od 2015. do 2020. godine u Zavodu za hematologiju, Klinike za internu medicinu, Kliničkog bolničkog centra Zagreb liječeni alogeničnom TKMS. Indikacije za liječenje bile su hematološke maligne bolesti. Odabrana skupina bolesnika nije imala fenotipski 10/10 HLA podudarnog nesrodnog davatelja, već su svi njihovi davatelji KMS bili 9/10 HLA podudarni nesrodni davatelji iz različitih registara uključenih u WMDA. Osnovne osobine bolesnika i njihovih nesrodnih davatelja prikazane su u *tablici 3*.

**Tablica 3.** Osnovne osobine bolesnika i njihovih nesrodnih davatelja (N=54)

<b>Ispitanici</b>	<b>prosječna dob (raspon godina)</b>
Primateelj	41,04 (1-66)
Davatelj	32,63 (1-57)

<b>Spol primatelja</b>	<b>n (%)</b>
M	39 (72,22)
Ž	15 (27,78)

<b>Spol para primatelj-nesrodni davatelj</b>	<b>n (%)</b>
Ž – Ž	6 (11,11)
Ž – M	9 (16,67)
M – Ž	18 (33,33)
M – M	21 (38,89)

<b>Dijagnoza</b>	<b>n (%)</b>
AML	21 (38,89)
ALL	13 (24,07)
MDS	6 (11,11)
CML	5 (9,26)
CLL	1 (1,85)
NHL	1 (1,85)
HL	1 (1,85)
Ostalo	6 (11,11)

<b>Protokol kondicioniranja</b>	<b>n (%)</b>
MAC	22 (40,74)
RIC	32 (59,26)

**Tablica 3.** nastavak

Izvor KMS	n (%)
Koštana srž	18 (33,33)
Periferne KMS	36 (66,67)
Status	n (%)
Živ	26 (48,15)
Mrtav	28 (51,85)
Uzrok smrti (N=28)	n (%)
Relaps	12 (42,86)
TRM	8 (28,57)
Ostalo	8 (28,57)
GvHD	n (%)
Bez znakova	21 (38,89)
aGvHD	22 (40,74)
cGvHD	6 (11,11)
aGvHD + cGvHD	5 (9,26)

Kazalo: n – broj ispitanika; % - učestalost; Ž – žene; M – muškarci; AML – akutna mijeloična leukemija; ALL – akutna limfoblastična leukemija; MDS – mijelodisplastični sindrom; CML – kronična mijeloična leukemija; CLL – kronična limfocitna leukemija; NHL – non-Hodgkinov limfom; HL – Hodgkinov limfom; MAC – mijeloablativno kondicioniranje; RIC – kondicioniranje sniženog intenziteta; KMS – krvotvorne matične stanice; TRM – smrt uzrokovana transplantacijom; GvHD – reakcija transplantata protiv primatelja (engl. *Graft versus Host Disease*); aGvHD – akutni GvHD; cGvHD – kronični GvHD

### 3.2. Metode

Svim bolesnicima i njihovim 9/10 HLA podudarnim nesrodnim davateljima uzeto je 5 mL periferne krvi s antikoagulansom EDTA iz koje se izolirala DNA. Nakon izolacije



DNA, bolesnici i nesrodni davatelji tipizirani su metodom lančane reakcije polimerazom i oligonukleotidima specifičnim za određenu sekvencu HLA (engl. *Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Oligonucleotids*, PCR-SSO) za alele lokusa HLA-DPB1, dok su svi sudionici istraživanja potvrdno tipizirani metodom lančane reakcije polimerazom i početnicama specifičnim za određenu sekvencu HLA (engl. *Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Primer*, PCR-SSP) za alele lokusa HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1.

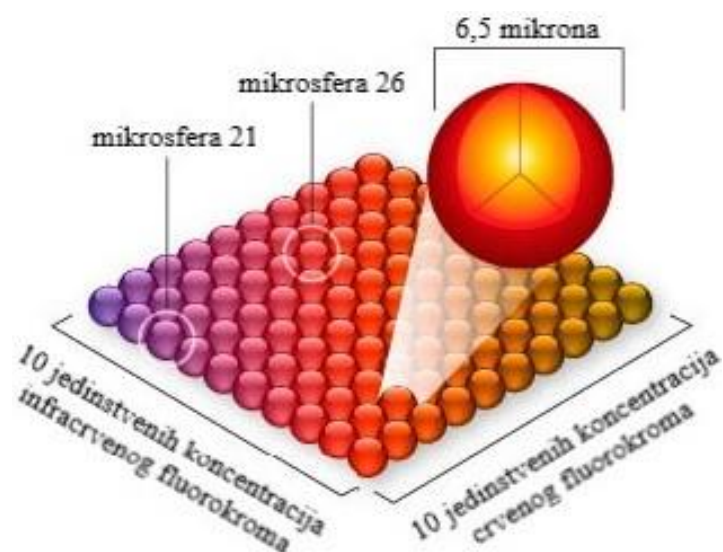
### **3.2.1. Izolacija DNA**

Iz 2 mL uzorka periferne krvi svih ispitanika izolirana je DNA pomoću komercijalnog seta za izolaciju DNA (NucleoSpin® Blood, Macherey-Nagel, Düren, Njemačka). Set sadrži NucleoSpin® kolone s kolektorskim epruveticama, kolektorske epruvetice (2 mL), proteinazu K za razgradnju stanica koja se isporučuje s puferom PB za stabilizaciju (engl. *Proteinase Buffer PB*) te pufer: B3 za liziranje eritrocita (engl. *Lysis Buffer B3*), BW za ispiranje (engl. *Wash Buffer BW*), B5 za ispiranje koji sadrži alkohol (engl. *Wash Buffer B5*), te pufer BE za otapanje DNA (engl. *Elution Buffer BE*). Postupak izolacije DNA izvodi se prema NucleoSpin® Blood protokolu. Postupkom se dobije 100 µl DNA koncentracije 20-30 ng/µl.

### **3.2.2. Metoda PCR-SSO**

Metoda PCR-SSO omogućuje tipizaciju tkiva na razini niske (NR) do srednje rezolucije (SR), odnosno, molekularnu tipizaciju HLA na razini gena (dvije znamenke, npr. HLA-A\*02). Temelji se na umnažanju egzona 2 i 3 za tipizaciju gena HLA razreda I i egzona za tipizaciju gena HLA razreda II upotrebom početnica obilježenih biotinom koje su visoko specifične za određene sekvence gena HLA. Metoda PCR-SSO izvodila se prema LIFECODES® HLA-SSO Typing (Immucor, Stamford, USA) protokolu. Nakon denaturacije, nastali jednolančani produkti obilježeni biotinom sudjeluju u hibridizacijskoj reakciji s različitim populacijama mikrosfera. Mikrosfere su polistirenske kuglice veličine 6,5 mikrona od kojih je svaka ispunjena jedinstvenim omjerom crvenog i infracrvenog fluorokroma, a međusobno se razlikuju po fluorescentnom intenzitetu. Na površinu svake fluorokromom ispunjene mikrosfere mogu se vezati oligonukleotidi specifični za određenu sekvencu HLA (engl. *Sequence Specific Oligonucleotides*, SSO). U jednoj reakciji moguće

je interpretirati do 100 različitih sekvenci gena HLA. Shematski prikaz kuglica mikrosfera nalazi se na slici 8.



**Slika 8.** Shematski prikaz kuglica mikrosfera (preuzeto i prilagođeno prema *web8*)

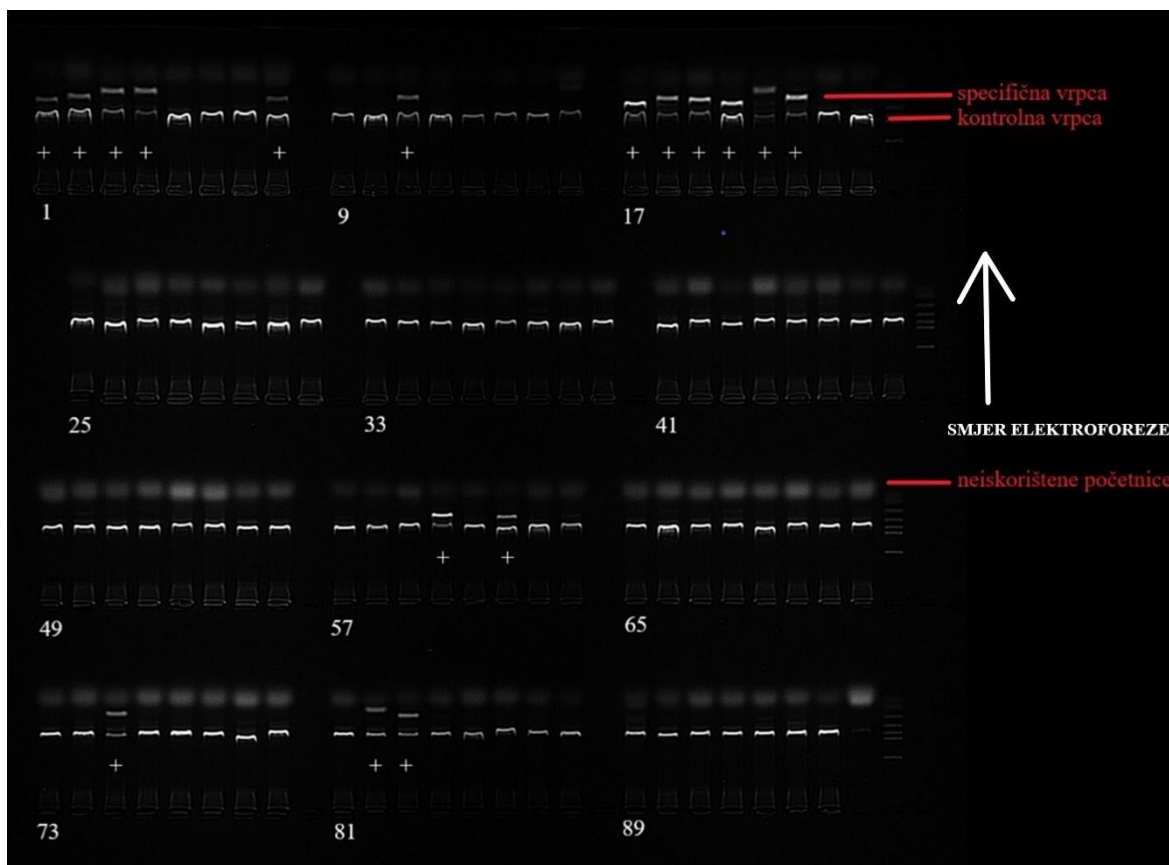
Nakon završetka hibridizacije, hibridizacijskoj smjesi produkta PCR i SSO dodaje se otopina fluorokroma SA-PE (engl. streptavidin-phycoerythrin) za obilježavanje, nastala konjugacijom streptavidina bojom fikoeritrin, koja se veže na biotinom označeni dio. Rezultati hibridizacijske reakcije očitavaju se pomoću uređaja Luminex koji očitava fluorescenciju pomoću dva lasera – crvenog koji ekscitira fluorokrom u mikrosferama te zelenog koji ekscitira fluorokrom vezan na biotinom označeni dio. Usporedbom uzoraka negativne i pozitivne kontrole s analiziranim uzorcima, rezultati se interpretiraju kao negativni ili pozitivni. Izostanak fluorescence interpretira se kao negativna reakcija što znači da nakon hibridizacije nije došlo do specifičnog vezanja produkata PCR obilježenih biotinom s komplementarnim SSO na određenim mikrosferama, dok pozitivna reakcija znači da je došlo do vezanja. Analitičkim programom MATCH IT!® DNA (Immucor, Stamford, USA) očitava se koje su se SSO vezale na produkt PCR, odnosno, određuje se o kojim se alelnim skupinama HLA radi.

### 3.2.3. Metoda PCR-SSP

Metoda PCR-SSP omogućuje tipizaciju tkiva na razini visoke rezolucije (VR), odnosno, molekularnu tipizaciju HLA na razini alela (četiri znamenke, npr. HLA-A\*02:01). Temelji se na umnožavanju određene sekvence DNA upotrebom parova početnica

specifičnih za pojedini alel HLA ili skupinu alela HLA. Metoda PCR-SSP izvodila se korištenjem komercijalnih setova Olerup SSP® HLA Typing Kits (West Chester, PA, SAD). Unutar svake reakcije u setu nalaze se kontrolne početnice i početnice specifične za određenu sekvencu HLA. Kontrolne početnice vežu se na sekvencu gena za hormon rasta te umnažaju odsječak DNA određene veličine koji služi kao pozitivna kontrola. Svaka od reakcija testira prisustvo jednog ili skupine alela HLA. Broj reakcija PCR ovisi o tome koji se gen/lokus HLA tipizira – 23+1 reakcija PCR za lokus HLA-A, -C i -DRB1, 47+1 reakcija PCR za lokus HLA-B, 13+1 reakcija PCR za lokus HLA-DQB1 te 95+1 reakcija PCR za lokus HLA-DPB1 (gdje je +1 označava reakciju u kojoj je negativna kontrola).

Očitovanje rezultata izvodilo se elektroforezom na 1,5%-tnom agaroznom gelu obojenim bojom GelRed (GenoVision Inc, West Chester, PA, SAD) koristeći pufer 1xTBE. Nakon elektroforeze, gel se slika pomoću kamere s tamnom komorom UV G:BOX (Syngene, Cambridge, UK). S obzirom na vidljivost umnoženog produkta PCR, reakcija će biti negativna ukoliko sadrži samo kontrolnu vrpcu te pozitivna ukoliko sadrži i kontrolnu i vrpcu koja označava specifični umnoženi produkt PCR. Interpretacija rezultata temeljena je na specifičnosti reakcija koje su označene kao pozitivne reakcije. Na *slici 9* nalazi se prikaz gel elektroforeze umnoženog produkta PCR lokusa HLA-DPB1 metodom PCR-SSP. Analitičkim programom Helmberg Score SSP™ mogu se odrediti aleli svakog pojedinog lokusa HLA.



**Slika 9.** Prikaz gel elektroforeze umnažanja metodom PCR-SSP uzorka NN za lokus HLA-DPB1; u jažicama broj 1, 2, 3, 4, 8, 11, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 60, 62, 75, 82 i 83 prisutne su pozitivne i kontrolne reakcije (dvije vrpce), dok su u ostalim jažicama prisutne samo kontrolne reakcije

### 3.2.4. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka napravljena je programom MedCalc (verzija 19.2.6) pomoću Kaplan-Meierove krivulje te Kruskal-Wallis testa. Kaplan-Meierova krivulja koristi se za opisivanje i analizu duljine vremena do nastanka događaja. Ishod u analizi Kaplan-Meierovom krivuljom često uključuje smrtnost od svih uzroka. U našem istraživanju korištena je za analizu ukupnog preživljenja (engl. *overall survival*, OS). Ukupno preživljenje računalo se od dana transplantacije do smrti ili posljednjeg praćenja. Nakon Kaplan-Meierove analize korišten je logrank statistički test za usporedbu univarijatnih utjecaja različitih čimbenika na ukupno preživljenje.

Kruskal-Wallis testom utvrđuje se postoji li statistički značajna razlika između dvaju ili više promatranih skupina. U našem istraživanju korišten je za analizu pojave GvHD-a te

pojave relapsa. Nakon Kruskal-Wallis testa korišten je conover statistički test za analizu univarijantnih utjecaja različitih čimbenika na pojavu GvHD-a i relapsa. Multivarijantne analize utjecaja različitih čimbenika na ishod TKMS, odnosno, na ukupno preživljenje, pojavu GvHD-a te pojavu relapsa, provedene su pomoću regresijskog modela metode najmanjih kvadrata i uključivale su varijable koje su pokazale statističku značajnost u pojedinim univarijantnim analizama. U multivarijantnu analizu uvrštene su varijable koje su u univarijantnoj analizi bile povezane s ishodom analize uz statističku značajnost  $P \leq 0,2$ .  $P < 0,05$  smatran je statistički značajnim.

## 4. REZULTATI

Među 54 bolesnika, petnaest (27,78%) osoba bilo je ženskog spola te 39 (72,22%) osoba muškog spola. Najčešća dijagnoza za liječenje TKMS bila je akutna mijeloična leukemija (AML) i to kod 21 (38,89%) bolesnika. Slijede ju akutna limfoblastična leukemija (ALL) kod trinaest (24,07%) bolesnika, mijelodisplastični sindrom (MDS) kod šest (11,11%) bolesnika, kronična mijeloična leukemija (CML) kod pet (9,26%) bolesnika, te kronična limfocitna leukemija (CLL), non-Hodgkin limfom (NHL) i Hodgkinov limfom (HL) kod po jednog (1,85%) bolesnika. Preostalih šest (11,11%) bolesnika imalo je druge dijagnoze za liječenje TKMS.

S obzirom na omjer spolova, u šest (11,11%) TKMS i primatelj i davatelj bile su osobe ženskog spola; u devet (16,67%) TKMS primatelj je bila osoba ženskog spola, dok je davatelj bila osoba muškog spola; u osamnaest (33,33%) TKMS primatelj je bila osoba muškog spola, dok je davatelj bila osoba ženskog spola; te u 21 (38,89%) TKMS i primatelj i davatelj bile su osobe muškog spola. U predtransplantacijskoj obradi bolesnika, 22 (40,74%) bolesnika kondicionirano je po mijeloablativnom protokolu, dok je 32 (59,26%) bolesnika kondicionirano po protokolu sniženog intenziteta. Izvor KMS u osamnaest (33,33%) TKMS bila je koštana srž, a u 36 (66,67%) periferne KMS.

U trenutku istraživanja, 26 (48,15%) bolesnika liječenih TKMS bilo je živo, dok je njih 28 (51,85%) umrlo. Uzrok smrti kod dvanaest (42,86%) bolesnika bio je relaps bolesti, kod osam (28,57%) bolesnika smrt bila je uzrokovana transplantacijom, dok je kod osam bolesnika smrt nastupila zbog nekog drugog razloga. Nakon TKMS, kod 21 (38,89%) bolesnika nije bilo znakova GvHD-a, kod 22 (40,74%) uočena je pojava akutnog GvHD-a, kod šest (11,11%) pojava kroničnog GvHD-a, dok je kod pet (9,26%) bolesnika uočena pojava i akutnog i kroničnog GvHD. Navedene osobine bolesnika liječenih TKMS prikazane su u *tablici 3*.

### 4.1. Analiza nepodudarnosti HLA para primatelj-nesrodni davatelj za lokuse HLA-A, -B, -C, DRB1 i -DQB1

Rezultati analize nepodudarnosti HLA para primatelj-nesrodni davatelj za lokuse HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1 prikazani su u *tablici 4*. Analizom nepodudarnosti za lokuse HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1 unutar skupine primatelja i njihovih nesrodnih

davatelja, utvrđeno je da su svi bolesnici imali nepodudarnost na jednom od lokusa HLA, odnosno, da su bili 9/10 podudarni sa svojim nesrodnim davateljima. Najveći broj nepodudarnosti HLA uočen je za lokus HLA-A i to kod dvadeset (37,04%) bolesnika. Zatim slijedi nepodudarnost na lokusu HLA-DRB1 kod trinaest (24,07%) bolesnika, na lokusu HLA-B kod jedanaest (20,37%) bolesnika, na lokusu HLA-C kod osam (14,82%) bolesnika te na lokusu HLA-DQB1 kod dva (3,70%) bolesnika.

Među parovima primatelj-nesrodni davatelj, od ukupno dvadeset (37,04%) nepodudarnosti uočenih na lokusu HLA-A, za sedamnaest (85,00%) nepodudarnosti utvrđeno je da su na razini gena HLA, dok je za tri (15,00%) nepodudarnosti utvrđeno da su na razini alela HLA. Od ukupno jedanaest (20,37%) nepodudarnosti uočenih na lokusu HLA-B, za sedam (63,64%) nepodudarnosti utvrđeno je da su na razini gena, dok je za četiri (36,36%) nepodudarnosti utvrđeno da su na razini alela. Od ukupno osam (14,82%) nepodudarnosti uočenih na lokusu HLA-C, za sedam (87,50%) nepodudarnosti utvrđeno je da su na razini gena, dok je jedna (12,50%) nepodudarnost bila na razini alela. Od ukupno trinaest (24,07%) nepodudarnosti uočenih na lokusu HLA-DRB1, nepodudarnosti za tri (23,08%) para primatelj-nesrodni davatelj bile su na razini gena, dok su za deset (76,92%) bile na razini alela. Samo su dva para (3,70%) bili nepodudarni za lokus HLA-DQB1 i obje nepodudarnosti bile su na razini gena.

**Tablica 4.** Raspodjela nepodudarnosti HLA para primatelj-nesrodni davatelj za lokuse HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1 (N=54)

Lokus	n (%)	NR n (%)	VR n (%)
HLA-A	20 (37,04)	17 (85,00)	3 (15,00)
HLA-B	11 (20,37)	7 (63,64)	4 (36,36)
HLA-C	8 (14,82)	7 (87,50)	1 (12,50)
HLA-DRB1	13 (24,07)	3 (23,08)	10 (76,92)
HLA-DQB1	2 (3,70)	2 (100,00)	-
$\Sigma$	54	36 (66,67)	18 (33,33)

Kazalo: n – broj ispitanika; % – učestalost; NR – niska rezolucija (dvije znamenke - razina gena HLA); VR – visoka rezolucija (četiri znamenke - razina alela HLA);  $\Sigma$  – ukupan broj

Rezultati analize smjera nepodudarnosti HLA para primatelj-nesrodni davatelj za lokuse HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1 prikazani su u *tablici 5*. Smjer nepodudarnosti HLA može biti u smjeru davatelj → primatelj, odnosno, transplantat protiv primatelja (engl. *Graft versus Host*, GvH) ili u smjeru primatelj → davatelj, odnosno, primatelj protiv transplantata (engl. *Host versus Graft*, HvG). Analizom smjera nepodudarnosti za lokuse HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1 unutar skupine para primatelj-nesrodni davatelj, utvrđeno je da je pet (9,26%) nepodudarnosti bilo u smjeru GvH, jedna (1,85%) nepodudarnost u smjeru HvG, dok je kod 48 (88,89%) parova nepodudarnost bila u oba smjera.

**Tablica 5.** Smjer nepodudarnosti HLA para primatelj-nesrodni davatelj za lokuse (N=54)

Smjer nepodudarnosti	n (%)
GvH	5 (9,26)
HvG	1 (1,85)
GvH + HvG	48 (88,89)

Kazalo: n – broj ispitanika; % – učestalost; GvH – transplantat protiv primatelja (engl. *Graft versus Host*); HvG – primatelj protiv transplantata (engl. *Host versus Graft*)

#### **4.2. Analiza nepodudarnosti HLA para primatelj-nesrodni davatelj kad je uključen i lokus HLA-DPB1**

Rezultati analize nepodudarnosti HLA para primatelj-nesrodni davatelj kad je uključen i lokus HLA-DPB1 prikazani su u *tablici 6*. Analizom nepodudarnosti na lokusima HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 i -DPB1 unutar skupine primatelj-nesrodni davatelj, za sedam (12,96%) bolesnika utvrđeno je da su imali nepodudarnost samo za jedan alel HLA, odnosno, da je podudarnost HLA bila 11/12. Najveći broj (n=29; 53,71%) parova primatelj-nesrodni davatelj međusobno se razlikovao za dva alela HLA, odnosno, bili su podudarni 10/12, dok je za osamnaest parova (33,33%) utvrđena podudarnost HLA bila 9/12.

Analizom nepodudarnosti na lokusu HLA-DPB1 unutar skupine para primatelj-nesrodni davatelj na razini alela, odnosno, na visokoj rezoluciji, utvrđeno je da je sedam (12,96%) bolesnika bilo podudarno za oba alela HLA-DPB1 sa svojim nesrodnim davateljem, 29 (53,71%) bolesnika bilo je podudarno za jedan od alela HLA-DPB1, dok



osamnaest (33,33%) bolesnika nije bilo podudarno ni za jedan od alela HLA-DPB1. Prema tome, nepodudarnost za alele HLA-DPB1 uočena je kod 47 (87,04%) bolesnika.

Prema algoritmu DPB1 T-Cell Epitope Algorithm (*web9*) 36 (66,67%) parova primatelj-nesrodni davatelj imalo je dozvoljene nepodudarnosti. U skupini od osamnaest (33,33%) parova s nedozvoljenom nepodudarnosti, kod osam (14,81%) parova nepodudarnost je bila u smjeru GvH, dok je kod deset (18,52%) parova nepodudarnost bila u smjeru HvG.

**Tablica 6.** Raspodjela nepodudarnosti HLA kod para primatelj-nesrodni davatelj kad je uključen i lokus HLA-DPB1 (N=54)

Podudarnost HLA (-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DPB1)	n (%)
11/12	7 (12,96)
10/12	29 (53,71)
9/12	18 (33,33)

Podudarnost alela HLA-DPB1	n (%)
2	7 (12,96)
1	29 (53,71)
0	18 (33,33)

Dozvoljene/nedozvoljene nepodudarnosti alela HLA-DPB1 (*TCE3)	n (%)
Dozvoljene nepodudarnosti TCE3	36 (66,67)
Nedozvoljene nepodudarnosti (GvH) TCE3	8 (14,81)
Nedozvoljene nepodudarnosti (HvG) TCE3	10 (18,52)

Kazalo: n – broj ispitanika; % – učestalost; ; GvH – transplantat protiv primatelja (engl. *Graft versus Host*); HvG – primatelj protiv transplantata (engl. *Host versus Graft*); TCE3 – T-stanični epitopi podijeljeni u tri grupe; \* – izračunato programom DPB1 T-Cell Epitope Algorithm (verzija 1.0) (*web9*)

### 4.3. Analiza nepodudarnosti epleta HLA para primatelj-nesrodni davatelj

Rezultati raspodjele broja nepodudarnosti epleta HLA para primatelj-nesrodni davatelj prikazani su u *tablici 7*. Raspodjela broja nepodudarnosti epleta HLA razreda I unutar skupine parova primatelj-nesrodni davatelj pokazala je da kod 31 (57,41%) para nije bilo nepodudarnosti u epletima HLA razreda I, sedamnaest (31,48%) parova imalo je jednu do četiri nepodudarnosti u epletima HLA razreda I, dok je šest (11,11%) parova imalo više od četiri nepodudarnosti u epletima HLA razreda I.

Analiza raspodjele broja nepodudarnosti epleta HLA razreda II unutar skupine para primatelj-nesrodni davatelj kad nije bio uključen lokus HLA-DPB1, pokazala je da su 43 (79,63%) para bila podudarna na razini epleta HLA razreda II, osam (14,81%) bolesnika imalo je jednu do četiri nepodudarnosti u epletima HLA razreda II, dok su tri (5,56%) bolesnika imala više od četiri nepodudarnosti u epletima HLA razreda II. Kad je lokus HLA-DPB1 bio uključen, uočeno je da devetnaest (35,18%) bolesnika nije imalo nepodudarnosti u epletima HLA razreda II, deset (18,52%) bolesnika imalo je jednu do četiri nepodudarnosti u epletima HLA razreda II, dok je 25 (46,30%) bolesnika imalo više od četiri nepodudarnosti u epletima HLA razreda II.

Posljednjom analizom raspodjele broja nepodudarnosti epleta HLA razreda I i II unutar istraživane skupine kad nije bio uključen lokus HLA-DPB1, uočeno je da kod dvadeset (37,04%) parova nije bila prisutna nepodudarnost u epletima HLA razreda I i II, kod 25 (46,29%) parova bile su uočene jedna do četiri nepodudarnosti u epletima HLA razreda I i II, dok je devet (16,67%) parova imalo više od četiri nepodudarnosti u epletima HLA razreda I i II. Uključivanjem lokusa HLA-DPB1 u analizu, situacija se promijenila i to: devet (16,67%) parova nije imalo nepodudarnosti u epletima HLA razreda II, četrnaest (25,92%) parova imalo je jednu do četiri nepodudarnosti u epletima HLA razreda II, dok je 31 (57,41%) par imao više od četiri nepodudarnosti u epletima HLA razreda II.

**Tablica 7.** Raspodjela broja nepodudarnosti u epletima HLA para primatelj-nesrodni davatelj (N=54)

<b>HLA razred I EM</b>	<b>n (%)</b>
0	31 (57,41)
1-≤4	17 (31,48)
>4	6 (11,11)

<b>HLA razred II EM</b>	<b>n (%)</b>
a) bez HLA-DPB1	
0	43 (79,63)
1-≤4	8 (14,81)
>4	3 (5,56)
b) uključen HLA-DPB1	
0	19 (35,18)
1-≤4	10 (18,52)
>4	25 (46,30)

<b>HLA razred I + II EM</b>	<b>n (%)</b>
a) bez HLA-DPB1	
0	20 (37,04)
1-≤4	25 (46,29)
>4	9 (16,67)
b) uključen HLA-DPB1	
0	9 (16,67)
1-≤4	14 (25,92)
>4	31 (57,41)

Kazalo: n – broj ispitanika; % – učestalost; EM – nepodudarnost u epletima; \* – izračunato programom ABC Eplet Matching Program V3.1.1 i DRDQDP Eplet Matching Program V3.1. (web10)

#### 4.4. Analiza utjecaja različitih čimbenika na ishod TKMS

Univarijante analize pojave GvHD-a i pojave relapsa te ukupnog preživljenja u skupini bolesnika transplantiranih od 9/10 HLA podudarnog nesrodnog davatelja uključivale su sljedeće čimbenike: dijagnozu, izvor KMS, nepodudarnost HLA razreda I, nepodudarnost HLA razreda II, broj nepodudarnosti HLA-DPB1, dozvoljene/nedozvoljene nepodudarnosti HLA-DPB1, nepodudarnost u epletima HLA razreda I, nepodudarnost u epletima HLA razreda II (uključujući HLA-DPB1) te nepodudarnost u epletima HLA razreda I i II (uključujući HLA-DPB1).

##### 4.4.1. Utjecaj različitih čimbenika na pojavu GvHD nakon TKMS

Rezultati univarijantne analize utjecaja različitih čimbenika na pojavu GvHD-a prikazani su u *tablici 8*. Univarijantna analiza pokazala je da na pojavu akutnog ili kroničnog GvHD-a utjecaj imaju izvor KMS i broj nepodudarnosti HLA-DPB1. Bolesnici kojima su izvor KMS bile matične stanice periferne krvi imali su češću pojavu GvHD-a u odnosu na bolesnike kojima je izvor KMS bila koštana srž ( $P=0,0190$ ;  $OR=0,24$ ;  $CI=0,07-0,81$ ). Također, češću pojavu GvHD-a imali su bolesnici s dvije nepodudarnosti HLA-DPB1 u odnosu na bolesnike s jednom ili nijednom nepodudarnošću ( $P=0,0280$ ;  $OR=0,20$   $CI=0,05-0,81$ ). Utjecaj nepodudarnost HLA razreda I i razreda II na pojavu GvHD-a nalazi se na granici statističke značajnosti. Bolesnici koji su imali nepodudarnost HLA razreda I imali su češću pojavu GvHD-a u odnosu na bolesnike koji nisu imali nepodudarnost ( $P=0,0506$ ;  $OR=0,30$ ;  $CI=0,09-1,02$ ). Suprotno tome, bolesnici koji su imali nepodudarnost HLA razreda II imali su manju pojavu GvHD-a u odnosu na bolesnike koji nisu imali nepodudarnost ( $P=0,0506$ ;  $OR=3,37$ ;  $CI=0,98-11,62$ ). Multivarijantnom analizom utvrđeno je da je pojava GvHD-a povezana jedino s izvorom KMS ( $P=0,0120$ ).

**Tablica 8.** Univarijantna analiza utjecaja različitih čimbenika na pojavu akutnog ili kroničnog GvHD-a u skupini bolesnika transplantiranih od 9/10 HLA podudarnog nesrodnog davatelja (N=54)

Čimbenik	Varijable	P	OR (95% CI)
Dijagnoza	AML vs. Ostale	0,9247	
Izvor KMS	BM vs. PBSC	0,0190	0,24 (0,07-0,81)
HLA razred I MM	Prisutan vs. Odsutan	0,0506	0,30 (0,09-1,02)
HLA razred II MM	Prisutan vs. Odsutan	0,0506	3,37 (0,98-11,62)
Broj HLA-DPB1 MM	0 vs. 1 vs. 2	0,0280	0,20 (0,05-0,81)
Dozvoljeni/nedozvoljeni HLA-DPB1 MM	Dozvoljeni vs. Nedozvoljeni	0,3374	
HLA razred I EM	0 vs. 1-≤4 vs. >4	0,2360	
HLA razred II (sa HLA-DPB1) EM	0 vs. 1-≤4 vs. >4	0,9750	
HLA razred I + II (sa HLA-DPB1) EM	0 vs. 1-≤4 vs. >4	0,4386	

Kazalo: P – statistička značajnost; OR – omjer izgleda (engl. *odds ratio*); CI – raspon pouzdanosti (engl. *confidence interval*); AML – akutna mijeloična leukemija; KMS – krvotvorne matične stanice; BM – koštana srž (engl. *bone marrow*) ; PBSC – matične stanice periferne krvi (engl. *peripheral blood stem cells*); MM – nepodudarnost HLA; EM – nepodudarnost u epletima

#### 4.4.2. Utjecaj različitih čimbenika na pojavu relapsa nakon TKMS

Rezultati univarijantne analize utjecaja različitih čimbenika na pojavu relapsa prikazani su u *tablici 9*. Iz podataka prikazanih u *tablici 9* vidljivo je da se povezanost pojave relapsa s brojem nepodudarnosti u epletima HLA razreda I i razreda II (uključen HLA-DPB1) nalazi na granici statističke značajnosti. Bolesnici koji su imali manji broj nepodudarnosti u epletima HLA razreda I i razreda II (s uključenim HLA-DPB1) imali su češću pojavu relapsa u odnosu na bolesnike koji su imali veći broj nepodudarnosti (P=0,0525; OR=0,36; CI=0,10-1,30). Ostali čimbenici nisu pokazali statističku značajnost, međutim, pojedinačne nepodudarnost HLA razreda I i razreda II pokazuju tendenciju statističke značajnosti. Multivarijantna analiza nije pokazala povezanost niti jednog praćenog čimbenika s pojavom relapsa bolesti.

**Tablica 9.** Utjecaj različitih čimbenika na relaps bolesti u skupini bolesnika transplantiranih od 9/10 HLA podudarnog nesrodnog davatelja (N=54)

Čimbenik	Varijable	P	OR (95% CI)
Dijagnoza	AML vs. Ostale	0,4947	
Izvor KMS	BM vs. PBSC	0,2649	
HLA razred I MM	Prisutan vs. Odsutan	0,0926	3,05 (0,82-11,38)
HLA razred II MM	Prisutan vs. Odsutan	0,0926	0,33 (0,09-1,23)
Broj HLA-DPB1 MM	0 vs. 1 vs. 2	0,3952	
Dozvoljeni/nedozvoljeni HLA-DPB1 MM	Dozvoljeni vs. Nedozvoljeni	0,1554	
HLA razred I EM	0 vs. 1-≤4 vs. >4	0,2625	
HLA razred II (sa HLA-DPB1) EM	0 vs. 1-≤4 vs. >4	0,6419	
HLA razred I + II (sa HLA-DPB1) EM	0 vs. 1-≤4 vs. >4	0,0525	0,36 (0,10-1,30)

Kazalo: P – statistička značajnost; OR – omjer izgleda (engl. *odds ratio*); CI – raspon pouzdanosti (engl. *confidence interval*); AML – akutna mijeloična leukemija; KMS – krvotvorne matične stanice; BM – koštana srž (engl. *bone marrow*) ; PBSC – matične stanice periferne krvi (engl. *peripheral blood stem cells*); MM – nepodudarnost HLA; EM – nepodudarnost u epletima

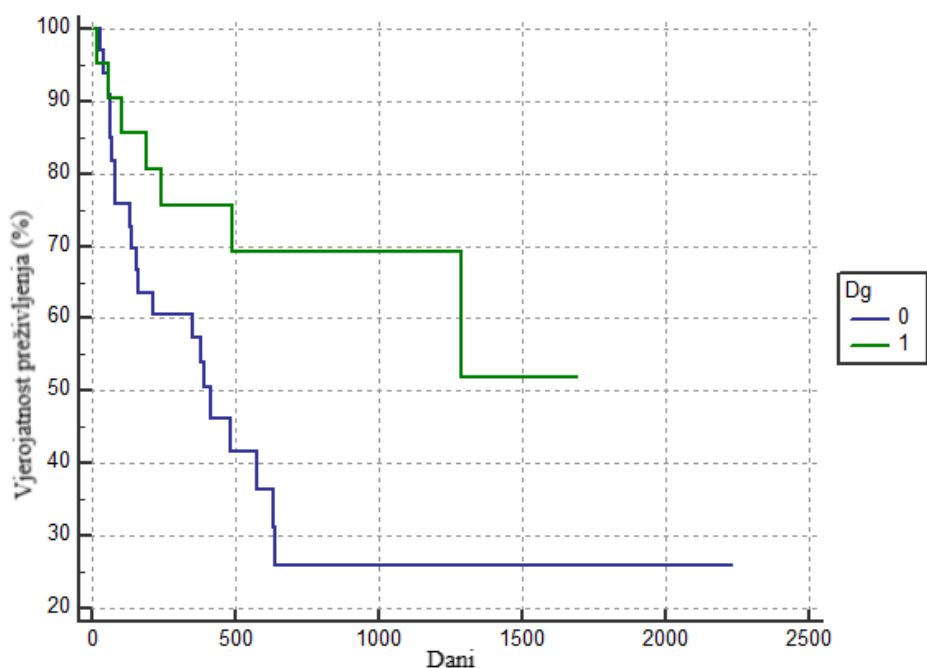
#### 4.4.3. Utjecaj različitih čimbenika na preživljenje nakon TKMS

Rezultati univarijantne analize utjecaja različitih čimbenika na preživljenje prikazani su u *tablici 10*. Univarijantnom analizom utjecaja različitih čimbenika na preživljenje utvrđeno je da jedino dijagnoza pokazuje statističku značajnost s obzirom na ukupno preživljenje u skupini bolesnika. Bolesnici s dijagnozom AML imali su bolje preživljenje u odnosu na bolesnike s drugim dijagnozama (P=0,0268; OR=2,33; CI=1,10-4,94) (*slika 10*). Ostali čimbenici nisu pokazali statističku značajnost, međutim, nepodudarnost u epletima HLA razreda I pokazuje tendenciju statističke značajnosti. Bolesnici koji nisu imali nepodudarnost u epletima HLA razreda I imali su bolje preživljenje u odnosu na bolesnike koji su imali nepodudarnosti (P=0,688; OR=0,61; CI=0,16-2,28) (*slika 11*). U multivarijantnoj analizi nije otkriven utjecaj nijednog od praćenih čimbenika na preživljenje.

**Tablica 10.** Univarijantna analiza utjecaja različitih čimbenika na preživljenje u skupini bolesnika transplantiranih od 9/10 HLA podudarnog nesrodnog davatelja (N=54)

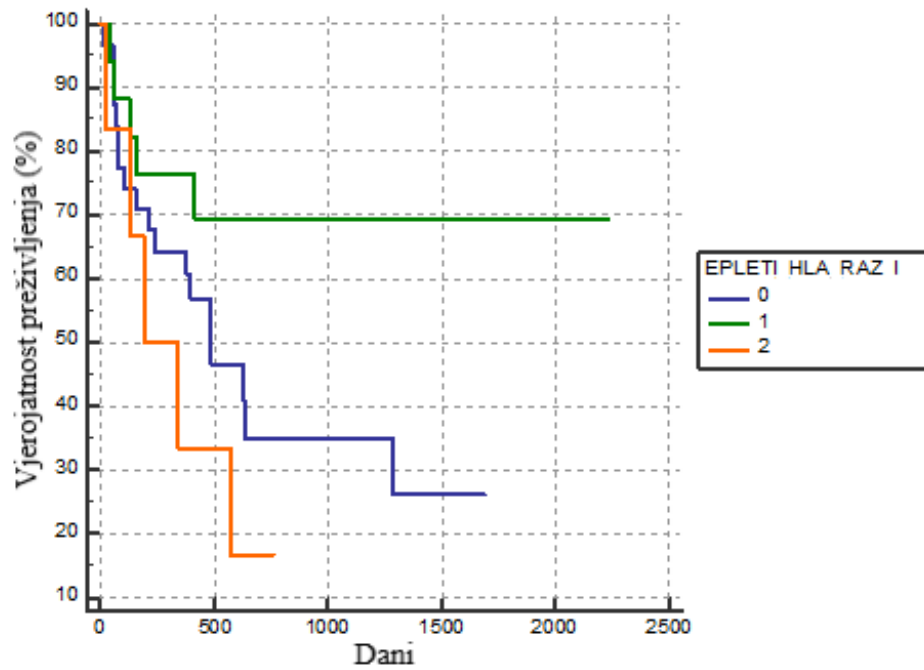
Čimbenik	Varijable	P	OR (95% CI)
Dijagnoza	AML vs. Ostale	0,0268	2,33 (1,10-4,94)
Izvor KMS	BM vs. PBSC	0,6177	
HLA razred I MM	Prisutan vs. Odsutan	0,7534	
HLA razred II MM	Prisutan vs. Odsutan	0,7534	
Broj HLA-DPB1 MM	0 vs. 1 vs. 2	0,9456	
Dozvoljeni/nedozvoljeni HLA-DPB1 MM	Dozvoljeni vs. Nedozvoljeni	0,2682	
HLA razred I EM	0 vs. 1-≤4 vs. >4	0,0688	0,61 (0,16-2,28)
HLA razred II (sa HLA-DPB1) EM	0 vs. 1-≤4 vs. >4	0,9111	
HLA razred I + II (sa HLA-DPB1) EM	0 vs. 1-≤4 vs. >4	0,0157	2,12 (0,63-7,17)

Kazalo: P – statistička značajnost; OR – omjer izgleda (engl. *odds ratio*); CI – raspon pouzdanosti (engl. *confidence interval*); AML – akutna mijeloična leukemija; KMS – krvotvorne matične stanice; BM – koštana srž (engl. *bone marrow*) ; PBSC – matične stanice periferne krvi (engl. *peripheral blood stem cells*); MM – nepodudarnost HLA; EM – nepodudarnost u epletima



**Slika 10.** Grafički prikaz preživljenja bolesnika do 2250 dana nakon alogenične TKMS ovisno o dijagnozi (P=0,0268)

Kazalo: Dg – dijagnoza; 0 – ostale dijagnoze; 1 - AML



**Slika 11.** Grafički prikaz preživljenja bolesnika do 2250 dana nakon alogenične TKMS ovisno o nepodudarnosti u epletima HLA razreda I ( $P=0,0688$ )

Kazalo: 0 – nema nepodudarnosti u epletima HLA razreda I, 1 –  $1 \leq 4$  nepodudarnosti u epletima HLA razreda I; 2 –  $>4$  nepodudarnosti u epletima HLA razreda I



## 5. RASPRAVA

Poznato je da prije konačnog izbora nesrodnog davatelja KMS nekoliko čimbenika utječe na cijeli tijek pronalaženja davatelja, poput dijagnoze bolesnika, životne dobi, CMV statusa (Bochtler i sur., 2010). Međutim, konačan izbor ovisi o dostupnosti potencijalnih davatelja KMS, odnosno, vremenu koje je potrebno za pronalazak takvog davatelja. Glavni kriterij odabira nesrodnog davatelja KMS je podudarnost HLA između primatelja i nesrodnog davatelja. Unatoč velikom broju nesrodnih davatelja u svijetu, za dio bolesnika nije moguće pronaći odgovarajućeg davatelja, a upravo su geni HLA ograničavajući faktor. Šansa da su dvije nesrodne osobe HLA podudarne vrlo je mala i ovisi o genima HLA samog primatelja.

Danas postoji nekoliko protokola koji se koriste za odabir nesrodnog davatelja. Standard u velikom broju transplantacijskih centara u svijetu, pa tako i u KBC-u Zagreb, predstavlja podudarnost HLA na visokoj rezoluciji (razina alela HLA) za lokuse HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1 (tzv. podudarnost 10/10). Međutim, za razliku od genotipski HLA podudarnog davatelja (član obitelji), kod fenotipski HLA podudarnog davatelja (nesrodni davatelj) postoji i dodatni problem da ista kombinacija alela HLA nužno ne znači i podudarnost u haplotipovima HLA.

Dostupne baze o učestalosti alela i haplotipova HLA u svijetu, nastale populacijskim istraživanjima, pokazuju da većinu populacija karakterizira izrazito veliki polimorfizam i brojnost haplotipova HLA, kako unutar iste populacije (uz izuzetak izoliranih ili zatvorenih populacija), tako i između različitih populacija, odnosno, etničkih skupina. Učestalost kojom će se neki haplotip HLA pojavljivati u populaciji ovisi o LD-u između alela HLA.

Učestalost haplotipova HLA u populaciji istodobno pospješuje i ograničava vjerojatnost pronalaska potpuno podudarnog HLA nesrodnog davatelja (Petersdorf, 2016; Grubić, 2018). Bolesnici čiji se haplotipovi HLA pojavljuju češće u populaciji, imaju veću vjerojatnost pronalaska potpuno podudarnog HLA nesrodnog davatelja u odnosu na bolesnike čiji su haplotipovi HLA rjeđi ili je veza između njihovih alela HLA prekinuta genetičkom rekombinacijom. Ovu činjenicu koriste mnogi transplantacijski centri u strategiji odabira nesrodnog davatelja KMS. Pretraživanje registra prvo se izvodi u skupini koja dijeli isto podrijetlo gdje, u teoriji, postoji veća vjerojatnost pronalaska potpuno podudarnog HLA nesrodnog davatelja.

Kad potpuno podudaran HLA nesrodni davatelj nije dostupan, odabir davatelja KMS usmjerava se na davatelje s ograničenom nepodudarnošću HLA. Uzimajući u obzir sva dosadašnja znanja o utjecaju nepodudarnosti HLA na ishod alogenične TKMS, opsežna klinička istraživanja provedena među bolesnicima iz velikih registara, kao što je američki ili japanski, ukazala su da ukupan broj nepodudarnosti te specifični lokus/lokusi HLA imaju odlučujući utjecaj na ishod same alogenične TKMS. Tako npr. kad potpuno podudaran HLA nesrodni davatelj nije dostupan, kao izbor davatelja KMS predlaže se mlađi davatelj muškog spola s jednom nepodudarnošću HLA (podudarnost HLA 9/10) koji je dostupan u relativno kratkom vremenu. Općenito, vrijeme traženja optimalnog davatelja značajno se produljuje za one bolesnike koji imaju rijetke/vrlo rijetke alele i haplotipove HLA. Treba spomenuti da vrlo mali broj transplantacijskih centara u svijetu provodi alogeničnu TKMS s nesrodnog davatelja koji je podudaran HLA 8/10.

Naše istraživanje provedeno je na skupini od 54 bolesnika koji su u KBC-u Zagreb liječeni alogeničnom TKMS od 9/10 HLA podudarnih nesrodnih davatelja. Analizirajući nepodudarnost HLA na specifičnim lokusima HLA, uočeno je da je najveći broj nepodudarnosti HLA u skupini para primatelj-nesrodni davatelj bio na lokusu HLA-A što u ovom trenutku predstavlja standard našeg transplantacijskog centra.

Najveći broj dobrovoljnih davatelja KMS tipizirano je za lokuse HLA-A, -B i -DRB1 koji se smatraju „primarnim“ ili lokusima HLA višeg prioriteta, odnosno, lokusima koji se preliminarnom pretragom prvi uzimaju u obzir. Ukoliko davatelji KMS prilikom preliminarne pretrage nisu tipizirani za ostale lokuse HLA ili su tipizirani na niskoj rezoluciji, takvi se davatelji mogu razvrstati prema vjerojatnosti da se ne otkriju dodatne nepodudarnosti među lokusima HLA (Bochtler i sur., 2010). Naime, ako postoji nepodudarnost između primatelja i davatelja na lokusu HLA-B, velika je vjerojatnost da će zbog jakog LD između alela lokusa HLA-B i -C postojati nepodudarnost i za jedan ili oba alela na lokusu HLA-C. Slična se situacija može dogoditi i zbog jakog LD između alela lokusa HLA-DRB1 i -DQB1 (Mytilineos i sur., 2021). S druge strane, aleli lokus HLA-A pokazuju slabiji LD s alelima susjednih lokusa HLA te je to ujedno i razlog zašto je u našem istraživanju u 37,04% slučajeva odabir bio davatelj s nepodudarnošću na lokusu HLA-A.

Poznato je da ishod TKMS ovisi i o tome je li nepodudarnost HLA na razini gena ili alela HLA (Petersdorf, 2016). U našem istraživanju većina uočenih nepodudarnosti na lokusu HLA-A među bolesnicima bila je na razini gena HLA (85,00%), dok su bolesnici s nepodudarnošću na lokusu HLA-DRB1 većinom (76,92%) bili transplantirani s davateljem

nepodudarnim na razini alela HLA. Razlog što je u našem istraživanju toliki postotak parova primatelj-nesrodni davatelj bio nepodudaran za lokus HLA-DRB1 na razini alela HLA, leži u činjenici da su davatelji u najvećem broju bili iz Njemačke. Naime, u našoj populaciji HLA-DRB1\*11:04 češći je nego HLA-DRB1\*11:01 koji se učestalije pojavljuje u populacijama zapadne Europe.

Pregledni rad iz 2016. godine obuhvatio je pregled dotadašnjih rezultata o ulozi pojedinih gena HLA na ishod TKMS. Većina istraživanja zaključila je da nepodudarnost na lokusu HLA-A utječe na preživljenje nakon alogenične TKMS i ne ovisi o razini nepodudarnosti. Međutim, prema nekim istraživanjima, nepodudarnost u genima HLA-A predstavlja veći rizik nego nepodudarnost u alelima HLA (Petersdorf, 2016). Za lokus HLA-B trenutno nema dovoljno podataka o utjecaju na ishod alogenične TKMS. Analizom lokusa HLA-B u našem istraživanju utvrđeno je jedanaest (20,37%) nepodudarnosti, od kojih je sedam (63,64%) bilo na razini gena, dok je ostatak (n=4; 36,36%) bio na razini alela HLA. Pojedini autori navode da je nepodudaranje u alelima HLA-B jednako rizično kao i nepodudaranje u genima HLA-B. U slučaju nepodudarnosti na lokusu HLA-C, pokazalo se da nepodudarnost gena HLA nosi veći rizik nakon TKMS.

O utjecaju nepodudarnosti na lokusu HLA-DRB1 na ishod TKMS trenutno ne postoji jedinstveno stajalište, dok je poznato da izolirana nepodudarnost na lokusu HLA-DQB1 nije povezana s višim rizicima na negativan ishod nakon TKMS. Općenito, sva istraživanja utjecaja nepodudarnosti HLA na ishod TKMS suglasna su da treba izbjegavati TKMS s nepodudarnošću na razini gena HLA kad god je to moguće (Petersdorf, 2016). Iz razloga što je naša skupina parova primatelj-nesrodni davatelj mala, u našem istraživanju nismo pratili utjecaj nepodudarnosti HLA po pojedinačnim lokusima, već samo po razredima HLA. Rezultati ovog rada pokazali su češću pojavu GvHD-a među onim bolesnicima koji su imali nepodudarnost HLA razreda I ( $P=0,0506$ ). Nasuprot tome, bolesnici s nepodudarnošću HLA razreda II imali su manju pojavu GvHD-a ( $P=0,0506$ ).

Uloga i značaj gena HLA-DPB1 u ishodu alogenične TKMS i dalje je nedovoljno istražena te ne postoji jedinstveni protokol o uključivanju ovog lokusa u algoritme pretraživanja (Burek Kamenarić i sur., 2017). Danas u svijetu mali broj transplantacijskih centara iz više razloga bira nesrodnog davatelja na temelju podudarnosti HLA 12/12 (lokus HLA-A, -B, -C, DRB1, -DQB1, -DPB1). Budući da molekule HLA-DP imaju nižu ekspresiju na staničnim membrana te ih je bilo teže određivati serološkim metodama, lokus HLA-DPB1 u prošlosti se nije uzimao u obzir pri određivanju nepodudarnosti HLA. Tek

uvođenjem molekularnih metoda, počela su istraživanja ovog lokusa i njegove uloge u ishodu TKMS. Treba istaknuti i veću učestalost rekombinacije između lokusa HLA-DPB1 i ostatka regije HLA što za rezultat ima česte slučajeve da i unutar obitelji dvoje djece koja su genotipski HLA identična za gene HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, nisu nužno identična i za gene HLA-DPB1 (Maskalan i sur., 2017). Lokus HLA-DPB1 s više od dvije tisuće različitih alela izrazito je polimorfan te predstavlja dodatni ograničavajući čimbenik u pronalaženju nesrodnog davatelja koji je s bolesnikom podudaran na svih šest lokusa HLA.

Upravo zbog velike raznolikosti alela HLA-DPB1 pokušalo se različitim metodama tj. modelima svrstati pojedine alele u određene skupine. Tako su *in vitro* modelom temeljenim na citotoksičnosti između klonova stanica T definirane skupine epitopa stanica T, tzv. skupine TCE, koje određuju jačinu ekspresije podudarnosti, odnosno, nepodudarnosti alela HLA-DPB1. Aleli HLA-DPB1 se na temelju skupina TCE klasificiraju kao aleli s niskom ekspresijom ili kao aleli s visokom ekspresijom. Na temelju ovakve podjele, pri odabiru potencijalnih nesrodnih davatelja i predviđanju ishoda TKMS, aleli HLA-DPB1 s niskom ekspresijom smatrat će se dozvoljenim nepodudarnostima HLA-DPB1, dok će se aleli HLA-DPB1 s visokom ekspresijom smatrati nedozvoljenim nepodudarnosti HLA-DPB1 (Fleischhauer i sur., 2012).

Budući da se u postupku odabira podudarnog nesrodnog davatelja u KBC-u Zagreb rutinski ne određuju aleli lokusa HLA-DPB1, upravo smo ovim retrospektivnim istraživanjem među našim parovima pratili utjecaj nepodudarnosti HLA-DPB1 na ishode TKMS. Otkrili smo da je prisutan vrlo visok postotak nepodudarnosti u alelima HLA-DPB1 (87,04%) među parovima primatelj-nesrodni davatelj, što je u skladu s rezultatima sličnih istraživanja (Mytilineos i sur., 2021). Povezanost nepodudarnosti HLA-DPB1 s teoretski očekivanom većom pojavom GvHD-a, potvrđena je i u našem istraživanju. Naime, pojava GvHD-a bila je veća kod bolesnika s nepodudarnošću za oba alela HLA-DPB1, nego kod bolesnika s jednom ili nijednom nepodudarnošću ( $P=0,0280$ ).

Analiza broja nepodudarnosti HLA-DPB1 nije pokazala statistički značajan utjecaj na povrat bolesti i ukupno preživljenje (Burek Kamenarić i su., 2017). Jedan od mogućih razloga za razliku u rezultatima leži u činjenici da je naša skupina bolesnika bila relativno mala te nije bila homogena s obzirom na dijagnozu kao i nepodudarnosti na drugim lokusima HLA. Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da uloga nepodudarnosti HLA-DPB1 i dalje ostaje otvoreno pitanje te da u potrebna daljnja istraživanja kako među našim ispitanicima, tako i među ispitanicima u svijetu.

Osim proučavanja nepodudarnosti na genskoj i alelnoj razini, tijekom vremena razvio se model koji smatra da ulogu u ishodu TKMS ima nepodudarnost za specifične HLA aminokiselinske ostatke, odnosno, eplete HLA (Duquesnoy, 2008). Proučavanjem nepodudarnosti na razini epleta HLA testira se hipoteza da se prisutnost točno određenih aminokiselinskih ostataka izraženog proteina HLA očituje povećanim rizikom GvHD-a te lošijeg preživljenja (Petersdorf, 2016). Naše istraživanje nije pokazalo utjecaj nepodudarnosti u epletima HLA na pojavu GvHD-a. Međutim, bolesnici koji su imali manji broj nepodudarnosti u epletima HLA razreda I i razreda II (uključen HLA-DPB1) imali su češću pojavu relapsa u odnosu na bolesnike koji su imali veći broj nepodudarnosti ( $P=0,0525$ ). Uzrok tome može biti pojava GvT efekta koji doprinosi nižoj pojavi relapsa kod bolesnika. Na ukupno preživljenje nepodudarnost u epletima HLA razreda I pokazuje tendenciju statističke značajnosti. Bolesnici koji nisu imali nepodudarnost u epletima HLA razreda I imali su bolje preživljenje u odnosu na bolesnike koji su imali nepodudarnosti ( $P=0,0688$ ).

## 6. ZAKLJUČAK

1. Najveći broj nepodudarnosti u parovima primatelj-nesrodni davatelj bio je na lokusu HLA-A (37%), od toga kod 85% parova na razini gena; na lokusu HLA-DRB1 24% parova bilo je nepodudarno i to češće na razini alela (77%). Nepodudarnost za gene HLA razreda I, kao i za gene HLA razreda II, pokazala je statistički graničnu vrijednost P ( $P=0,0506$ ) samo za pojavu GvHD-a.
2. Na lokusu HLA-DPB1 ukupno je 87% parova primatelj-nesrodni davatelj bilo nepodudarno, od toga njih 62% za jedan alel HLA-DPB1 i 38% za oba alela HLA-DPB1. Veći broj nepodudarnosti HLA-DPB1 bio je statistički značajno povezan samo s pojavom GvHD-a ( $P=0,0280$ ).
3. Smjer nepodudarnosti za lokuse HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 i -DPB1 između para primatelj-nesrodni davatelj najčešće je bio u oba smjera i nije pokazao povezanost s GvHD-om, relapsom ili preživljenjem nakon TKMS.
4. Analiza dozvoljene/nedozvoljene nepodudarnosti na lokusu HLA-DPB1 na temelju skupina TCE3, pokazala je da 67% parova imalo dozvoljene nepodudarnosti. Nije uočena razlika u ishodu TKMS (pojava GvHD-a i relapsa te ukupno preživljenje) između parova s dozvoljenim nepodudarnostima HLA-DPB1 u odnosu na parove s nedozvoljenim nepodudarnostima.
5. Nepodudarnost na razini epleta HLA razreda I uočena je kod 42% parova, a na razini epleta HLA razred II kod 20% parova. Češća pojava relapsa uočena je kod bolesnika koji su imali manji broj nepodudarnosti u ukupnom broju epleta HLA ( $P=0.0525$ ).
6. Statistički značajno češća pojava GvHD-a ( $P=0,0190$ ) uočena je kod bolesnika kojima je izvor KMS bila periferna krv.

## 7. LITERATURA

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S. (2018) *Stanična i molekularna imunologija*. Osmo izdanje. Zagreb: Medicinska naklada.

Aiuti, A., Scala, S., Chabannon, C. (2019) Biological Properties of HSC: Scientific Basis for HSCT. U: Carreras, E., Dufour, C., Mohty, M. Kröger, K. (2019) *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Sedmo izdanje. Cham (CH): Springer. Poglavlje 7 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553952/> doi: 10.1007/978-3-030-02278-5\_7

Alter, I., Gragert, L., Fingerson, S., Maiers, M., Louzoun, Y. (2017) HLA class I haplotype diversity is consistent with selection for frequent existing haplotypes. *PLoS Computational Biology*, 13(8), e1005693. doi:10.1371/journal.pcbi.1005693

Ayala García, M. A., González Yebra, B., López Flores, A. L., Guaní Guerra, E. (2012) The Major Histocompatibility Complex in Transplantation. *Journal of Transplantation*, 2012, 1–7. doi:10.1155/2012/842141

Baranwal, A. K., Mehra, N. K. (2017) Major Histocompatibility Complex Class I Chain-Related A (MICA) Molecules: Relevance in Solid Organ Transplantation. *Frontiers in Immunology*, 8:182. doi:10.3389/fimmu.2017.00182

Beck, S., Geraghty, D., Inoko, H., Rowen, L. (1999) The MHC sequencing consortium: Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature*, 401(6756), 921–923. doi:10.1038/44853

Bendall, L. J., Bradstock, K. F. (2014) G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 25(4), 355–367. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.07.011

Bezstarosti, S., Bakker, K. H., Kramer, C., de Fijter, J. W., Reinders, M., Mulder, A., Claas, F., Heidt, S. (2022) A Comprehensive Evaluation of the Antibody-Verified Status of Eplets Listed in the HLA Epitope Registry. *Frontiers in Immunology*, 12, 800946. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.800946>

Bhatia, M. (2007) Hematopoietic Development from Human Embryonic Stem Cells. *Hematology*, 2007(1), 11–16. doi:10.1182/asheducation-2007.1.11

Bochtler, W., Maiers, M., Bakker, J. N. A., Oudshoorn, M., Marsh, S. G. E., ... Müller, C. R. (2010) World Marrow Donor Association framework for the implementation of HLA matching programs in hematopoietic stem cell donor registries and cord blood banks. *Bone Marrow Transplantation*, 46(3), 338–343. doi:10.1038/bmt.2010.132

Bojanić, I., Mazić, S. Golubić Ćepulić, B. (2009) Prikupljanje krvotvornih matičnih stanica iz periferne krvi. *Liječnički vjesnik: glasilo Hrvatskog liječničkog zbora. Supplement*, 131, 315-323.

Borchers, C. H., Kast, J., Foster, L. J., Siu, K. W. M., Overall, C. M., Binkowski, T. A., Hildebrand, W.H., Scherer, A., Mansoor, M., Keown, P. A. (2014) The Human Proteome Organization Chromosome 6 Consortium: Integrating chromosome-centric and biology/disease driven strategies. *Journal of Proteomics*, 100, 60–67. doi:10.1016/j.jprot.2013.08.001

Burek Kamenaric, M., Maskalan, M., Grubic, Z., Mikulic, M., Serventi Seiwert, R., Durakovic, N., ... Zunec, R. (2017). HLA-DPB1 matching in unrelated hematopoietic stem cell transplantation program contributes to a higher incidence of disease relapse. *Human Immunology*, 78(11-12), 665–671. doi:10.1016/j.humimm.2017.08.008

Calabrese, B. (2018) Linkage Disequilibrium. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*. doi:10.1016/b978-0-12-809633-8.20234-3

Champlin, R. (2003) Selection of Autologous or Allogeneic Transplantation. U: Kufe, D. W., Pollock, R. E., Weichselbaum, R. R., Bast, R. C., Gansler, T. S., Holland, J. F., Frei, E. *Holland-Frei Cancer Medicine*. Šesto izdanje. Hamilton (ON): BC Decker. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12844/>

Chivu-Economescu M., Rubach M. (2017) Hematopoietic Stem Cells Therapies. *Curr Stem Cell Res Ther*. 12(2):124-133. doi: 10.2174/1574888X10666151026114241. PMID: 26496888.



- Choo, S. Y. (2007) The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications. *Yonsei Medical Journal*, 48(1), 11-23. doi:10.3349/ymj.2007.48.1.11
- Copelan, E. A. (2006) Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 354(17), 1813–1826. doi:10.1056/nejmra052638
- Costantino, P. R., Zeck, S. C., da Silva, W. A., Bicalho, M. da G. (2017) Human leukocyte antigen allele linkage disequilibrium and haplotype structure in volunteer bone marrow donors of Paraná State. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 39(3), 229–236. doi:10.1016/j.bjhh.2017.01.006
- Crocchiolo, R., Zino, E., Vago, L., Oneto, R., Bruno, B., ... Pollichieni, S. (2009) Nonpermissive HLA-DPB1 disparity is a significant independent risk factor for mortality after unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 114(7), 1437–1444. doi:10.1182/blood-2009-01-200378
- Cruz-Tapias, P., Castiblanco, J., Anaya, J. M. (2013) Major histocompatibility complex: Antigen processing and presentation. U: Anaya, J.M., Shoenfeld, Y., Rojas-Villarraga, A., Levy, R. A., Cervera R. *Autoimmunity: From Bench to Bedside*. Bogota (Colombia): El Rosario University Press. Poglavlje 10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459467/>
- Danchin, E., Vitiello, V., Vienne, A., Richard, O., Gouret, P., McDermott, M. F., Pontarotti, P. (2004). *The major histocompatibility complex origin*. *Immunological Reviews*, 198(1), 216–232. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00132.x
- Duquesnoy, R. J. (2008) Clinical usefulness of HLAMatchmaker in HLA epitope matching for organ transplantation. *Current Opinion in Immunology*, 20(5), 594–601. doi:10.1016/j.coi.2008.06.010
- Fleischhauer, K., Shaw, B. E., Gooley, T., Malkki, M., Bardy, P., Bignon, J.-D., ... Petersdorf, E. W. (2012) Effect of T-cell-epitope matching at HLA-DPB1 in recipients of unrelated-donor haemopoietic-cell transplantation: a retrospective study. *The Lancet Oncology*, 13(4), 366–374. doi:10.1016/s1470-2045(12)70004-9

Grubić, Z. (2018) Human Leukocyte Antigen Polymorphism in Search For a Matched Unrelated Donor in Haematopoietic Stem Cell Transplantation. *Molecular and Experimental Biology in Medicine*, 1 (1), 4-12.

Grubić, Z., Burek Kamenarić, M., Mikulić, M., Štingl Janković, K., Maskalan, M., Žunec, R. (2014) HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 allele and haplotype diversity among volunteer bone marrow donors from Croatia. *International Journal of Immunogenetics*, 41(3), 211–221. doi:10.1111/iji.12117

Hoek, M., Demmers, L. C., Wu, W., Heck, A. J. R. (2021) Allotype-Specific Glycosylation and Cellular Localization of Human Leukocyte Antigen Class I Proteins. *Journal of Proteome Research*, 20(9), 4518–4528. doi:10.1021/acs.jproteome.1c00466

Horton, R., Wilming, L., Rand, V., Lovering, R. C., Bruford, E. A., Khodiyar, V. K., Lush, M. J., Poverly, S., Talbot, C. C. Jr., Wright, M. W., Wain, H. M., Trowsdale, J., Ziegler A., Beck, S. (2004) Gene map of the extended human MHC. *Nature Reviews Genetics*, 5(12), 889–899.

Howell, W. M., Carter, V. Clark, B. (2010) The HLA system: immunobiology, HLA typing, antibody screening and crossmatching techniques. *Journal of Clinical Pathology*, 63(5), 387–390. doi:10.1136/jcp.2009.072371

Jagasia, M. H., Greinix, H. T., Arora, M., Williams, K. M., Wolff, D., Cowen, E. W., Palmer, J., Weisdorf, D., Treister, N. S., Cheng, G.-S., Kerr, H., Stratton, P., Duarte, R. F., McDonald, G. B., Inamoto, Y., Vigorito, A., Arai, S., Datile, M. B., Jacobsohn, D., Heller, T., Kitko, C. L., Mitchell, S. A., Martin, P. J., Shulman, H., Wu, R. S., Cutler, C.S., Vogelsang, G. B., Lee, S. J., Pavletic, S. Z., Flowers, M. E. D. (2015) National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 21(3), 389–401.e1. doi:10.1016/j.bbmt.2014.12.001

Janeway, C. A. Jr, Travers, P., Walport, M, Shlomchik, M. J. (2001) *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. Peto izdanje. New York: Garland Science. The major histocompatibility complex and its functions.

Jorge, A. S., Suárez-Lledó, M., Pereira, A., Gutierrez, G., Fernández-Avilés, F., Rosiñol, L., Llobet, N., Solano, T., Urbano-Ispizua, A., Rovira, M., Martínez, C. (2018) Single Antigen–Mismatched Unrelated Hematopoietic Stem Cell Transplantation Using High-Dose Post-Transplantation Cyclophosphamide Is a Suitable Alternative for Patients Lacking HLA-Matched Donors. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 24(6), 1196–1202. doi:10.1016/j.bbmt.2018.01.021

Kalra K, Tomar P. (2014) Stem cell: Basics, classification and applications. *Am Jour of Phytomed & Clinical Therapeut*, 2:919–30.

Kanji, S., J. Pompili, V. (2011) Plasticity and Maintenance of Hematopoietic Stem Cells During Development. *Recent Patents on Biotechnology*, 5(1), 40–53. doi:10.2174/187220811795655896

Khaddour K., Hana, C.K., Mewawalla, P. (2022) Hematopoietic Stem Cell Transplantation. U: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Kolb, H.-J. (2008) Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood*, 112(12), 4371–4383. doi:10.1182/blood-2008-03-077974

Lim, W. F., Inoue-Yokoo, T., Tan, K. S., Lai, M. I., Sugiyama, D. (2013) Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 4(3). doi:10.1186/scrt222

Little, A., Akbarzad-Yousefi, A., Anand, A., Diaz Burlinson, N., Dunn, P. P. J., Evseeva, I., ... Wright, P. A. (2021) BSHI guideline: HLA matching and donor selection for haematopoietic progenitor cell transplantation. *International Journal of Immunogenetics*, 48(2), 75–109. doi:10.1111/iji.12527

Malissen, M., Malissen, B., Jordan, B. R. (1982) Exon/intron organization and complete nucleotide sequence of an HLA gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(3), 893–897. doi:10.1073/pnas.79.3.893

Maskalan, M., Burek Kamenarić, M., Serventi-Seiwerth, R., Štingl Janković, K., Mikulić, M., Žunec, R., Duraković, N., Grubić, Z. (2017) Uloga gena HLA-DPB1 u transplantaciji krvotvornih matičnih stanica. *Bilten Krohema*, 9 (1), 30-34.

McCarthy, D. M., Goldman, J. M., Goldman, J. M. (1984) Transfusion of Circulating Stem Cells. *CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 20(1), 1–24. doi:10.3109/10408368409165768

Mytilineos, D., , Tsamadou, C., Neuchel, C., Platzbecker, U., Bunjes, D., Schub, N., Wagner-Drouet, E., Wulf, G., Kröger, N., Murawski, N., Einsele, H., Schaefer-Eckart, K., Freitag, S., Casper, J., Kaufmann, M., Dürholt, M., Hertenstein, B., Klein, S., Ringhoffer, M., Mueller, C. R., Frank, S., Schrezenmeier, H., Fuerst, D., Mytilineos, J. (2021) The Human Leukocyte Antigen-DPB1 Degree of Compatibility Is Determined by Its Expression Level and Mismatch Permissiveness: A German Multicenter Analysis. *Frontiers in immunology*, 11, 614976. doi:10.3389/fimmu.2020.614976

Mungall, A. J., Palmer, S. A., Sims, S. K., Edwards, C. A., Ashurst, J. L., Wilming, L., Jones, M. C., Horton, R., Hunt, S. E., Scott, C. E., Gilbert, J. G., Clamp, M. E., Bethel, G., Milne, S., Ainscough, R., Almeida, J. P., Ambrose, K. D., Andrews, T. D., Ashwell, R. I., Babbage, A. K., ... Beck, S. (2003) The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nature*, 425(6960), 805–811. <https://doi.org/10.1038/nature02055>

Mutar Mahdi, B. (2019). Introductory Chapter: Concept of Human Leukocyte Antigen (HLA). *Human Leukocyte Antigen (HLA)*. doi:10.5772/intechopen.83727

Nowak, J. (2008) Role of HLA in hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplantation*, 42(S2), S71–S76. doi:10.1038/bmt.2008.288

Park, M., Seo, J. J. (2012). Role of HLA in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Bone Marrow Research*, 2012, 1–7. doi:10.1155/2012/680841

Passweg, J. R., Baldomero, H., Chabannon, C., Basak, G. W., de la Cámara, R. Corbacioglu, S., Corbacioglu, S., Dolstra, H., Duarte, R., Glass, B., Greco, R., Lankester, A. C., Moht, M., de Latour, R. P., Snowden, J. A., Yakoub-Agha, I., Kröger, N. (2021) Hematopoietic cell transplantation and cellular therapy survey of the EBMT: monitoring of activities and

trends over 30 years. *Bone Marrow Transplantation*, 56(7), 1651–1664. doi:10.1038/s41409-021-01227-8

Peters, W. P., Hamm, C., Baynes, R. D. (2000) Autologous Bone Marrow and Stem Cell Transplantation. U: Bast, R. C. Jr., Kufe, D. W., Pollock, R. E., Weichselbaum, R. R., Holland, J. F., Frei, E. *Holland-Frei Cancer Medicine*. Peto izdanje. Hamilton (ON): BC Decker. Poglavlje 67. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20890/>

Petersdorf, E. W. (2016) Mismatched unrelated donor transplantation. *Seminars in Hematology*, 53(4), 230–236. doi:10.1053/j.seminhematol.2016.07.003

Phillips, B. L. Callaghan, C. (2017) The immunology of organ transplantation. *Surgery (Oxford)*, 35(7), 333–340

Robin, M., Porcher, R., Adès, L., Boissel, N., Raffoux, E., Xhaard, A., Larghero, J., Gardin, C., Hemberlin, C., Delmer, A., Fenaux, P., Dombret, H., Socie, G., Peffault de Latour, R. (2013) Matched unrelated or matched sibling donors result in comparable outcomes after non-myeloablative HSCT in patients with AML or MDS. *Bone Marrow Transplantation*, 48(10), 1296–1301. doi:10.1038/bmt.2013.50

Robinson, J., Halliwell, J. A., Hayhurst, J. D., Flicek, P., Parham, P., Marsh, S. G. E. (2015) The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D423–D431. doi: 10.1093/nar/gku1161

Robinson, J., Barker, D. J., Georgiou, X., Cooper, M. A., Flicek, P., Marsh, S. G. E. (2019) IPD-IMGT/HLA Database, *Nucleic Acids Research*, 48, 948–955, doi:10.1093/nar/gkz950

Rosenberg, L. E., Rosenberg, D. D. (2012) Transmission of Genes. *Human Genes and Genomes*, 51–73. doi:10.1016/b978-0-12-385212-0.00005-6

Shiina, T., Hosomichi, K., Inoko, H., Kulski, J. K. (2009) The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *Journal of Human Genetics*, 54(1), 15–39. doi:10.1038/jhg.2008.5

Slatkin, M. (2008) Linkage disequilibrium — understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nature Reviews Genetics*, 9(6), 477–485. doi:10.1038/nrg2361

Strachan, T. Read, A. (2010) Human Molecular Genetics. *Garland Science*. p. 45.

Williams, T. M. (2001) Human Leukocyte Antigen Gene Polymorphism and the Histocompatibility Laboratory. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 3(3), 98–104. doi:10.1016/s1525-1578(10)60658-7

Žunec, R., Grubić, Z. Balen, S. (2011) Važnost imunogenetike u transplantaciji organa. *Medix: specijalizirani medicinski dvomjesečnik*, vol. 17, no. 92/93, str. 208-213

Mrežne stranice (pristupljeno 6.9.2022.):

Web1: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/grc/human/data>

Web2:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/genome/?id=GCF\\_000001405.36](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/genome/?id=GCF_000001405.36)

Web3: [https://en.wikipedia.org/wiki/Chromosome\\_6](https://en.wikipedia.org/wiki/Chromosome_6)

Web4: <https://microbenotes.com/differences-between-mhc-class-i-and-class-ii/>

Web5: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f0/Hematopoiesis\\_simple.svg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f0/Hematopoiesis_simple.svg)

Web6: <https://statistics.wmda.info/>

Web7: <https://zaklada-ana-rukavina.hr/>

Web8: <https://dlongwood.com/en/products/lifecodes-hla-ss0-kits/>

Web9: [https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/matching/dpb\\_v1/](https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/matching/dpb_v1/)

Web10: <http://www.epitopes.net/>

## ŽIVOTOPIS

Rođena sam 14. listopada 1995. godine u Đakovu gdje sam i završila Opću gimnaziju. Nastavno na srednjoškolsko obrazovanje, 2014. godine upisujem Sveučilišni preddiplomski studij Biologija na Odjelu za biologiju pri Sveučilištu J. J. Strossmayera u Osijeku koji 2018. godine završavam s temom završnog rada *Alkilni analozi ugljikohidrata za označavanje i vizualizaciju glikokonjugata u stanicama* i tako stječem titulu sveučilišne prvostupnice biologije (*univ. bacc. biol.*). Daljnje obrazovanje nastavljam na Sveučilišnom diplomskom studiju Eksperimentalna biologija (modul Fiziologija i imunobiologija) na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pri Sveučilištu u Zagrebu. Tijekom godina studiranja izdvojila bih rad u laboratoriju Kliničkog zavoda za patologiju pri Kliničkom bolničkom centru Sestre milosrdnice pod stručnim vodstvom dipl. ing. Snježane Ramić, laboratoriju Odjela za tipizaciju tkiva Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju pri Kliničkom bolničkom centru Zagreb pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Zorane Grubić te Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju Zavoda za istraživanje mora i okoliša pri Institutu Ruđer Bošković pod stručnim vodstvom dr. sc. Marte Popović. Njihovo vodstvo omogućilo mi je individualan napredak i zanimanje za ta područja znanosti.