

Molekularne metode prikladne za praćenje kimerizma nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica

Jančin, Jana

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:217:524410>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Jana Jančin

**Molekularne metode prikladne za
utvrđivanje kimerizma nakon transplantacije
krvotvornih matičnih stanica**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Jana Jančin

**Molecular methods of choice for chimerism
monitoring after hematopoietic stem cell
transplantation**

Master thesis

Zagreb, 2022.

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

ZAHVALE

Najprije bih se voljela zahvaliti svojoj poštovanoj mentorici prof.dr.sc. Zorani Grubić na pruženoj prilici, ukazanom povjerenju, stručnim savjetima te velikom strpljenju tokom izrade ovog rada. Hvala Vam prvenstveno na ovom iskustvu koje me uvelo u svijet znanosti i koje će mi sasvim sigurno pomoći otvoriti brojna vrata u budućnosti.

Također, voljela bih se zahvaliti svim djelatnicima Odjela za tipizaciju KBC-a Zagreb na iznimno ugodnoj radnoj atmosferi, pristupačnosti i pomoći. Posebno se moram zahvaliti dr.sc. Katarini Štingl Janković na svim savjetima, odgovorima, strpljenju, a najviše na ukazanoj podršci. Bez Vas izrada ovog rada ne bi bila toliko ugodno iskustvo.

Beskrajno se zahvaljujem svojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci, pomoći i strpljenju tokom cijelog mog obrazovanja.

U konačnici se zahvaljujem i svim svojim prijateljima koji su cijelo ovo vrijeme bili uz mene. Hvala vam za sve uspomene koje smo zajedno izgradili tokom godina.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Molekularne metode prikladne za utvrđivanje kimerizma nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica

Jana Jančin

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Uspjeh transplantacije krvotvornih matičnih stanica (TKM) procjenjuje se analizom statusa kimerizma odnosno, udjela primateljnih stanica u uzorku bolesnika nakon TKMS. Cilj istraživanja bio je usporediti dvije molekularne metode u praćenju kimerizma: metodu umnažanja kratkih uzastopnih ponavljanja DNA lančanom reakcijom (PCR-STR) i metodu lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR) u svrhu određivanja pouzdanosti, osjetljivosti i preciznosti metoda ovisno o omjeru primateljnih i davateljnih stanica u uzorku bolesnika nakon TKMS. Istraživanje je obuhvatilo 12 parova primatelj-davatelj te sveukupno 42 uzorka kimera u kojima je udio primateljnih stanica bio u rasponu od 10-90%. Od 21 analiziranog lokusa STR, najinformativnijima su se pokazali lokusi D13S797, D18S976 i D21S1442, dok je među 30 biljega qPCR za daljnu analizu su najčešće upotrebljavani biljezi KMR040 i KMR050. Raspon dobivenih vrijednosti za udio primateljnih stanica su u prosjeku bio je manji za lokuse STR nego raspon dobiven analizom biljega qPCR. Istraživanje je pokazalo da je metoda qPCR manje pouzdana od metode PCR-STR u određivanju udjela primateljnih stanica kod bolesnika s >10% udjela vlastitih stanica u uzorku nakon TKMS. Zaključno, metoda PCR-STR je bolji izbor za praćenje kimerizma kod bolesnika s visokim udjelom primateljnih stanica.

Ključne riječi: PCR-STR, qPCR, informativni lokusi
(60 stranica, 9 slika, 48 tablica, 34 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: Dr. sc. Zorana Grubić, red. prof., KBC Zagreb

Ocjenitelji:

Dr. sc. Zorana Grubić, red.prof., KBC Zagreb

Dr. sc. Petra Korać, izv. prof., PMF Sveučilišta u Zagrebu

Dr. sc. Ana Galov, izv. prof., PMF Sveučilišta u Zagrebu

Rad prihvaćen: 08.09.2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Molecular methods of choice for chimerism monitoring after hematopoietic stem cell transplantation

Jana Jančin

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Success of hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is evaluated by chimerism analysis, which is based on determination of recipient and donor cells ratio in patient's sample after HSCT. Purpose of this study was to compare two molecular methods in chimerism monitoring: Short Tandem Repeat-Polymerase Chain Reaction (STR-PCR) and Real time-Polymerase Chain Reaction (qPCR), in order to determine their reliability, sensitivity and accuracy depending on ratio of recipients and donors cells in recipient's sample after HSCT. This study included 12 recipient-donor pairs and altogether 42 post-HSCT samples in which recipient's cell ratio was in the range of 10-90%. Out of 12 analysed STR loci the most informative ones were D13S797, D18S976 and D21S1442, while among 30 investigated qPCR markers, KMR040 and KMR050 were most frequently used for chimerism analysis. Range of values obtained for percentage of recipient cells was lower for STR loci in comparison to the one obtained by analysis of qPCR markers. The study showed that qPCR is less reliable than STR-PCR for chimerism monitoring for patients with >10% of their own cells in post HSCT sample. In conclusion, PCR-STR method is a better choice for chimerism status monitoring of those patients with a higher percentage of recipient cells.

Keywords: PCR-STR, qPCR, informative loci
(60 pages, 9 figures, 48 tables, 34 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Dr. Zorana Grubić, Prof., University Hospital Centre Zagreb

Reviewers:

Dr. Zorana Grubić, Prof., University Hospital Centre Zagreb
Dr. Petra Korać, Prof., Faculty of Science, University of Zagreb
Dr. Ana Galov, Prof., Faculty of Science, University of Zagreb

Thesis accepted: 08.09.2022.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Transplantacija krvotvornih matičnih stanica (TKMS).....	1
1.2. Kimerizam.....	3
1.2.1. Podjela kimerizma nakon TKMS.....	4
1.3. Praćenje statusa kimerizma.....	6
1.3.1. Metoda PCR-STR u praćenju statusa kimerizma.....	8
1.3.2. Metoda qPCR u praćenju statusa kimerizma.....	9
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	12
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. Ispitanici.....	13
3.2. Metode.....	13
3.2.1. Izolacija DNA.....	13
3.2.2. Metoda PCR-STR.....	14
3.2.3. Elektroforeza.....	15
3.2.4. Analiza produkata PCR-STR.....	26
3.2.5. Izračun udjela stanica primatelja i davatelja u uzorku primatelja nakon TKMS.....	17
3.2.6. Metoda qPCR.....	19
3.2.6.1. Protokol genotipizacije qPCR.....	20
3.2.6.2. Protokol praćenja statusa kimerizma.....	21
3.2.7. Statistička obrada podataka.....	22
4. REZULTATI	23
4.1. Određivanje informativnih lokusa STR za parove primatelj-davatelj.....	23

4.2. Analiza statusa kimerizma u uzorcima bolesnika nakon TKMS.....	23
5. RASPRAVA.....	53
6. ZAKLJUČAK.....	57
7. LITERATURA.....	58
8. ŽIVOTOPIS	

KRATICE

DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. Deoxyribonucleic Acid)
GvHD	reakcija presatka protiv primatelja (engl. Graft versus Host Disease)
HLA	Glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. Human Leukocyte Antigen)
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. Polymerase Chain Reaction)
qPCR	PCR u stvarnom vremenu (engl. Real-Time quantitative PCR)
STR	kratka uzastopna ponavljanja (engl. Short Tandem Repeats)
TKMS	transplantacija krvotvornih matičnih stanica
MRD	minimalna ostatna bolest (engl. Minimal Residual Disease)

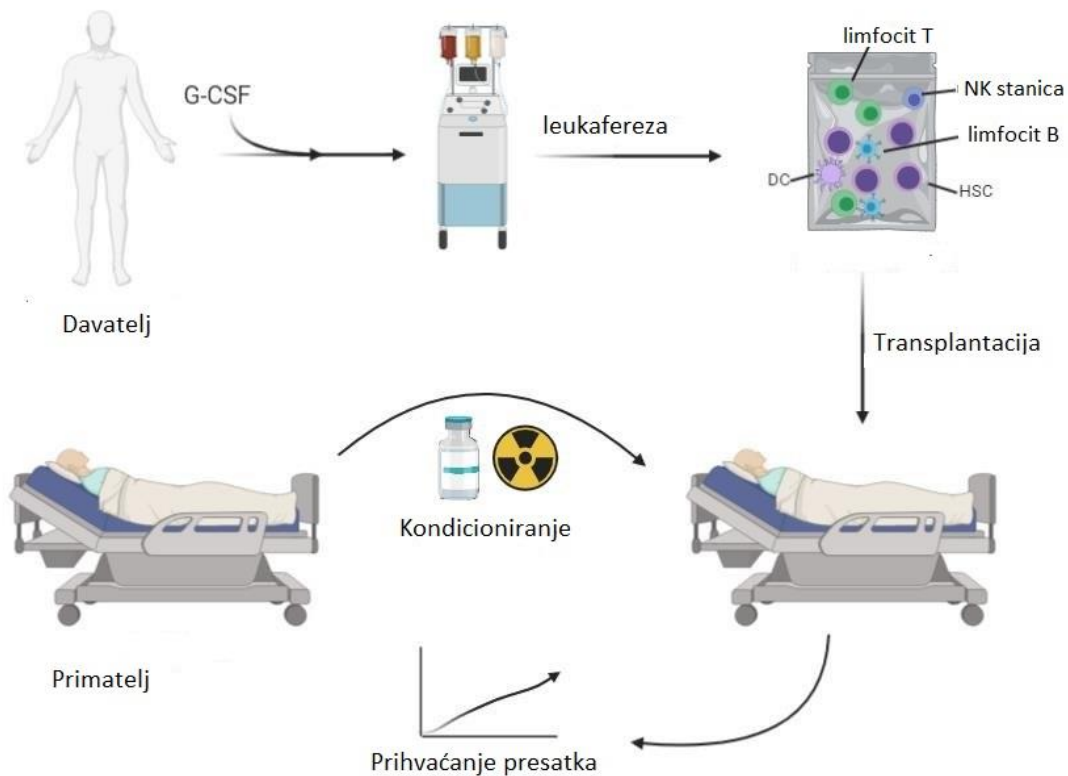
1. UVOD

1.1. TRANSPLANTACIJA KRVOTVORNIH MATIČNIH STANICA

Transplantacija krvotvornih matičnih stanica (TKMS) je postupak kojim se krvotvorni sustav bolesnika zamjenjuje s presađenim krvotvornim matičnim stanicama koje potom preuzimaju ulogu proizvodnje krvnih stanica (slika 1). Cilj TKMS je zamjena malignih ili nefunkcionalnih stanica krvotvornog sustava bolesnika sa zdravim stanicama donora (Storb 2004). Izvor krvotvornih matičnih stanica može biti koštana srž, umbilikalna krv ili periferna krv.

Postoje tri tipa TKMS: autologna, alogenična ili singenična transplantacija. Kod autologne transplantacije prikupljaju se krvotvorne matične stanice bolesnika koje mu se, nakon pripreme, ponovno infundiraju. U alogeničnoj transplantaciji presađuju se krvotvorne matične stanice druge osobe dok je kod singenične TKMS davatelj jednojajčani blizanac.

Ishod TKMS uvelike ovisi o izboru davatelja odnosno o podudarnosti bolesnika i davatelja. Pritom su se od ključne važnosti pokazali geni glavnog sustava tkivne podudarnosti (engl. Human Leukocyte Antigen, HLA), budući da je dokazano kako je rizik za pojavu reakcije presatka protiv primatelja (engl. Graft versus Host Disease, GvHD) izravno povezan s nepodudarnošću bolesnika i davatelja za gene HLA. Geni HLA kodiraju molekule HLA, odnosno membranske proteine, čija je glavna uloga razlučivanje vlastitih od tuđih stanica te aktivacija imunološkog odgovora prilikom susreta sa stranim antigenom (Andreis i sur. 2004). Molekule HLA su značajne u sazrijevanju limfocita T u timusu, gdje limfociti T prolaze kroz proces pozitivne i negativne selekcije u vidu selekcije isključivo onih limfocita T koji su skloni prepoznavanju i razlučivanju vlastitih molekula HLA. Iz spomenutog je razloga otkriće sustava HLA, odnosno podudarnosti gena HLA primatelja i davatelja, postalo od prijeke važnosti u provedbi TKMS (Thorsby 2009). S obzirom na važnost podudarnosti bolesnika i davatelja za povoljan ishod TKMS, prvi izbor za davatelja KMS je HLA identičan brat ili sestra, odnosno srodni davatelj. U slučaju da unutar uže obitelji ne postoji HLA identična osoba, provodi se pretraživanje registara dobrovoljnih darivatelja krvotvornih matičnih stanica ili banki umbilikalne krvi u potrazi za podudarnim nesrodnim davateljem ili jedinicom umbilikalne krvi. Naposljetku, u posljednje vrijeme se, uslijed poboljšanja u postupcima vezanim uz spriječavanje razvoja GvHD-a, za davatelja može izabrati i tzv. haploidentični davatelj, unutar obitelji, koji s njim dijeli jedan zajednički haplotip HLA.



Slika 1. Prikaz alogenične transplantacije krvotvornih matičnih stanica

(Preuzeto i prilagođeno sa: <https://www.researchgate.net/>)

Liječenje TKMS se smatra jedinom terapijom koja može dovesti do potpunog izlječenja od različitih malignih i nemalignih bolesti krvotvornog sustava (tablica 1) (Snowden i sur. 2022). Prije same transplantacije potrebno je provesti pravilnu pripremu bolesnika, tzv. kondicioniranje, čiji tip ovisi o bolesti koja se liječi i o općem stanju bolesnika. Mijeloablativni postupak uključuje kemoterapiju i zračenje u svrhu supresije imunološkog sustava bolesnika ne bi li se smanjila mogućnost odbacivanja transplantata te smanjio broj tumorskih stanica ukoliko pacijent boluje od maligne bolesti. Ovaj postupak u potpunosti uništava hematopoetski sustav bolesnika. Stariji bolesnici i bolesnici težeg zdravstvenog stanja koji ovakav agresivni postupak ne bi mogli podnijeti, prolaze kroz nemijeloablativno kondicioniranje odnosno kondicioniranje smanjenog intenziteta. Nemijeloablativno kondicioniranje se temelji na jakoj i dugotrajnoj imunosupresiji bolesnika pomoću niskih doza zračenja ili citostatika. Nakon same transplantacije, krvotvorne matične stanice davatelja preuzimaju ulogu u obnovi krvotvornog i imunološkog sustava

primatelja. Ipak, važne su i zrele stanice davateljevog imunološkog sustava, ponajviše citotoksični limfociti T, koje dovode do učinka transplantata protiv tumora (engl. Graft-versus-Leukemia, GVL) što je posebno bitno u slučajevima kondicioniranja smanjenog intenziteta (Ringden 2005).

Tablica 1. Prikaz najčešćih malignih/nemalignih bolesti koje se liječe transplantacijom krvotvornih matičnih stanica

Maligne bolesti	Nemaligne bolesti
Akutna mijeloična leukemija (AML)	Aplastična anemija
Akutna limfocitna leukemija (ALL)	Hemoglobinopatije
Kronična limfocitna leukemija (CLL)	Kongenitalni poremećaji hematopoeze
Mijelodisplastični sindrom (MDS)	Kongenitalne imunodeficijencije
Mijelofibroza	Urođene greške metabolizma
Hodgkinova bolest (HL)	Autoimuni poremećaji
Multipli mijelom	
Solidni tumori	

1.2. KIMERIZAM

Izraz kimera potječe od riječi “Chymera” koja opisuje stvorenje iz grčke mitologije sastavljeno od glave lava, tijela koze i repa zmije (slika 2). Gledano s medicinskog stajališta, kimerizam opisuje stanje u kojem unutar pojedinca postoje populacije stanica dviju ili više genetički različitih jedinka. Može nastati prirodnim putem nakon trudnoće, kada nailazimo na majčine stanice unutar djetetove cirkulacije u slučaju kada fetalne stanice prodiru u maternalni sustav cirkulacije ili kao posljedica medicinskih postupaka poput transfuzije ili transplantacije (Rinkevich 2001).

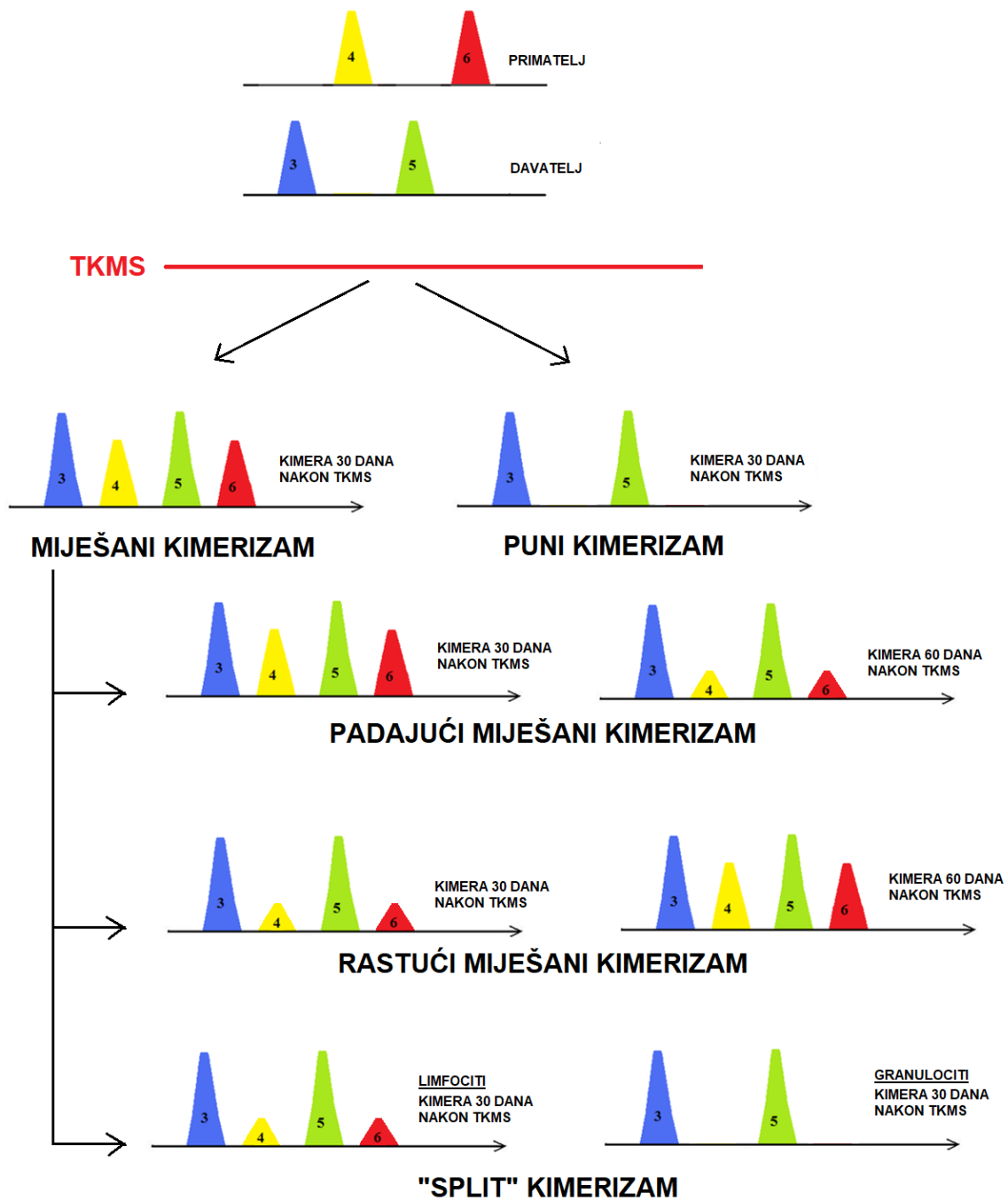


Slika 2. Prikaz grčkog mitološkog stvorenja “Chymera”

(Preuzeto sa: <https://www.shutterstock.com/>)

1.2.1. PODJELA KIMERIZMA NAKON TKMS

Nakon TKMS unutar krvotvornog sustava bolesnika javlja se kimerizam čija podjela ovisi o udjelu davateljevih, odnosno primateljevih stanica. Razlikujemo potpuni kimerizam u slučaju kada nalazimo samo stanice davatelja te miješani kimerizam gdje nalazimo stanice kako primatelja tako i davatelja (Bader i sur. 2005). Također, razlikujemo i „split“ kimerizam kod kojeg su unutar jedne stanične linije prisutne samo stanice primatelja, a u drugoj samo stanice davatelja (Grubić 2014). Miješani kimerizam obuhvaća nekoliko različitih podtipova koji se razlikuju po promjeni omjera stanica davatelja i primatelja. Prvi podtip je rastući kimerizam za koji je specifičan porast udjela stanica primatelja u određenom vremenskom periodu. Suprotno tomu postoji i padajući kimerizam u kojem se javlja smanjenje udjela stanica primatelja, a najčešće se javlja netom nakon same transplantacije. Također može biti prisutan i stabilni kimerizam kod kojeg se udio stanica primatelja i davatelja ne mijenja značajno s vremenom (slika 3) (Antin i sur. 2001).



Slika 3. Primjeri tipova statusa kimerizma nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica (br. 4 i 6-aleli STR primatelja; br. 3 i 5- aleli STR davatelja)

1.3. PRAĆENJE STATUSA KIMERIZMA

Jedan od kriterija kojim se prati uspjeh TKMS, odnosno prihvaćanje transplantata, je analiza statusa kimerizma koja prepoznaje specifične genetičke razlike koje razlučuju primateljeve od davateljevih stanica, odnosno utvrđuje porijeklo stanica u perifernoj krvi ili koštanoj srži (Lion i sur. 2012). Utvrđivanje podrijetla stanica nam govori o funkcioniranju transplantata, učinkovitosti kemoterapije i imunosupresivne terapije. Ipak, utvrđivanjem prisutnosti primateljevih stanica analizom statusa kimerizma ne možemo utvrditi da li je riječ o tumorskim stanicama ili zdravim krvotvornim stanicama primatelja. Upravo zato je uz analizu statusa kimerizma također važna i analiza minimalne ostatne bolesti (engl. Minimal Residual Disease, MRD) koja podrazumijeva praćenje biljega specifičnih za maligne stanice primatelja za vrijeme ili nakon liječenja (Ross i sur. 2013).

Status kimerizma se drugačije tumači ovisno o tome radi li se o liječenju maligne ili nemaligne bolesti. Ukoliko je riječ o nemalignoj bolesti dovoljno je postići status miješanog kimerizma. Svrha TKMS u vidu liječenja nemalignih bolesti je poboljšanje funkcije krvotvornih stanica ili imunokompetentnosti pacijenta pa nije nužno doseći potpuni kimerizam (Collins i sur. 2000). Ukoliko je ipak riječ o liječenju malignih bolesti, nužno je postići potpuni kimerizam, odnosno u potpunosti zamijeniti primateljev krvotvorni sustav s davateljevim. Ako se praćenjem statusa kimerizma dokaže prisutnost primateljevih stanica to može ukazati na potencijalno preživljavanje tumorskih stanica primatelja.

Prvi uzorak bolesnika analizira se 21. dan nakon TKMS, tj. nakon oporavka hematopoeze, dok se ovisno o nalazu statusa kimerizma ali i samoj dijagnozi određuje daljnja terapija te vremenski period praćenja. Status kimerizma, kod liječenja malignih bolesti, preporučeno je pratiti na tjednoj razini prvih 100-200 dana ovisno o tipu kimerizma koji je prisutan kod bolesnika, upravo zbog potencijalnog povratka bolesti koji se najčešće javlja u tom periodu. Idućih 18 mjeseci nakon TKMS status kimerizma se preporuča pratiti na mjesečnoj razini. Ukoliko nalaz statusa kimerizma prikazuje da je prisutan puni kimerizam, potrebno je daljnje praćenje jednom mjesečno iduće dvije godine ne bi li se naknadno ponovno uočile vlastite stanice u uzorku bolesnika. U slučaju padajućeg miješanog kimerizma važno je provoditi tjedne analize sve dok se ne uspostavi puni kimerizam, dok je kod rastućeg miješanog kimerizma potrebno provoditi analizu na tjednoj bazi prvih 200 dana nakon TKMS. Ipak, ukoliko je udio primateljevih stanica stabilan, važno je pratiti

status kimerizma jednom tjedno ili s vremenom barem dva puta mjesečno. Bolesnicima kod kojih je uočen „split“ kimerizam, preporuča se analiza odvojenih staničnih linija ne bi li se tako izbjeglo odbacivanje transplantata (Bader i sur. 2005).

Analiza statusa kimerizma bazira se na određivanju omjera hematopoetskih stanica davatelja u odnosu na primatelja u uzorcima periferne krvi ili koštane srži. U tu svrhu koriste se različite metode iako se svaka od njih temelji na otkrivanju informativnih polimorfnih genetičkih biljega. Citogenetska analiza, fluorescentna *in situ* hibridizacija (engl. Fluorescent In Situ Hybridization, FISH), polimorfizmi duljine restrikcijskog fragmenta (engl. Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), fenotipizacija eritrocita te analiza biljega specifičnih za kromosom X samo su neke od metoda koje su se u prošlim desetljećima koristile za praćenje statusa kimerizma, a vrijednosti njihove osjetljivosti i informativnosti navedene su u tablici 2 (Blouin i sur. 2021). Iako bi se zbog svoje velike raznovrsnosti geni HLA mogli koristiti za praćenje statusa kimerizma, to nije slučaj jer se TKMS i dalje najčešće provodi između HLA podudarnog primatelja i davatelja, što umanjuje mogućnost uporabe ove metode.

Danas se ipak najčešće upotrebljavaju dvije molekularne metode od kojih se jedna temelji na umnažanju kratkih uzastopnih ponavljanja DNA lančanom reakcijom polimerazom, PCR-STR (engl. Polymerase Chain Reaction-Short Tandem Repeats), a druga metoda se temelji na lančanoj reakciji polimerazom u stvarnom vremenu, qPCR (engl. Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction). Posljednjih je dvadesetak godina metoda PCR-STR bila najčešće upotrebljavana u praćenju statusa kimerizma, dok se zadnjih godina metoda qPCR pokazala osjetljivijom u praćenju kinetike presatka i ranog prepoznavanja odbacivanja istog. Osim navedenih metoda, posljednjih nekoliko godina se upotrebljavaju i novije metode iznimno visoke osjetljivosti poput droplet digital PCR, ddPCR (engl. droplet digital Polymerase Chain Reaction) te sekvenciranje nove generacije, NGS (engl. Next Generation Sequencing). Metoda ddPCR, za razliku od metode qPCR, omogućuje apsolutnu kvantifikaciju neovisnu o baždarenoj krivulji, te je pritom manje osjetljiva na utjecaj inhibitora PCR. Prednosti metode NGS, osim u osjetljivosti, leže i u paralelnom čitanju više milijuna sekvencija, brzini postupka ali i niskim troškovima (Blouin i sur. 2021).

Tablica 2. Usporedba metoda u praćenju statusa kimerizma nakon TKMS

Metoda	Osjetljivost (%)	Informativnost
Fenotipizacija eritrocita	0,04-3	niska
Citogenetska analiza	5-10	niska
FISH	0,07-5	visoka
RFLP	5-10	visoka
Biljezi X kromosoma	0,1-4	visoka
PCR-STR	1-5	jako visoka
qPCR	0,01-0,1	srednja
ddPCR	0,01-0,1	srednja
NGS	0,01-1	srednja

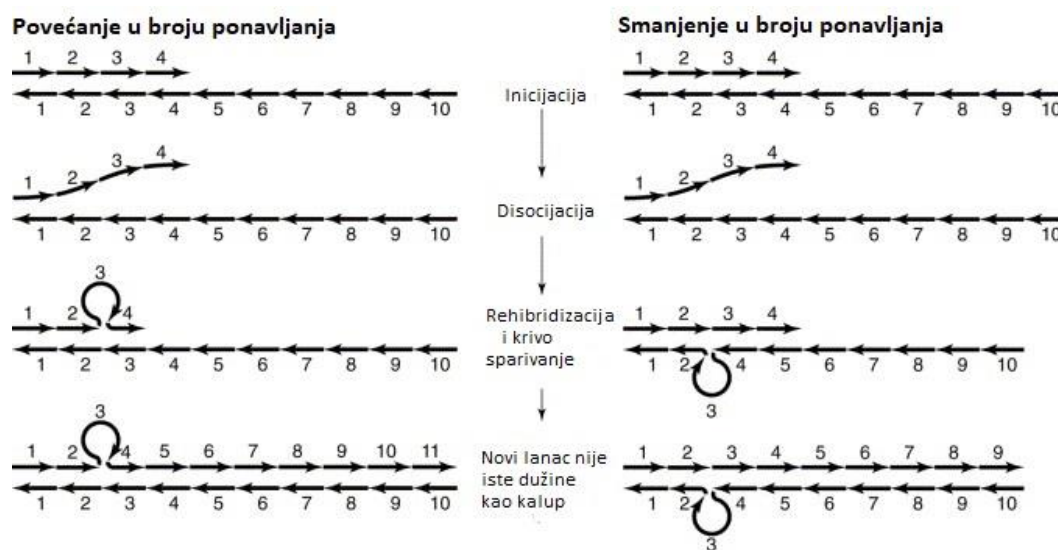
Legenda: FISH - Fluorescent In Situ Hybridization; RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism; PCR-STR - Polymerase Chain Reaction-Short Tandem Repeats; qPCR - Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction; ddPCR - droplet digital Polymerase Chain Reaction; NGS - Next Generation Sequencing

1.3.1. METODA PCR-STR U PRAĆENJU STATUSA KIMERIZMA

Metoda PCR-STR temelji se na umnažanju kratkih uzastopnih ponavljanja slijeda DNA, odnosno mikrosatelitskih lokusa (STR). Mikrosateliti zahvaljujući visokom polimorfizmu imaju važnu ulogu u mapiranju genoma, identifikaciji genotipova, populacijskoj genetici te sudskoj i forenzičnoj medicini.

Lokusi STR su smješteni u eukromatinskim regijama kromosoma unutar izvangenskih, ali i kodirajućih regija gena. Ipak se u genomu čovjeka 90% mikrosatelita nalazi u nekodirajućim regijama DNA što je i razlog za manjkom fenotipske ekspresije izazvane mutacijama (Cummings i Zoghbi 2000). Čine ih dijelovi genoma kod kojih je prisutno ponavljanje slijeda nukleotida dužine 1-6 pb u prosjeku svakih 6 kb ukoliko je riječ o ljudskom genomu (Hearne i sur. 1992). Ovisno o broju ponavljanja i dužini slijeda možemo međusobno razlikovati jednostavna, složena i kompleksna ponavljanja. Jednostavna sadrže dijelove identične dužine i slijeda. Složena se

ponavljanja sastoje od više jednostavnih dok ona kompleksna sadržavaju više dijelova ponavljajućih jedinica čiji se slijedovi mogu mijenjati. Raznolikost lokusa STR je posljedica visoke učestalosti mutacija koju objašnjavaju dvije hipoteze. Prva se hipoteza bazira na greškama u samoj replikaciji kada polimeraza, tijekom sinteze zaostajućeg lanca DNA, ne replicira sve ponavljajuće slijedove ili neke replicira više puta. Rezultat je novi lanac DNA koji sadrži različit broj ponavljanja u odnosu na roditeljski lanac (slika 4). Druga se hipoteza zasniva na greškama u crossing-overu, u kojem dolazi do nejednolične raspodjele ponavljanja između kromosoma (Jarne i Lagoda 1996). Upravo zbog toga što se aleli mikrosatelitskih lokusa razlikuju po duljini i slijedu pogodni su za praćenje statusa kimerizma (Urquhart i sur. 1994).



Slika 4. Mehanizam stvaranja polimorfizma lokusa STR

(Preuzeto i prilagođeno sa: <https://www.quora.com/>)

1.3.2. METODA qPCR U PRAĆENJU STATUSA KIMERIZMA

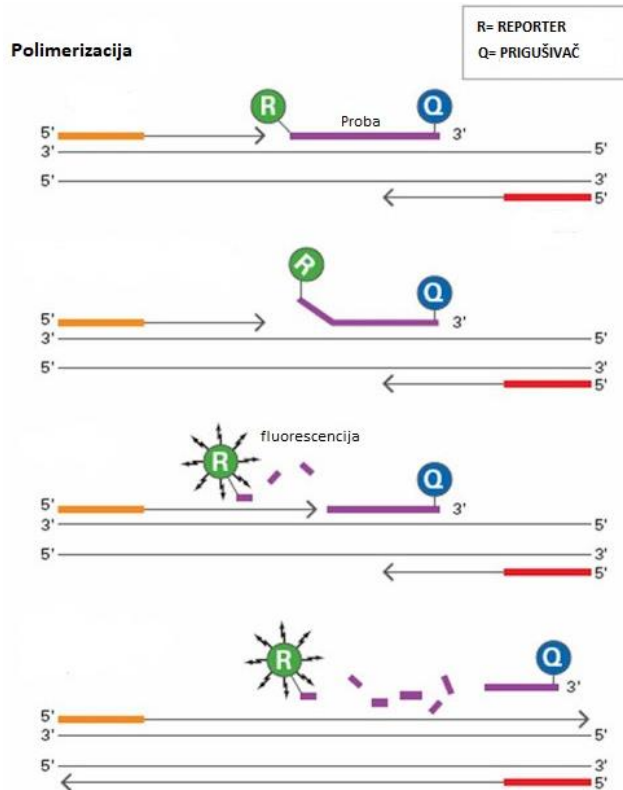
Metoda qPCR omogućuje mjerenje količine umnožene DNA u stvarnom vremenu tijekom umnažanja. Koriste se dialelni biljezi, tzv. insercije/delecije za koje pojedina osoba može biti pozitivna ili negativna, a važno je odrediti koji su biljezi specifični za primatelja, a koji za davatelja (tablica 3). Za ovu je metodu značajna fluorescentno obilježena proba, ugrađena između početnica

5' i 3', koja na jednom svom kraju ima vezan reporter fluorescencije, a na drugom prigušivač fluorescencije. Vezanjem probe za ciljnu sekvenciju, prigušivač i reporter se nalaze u bliskom kontaktu te na taj način sprječavaju emisiju fluorescencije. Tijekom koraka produljenja za vrijeme ciklusa PCR, polimeraza uzrokuje hidrolizu probe zbog čega se reporter otpušta i omogućuje se emisija fluorescencije (slika 5). Svakim se ciklusom količina probe udvostručuje zbog čega postoji linearan odnos između količine produkta PCR i fluorescencije (Alizadeh i sur. 2002). Riječ je o direktnoj kvantitativnoj metodi koja vrednuje Ct vrijednost (engl. Cycle threshold), koja je obrnuto proporcionalna količini početne DNA od interesa (Karlen i sur. 2007). Postotak primateljeve, odnosno davateljeve DNA dobiva se u konačnici usporedbom Ct vrijednosti DNA nakon transplantacije sa Ct vrijednošću DNA primatelja ili davatelja prije transplantacije, uzevši pritom u obzir vrijednosti dobivene za referentni biljeg (slika 6) (Khan i sur. 2004).

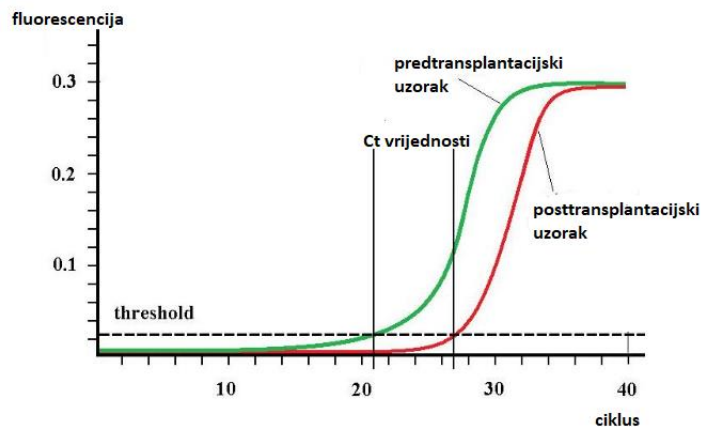
Tablica 3. Prikaz određivanja biljega informativnog za primatelja/davatelja u uzorku bolesnika nakon TKMS

BILJEG qPCR	PRIMATELJ	DAVATELJ	BILJEG INFORMATIVAN ZA
KMR013	pozitivan	negativan	primatelja
KMR028	negativan	pozitivan	davatelja
KMR037	pozitivan	pozitivan	N.I.
KMR056	negativan	negativan	N.I.

Legenda: N.I. – biljeg nije informativan



Slika 5. Metoda qPCR temeljena na fluorescentno obilježenoj probi
(Preuzeto i prilagođeno sa: <https://commons.wikimedia.org/>)



Slika 6. Grafički prikaz Ct vrijednosti (broja ciklusa kod kojeg razina fluorescencije prelazi prag značajnog odstupanja od prethodno definirane granične vrijednosti fluorescencije) kod metode qPCR

(Preuzeto i prilagođeno sa: <https://toptipbio.com/>)

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj ovog istraživanja je međusobno usporediti dvije molekularne metode u praćenju kimerizma: metodu PCR-STR i metodu qPCR u svrhu određivanja osjetljivosti, pouzdanosti i preciznosti metoda te njihove primjene u različitim slučajevima ovisno o omjeru primateljnih i davateljevih stanica u uzorku bolesnika nakon TKMS.

Specifični ciljevi su sljedeći :

1. Metodom PCR-STR testirati 12 parova primatelj-davatelj u programu TKMS i za svaki par odrediti informativne lokuse.
2. Metodom qPCR testirati 12 parova primatelj-davatelj u programu TKMS i za svaki par odrediti informativne biljege.
3. Utvrditi informativnost svakog pojedinog lokusa STR.
4. Odrediti informativnost svakog pojedinog biljega qPCR.
5. Usporediti rezultate dobivene metodama PCR-STR i qPCR i utvrditi algoritam primjene određene metode u praćenju statusa kimerizma.
6. Dobivene rezultate usporediti s rezultatima iz literature.

3. MATERI JALI I METODE

3.1. ISPITANICI

Postupci koji se provode u ovom istraživanju dio su rutinskog postupka u praćenju bolesnika nakon TKMS te su obuhvaćeni informiranim pristankom kojeg svaki bolesnik potpisuje prije ulaska u program TKMS.

Istraživanje je provedeno na dvanaest parova primatelj-davatelj nakon TKMS. Uključena su sveukupno 42 uzorka periferne krvi (5 ml) s antikoagulansom EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina), prikupljena u Odjelu za tipizaciju tkiva Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju KBC Zagreb, u razdoblju od 2018.-2022. godine. Uzorci bolesnika nakon transplantacije su prikupljeni najranije 21 dan nakon TKMS, te potom u različitim vremenskim intervalima, ovisno o kliničkom statusu bolesnika. Za ispitivane je uzorke prethodno utvrđen udio primateljevih stanica u rasponu od 10-90% jednom od metoda (PCR-STR ili qPCR) te se ovisno o tome kojom su metodom prethodno testirani, u sklopu istraživanja testiraju drugom metodom.

3.2. METODE

3.2.1. IZOLACIJA DNA

Prvi je korak izolacija DNA iz svih uzoraka periferne krvi pomoću „Nucleospin Blood” komercijalnog seta za izolaciju DNA (Nucleospin, Macherey Nagel, Düren, Njemačka). Metoda se temelji na specifičnom vezanju DNA za silikatnu membranu kolumne. Prvotno se stanice liziraju inkubacijom uzorka (200µL) zajedno sa proteinazom K (25µL) te dodatkom pufera B3 (200µL). Dodatkom etanola (210µL) u lizat, DNA se veže za silikatnu membranu kolumne. Pomoću pufera BW (500µL) u prvom ispiranju te pufera B5 (600µL) u drugom ispiranju se postiže ispiranje onečišćenja, dok se čista genomska DNA ispiri pomoću alkalnog elucijskog pufera BE (100µL). Po završetku izolacije koncentracija i čistoća čiste genomske DNA je određena pomoću spektrofotometrijskog uređaja NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD).

3.2.2. METODA PCR-STR

Umnažanje lokusa STR provedeno je pomoću seta Aneufast Multiplex QF-PCR Kit (MoIGENTIX, Barcelona, Španjolska) i PCR aparata Applied Biosystems 7500 real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Set sadrži sustav sa pet fluorescentnih boja koji omogućuje automatiziranu analizu DNA odsječaka. Korišteni Multiplex QF-PCR setovi S1 i S2 omogućuju istovremenu analizu po pet lokusa STR na svakom od autosoma 21, 18 i 13, tri pseudoautosomalna (DXYS267, X22 I DXYS218) i jedan vezan uz X kromosom (tablica 4). Umnažaju se i dvije nepolimorfne sekvencije AMXY i SRY vezane uz spol. Prilikom umnažanja lokusa STR, upotrebljavaju se fluorescentno obilježene početnice specifične za sljedove DNA pojedinog mikrosatelitskog lokusa.

Tablica 4. Lokusi STR uključeni u setove S1 i S2

Lokus STR	Smještaj	Duljina ponavljanja (pb)
AMXY (S1)	Xp22.1 Yp11.2	104-109
SRY (S2)	Yp11.2	463
X22 (S2)	Xq28 Yq (PAR2)	189-253
DXYS267 (S1)	Xq21.31 Yp11.31	330-354
DXYS218 (S2)	Xp22.32 Yp11.3 (PAR1)	266-294
HPRT (S2)	Xq26.1	264-313
D21S1414 (S1)	21q21	328-443
D21S1411 (S2)	21q22.3	246-319
D21S1446 (S1)	21q22.3-ter	200-228
D21S1435 (S2)	21q21	142-188
D21S1442 (S1)	21q11.11	136-174
D18S391 (S1)	18p11.2	144-168
D18S390 (S2)	18q22.2	398-430
D18S535 (S1)	18q12.2	126-156
D18S386 (S2)	18q22.1	319-387
D18S976 (S1)	18p11.31	164-184
D13S631 (S1)	13q31-32	192-218
D13S634 (S2)	13q14.3	460-500
D13S258 (S2)	13q21	230-281
D13S305 (S1)	13q12.1-13q14.1	426-458
D13S797 (S1)	13q32-q33	417-454

Legenda: pb – parovi baza

Ukupni volumen reakcije PCR iznosi 7,5 μL a sastoji se od Multiplex PCR Mix-a, određenog volumena DNA ovisno o iznosu koncentracije DNA dobivene prethodnom izolacijom, seta početnica (S1 i S2) te vode do ukupnog volumena (tablica 5). Uvjeti reakcije PCR prikazani su u tablici 6.

Tablica 5. Sastavnice reakcije PCR

Set početnica (S1 i S2)	3,5 μL
Aneufast PCR Mix	1,5 μL
DNA	30 ng
H₂O	do konačnog volumena od 7,5 μL
Konačni volumen PCR	7,5 μL

Tablica 6. Program umnažanja DNA

Aktivacija Taq polimeraze	Denaturacija	Hibridizacija	Produljenje	Završno produljenje	Pohrana
95°C - 15min	95°C - 40s	59°C - 1min, 30 s	72°C - 40s	60°C - 30min	4°C
25 ciklusa					

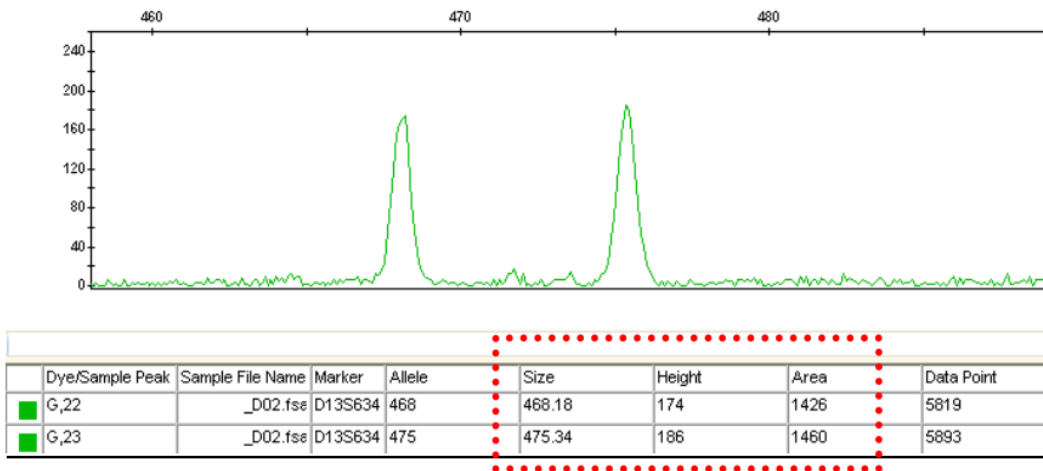
3.2.3. ELEKTROFOREZA

Umnoženi se produkti razdvajaju elektroforezom s obzirom da će zbog međusobno različite duljine sljedova putovati drugačijom brzinom kroz gel. Elektroforeza se odvija pomoću automatskog sekvencera 3130 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Hitachi, Japan). Prije elektroforeze su unutar iste tubice pomiješani umnoženi S1 i S2 produkti (1.5 μL S1 + 1,5 μL S2) sa Hi-Di formamidom (40 μL) i standardom GeneScan™ 500 LIZ™ (0.3 μL). Hi-Di formamid se koristi za resuspendiranje uzoraka prije injektiranja u sustav kapilarne elektroforeze, dok je standard važan za analizu duljine odsječka DNA. Uzorci se prije same elektroforeze denaturiraju dvije minute na 95°C, te zatim nanose u sekvencer.

Pomoću fotosenzora koji očitava fluorescenciju, moguće je odrediti duljinu alela usporedbom vremena od početka elektroforeze pa do detekcije fluorescencije alela lokusa STR od interesa te odsječka DNA čija nam je duljina poznata (Koreth i sur. 1996). Pomoću računalnog programa ABI PRISM GeneScan® Analysis Software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) određene su duljine analiziranih odsječaka DNA na temelju vremena elektroforeze standarda čiji su odsječaka DNA poznate duljine.

3.2.4. ANALIZA PRODUKATA PCR-STR

Svaki je biljeg definiran bojom i veličinom odgovarajućeg produkta, dok su biljezi s alelima sličnih veličina obilježeni različitim flourokromima. Boje FAM, VIC, NED i PET koriste se za obilježavanje početnica, a na elektroforetogramu se vide kao plava, zelena, žuta i crvena boja, dok se narančasta boja LIZ koristi isključivo za poznate standarde. Umnažanjem lokusa STR stvara se fluorescentni produkt koji je direktno proporcionalan količini analizirane sekvencije unutar početnog uzorka. Količina flourescirajućeg produkta PCR numerički je određena područjem „pika“ na elektroforetogramu, dok je visina „pika“ također i mjera za aktivnost flourescencije. Računalni program prikazuje rezultat elektroforeze odnosno elektroforetogram, ali pritom i stvara tablice sa svim važnim informacijama (slika 7). Tablica prikazuje vrijednost veličine tj. duljinu produkta u parovima baza te visinu i regiju čije vrijednosti određuju aktivnost flourescencije a samim time i količinu produkta PCR (Aneufast User's Manuel 2011).



Slika 7. Prikaz elektroforetograma i njemu pripadajuće tablice

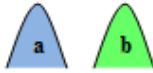
(Preuzeto iz: Aneufast User's Manual Revised Aug 2011 V2)

3.2.5. IZRAČUN UDJELA STANICA PRIMATELJA I DAVATELJA U UZORKU PRIMATELJA NAKON TKMS

Koncentracija DNA dobivena reakcijom PCR proporcionalna je udjelu stanica primatelja tj. davatelja u uzorku primatelja nakon TKMS. Zahvaljujući fotosenzoru koji očitava fluorescenciju usred prolaska molekule DNA kroz lasersku zraku te rezultat izražava kao visinu signala pojedinog alela, jednostavno je izračunati udio primatelja odnosno davatelja u uzorku primatelja nakon TKMS upravo iz omjera visine signala alela od interesa. Postoji više formula koje omogućavaju izračun omjera a razlikuju se ovisno o tome da li su primatelj i/ili davatelj homozigoti za pojedini alel ili se razlikuju u oba ili samo jednom alelu (slika 8) (Nollet i sur. 2001).

Primjer 1. Primatelj i davatelj se razlikuju za oba alela

Primatelj



Davatelj



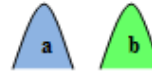
Kimera



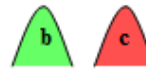
$$\% \text{ primatelj} = \frac{a + b}{a + b + c + d}$$

Primjer 2. Primatelj i davatelj se razlikuju za jedan alel, dok im je drugi alel isti

Primatelj



Davatelj



Kimera



$$\% \text{ primatelj} = \frac{a}{a + c}$$

Primjer 3. Davatelj je homozigot za jedan od alela koji ima primatelj

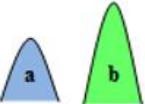
Primatelj



Davatelj



Kimera



$$\% \text{ primatelj} = \frac{2a}{a + b}$$

Primjer 4. Primatelj je homozigot za jedan od alela koji ima davatelj

Primatelj



Davatelj



Kimera



$$\% \text{ primatelj} = \frac{a - b}{a + b}$$

Primjer 5. Primatelj je homozigot za alel koji nema davatelj

Primatelj



Davatelj



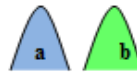
Kimera



$$\% \text{ primatelj} = \frac{a}{a + b + c}$$

Primjer 6. Davatelj je homozigot za alel koji nema primatelj

Primatelj



Davatelj



Kimera

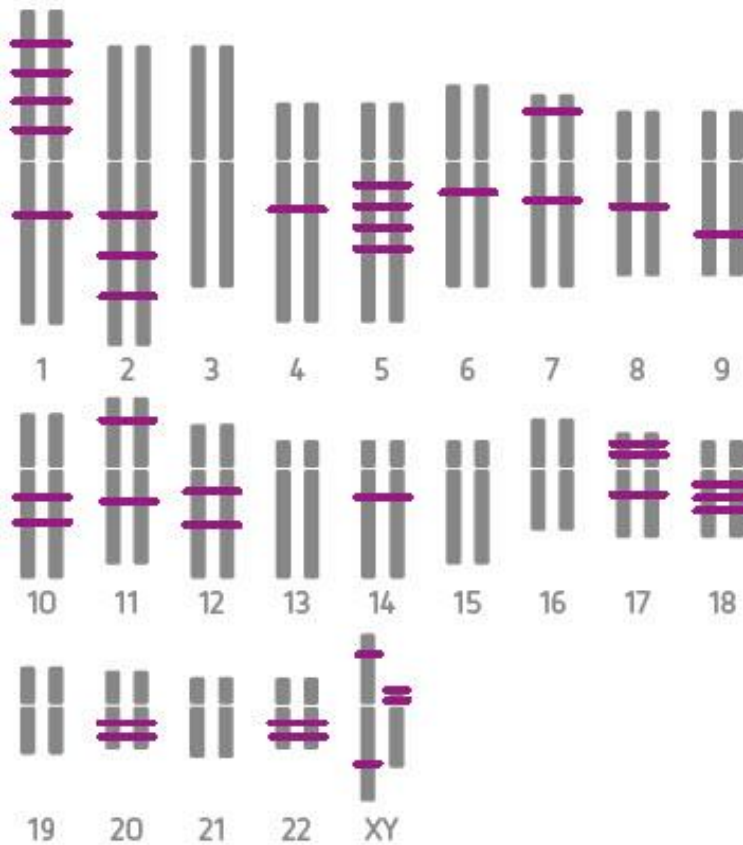


$$\% \text{ primatelj} = \frac{a + b}{a + b + c}$$

Slika 8. Primjeri formula za izračunavanje omjera stanica primatelja i davatelja u uzorku bolesnika nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica

3.2.6. METODA qPCR

Umnažanje biljega specifičnih za primatelja odnosno davatelja provedeno je pomoću seta KMRtype i KMRtrack (GenDx, Utrecht, Nizozemska). Metoda nam omogućuje testiranje sveukupno 30 biljega raspoređenih na različitim kromosomima unutar genoma (slika 9). Nakon umnažanja se kvantifikacijom dobivaju rezultati o prisutnosti biljega koji se koriste za praćenje statusa kimerizma. Za praćenje statusa kimerizma koristi se uzorak bolesnika prije TKMS, uzorak nakon TKMS te dva biljega informativna za primatelja. Biljeg se smatra pozitivnim ukoliko je Ct vrijednost niža od 33 a negativnim ukoliko je viša od 38, dok se Ct vrijednosti u rasponu od 33 do 38 smatraju neinterpretabilnim. Za standardizaciju rezultata koristi se KMRassay referentni gen (GenDx, Utrecht, Nizozemska).



Slika 9. Položaj testiranih biljega unutar genoma

(Preuzeto sa: https://www.gendx.com/product_line/kmrtype/)

3.2.6.1. PROTOKOL GENOTIPIZACIJE qPCR

Genotipizacijom uzoraka primatelja i davatelja dobivaju se podaci o prisutnosti biljega koji se potom koriste za praćenje statusa kimerizma.

Ukupni volumen reakcije PCR iznosi 20 μ L a sastoji se od KMRtype mješavine (KMRassay qPCR pufer, KMRassay enzim i voda), KMRassay referentnog gena te DNA od interesa za svakog davatelja i primatelja (tablica 7). U posebno označene jažice na pločici dodaje se KMRtype mješavina te DNA od interesa, dok se na preostale kolone umjesto DNA dodaje KMRassay referentni gen (5 μ L) te voda do ukupnog volumena. Uvjeti reakcije PCR prikazani su u tablici 8.

Tablica 7. Sastavnice reakcije PCR

KMRassay qPCR pufer	5 μ L
KMRassay enzim	0,4 μ L
DNA	9 μ L
H₂O	0,6 μ L
Konačni volumen PCR	20 μ L

Tablica 8. Program umnažanja DNA

Inicijalna denaturacija	Denaturacija	Hibridizacija/Elongacija
95°C - 5min	95°C - 15s	62°C - 1min
	40 ciklusa	

3.2.6.2. PROTOKOL PRAĆENJA STATUSA KIMERIZMA

Dobiveni rezultati se nakon umnažanja unose u računalni program za analizu KMRengine (GenDx, Utrecht, Nizozemska) pomoću kojeg se odabire informativni biljeg za praćenje te referentni uzorak. Ukupni volumen reakcije PCR iznosi 20 μ L te se sastoji od PCR mixa (KMRassay qPCR pufer, KMRassay enzim i voda) pripremljenog prema tablici 7, informativnog KMRtrack biljega i DNA od interesa (tablica 9). U pozitivnu kontrolu se dodaje KMRassay referentni gen (5 μ L), dok se u negativnu uz referentni gen dodaje i voda (9 μ L). Nakon završetka reakcije PCR dobiveni se rezultati ponovno unose u KMRengine računalni program koji potom prikazuje postotak stanica primatelja i davatelja u referentnom uzorku.

Tablica 9. Sastavnice reakcije PCR

KMRtype mješavina	6 μ L
KMRtrack informativni biljeg	5 μ L
DNA	9 μ L
Konačni PCR volumen	20 μ L

3.2.7. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Metodom PCR-STR za svaki par primatelj-davatelj su dobivene vrijednosti udjela primateljnih stanica u uzorku bolesnika nakon TKMS za maksimalno 21 lokus STR, dok su metodom qPCR za svaki par primatelj-davatelj dobivene vrijednosti za maksimalno 30 biljega informativnih za primatelja. Srednje vrijednosti udjela primateljnih stanica u uzorcima bolesnika nakon TKMS, izračunate su prema formuli:

$$X = \frac{x_1+x_2+x_3+\dots+x_k}{N} = \frac{\sum_{i=1}^k X_i}{N}$$

X - srednja vrijednost udjela primateljnih stanica u uzorku bolesnika nakon TKMS dobivena metodama PCR-STR/qPCR

x - vrijednost udjela primateljnih stanica u uzorku bolesnika nakon TKMS, za jedan lokus STR/biljeg informativan za primatelja

Informativnost i uspješnost lokusa STR/biljega qPCR izračunata je prema formuli:

$$\% = \frac{x}{N}$$

x - broj parova primatelj-davatelj za koje je lokus STR/biljeg qPCR bio informativan/uspješan

N - sveukupan broj parova primatelj-davatelj

4. REZULTATI

4.1. ODREĐIVANJE INFORMATIVNIH LOKUSA STR ZA PAROVE PRIMATELJ-DAVATELJ

Za 12 parova parova primatelj-davatelj provedena je analiza lokusa STR u svrhu određivanja porijekla stanica. Svi parovi primatelj-davatelj testirani su metodom PCR-STR za ukupno 21 lokus STR. Za analizu udjela primateljnih, odnosno davateljnih stanica potrebno je odrediti koji lokusi STR su informativni, odnosno za koji lokus STR se primatelj i davatelj razlikuju u barem jednom alelu.

Uzorci periferne krvi 12 bolesnika prije TKMS kao i njihovih davatelja analizirani su i za 30 dialelnih biljega metodom qPCR. U svrhu izračunavanja udjela primateljnih stanica u uzorku nakon TKMS, potrebno je analizirati biljege koji su informativni za primatelja, odnosno one biljege koji prisutni kod primatelja, a odsutni kod davatelja.

4.2. ANALIZA STATUSA KIMERIZMA U UZORCIMA BOLESNIKA NAKON TKMS

U tablicama 10-21 prikazana je usporedba rezultata dobivenih s metodama PCR-STR i qPCR za svakog pojedinog bolesnika. Broj informativnih lokusa je veći u onim slučajevima kada primatelj i davatelj nisu u krvnom srodstvu. Kod 12 bolesnika je metodom PCR-STR testirano u prosjeku 15 od ukupno 21 informativnih lokusa, dok su za svakog bolesnika praćena dva biljega informativna za primatelja. Izračunate srednje vrijednosti udjela stanica primatelja u uzorku bolesnika nakon TKMS dobivene objema metodama su prikazane u tablicama 10-21. Lokusi AMXY i SRY nisu uključeni u izračun.

Tablica 10a. i 10.b. Rezultati analize informativnosti lokusa STR i biljega qPCR za par primatelj-davatelj br. 1

a) Lokusi STR

LOKUS STR	ALELI PRIMATELJA BR. 1 (pb)	ALELI DAVATELJA BR. 1 (pb)	LOKUS STR INFORMATIVAN (da/ne)
AMXY	104, 109	104, 104	da
SRY	463	/	ne
D13S258	241, 282	245, 270	da
D13S305	442, 450	446, 450	da
D13S631	209, 209	201, 209	da
D13S634	472, 475	472, 475	ne
D13S797	438, 438	417, 438	da
D18S386	347, 356	347, 373	da
D18S390	418, 422	418, 418	da
D18S391	161, 161	161, 164	da
D18S535	146, 146	136, 150	da
D18S976	178, 184	172, 176	da
D21S1411	287, 299	287, 303	da
D21S1414	347, 347	347, 354	da
D21S1435	177, 181	181, 185	da
D21S1442	145, 158	154, 158	da
D21S1446	210, 218	210, 224	da
HPRT	281, 281	281, 281	ne
X22	200, 209	200, 204	da
DXYS218	286, 286	277, 286	da
DXYS267	335, 339	339, 339	da

Legenda: pb – parovi baza

b) Biljezi qPCR

BILJEG qPCR	PRIMATELJ BR. 1	DAVATELJ BR.1	qPCR BILJEG INFORMATIVAN (da/ne)
KMR009	-	-	ne
KMR011	-	-	ne
KMR013	-	-	ne
KMR016	+	-	da (primatelj)
KMR019	+	-	da (primatelj)
KMR028	+	-	da (primatelj)
KMR030	+	+	ne
KMR035	x	x	-
KMR036	+	+	ne
KMR037	+	-	da (primatelj)
KMR038	+	-	da (primatelj)
KMR039	+	+	ne
KMR040	+	-	da (primatelj)
KMR041	-	-	ne
KMR042	+	+	ne
KMR043	+	-	da (primatelj)
KMR044	+	+	ne
KMR045	+	+	ne
KMR046	+	-	da (primatelj)
KMR047	-	+	da (davatelj)
KMR048	-	+	da (davatelj)
KMR049	+	+	ne
KMR050	+	+	ne
KMR051	+	-	da (primatelj)
KMR052	+	+	ne
KMR053	+	x	-
KMR054	+	x	-
KMR055	+	+	ne
KMR056	-	-	ne
KMR057	-	-	ne

Legenda: x – rezultat izvan prihvaćenog raspona za pozitivnu/negativnu reakciju

U tablici 10c prikazani su rezultati analiza za bolesnika br. 1. Analiza rezultata pokazala je razliku u srednjoj vrijednosti udjela primateljevih stanica u uzorku bolesnika nakon TKMS dobivenih metodom PCR-STR i qPCR. Za uzorak kimere 1 razlika rezultata u srednjoj vrijednosti iznosi 2,2%, dok za uzorak kimere 2 iznosi 4,5%. Pritom je metodom PCR-STR testirano 17 informativnih lokusa a metodom qPCR su praćena dva biljega informativna za primatelja. Raspon udjela primateljevih stanica u uzorku nakon TKMS za metodu PCR-STR iznosi 2-34% za kimeru 1 te 15-34% za kimeru 2, dok za qPCR razlika u vrijednostima za dva biljega iznosi 4,7% za kimeru 1 te 0,9 % za kimeru 2.

Tablica 10c. Usporedba rezultata analize statusa kimerizma dobivenih s metodama PCR-STR i qPCR za bolesnika br.1

LOKUS / BILJEG		UDIO PRIMATELJEVIH STANICA U UZORCIMA NAKON TKMS (%)	
		kimera 1	kimera 2
STR	D13S258	16	24
	D13S305	19	26
	D13S631	12	19
	D13S797	2	15
	D18S386	15	24
	D18S390	15	22
	D18S391	9	25
	D18S535	16	25
	D18S976	14	24
	D21S1411	18	24
	D21S1414	16	25
	D21S1435	19	26
	D21S1442	14	21
	D21S1446	14	22
	X22	12	20
	DXYS218	11	18
	DXYS267	34	34
qPCR	KMR016	11,8	-
	KMR037	16,5	-
	KMR019	-	27,9
	KMR037	-	27,0
Δ STR		16,0	23,0
Δ qPCR		14,2	27,5

Legenda: Δ - srednja vrijednost; uzorci bolesnika nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica prikupljeni u određenim vremenskim razmacima

Tablica 11a. i 11b. Rezultati analize informativnosti lokusa STR i biljega qPCR za par primatelj-davatelj br. 2

a) Lokusi STR

LOKUS STR	ALELI PRIMATELJA BR. 2 (pb)	ALELI DAVATELJA BR. 2 (pb)	LOKUS STR INFORMATIVAN (da/ne)
AMXY	104, 104	104, 109	da
SRY	/	463	ne
D13S258	237, 241	237, 237	da
D13S305	438, 438	450, 454	da
D13S631	205, 209	197, 197	da
D13S634	472, 480	472, 478	da
D13S797	442, 442	438, 442	da
D18S386	355, 373	369, 377	da
D18S390	418, 418	418, 418	ne
D18S391	156, 160	160, 160	da
D18S535	146, 154	146, 146	da
D18S976	171, 175	167, 175	da
D21S1411	299, 303	277, 299	da
D21S1414	359, 367	343, 351	da
D21S1435	181, 181	169, 185	da
D21S1442	136, 136	150, 158	da
D21S1446	218, 224	224, 224	da
HPRT	277, 289	285, 285	da
X22	204, 238	204, 228	da
DXYS218	281, 285	281, 281	da
DXYS267	339, 339	335, 339	da

Legenda: pb – parovi baza

b) Biljezi qPCR

BILJEG qPCR	PRIMATELJ BR. 2	DAVATELJ BR.2	qPCR BILJEG INFORMATIVAN (da/ne)
KMR009	-	-	ne
KMR011	-	+	da (davatelj)
KMR013	-	+	da (davatelj)
KMR016	+	+	ne
KMR019	+	+	ne
KMR028	+	+	ne
KMR030	+	+	ne
KMR035	+	+	ne
KMR036	-	-	ne
KMR037	+	+	ne
KMR038	-	+	da (davatelj)
KMR039	-	+	da (davatelj)
KMR040	-	-	ne
KMR041	+	-	da (primatelj)
KMR042	-	x	-
KMR043	+	+	ne
KMR044	-	+	da (davatelj)
KMR045	+	+	ne
KMR046	-	-	ne
KMR047	-	+	da (davatelj)
KMR048	-	-	ne
KMR049	x	+	-
KMR050	-	+	da (davatelj)
KMR051	-	-	ne
KMR052	-	+	da (davatelj)
KMR053	+	+	ne
KMR054	x	+	-
KMR055	-	+	da (davatelj)
KMR056	-	+	da (davatelj)
KMR057	-	-	ne

Legenda: x – rezultat izvan prihvaćenog raspona za pozitivnu/negativnu reakciju

Metodom qPCR pronađen je samo jedan informativni lokus za primatelja među 30 analiziranih biljega te je analiza napravljena na dodatnih 9 biljega od kojih su se 4 pokazala informativnim za primatelja.

Tablica 11c. Dodatni biljezi qPCR

BILJEG qPCR	PRIMATELJ BR.2	DAVATELJ BR.2	qPCR BILJEG INFORMATIVAN (da/ne)
KMR004	+	-	da (primatelj)
KMR010	+	-	da (primatelj)
KMR014	-	+	da (davatelj)
KMR017	-	+	da (davatelj)
KMR020	+	+	ne
KMR029	+	-	da (primatelj)
KMR031	-	-	ne
KMR033	+	-	da (primatelj)
KMR034	+	+	ne

Kod bolesnika br. 2 metodom PCR-STR testirano je 18 informativnih lokusa od kojih analiza jednog lokusa nije bila uspješna, dok su metodom qPCR praćena dva biljega informativna za primatelja. Tablica 11d prikazuje raspon udjela primateljevih stanica dobiven metodom PCR-STR, u iznosu od 48-71% za kimeru 1, te 11-25% za kimeru 2. Metodom qPCR dobivena razlika u vrijednostima za dva biljega iznosi 35% i 0,8%. Razlika u srednjoj vrijednosti udjela primateljevih stanica, dobivenih s dvije metode, u uzorku bolesnika nakon TKMS iznosi 22,6% za uzorak kimere 1 te 4,8% za uzorak kimere 2.

Tablica 11d. Usporedba rezultata analize statusa kimerizma dobivenih s metodama PCR-STR i qPCR za bolesnika br. 2

LOKUS / BILJEG		UDIO PRIMATELJEVIH STANICA U UZORCIMA NAKON TKMS (%)	
		kimera 1	kimera 2
STR	D13S258	54	13
	D13S305	57	14
	D13S631	58	15
	D13S634	57	14
	D18S797	48	10
	D18S386	58	X
	D18S391	60	19
	D18S535	54	13
	D18S976	56	17
	D21S1411	58	13
	D21S1414	54	13
	D21S1435	56	15
	D21S1442	57	15
	D21S1446	58	13
	HPRT	71	25
	X22	55	12
	DXYS218	52	14
	DXYS267	49	11
qPCR	KMR010	96,1	-
	KMR033	61,1	-
	KMR004	-	9,6
	KMR029	-	8,8
	Δ STR	56,0	14,0
	Δ qPCR	78,6	9,2

Legenda: X – analiza nije uspjela; Δ - srednja vrijednost ; uzorci bolesnika nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica prikupljeni u određenim vremenskim razmacima

Tablica 12a. i 12b. Rezultati analize informativnosti lokusa STR i biljega qPCR za par primatelj-davatelj br. 3

a) Lokusi STR

LOKUS STR	ALELI PRIMATELJA BR. 3 (pb)	ALELI DAVATELJA BR. 3 (pb)	LOKUS STR INFORMATIVAN (da/ne)
AMXY	104, 109	104, 109	ne
SRY	463	463	ne
D13S258	242, 274	242, 242	da
D13S305	442, 442	430, 442	da
D13S631	197, 197	193, 201	da
D13S634	468, 490	476, 484	da
D13S797	442, 442	438, 442	da
D18S386	343, 361	339, 371	da
D18S390	414, 418	414, 414	da
D18S391	160, 164	156, 164	da
D18S535	146, 150	146, 150	ne
D18S976	175, 179	171, 183	da
D21S1411	278, 290	290, 298	da
D21S1414	346, 360	354, 356	da
D21S1435	181, 181	181, 181	ne
D21S1442	154, 154	140, 150	da
D21S1446	210, 214	210, 214	ne
HPRT	289, 289	281, 281	da
X22	204, 232	200, 210	da
DXYS218	281, 281	281, 285	da
DXYS267	338, 346	334, 338	da

Legenda: pb – parovi baza

b) Biljezi qPCR

BILJEG qPCR	PRIMATELJ BR. 3	DAVATELJ BR. 3	qPCR BILJEG INFORMATIVAN (da/ne)
KMR009	-	-	ne
KMR011	+	+	ne
KMR013	+	+	ne
KMR016	+	+	ne
KMR019	-	-	ne
KMR028	-	+	da (davatelj)
KMR030	+	+	ne
KMR035	+	x	-
KMR036	-	+	da (davatelj)
KMR037	+	+	ne
KMR038	+	x	-
KMR039	+	+	ne
KMR040	+	+	ne
KMR041	-	-	ne
KMR042	+	x	-
KMR043	-	+	da (davatelj)
KMR044	+	+	ne
KMR045	x	x	-
KMR046	-	-	ne
KMR047	x	-	-
KMR048	+	+	ne
KMR049	-	+	da (davatelj)
KMR050	+	+	ne
KMR051	+	-	da (primatelj)
KMR052	-	+	da (davatelj)
KMR053	-	+	da (davatelj)
KMR054	+	+	ne
KMR055	+	+	ne
KMR056	+	+	ne
KMR057	+	-	da (primatelj)

Legenda: x – rezultat izvan prihvaćenog raspona za pozitivnu/negativnu reakciju

Za bolesnika br. 3 dvije su kimere testirane metodom PCR-STR za 17 informativnih lokusa, od kojih analiza četiri lokusa nije bila uspješna, a metodom qPCR praćena su dva biljega informativna za primatelja. U tablici 12c utvrđena je razlika u srednjoj vrijednosti udjela primateljevih stanica u uzorku bolesnika nakon TKMS dobivenih ovim dvjema metodama. Za kimeru 1 ta razlika u srednjoj vrijednosti iznosi svega 1,5% , dok za uzorak kimere 2 iznosi čak 24,2%. Metodom qPCR dobivena je razlika u vrijednostima za dva biljega u iznosu od 1,8% i 3,4% , a metodom PCR-STR su dobiveni rasponi udjela primateljevih stanica u uzorku nakon TKMS od 19-27% i 8-14%.

Tablica 12c. Usporedba rezultata analize statusa kimerizma dobivenih s metodama PCR-STR i qPCR za bolesnika br. 3

LOKUS / BILJEG		UDIO PRIMATELJEVIH STANICA U UZORCIMA NAKON TKMS (%)	
		kimera 1	kimera 2
STR	D13S258	24	11
	D13S305	21	8
	D13S631	25	X
	D13S634	26	12
	D18S797	19	X
	D18S386	27	13
	D18S390	25	12
	D18S391	27	13
	D18S976	25	X
	D21S1411	26	11
	D21S1414	25	11
	D21S1442	X	X
	HPRT	25	12
	X22	25	12
	DXYS218	26	14
	DXYS267	25	12
	D13S258	24	11
qPCR	KMR051	24,4	34,5
	KMR057	22,6	37,9
	Δ STR	25,0	12,0
	Δ qPCR	23,5	36,2

Legenda: X – analiza nije uspjela; Δ - srednja vrijednost; uzorci bolesnika nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica prikupljeni u određenim vremenskim razmacima

Tablica 13a. i 13b. Rezultati analize informativnosti lokusa STR i biljega qPCR za par primatelj-davatelj br. 4

a) Lokusi STR

LOKUS STR	ALELI PRIMATELJA BR. 4 (pb)	ALELI DAVATELJA BR. 4 (pb)	LOKUS STR INFORMATIVAN (da/ne)
AMXY	104, 104	104, 109	da
SRY	/	463	ne
D13S258	241, 278	237, 241	da
D13S305	443, 443	443, 447	da
D13S631	205, 209	201, 201	da
D13S634	472, 477	468, 472	da
D13S797	434, 442	438, 442	da
D18S386	344, 347	332, 365	da
D18S390	414, 418	414, 422	da
D18S391	161, 165	161, 161	da
D18S535	145, 145	150, 150	da
D18S976	178, 179	175, 179	da
D21S1411	291, 291	295, 299	da
D21S1414	354, 356	350, 350	da
D21S1435	173, 177	173, 177	ne
D21S1442	136, 136	150, 166	da
D21S1446	224, 232	210, 224	da
HPRT	265, 289	281, 281	da
X22	223, 223	199, 209	da
DXYS218	277, 281	281, 281	da
DXYS267	339, 343	339, 339	da

Legenda: pb – parovi baza

b) Biljezi qPCR

BILJEG qPCR	PRIMATELJ BR. 4	DAVATELJ BR. 4	qPCR BILJEG INFORMATIVAN (da/ne)
KMR009	+	-	da (primatelj)
KMR011	+	-	da (primatelj)
KMR013	+	-	da (primatelj)
KMR016	+	-	da (primatelj)
KMR019	+	-	da (primatelj)
KMR028	+	+	ne
KMR030	+	+	ne
KMR035	+	+	ne
KMR036	+	-	da (primatelj)
KMR037	+	+	ne
KMR038	+	+	ne
KMR039	+	-	da (primatelj)
KMR040	+	-	da (primatelj)
KMR041	-	-	ne
KMR042	+	+	ne
KMR043	+	-	da (primatelj)
KMR044	+	+	ne
KMR045	+	+	ne
KMR046	+	+	ne
KMR047	-	-	ne
KMR048	+	-	da (primatelj)
KMR049	+	+	ne
KMR050	+	-	da (primatelj)
KMR051	-	+	da (davatelj)
KMR052	+	+	ne
KMR053	-	-	ne
KMR054	+	-	da (primatelj)
KMR055	+	+	ne
KMR056	+	-	da (primatelj)
KMR057	+	-	da (primatelj)

Legenda: x – rezultat izvan prihvaćenog raspona za pozitivnu/negativnu reakciju

Tablica 13c prikazuje razliku u srednjoj vrijednosti udjela primateljelih stanica u uzorku bolesnika br. 4 nakon TKMS, dobivenih metodom PCR-STR i qPCR, za uzorke prve i treće kimere u iznosu od 4,6% i 2%, dok su za uzorak druge kimere srednje vrijednosti jednake u iznosu od 35%. Pritom su uzorci testirani za 14 informativnih lokusa metodom PCR-STR te su metodom qPCR praćena dva biljega informativna za primatelja. Raspon udjela primateljelih stanica u uzorku nakon TKMS za metodu PCR-STR iznosio je 7-23% za kimeru 1, 22-51% za kimeru 2 te 28-64% za kimeru 3, dok su za qPCR razlike u vrijednostima za dva biljega iznosile redom: 13,5%, 1,5% i 14,1%.

Tablica 13c. Usporedba rezultata analize statusa kimerizma dobivenih s metodama PCR-STR i qPCR za bolesnika br. 4

LOKUS / BILJEG		UDIO PRIMATELJEVIH STANICA U UZORCIMA NAKON TKMS (%)		
		kimera 1	kimera 2	kimera 3
STR	D13S258	23	51	64
	D13S305	15	41	49
	D13S797	16	41	48
	D13S386	14	37	41
	D18S390	16	40	46
	D18S391	13	36	41
	D18S976	7	24	29
	D21S1411	14	39	46
	D21S1414	13	40	46
	D21S1435	10	32	38
	D21S1442	9	23	30
	D21S1446	13	40	45
	HPRT	7	22	28
	DXYS218	9	29	36
qPCR	KMR019	10,8	-	47,1
	KMR048	24,3	-	-
	KMR054	-	35,7	-
	KMR057	-	34,2	33,0
Δ STR		13,0	35,0	42,0
Δ qPCR		17,6	35,0	40,0

Legenda: Δ - srednja vrijednost; uzorci bolesnika nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica prikupljeni u određenim vremenskim razmacima

Tablica 14a. i 14b. Rezultati analize informativnosti lokusa STR i biljega qPCR za par primatelj-davatelj br. 5

a) Lokusi STR

LOKUS STR	ALELI PRIMATELJA BR. 5 (pb)	ALELI DAVATELJA BR. 5 (pb)	LOKUS STR INFORMATIVAN (da/ne)
AMXY	104, 104	104, 109	da
SRY	/	463	ne
D13S258	237, 241	237, 237	da
D13S305	438, 438	450, 454	da
D13S631	205, 209	197, 197	da
D13S634	472, 480	472, 478	da
D13S797	442, 442	438, 442	da
D18S386	355, 373	369, 377	da
D18S390	418, 418	418, 418	ne
D18S391	156, 160	160, 160	da
D18S535	146, 154	146, 146	da
D18S976	171, 175	167, 175	da
D21S1411	299, 303	277, 299	da
D21S1414	359, 367	343, 351	da
D21S1435	181, 181	169, 185	da
D21S1442	136, 136	150, 158	da
D21S1446	218, 224	224, 224	da
HPRT	277, 289	285, 285	da
X22	204, 238	204, 228	da
DXYS218	281, 285	281, 281	da
DXYS267	339, 339	335, 339	da

Legenda: pb – parovi baza

b) Biljezi qPCR

BILJEG qPCR	PRIMATELJ BR. 5	DAVATELJ BR. 5	qPCR BILJEG INFORMATIVAN (da/ne)
KMR009	+	-	da (primatelj)
KMR011	+	+	ne
KMR013	-	+	da (davatelj)
KMR016	+	+	ne
KMR019	-	-	ne
KMR028	+	+	ne
KMR030	+	+	ne
KMR035	x	+	-
KMR036	+	+	ne
KMR037	+	-	da (primatelj)
KMR038	+	+	ne
KMR039	+	+	ne
KMR040	+	-	da (primatelj)
KMR041	x	+	-
KMR042	+	-	da (primatelj)
KMR043	-	+	da (davatelj)
KMR044	+	-	da (primatelj)
KMR045	-	+	da (davatelj)
KMR046	-	+	da (davatelj)
KMR047	-	+	da (davatelj)
KMR048	+	+	ne
KMR049	-	-	ne
KMR050	+	-	da (primatelj)
KMR051	-	+	da (davatelj)
KMR052	-	+	da (davatelj)
KMR053	-	-	ne
KMR054	-	+	da (davatelj)
KMR055	+	-	da (primatelj)
KMR056	-	+	da (davatelj)
KMR057	-	+	da (davatelj)

Legenda: x – rezultat izvan prihvaćenog raspona za pozitivnu/negativnu reakciju

U tablici 14c prikazana je razlika od 5,2% za srednju vrijednost udjela primateljevih stanica za bolesnika br. 5 nakon TKMS. Metodom PCR-STR testirano je 17 informativnih lokusa od kojih analiza jednog lokusa nije bila uspješna te je dobiven raspon udjela primateljevih stanica od 47-60%. Metodom qPCR praćena su dva biljega informativna za primatelja, te je dobivena razlika od 14%.

Tablica 14c. Usporedba rezultata analize statusa kimerizma dobivenih s metodama PCR-STR i qPCR za bolesnika br. 5

LOKUS / BILJEG		UDIO PRIMATELJEVIH STANICA U UZORCIMA NAKON TKMS (%)
		kimera 1
STR	D13S258	47
	D13S305	50
	D13S631	54
	D13S634	51
	D18S797	50
	D18S386	55
	D18S390	53
	D18S391	51
	D18S535	54
	D18S976	53
	D21S1411	53
	D21S1414	54
	D21S1442	53
	HPRT	X
	X22	51
	DXYS218	60
	DXYS267	52
qPCR	KMR040	41,2
	KMR055	55,2
	Δ STR	53,0
	Δ qPCR	48,2

Legenda: X – analiza nije uspjela; Δ - srednja vrijednost; uzorak bolesnika nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica prikupljen u određenom vremenskom razmaku

Tablica 15a. i 15b. Rezultati analize informativnosti lokusa STR i biljega qPCR za par primatelj-davatelj br. 6

a) Lokusi STR

LOKUS STR	ALELI PRIMATELJA BR. 6 (pb)	ALELI DAVATELJA BR. 6 (pb)	LOKUS STR INFORMATIVAN (da/ne)
AMXY	104, 104	104, 104	ne
SRY	/	/	ne
D13S258	274, 278	274, 278	ne
D13S305	450, 454	446, 450	da
D13S631	197, 209	209, 209	da
D13S634	468, 472	468, 472	ne
D13S797	438, 442	438, 438	da
D18S386	343, 365	361, 367	da
D18S390	419, 419	419, 419	ne
D18S391	161, 165	161, 161	da
D18S535	141, 154	146, 150	da
D18S976	180, 182	178, 183	da
D21S1411	287, 295	287, 295	ne
D21S1414	356, 360	342, 360	da
D21S1435	177, 181	173, 177	da
D21S1442	154, 162	154, 170	da
D21S1446	210, 224	210, 224	ne
HPRT	281, 281	281, 289	da
X22	228, 234	228, 228	da
DXYS218	282, 282	278, 282	da
DXYS267	335, 347	335, 347	ne

Legenda: pb – parovi baza

b) Biljezi qPCR

BILJEG qPCR	PRIMATELJ BR. 6	DAVATELJ BR. 6	qPCR BILJEG INFORMATIVAN (da/ne)
KMR009	-	-	ne
KMR011	-	-	ne
KMR013	+	+	ne
KMR016	+	-	da (primatelj)
KMR019	+	+	ne
KMR028	-	-	ne
KMR030	-	-	ne
KMR035	+	+	ne
KMR036	-	-	ne
KMR037	+	-	da (primatelj)
KMR038	-	-	ne
KMR039	-	-	ne
KMR040	+	-	da (primatelj)
KMR041	+	+	ne
KMR042	-	-	ne
KMR043	-	-	ne
KMR044	+	+	ne
KMR045	+	+	ne
KMR046	-	-	ne
KMR047	+	+	ne
KMR048	-	-	ne
KMR049	+	-	da (primatelj)
KMR050	+	+	ne
KMR051	+	+	ne
KMR052	+	+	ne
KMR053	-	+	da (davatelj)
KMR054	-	-	ne
KMR055	+	+	ne
KMR056	-	-	ne
KMR057	-	-	ne

Legenda: x – rezultat izvan prihvaćenog raspona za pozitivnu/negativnu reakciju

Kod bolesnika br. 6 su tri uzorka kimeri testirana za 13 informativnih lokusa, te su dobiveni rasponi udjela primateljnih stanica u iznosu od 18-27% za kimeru 1, 14-33% za kimeru 2 te 16-30% za kimeru 3. Metoda qPCR pokazala je razliku u iznosu od 2,2%, 2,8% i 8,9%. Usporedbom rezultata dobivenih ovim dvjema metodama uočena je razlika u srednjoj vrijednosti primateljnih stanica u uzorku bolesnika nakon TKMS, koja za uzorak kimeri 1 iznosi 6%, za uzorak kimeri 2 iznosi 1%, dok za uzorak kimeri 3 iznosi 9%.

Tablica 15c. Usporedba rezultata analize statusa kimerizma dobivenih s metodama PCR-STR i qPCR za bolesnika br. 6

LOKUS / BILJEG		UDIO PRIMATELJEVIH STANICA U UZORCIMA NAKON TKMS (%)		
		kimera 1	kimera 2	kimera 3
STR	D13S305	20	16	19
	D13S631	21	23	19
	D13S797	20	17	19
	D13S386	25	22	25
	D18S391	25	33	20
	D18S535	21	19	20
	D18S976	18	17	17
	D21S1414	25	24	26
	D21S1435	19	16	17
	D21S1442	21	20	30
	HPRT	27	22	21
	X22	21	18	18
	DXYS218	18	14	16
qPCR	KMR037	15,0	22,3	25,7
	KMR049	17,2	-	-
	KMR016	-	19,5	34,6
	Δ STR	22,0	20,0	21,0
	Δ qPCR	16,1	20,9	30,2

Legenda: Δ - srednja vrijednost; uzorci bolesnika nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica prikupljeni u određenim vremenskim razmacima

Tablica 16a. i 16b. Rezultati analize informativnosti lokusa STR i biljega qPCR za par primatelj-davatelj br. 7

a) Lokusi STR

LOKUS STR	ALELI PRIMATELJA BR. 7 (pb)	ALELI DAVATELJA BR. 7 (pb)	LOKUS STR INFORMATIVAN (da/ne)
AMXY	104, 109	104, 109	ne
SRY	463	463	ne
D13S258	278, 278	230, 242	da
D13S305	446, 450	450, 450	da
D13S631	205, 205	197, 209	da
D13S634	474, 488	468, 476	da
D13S797	434, 434	438, 438	da
D18S386	372, 374	348, 366	da
D18S390	405, 421	413, 417	da
D18S391	160, 160	160, 160	ne
D18S535	146, 150	140, 150	da
D18S976	168, 176	176, 178	da
D21S1411	287, 303	287, 303	ne
D21S1414	351, 355	341, 349	da
D21S1435	177, 185	177, 181	da
D21S1442	154, 170	154, 158	da
D21S1446	210, 224	210, 210	da
HPRT	288, 288	280, 280	da
X22	203, 227	203, 231	da
DXYS218	277, 281	281, 285	da
DXYS267	335, 339	335, 343	da

Legenda: pb – parovi baza

b) Biljezi qPCR

BILJEG qPCR	PRIMATELJ BR. 7	DAVATELJ BR. 7	qPCR BILJEG INFORMATIVAN (da/ne)
KMR009	-	-	ne
KMR011	-	-	ne
KMR013	+	+	ne
KMR016	-	+	da (davatelj)
KMR019	-	-	ne
KMR028	-	-	ne
KMR030	+	x	-
KMR035	-	+	da (davatelj)
KMR036	-	x	-
KMR037	x	+	-
KMR038	-	+	da (davatelj)
KMR039	x	-	-
KMR040	+	+	ne
KMR041	-	+	da (davatelj)
KMR042	+	-	da (primatelj)
KMR043	-	+	da (davatelj)
KMR044	+	+	ne
KMR045	-	+	da (davatelj)
KMR046	-	+	da (davatelj)
KMR047	-	x	-
KMR048	+	-	da (primatelj)
KMR049	-	-	ne
KMR050	-	-	ne
KMR051	-	-	ne
KMR052	+	+	ne
KMR053	x	x	-
KMR054	+	+	ne
KMR055	+	+	ne
KMR056	+	+	ne
KMR057	-	+	da (davatelj)

Legenda: x – rezultat izvan prihvaćenog raspona za pozitivnu/negativnu reakciju

Rezultati usporedbe dviju metoda za bolesnika br. 7 prikazani su u tablici 16c. U uzorku kimere 1 dobivena je razlika u srednjoj vrijednosti od 19% za rezultate dobivene metodama PCR-STR i qPCR, dok za uzorak kimere 2 ta razlika iznosi 8%. Metodom PCR-STR testirano je 17 informativnih lokusa te su pritom za udio primateljevih stanica u uzorcima dobiveni rasponi od 73-86% i 20-38%. Praćenjem dva biljega informativna za primatelja metodom qPCR dobivene su razlike u iznosu od 18,9% i 3,2%.

Tablica 16c. Usporedba rezultata analize statusa kimerizma dobivenih s metodama PCR-STR i qPCR za bolesnika br. 7

LOKUS / BILJEG		UDIO PRIMATELJEVIH STANICA U UZORCIMA NAKON TKMS (%)	
		kimera 1	kimera 2
STR	D13S258	74	22
	D13S305	84	38
	D13S631	78	26
	D13S634	79	25
	D18S797	80	29
	D18S386	86	20
	D18S390	77	25
	D18S535	76	29
	D18S976	80	27
	D21S1414	78	25
	D21S1435	74	26
	D21S1442	77	25
	D21S1446	73	26
	HPRT	76	24
	X22	79	28
	DXYS218	80	30
	DXYS267	81	35
qPCR	KMR042	49,6	36,3
	KMR048	68,5	33,1
Δ STR		78,0	27,0
Δ qPCR		59,0	34,7

Legenda: Δ - srednja vrijednost; uzorci bolesnika nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica prikupljeni u određenim vremenskim razmacima

Tablica 17a. i 17b. Rezultati analize informativnosti lokusa STR i biljega qPCR za par primatelj-davatelj br. 8

a) Lokusi STR

LOKUS STR	ALELI PRIMATELJA BR. 8 (pb)	ALELI DAVATELJA BR. 8 (pb)	LOKUS STR INFORMATIVAN (da/ne)
AMXY	104, 109	104, 109	ne
SRY	463	463	ne
D13S258	237, 269	233, 241	da
D13S305	443, 451	443, 451	ne
D13S631	209, 209	201, 205	da
D13S634	481, 487	473, 479	da
D13S797	434, 442	438, 442	da
D18S386	332, 362	372, 380	da
D18S390	419, 423	419, 419	da
D18S391	160, 160	156, 164	da
D18S535	132, 154	146, 146	da
D18S976	175, 175	175, 178	da
D21S1411	291, 299	279, 299	da
D21S1414	346, 360	350, 350	da
D21S1435	173, 181	177, 181	da
D21S1442	136, 158	144, 154	da
D21S1446	214, 218	218, 218	da
HPRT	285, 285	285, 285	ne
X22	228, 228	200, 224	da
DXYS218	281, 289	265, 277	da
DXYS267	334, 338	334, 338	ne

Legenda: pb – parovi baza

b) Biljezi qPCR

BILJEG qPCR	PRIMATELJ BR. 8	DAVATELJ BR. 8	qPCR BILJEG INFORMATIVAN (da/ne)
KMR004	-	-	ne
KMR010	-	-	ne
KMR014	+	-	da (primatelj)
KMR017	+	+	ne
KMR020	-	+	da (davatelj)
KMR029	+	-	da (primatelj)
KMR031	+	+	ne
KMR033	+	+	ne
KMR034	-	-	ne

Legenda: x – rezultat izvan prihvaćenog raspona za pozitivnu/negativnu reakciju

Kod bolesnika br. 8 praćen je uzorak samo jedne kimere te je pritom isti testiran za 16 informativnih lokusa metodom PCR-STR te za dva biljega informativna za primatelja metodom qPCR. Zbog tehničkih razloga, kod bolesnika br. 8, je analizirano 9 biljega qPCR iz dodatnog seta umjesto 30 biljega qPCR iz primarnog seta, za koje su testirani ostali bolesnici. Metoda PCR-STR pokazala je raspon od 25-45% za udio primateljevih stanica u uzorku nakon TKMS, dok je metodom qPCR dobivena razlika u vrijednostima za dva biljega u iznosu od 3,9%.

Tablica 17c. Usporedba rezultata analize statusa kimerizma dobivenih s metodama PCR-STR i qPCR za bolesnika br. 8

LOKUS / BILJEG		UDIO PRIMATELJEVIH STANICA U UZORCIMA NAKON TKMS (%)
		kimera 1
STR	D13S258	30
	D13S631	28
	D13S634	26
	D18S797	30
	D18S386	36
	D18S390	28
	D18S391	29
	D18S535	30
	D18S976	25
	D21S1411	30
	D21S1414	31
	D21S1435	30
	D21S1442	45
	D21S1446	34
	X22	26
	DXYS218	27
qPCR	KMR014	25,8
	KMR029	21,9
Δ STR		30,0
Δ qPCR		23,9

Legenda: Δ - srednja vrijednost; uzorak bolesnika nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica prikupljen u određenom vremenskom razmaku

Tablica 18a. i 18b. Rezultati analize informativnosti lokusa STR i biljega qPCR za par primatelj-davatelj br. 9

a) Lokusi STR

LOKUS STR	ALELI PRIMATELJA BR. 9 (pb)	ALELI DAVATELJA BR. 9 (pb)	LOKUS STR INFORMATIVAN (da/ne)
AMXY	105, 109	105, 109	ne
SRY	463	463	ne
D13S258	229, 233	233, 237	da
D13S305	443, 450	443, 447	da
D13S631	205, 209	205, 209	ne
D13S634	468, 485	468, 485	ne
D13S797	438, 442	438, 442	ne
D18S386	344, 373	344, 373	ne
D18S390	418, 418	402, 418	da
D18S391	161, 161	161, 165	da
D18S535	128, 159	146, 150	da
D18S976	179, 179	169, 169	da
D21S1411	287, 299	299, 312	da
D21S1414	343, 350	350, 350	da
D21S1435	185, 185	181, 185	da
D21S1442	136, 158	136, 154	da
D21S1446	210, 228	210, 214	da
HPRT	285, 285	285, 285	ne
X22	204, 214	204, 242	da
DXYS218	282, 286	282, 282	da
DXYS267	335, 339	335, 339	ne

Legenda: pb – parovi baza

b) Biljezi qPCR

BILJEG qPCR	PRIMATELJ BR. 9	DAVATELJ BR. 9	qPCR BILJEG INFORMATIVAN (da/ne)
KMR009	-	-	ne
KMR011	+	+	ne
KMR013	+	-	da (primatelj)
KMR016	-	-	ne
KMR019	x	x	-
KMR028	+	-	da (primatelj)
KMR030	+	+	ne
KMR035	-	-	ne
KMR036	+	-	da (primatelj)
KMR037	+	+	ne
KMR038	-	-	ne
KMR039	+	+	ne
KMR040	-	-	ne
KMR041	+	-	da (primatelj)
KMR042	+	+	ne
KMR043	-	-	ne
KMR044	+	-	da (primatelj)
KMR045	+	+	ne
KMR046	-	-	ne
KMR047	-	-	ne
KMR048	-	-	ne
KMR049	+	+	ne
KMR050	+	+	ne
KMR051	+	+	ne
KMR052	-	-	ne
KMR053	-	-	ne
KMR054	+	+	ne
KMR055	+	+	ne
KMR056	-	-	ne
KMR057	-	-	ne

Legenda: x – rezultat izvan prihvaćenog raspona za pozitivnu/negativnu reakciju

Usporedba rezultata udjela primateljnih stanica u uzorku bolesnika br. 9 dobivenih metodama PCR-STR i qPCR prikazana je u tablici 18c. Analiza rezultata pokazala je razliku u srednjoj vrijednosti kod uzorka svih devet kimera u iznosima od 3,5%, 3%, 7,1%, 8,9%, 12,3%, 1,7%, 35,8%, 60% i 22%. Uzorci bolesnika nakon TKMS testirani su za 13 informativnih lokusa metodom PCR-STR te za dva biljega informativna za primatelja metodom qPCR. Rasponi udjela primateljnih stanica u uzorcima nakon TKMS za metodu PCR-STR iznose redom: 17-29%, 39-50%, 32-44%, 39-51%, 73-84%, 69-82%, 66-81%, 68-79% i 80-94%, dok za qPCR razlike u vrijednostima za dva biljega iznose: 2,8%, 1,1%, 5,6%, 0,4%, 14,2%, 1,9%, 17,1%, 5,3% i 19,4%.

Tablica 18c. Usporedba rezultata analize statusa kimerizma dobivenih s metodama PCR-STR i qPCR za bolesnika br. 9

LOKUS / BILJEG		UDIO PRIMATELJEVIH STANICA U UZORCIMA NAKON TKMS (%)								
		kimera 1	kimera 2	kimera 3	kimera 4	kimera 5	kimera 6	kimera 7	kimera 8	kimera 9
STR	D13S258	29	48	44	51	83	81	78	78	90
	D13S305	21	42	38	45	77	75	71	72	84
	D18S390	17	40	32	42	78	77	73	72	87
	D18S391	27	46	44	49	79	78	66	72	87
	D18S535	25	45	42	47	78	78	74	74	85
	D18S976	23	44	39	48	80	79	75	75	88
	D21S1411	19	40	36	39	80	79	74	74	89
	D21S1414	25	47	43	51	84	82	81	79	94
	D21S1435	19	39	34	42	73	69	67	68	80
	D21S1442	23	43	39	46	74	72	69	74	81
	D21S1446	22	42	37	46	77	77	73	73	88
	X22	26	50	43	51	82	81	79	79	90
	DXY218	23	42	39	46	75	73	73	71	84
qPCR	KMR013	27,9	-	48,9	55,1	-	77,7	-	-	-
	KMR028	25,1	-	-	-	-	-	28,6	16,6	55,3
	KMR041	-	41,5	43,3	54,7	-	-	-	-	-
	KMR044	-	40,4	-	-	58,6	-	-	-	-
	KMR036	-	-	-	-	72,8	79,6	45,7	11,3	74,7
	Δ STR	23,0	44,0	39,0	46,0	78,0	77,0	73,0	74,0	87,0
	Δ qPCR	26,5	41,0	46,1	54,9	65,7	78,7	37,2	14,0	65,0

Legenda: Δ - srednja vrijednost; uzorci bolesnika nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica prikupljeni u određenim vremenskim razmacima

Tablica 19a. i 19b. Rezultati analize informativnosti lokusa STR i biljega qPCR za par primatelj-davatelj br. 10

a) Lokusi STR

LOKUS STR	ALELI PRIMATELJA BR. 10 (pb)	ALELI DAVATELJA BR. 10 (pb)	LOKUS STR INFORMATIVAN (da/ne)
AMXY	104, 109	104, 109	ne
SRY	463	/	ne
D13S258	229, 232	232, 242	da
D13S305	439, 445	439, 445	ne
D13S631	197, 217	197, 197	da
D13S634	471, 481	481, 481	da
D13S797	438, 438	434, 438	da
D18S386	370, 372	370, 372	ne
D18S390	414, 418	414, 418	ne
D18S391	152, 160	152, 156	da
D18S535	150, 150	140, 150	da
D18S976	171, 182	179, 182	da
D21S1411	282, 282	282, 282	ne
D21S1414	338, 346	346, 346	da
D21S1435	180, 180	164, 180	da
D21S1442	150, 154	150, 154	ne
D21S1446	210, 214	210, 224	da
HPRT	285, 285	285, 285	ne
X22	229, 233	229, 233	ne
DXYS218	277, 281	277, 281	ne
DXYS267	334, 338	338, 342	da

Legenda: pb – parovi baza

b) Biljezi qPCR

BILJEG qPCR	PRIMATELJ BR. 10	DAVATELJ BR. 10	qPCR BILJEG INFORMATIVAN (da/ne)
KMR009	-	-	ne
KMR011	+	+	ne
KMR013	+	+	ne
KMR016	+	+	ne
KMR019	x	x	-
KMR028	+	+	ne
KMR030	+	+	ne
KMR035	x	x	-
KMR036	-	-	ne
KMR037	+	+	ne
KMR038	+	+	ne
KMR039	+	+	ne
KMR040	-	+	da (davatelj)
KMR041	+	x	-
KMR042	+	+	ne
KMR043	+	-	da (primatelj)
KMR044	-	+	da (davatelj)
KMR045	+	+	ne
KMR046	+	+	ne
KMR047	-	-	ne
KMR048	+	-	da (primatelj)
KMR049	-	-	ne
KMR050	+	+	ne
KMR051	-	+	da (davatelj)
KMR052	-	+	da (davatelj)
KMR053	-	+	da (davatelj)
KMR054	+	-	da (primatelj)
KMR055	+	+	ne
KMR056	+	-	da (primatelj)
KMR057	+	-	da (primatelj)

Legenda: x – rezultat izvan prihvaćenog raspona za pozitivnu/negativnu reakciju

Tablica 19c pokazuje razlike u srednjoj vrijednosti udjela primateljevih stanica u uzorku bolesnika nakon TKMS za svih pet testiranih kimera u iznosu od 2%, 9%, 2%, 2% i 3%. Testirano je 11 informativnih lokusa STR i dva biljega qPCR informativna za primatelja. Metodom qPCR dobivene su razlike u iznosima za dva biljega od 7,9%, 1,1%, 25,5%, 32,3% i 3,7%, dok su metodom PCR-STR dobiveni rasponi od 12-23%, 22-34%, 35-46%, 40-54% i 2-19%.

Tablica 19c. Usporedba rezultata analize statusa kimerizma dobivenih s metodama PCR-STR i qPCR za bolesnika br. 10

LOKUS / BILJEG		UDIO PRIMATELJEVIH STANICA U UZORCIMA NAKON TKMS (%)				
		kimera 1	kimera 2	kimera 3	kimera 4	kimera 5
STR	D13S258	21	32	43	47	17
	D13S631	19	30	41	46	14
	D13S634	22	34	46	54	16
	D13S797	14	22	35	40	10
	D18S391	20	30	41	48	14
	D18S535	14	27	39	47	9
	D18S976	21	29	41	50	15
	D21S1414	20	30	43	51	15
	D21S1435	12	24	35	42	2
	D21S1446	20	30	41	49	15
	DXY267	23	34	42	53	19
qPCR	KMR048	17,3	38,8	-	-	-
	KMR056	25,2	37,7	55,8	65,6	-
	KMR054	-	-	30,3	33,6	17,6
	KMR057	-	-	-	-	13,9
	Δ STR	19,0	29,0	41,0	48,0	13,0
	Δ qPCR	21,3	38,3	43,1	49,6	15,8

Legenda: Δ - srednja vrijednost; uzorci bolesnika nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica prikupljeni u određenim vremenskim razmacima

Tablica 20a. i 20b. Rezultati analize informativnosti lokusa STR i biljega qPCR za par primatelj-davatelj br. 11

a) Lokusi STR

LOKUS STR	ALELI PRIMATELJA BR. 11 (pb)	ALELI DAVATELJA BR. 11 (pb)	LOKUS STR INFORMATIVAN (da/ne)
AMXY	104, 104	104, 104	ne
SRY	463	/	ne
D13S258	241, 274	241, 274	ne
D13S305	442, 446	446, 446	da
D13S631	201, 209	205, 209	da
D13S634	477, 484	484, 484	da
D13S797	438, 442	438, 438	da
D18S386	336, 365	365, 372	da
D18S390	414, 423	423, 423	da
D18S391	156, 161	161, 165	da
D18S535	146, 154	146, 154	ne
D18S976	178, 182	171, 171	da
D21S1411	295, 319	295, 303	da
D21S1414	350, 358	350, 358	ne
D21S1435	177, 189	189, 189	da
D21S1442	140, 140	150, 150	da
D21S1446	210, 210	210, 210	ne
HPRT	277, 277	277, 289	da
X22	213, 238	213, 228	da
DXYS218	278, 281	281, 281	da
DXYS267	338, 346	334, 342	da

Legenda: pb – parovi baza

b) Biljezi qPCR

BILJEG qPCR	PRIMATELJ BR. 11	DAVATELJ BR. 11	qPCR BILJEG INFORMATIVAN (da/ne)
KMR009	+	+	ne
KMR011	x	+	-
KMR013	+	+	ne
KMR016	-	-	ne
KMR019	+	+	ne
KMR028	+	+	ne
KMR030	-	-	ne
KMR035	+	+	ne
KMR036	-	-	ne
KMR037	+	+	ne
KMR038	-	-	ne
KMR039	-	+	da (davatelj)
KMR040	+	+	ne
KMR041	-	x	-
KMR042	+	+	ne
KMR043	+	+	ne
KMR044	+	-	da (primatelj)
KMR045	-	-	ne
KMR046	-	-	ne
KMR047	+	+	ne
KMR048	-	-	ne
KMR049	+	+	ne
KMR050	+	-	da (primatelj)
KMR051	+	+	ne
KMR052	+	+	ne
KMR053	-	-	ne
KMR054	+	-	da (primatelj)
KMR055	+	-	da (primatelj)
KMR056	+	+	ne
KMR057	-	-	ne

Legenda: x – rezultat izvan prihvaćenog raspona za pozitivnu/negativnu reakciju

Kod bolesnika br. 11 dokazana je razlika u srednjoj vrijednosti udjela primateljelih stanica u uzorku bolesnika nakon TKMS dobivenih metodama PCR-STR i qPCR za sva tri testirana uzorka kimeri. Uzorci su metodom PCR-STR testirani za sveukupno 15 informativnih lokusa STR, a metodom qPCR za dva biljega informativna za primatelja. Tablica 20c prikazuje razlike u srednjim vrijednostima u iznosu od 3% za uzorak kimere 1, 14% za uzorak kimere 2 te 43% za uzorak kimere 3. Pojedinačno rezultati raspona dobiveni metodom PCR-STR iznose redom: 56-87%, 60-86% i 57-81%, dok metodom qPCR dobivene razlike za dva biljega iznose redom: 30,5%, 8,4% i 16,8%.

Tablica 20c. Usporedba rezultata analize statusa kimerizma dobivenih s metodama PCR-STR i qPCR za bolesnika br. 11

LOKUS / BILJEG		UDIO PRIMATELJEVIH STANICA U UZORCIMA NAKON TKMS (%)		
		kimera 1	kimera 2	kimera 3
STR	D13S305	73	74	75
	D13S631	66	66	66
	D13S634	71	72	72
	D13S797	65	66	66
	D18S386	73	75	75
	D18S390	70	71	72
	D18S391	70	71	71
	D18S976	80	81	81
	D21S1411	61	63	66
	D21S1435	87	86	71
	D21S1442	70	69	69
	HPRT	56	60	57
	X22	62	62	64
	DXYS218	72	74	75
	DXYS267	58	60	61
qPCR	KMR044	56,8	-	33,9
	KMR055	87,3	59,7	17,1
	KMR050	-	51,3	-
	Δ STR	69,0	70,0	69,0
	Δ qPCR	72,1	55,5	25,5

Legenda: Δ - srednja vrijednost; uzorci bolesnika nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica prikupljeni u određenim vremenskim razmacima

Tablica 21a. i 21b. Rezultati analize informativnosti lokusa STR i biljega qPCR za par primatelj-davatelj br. 12

a) Lokusi STR

LOKUS STR	ALELI PRIMATELJA BR. 12 (pb)	ALELI DAVATELJA BR. 12 (pb)	LOKUS STR INFORMATIVAN (da/ne)
AMXY	104, 109	104, 109	ne
SRY	463	463	ne
D13S258	229, 274	237, 274	da
D13S305	434, 450	434, 450	ne
D13S631	209, 209	201, 209	ne
D13S634	468, 488	468, 468	da
D13S797	438, 438	443, 450	da
D18S386	362, 365	362, 365	ne
D18S390	410, 418	410, 418	ne
D18S391	161, 161	156, 161	ne
D18S535	137, 150	137, 105	ne
D18S976	171, 178	171, 178	ne
D21S1411	290, 295	290, 295	ne
D21S1414	354, 354	346, 354	ne
D21S1435	173, 173	173, 181	da
D21S1442	136, 158	136, 145	da
D21S1446	210, 224	224, 224	da
HPRT	285, 285	285, 285	ne
X22	219, 219	219, 219	ne
DXYS218	277, 285	277, 285	ne
DXYS267	342, 346	342, 346	ne

Legenda: pb – parovi baza

b) Biljezi qPCR

BILJEG qPCR	PRIMATELJ BR. 12	DAVATELJ BR. 12	qPCR BILJEG INFORMATIVAN (da/ne)
KMR009	+	-	da (primatelj)
KMR011	x	x	-
KMR013	+	-	da (primatelj)
KMR016	+	+	ne
KMR019	+	+	ne
KMR028	+	-	da (primatelj)
KMR030	+	+	ne
KMR035	+	+	ne
KMR036	+	+	ne
KMR037	x	+	-
KMR038	-	-	ne
KMR039	-	-	ne
KMR040	+	+	ne
KMR041	+	+	ne
KMR042	-	-	ne
KMR043	-	-	ne
KMR044	+	+	ne
KMR045	-	+	da (davatelj)
KMR046	-	-	ne
KMR047	+	+	ne
KMR048	-	-	ne
KMR049	x	x	-
KMR050	+	-	da (primatelj)
KMR051	+	+	ne
KMR052	-	+	da (davatelj)
KMR053	-	-	ne
KMR054	+	+	ne
KMR055	+	+	ne
KMR056	+	+	ne
KMR057	-	-	ne

Legenda: x – rezultat izvan prihvaćenog raspona za pozitivnu/negativnu reakciju

Metodom PCR-STR i qPCR testirani su uzorci ukupno devet kimeri za bolesnika br. 12. U tablici 21c prikazane su vrijednosti udjela primateljnih stanica u uzorku bolesnika nakon TKMS za šest testiranih lokusa metodom PCR-STR od kojih analiza jednog lokusa nije bila uspješna, te rasponi njihovih srednjih vrijednosti u iznosu od 12-21%, 22-32%, 48-56%, 67-80%, 23-45%, 18-19%, 26-36%, 29-53% i 23-27%. Metodom qPCR praćena su dva biljega informativna za primatelja te su dobivene razlike u vrijednostima za dva biljega u iznosima od: 0,5%, 3,9%, 9,5%, 20,6%, 14,5%, 12,1%, 3%, 12,8% i 13,4%. Usporedbom rezultata dobivenih metodama PCR-STR i qPCR dobivene su razlike u srednjim vrijednostima za uzorke devet kimeri čije vrijednosti iznose: 6%, 9%, 10%, 7%, 19%, 57%, 4%, 7% i 8%.

Tablica 21c. Usporedba rezultata analize statusa kimerizma dobivenih s metodama PCR-STR i qPCR za bolesnika br. 12

LOKUS / BILJEG		UDIO PRIMATELJEVIH STANICA U UZORCIMA NAKON TKMS (%)								
		kimera 1	kimera 2	kimera 3	kimera 4	kimera 5	kimera 6	kimera 7	kimera 8	kimera 9
STR	D13S258	15	22	55	67	24	19	27	39	24
	D13S634	21	32	X	X	45	X	36	49	X
	D13S797	13	23	52	72	24	18	26	38	24
	D21S1435	17	22	48	69	25	19	28	29	27
	D21S1442	13	22	50	68	23	18	26	37	23
	D21S1446	12	25	56	80	33	19	28	53	25
qPCR	KMR009	21,1	-	-	-	-	82,4	-	-	10,6
	KMR013	20,6	16,5	-	-	55,1	-	26,1	-	-
	KMR050	-	12,6	36,8	73,8	-	70,3	23,1	27,2	24
	KMR028	-	-	46,3	94,4	40,6	-	-	40	-
	Δ STR	15,0	24,0	52,0	71,0	29,0	19,0	29,0	41,0	25,0
	Δ qPCR	20,9	14,6	41,6	84,1	47,9	76,4	24,6	33,6	17,3

Legenda: X - analiza nije uspjela; Δ - srednja vrijednost; uzorci bolesnika nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica prikupljeni u određenim vremenskim razmacima

Tablica 22 prikazuje analizu informativnosti za 19 lokusa STR te uspješnosti njihovog testiranja za ukupno 12 parova primatelj-davatelj u uzorcima prije TKMS. Analizom je utvrđeno da su lokusi D13S797, D18S976 i D21S1442 bili informativni u najvećem broju slučajeva, odnosno svaki je lokus STR bio informativan za 11 parova primatelj-davatelj, dok su se lokusi D18S390 i HPRT pokazali kao najmanje informativni budući su se mogli koristiti za daljnje praćenje samo kod 7 parova primatelj-davatelj. U prosjeku su lokusi STR bili informativni za 9 parova primatelj-davatelj, tj. njihova prosječna informativnost iznosi 75%. Niti jedan od lokusa STR uključenih u istraživanje nije bio informativan kod svih parova.

Tablica 22. Prikaz informativnosti testiranih lokusa STR (N=12)

LOKUS STR	INFORMATIVNOST n (%)
D13S258	10 (83,3)
D13S305	9 (75,0)
D13S631	10 (83,3)
D13S634	9 (75,0)
D13S797	11 (91,7)
D18S386	9 (75,0)
D18S390	7 (58,3)
D18S391	10 (83,3)
D18S535	9 (75,0)
D18S976	11 (91,7)
D21S1411	8 (66,7)
D21S1414	10 (83,3)
D21S1435	10 (83,3)
D21S1442	11 (91,7)
D21S1446	9 (75,0)
HPRT	7 (58,3)
X22	10 (83,3)
DXYS218	10 (83,3)
DXYS267	8 (66,7)

Legenda: n – broj parova primatelj-davatelj

Tablica 23 prikazuje analizu informativnosti i uspješnosti za 30 biljega qPCR kod 11 parova primatelj-davatelj u uzorcima prije TKMS. Analiza je provedena za 11 od ukupno 12 parova zbog tehničkih razloga kod bolesnika br. 8 koji je bio testiran samo za 9 biljega qPCR iz dodatnog seta.

Tablica 23. Prikaz informativnosti i uspješnosti testiranih biljega qPCR (N=11)

BILJEG qPCR	INFORMATIVNOST n (%)	USPJEŠNOST ANALIZE n (%)
KMR009	3 (27,3)	11 (100)
KMR011	1 (9,1)	10 (91,0)
KMR013	3 (27,3)	11 (100)
KMR016	3 (27,3)	11 (100)
KMR019	1 (9,1)	9 (81,8)
KMR028	3 (27,3)	11 (100)
KMR030	0 (0)	10 (91,0)
KMR035	0 (0)	8 (72,7)
KMR036	2 (18,2)	10 (91,0)
KMR037	3 (27,3)	9 (81,8)
KMR038	1 (9,1)	10 (91,0)
KMR039	1 (9,1)	10 (91,0)
KMR040	4 (36,4)	11 (100)
KMR041	2 (18,2)	8 (72,7)
KMR042	2 (18,2)	10 (91,0)
KMR043	2 (18,2)	11 (100)
KMR044	3 (27,3)	11 (100)
KMR045	0 (0)	10 (91,0)
KMR046	1 (9,1)	11 (100)
KMR047	0 (0)	9 (81,8)
KMR048	3 (27,3)	11 (100)
KMR049	1 (9,1)	9 (81,8)
KMR050	4 (36,4)	11 (100)
KMR051	2 (18,2)	11 (100)
KMR052	0 (0)	11 (100)
KMR053	0 (0)	9 (81,8)
KMR054	2 (18,2)	9 (81,8)
KMR055	2 (18,2)	11 (100)
KMR056	2 (18,2)	11 (100)
KMR057	3 (27,3)	11 (100)

Legenda: n – broj parova primatelj-davatelj

Utvrđeno je da su biljezi KMR040 i KMR050 bili informativni za najveći broj parova primatelj-davatelj, odnosno da njihova informativnost iznosi 36,4%. Biljezi KMR030, KMR035, KMR045, KMR047, KMR052 i KMR053 nisu bili informativni niti za jedan par primatelj-davatelj. Ipak, prosječna informativnost biljega iznosi 18%. Srednja vrijednost uspješnosti analize biljega qPCR iznosi 91%, što znači da je u prosjeku svaka analiza biljega qPCR bila uspješna za 10 parova primatelj-davatelj.

5. RASPRAVA

Transplantacija krvotvornih matičnih stanica se smatra jedinom terapijskom metodom koja može dovesti do trajnog izlječenja malignih i nemalignih bolesti krvotvornog sustava. Iako postoji rizik od odbacivanja presatka, povratka bolesti te pojave GvHD, broj izvedenih TKMS značajno raste posljednjih nekoliko desetljeća (D'Souza i sur. 2017). Praćenje statusa kimerizma od iznimne je važnosti u procjeni uspjeha TKMS, ali i pravilnoj prilagodbi terapije nakon transplantacije. Iz tog je razloga primarni cilj ovog rada bio usporediti rezultate praćenja statusa kimerizma za 12 parova primatelj-davatelj nakon TKMS u KBC Zagreb, dobivene dvjema molekularnim metodama koje se danas najčešće upotrebljavaju: PCR-STR i qPCR. Usporedba metoda temelji se na određivanju njihove osjetljivosti i preciznosti te primjene ovisno o omjeru primateljnih i davateljnih stanica u uzorku bolesnika nakon TKMS.

Metoda PCR-STR je posljednjih dvadesetak godina jedna od najčešće klinički upotrebljivanih metoda za praćenje statusa kimerizma s osjetljivošću od 1-5%. Dodatna prednost ove metode ogleda se i u njenoj brzini, pouzdanosti i reproducibilnosti. Za ovu je metodu potrebna mala količina DNA (1-5ng), što je važno ukoliko se status kimerizma utvrđuje u pojedinim staničnim linijama, npr. među limfocitima B čija je učestalost u perifernoj krvi niska. Uzevši u obzir da je metoda PCR-STR danas najčešće korištena metoda u ovu svrhu, dostupan je čitav niz komercijalnih setova i računalnih programa za analizu dobivenih rezultata (Blouin i sur. 2021). Lokuse STR odlikuje iznimna raznovrsnost što im omogućuje visoku informativnost odnosno mogućnost za razlikovanje dviju zasebnih jedinki. Također, osim što je pogodnija za određivanje miješanog kimerizma pri kojem je udio manje zastupljene populacije viši, njena slabija osjetljivosti u odnosu na metodu qPCR se, kad je riječ o kliničkom značaju i postransplantacijskoj terapiji, može u određenim slučajevima čak smatrati i prednošću. Naime, smatra se da metode sa višom osjetljivošću mogu rezultirati i lažno pozitivnim nalazom, odnosno nalazom lažnog miješanog kimerizma upravo zbog slučajno prikupljenih stanica kože, epitela ili stromalnih stanica primatelja (Tozzo i sur. 2021). Metodi PCR-STR ide u prilog i činjenica da ukoliko ponestane uzorka bolesnika prije transplantacije, postoji mogućnost prikupljanja bukalnog uzorka primatelja i davatelja te usporedbe rezultata analize lokusa STR na uzorcima prije TKMS sa rezultatima dobivenim nakon TKMS, što nije slučaj za metodu qPCR.

Ipak, kada je riječ o niskom postotku kimerizma, odnosno u slučajevima kada je udio primateljnih stanica niži (<10% primateljnih stanica), dio istraživanja pokazuje kako se ova metoda ipak nije pokazala dovoljno preciznom upravo zbog svoje niže osjetljivosti (Blouin i sur. 2021). Dodatno,

neka istraživanja navode najprikladnijim izborom utvrđivanja kimerizma kombinaciju praćenja statusa kimerizma zajedno sa praćenjem MRD, pri čemu bi bilo uputno koristiti metode više osjetljivosti ($>0,1\%$) (Tyler i sur. 2019).

Rezultati dobiveni u ovom radu u skladu su s literaturnim podacima te su pokazali veću preciznost i pouzdanost metode PCR-STR kada su u pitanju oni uzorci kimera kod kojih je postotak primateljelih stanica u uzorku bolesnika nakon TKMS veći od 10%. S obzirom da su za ovo istraživanje odabrani samo oni bolesnici čiji je udio primateljelih stanica u uzorku nakon TKMS veći od 10%, nije bilo moguće napraviti usporedbu s literaturnim podacima vezano uz smanjenu pouzdanost metode PCR-STR kada je riječ o manjim udjelima primateljelih stanica. Metodom PCR-STR za svaki je par primatelj-davatelj dobiven velik broj informativnih lokusa za daljnje praćenje (>10), čime se povećava preciznost dobivenih rezultata. Svaki je primatelj u prosjeku imao 15 (71,4%) informativnih lokusa. Općenito, broj informativnih lokusa se smanjuje ukoliko su primatelj i davatelj u krvnom srodstvu, što možemo primjetiti i kod naših rezultata. Naime bolesnici kojima je davatelj bio srodnik (bolesnici br. 6, 9, 10, 11 i 12) imali su u prosjeku 5 manje informativnih lokusa od bolesnika s nesrodnim davateljem (bolesnici br. 1, 2, 3, 4, 5, 7 i 8). Također, istraživanje je pokazalo da informativnost lokusa STR u prosjeku iznosi 92%, dok je uspješnost analize lokusa STR uzorcima parova primatelj-davatelj prije TKMS iznosila 100%. Ovi rezultati idu u korist primjenjivosti, ali i pouzdanosti metode PCR-STR, koja je pokazala veću informativnost te uspješnosti analize od metode qPCR čija prosječna vrijednost informativnosti biljega qPCR iznosi svega 18%, dok je uspješnost analize iznosila u prosjeku 91%. Rasponi vrijednosti udjela primateljelih stanica dobiveni metodom PCR-STR su u prosjeku bili niski iako su u nekim slučajevima vrijednosti odskakale. Takav primjer uočavamo kod bolesnika broj 1, čiji su uzorci nakon TKMS bili analizirani za ukupno 17 informativnih lokusa. Kod uzorka kimere 1 za navedenog bolesnika, dobivena je podjednaka vrijednost udjela primateljelih stanica za 14 informativnih lokusa u uzorku nakon TKMS (11-19%), dok su vrijednosti dobivene za preostala tri informativna lokusa odskakale i do 10-15 % od srednje vrijednosti. Problem je vjerojatno rezultat umnažanja odnosno specifičnosti pojedinog lokusa. S obzirom da je riječ o velikom broju testiranih lokusa, srednja vrijednost se, u ovom slučaju, neće značajno promijeniti ukoliko se u izračun uvrste i rezultati dobiveni za one lokuse STR čije vrijednosti znatnije odudaraju.

Posljednjih desetak godina se u svrhu praćenja kimerizma nakon TKMS sve više upotrebljavaju novije metode poput metode qPCR čija osjetljivost doseže i 0,1-0,01%, što se smatra velikom

prednošću u odnosu na metodu PCR-STR (Abatay-Sel i sur. 2019). Upravo zbog svoje visoke osjetljivosti ova se metoda smatra pogodnom za praćenje ne samo statusa kimerizma nego i MRD, što je također važno ukoliko je riječ o bolesniku sa zloćudnom bolešću. Dodatne prednosti ove metode, osim visoke osjetljivosti, leže i u jednostavnosti njenog provođenja, kao i brzini određivanja DNA od interesa (Tozzo i sur. 2021). Dokazana je mogućnost određivanja vrlo niskog udjela primateljevih stanica u uzorku bolesnika nakon TKMS, što je od iznimne važnosti za rano uočavanje miješanog kimerizma što doprinosi boljem sagledavanju kliničke slike bolesnika i donošenju odluka o daljnjim postupcima (Abatay-Sel i sur. 2019).

Porastom osjetljivosti metode raste i rizik od smanjene specifičnosti i povećane mogućnosti za pojavom lažno pozitivnih rezultata koja u nekim istraživanjima doseže visokih 22,7% (Blouin i sur. 2021). Lažno pozitivni rezultati mogu uzrokovati nepotrebnu primjenu terapije nakon TKMS kod onih bolesnika kod kojih se povrat bolesti zapravo nije ni dogodio (Fry i sur. 2010). Problem predstavlja i potreba za velikom količinom primateljeve DNA prije same transplantacije s obzirom da se u svakoj sljedećoj reakciji PCR ona ponovno analizira. Također, metoda qPCR nije prikladna ukoliko je riječ o drugoj transplantaciji s novim davateljem jer vjerojatnost pronalaska informativnog biljega među dialelnim biljezima koji se analiziraju qPCR metodom značajno opada kad je potrebno razlučiti stanice porijeklom od tri različite osobe. Zaključno su dakle nedostaci qPCR metode potreba za velikom početnom količinom DNA, potreba za kalibracijskim krivuljama, slaba moć razlučivanja dialelnih biljega te mali broj varijacija za analiziranje (Chen i sur. 2011).

Rezultati dobiveni metodom qPCR u ovom radu su u skladu s podacima iz literature u kojima se metoda opisuje kao slabije pouzdanom kada je udio primateljevih stanica veći od 10%. Kao što je navedeno ranije, u istraživanje su uključeni upravo takvi bolesnici stoga također nije bilo moguće usporediti dobivene rezultate s literaturnim podacima o pouzdanosti metode qPCR kada su u pitanju manje vrijednosti primateljevih stanica. Kao što je već spomenuto, kod metode qPCR postoji manji broj varijanta za analiziranje. Iz tog je razloga za neke bolesnike bio problem naći dva biljega informativna za primatelja. Upravo takav slučaj je kod bolesnika broj 2, za kojeg je u početnoj skupini od 30 analiziranih biljega, pronađen samo jedan koji je bio informativan za primatelja. Iz tog razloga je taj par primatelj-davatelj bio dodatno testiran za dodatnih 9 biljega, što u svakom slučaju otežava i usporava postupak analize statusa kimerizma. Kod svakog su bolesnika u prosjeku sveukupno praćena samo četiri biljega informativna za primatelja, pri čemu

su za svaki uzorak nakon TKMS u analizi korištena dva biljega., S obzirom da se reakcije za svaki biljeg provode u triplikatu, prema većini danas korištenih protokola za praćenje kimerizma metodama qPCR, smatra se kako su dva biljega dovoljna za analizu uzorka kimere. Kod većine je uzoraka razlika u vrijednosti za udio primateljevih stanica za dva biljega značajno velika, s ponekom iznimkom, te je iznosila i do 30%. Takav rezultat ide u korist podacima da je metoda qPCR manje pouzdana kad je riječ o većem udjelu primateljevih stanica.

Zaključno, rezultati ovog istraživanja ukazali su na prednosti metode PCR-STR u odnosu na metodu qPCRu slučajevima kada je udio primateljevih stanica u uzorku bolesnika nakon TKMS veći od 10%. Rezultati ukazuju na nužnost zadržavanja obje metode u protokolu rutinskog praćenja statusa kimerizma nakon TKMS pri čemu bi se brza i jednostavna metoda qPCR koristila kao prvi izbor. U slučajevima kada bi rezultat analize biljega qPCR ukazivao na porast udjela primateljevih stanica na više od 10%, nužno je ponoviti analizu metodom PCR-STR te tog bolesnika dalje nastaviti pratiti metodom PCR-STR.

6. ZAKLJUČAK

1. Od 21 analiziranog lokusa STR, najinformativnijima su se pokazali lokusi D13S797, D18S976 i D21S1442, dok su najmanje informativni bili lokusi D18S390 i HPRT.
2. Među 30 biljega testiranih metodom qPCR, dva (KMR040 i KMR050) su bila najčešće informativna, dok čak 6 biljega (KMR030, KMR035, KMR045, KMR047, KMR052 i KMR053) nije bilo informativno niti za jedan par primatelj-davatelj.
3. Raspon dobivenih vrijednosti za udio primateljstaničnih stanica je u prosjeku bio manji za lokuse STR nego onaj dobiven analizom biljega qPCR.
4. Metoda PCR-STR pouzdanija je kad je riječ o uzorcima kimera s višim postotkom primateljstaničnih stanica (>10%).
5. Metoda qPCR je manje pouzdana od metode PCR-STR za one uzorke čiji je postotak primateljstaničnih stanica viši od 10%.
6. Obje metode imaju svoje prednosti i nedostatke, te ovisno o statusu kimerizma pojedinog bolesnika treba odabrati, odnosno prilagoditi izbor metode za njegovo određivanje.

7. LITERATURA

Abatay-Sel F., Savran-Oguz F., Kalayoglu-Besisik S. i sur. (2019): Short Tandem Repeat-Polymerase Chain Reaction (STR-PCR) with Quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) Method Using for Chimerism Analysis. **Clinical Laboratory** 65(9): 1697-1703

Alizadeh M., Bernard M., Danic B. i sur. (2002): Quantitative Assessment of Hematopoietic Chimerism after Bone Marrow Transplantation by Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction. **Blood** 99: 4618-4625.

Andreis I., Batinić D., Čulo F. i sur. (2004): Imunologija. Medicinska naklada, Zagreb.

Aneufast User's Manual (2011) <http://www.aneufast.com/> (pristupljeno 02.09.2022.).

Antin JH., Childs R., Filipovich AH. i sur. (2001): Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem Meetings of the International Bone Marrow Transplant Registry and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. **Biology of Blood and Marrow Transplantation** 9: 473-485.

Bader P., Niethammer D., Willasch A. i sur. (2005): How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? **Bone Marrow Transplantation** 2: 107-119.

Blouin A.G., Ye F., Williams J. i sur. (2021): A practical guide to chimerism analysis: Review of the literature and testing practices worldwide, **Human Immunology** 82: 838-849.

Chen D.P., Tseng C.P., Wang W.T. i sur. (2011): Real-Time Biallelic Polymorphism-Polymerase Chain Reaction for Chimerism Monitoring of Hematopoietic Stem Cell Transplantation Relapsed Patients. **Clinica Chimica Acta** 412: 625-630.

Collins RH., Goldstein S., Giralt S. i sur. (2000): Donor leukocyte infusions in acute lymphocytic leukemia. **Bone Marrow Transplantation** 26: 511-516.

Cummings C.J., Zoghbi H.Y. (2000): Trinucleotide repeats: mechanism and pathophysiology. **Annual Review of Genomics and Human Genetics** 1: 281-328.

D'Souza A., Lee S., Zhu X. i sur.(2017): Current use and trends in hematopoietic cell transplantation in the United States. **Biology of Blood Marrow Transplantation** 23: 1417-1421.

- Fry T.J., Willasch A., Bader P. (2010): The graft-versus-tumor effect in pediatric malignancy. **Pediatric Clinics of North America** 57: 67-81.
- Grubić Z. (2012): Tipizacija HLA u procjeni kompatibilnog darivatelja. **Bilten Krohema** 4(2): 42-44.
- Hearne C., Ghosh S., Todd J. (1992): Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. **Trends in Genetics** 8: 288-294.
- Jarne P., Lagoda, P.J.L. (1996): Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology and Evolution** 11: 424-429.
- Karlen Y., McNair A., Perseguers S. i sur. (2007): Statistical significance of quantitative PCR. **BMC Bioinformatics** 8 (1): 131-147.
- Khan F., Agarwal A., Agrawal S. (2004): Significance of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation: new variations on an old theme, **Bone Marrow Transplantation** 34: 1-12.
- Koreth J., O Leary J., McGee J. (1996): Microsatellites and PCR genomics. **The Journal of Pathology** 178: 239-248.
- Lion T., Watzinger F., Preuner S. i sur. (2012): The EuroChimerism concept for a standardized approach to chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation. **Leukemia** 26(8): 1821-1828.
- Nollet F., Billiet J., Selleslag D. i sur. (2001): Standardisation of multiplex fluorescent short tandem repeat analysis for chimerism testing. **Bone Marrow Transplantation** 28(5): 511-518.
- Ringdén O., le Blanc K. (2005): Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: state of the art and new perspectives. **APMIS** 113: 813-830.
- Rinkevich B. (2001): Human Natural Chimerism: An Acquired Character or a Vestige of Evolution? **Human Immunology** 62: 651-657.
- Ross D. M., Branford S., Seymour J. F. i sur. (2013): Safety and efficacy of imatinib cessation for 33 CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. **Blood** 122(4): 515-523.

Snowden J.A., Sánchez-Ortega I., Corbacioglu S. i sur. (2022): Indications for haematopoietic cell transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe. **Bone Marrow Transplantation** 19: 1-23.

Storb R. (2004): Non-myeloablative allogeneic transplantation state of the art. **Pediatric Transplantation** 8: 12-18.

Thorsby E. (2009): A short history of HLA. **Tissue Antigens** 74 (2): 101-116.

Tozzo P., Delicati A., Zambello R. i sur. (2021): Chimerism Monitoring Techniques after Hematopoietic Stem Cell Transplantation: An Overview of the Last 15 Years. **Diagnostics** 11: 621-628.

Tyler J., Kumer L., Fisher C. i sur. (2019): Personalized Chimerism Test That Uses Selection of Short Tandem Repeat or Quantitative PCR Depending on Patient's Chimerism Status. **The Journal of Molecular Diagnostics** 21: 483-490.

Urquhart A., Kimpton CP., Downes TJ. i sur. (1994): Variation in Short Tandem Repeat sequences - a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. **International Journal of Legal Medicine** 107: 13-20.

Internetski izvori:

<https://www.researchgate.net/>, pristupljeno 20.07.2022.

<https://www.shutterstock.com/>, pristupljeno 25.07.2022.

<https://www.quora.com/>, pristupljeno 10.08.2022.

<https://commons.wikimedia.org/>, pristupljeno 11.08.2022.

https://www.gendx.com/product_line/kmrtype/, pristupljeno 18.08.2022.

8. ŽIVOTOPIS

Ja, Jana Jančin, rođena sam 04.08.1997. u Zagrebu, gdje sam od rujna 2012. do srpnja 2016. pohađala opći smjer u Gimnaziji Lucijana Vranjanina. U srpnju 2017. upisala sam preddiplomski studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu, te u rujnu 2020. stekla titulu sveučilišne prvostupnice biologije. Obrazovanje sam u listopadu 2020. nastavila na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, upisavši diplomski studij eksperimentalne biologije, modul fiziologije i imunobiologije. Godine 2018. sam sudjelovala u projektu „Noć biologije“, koji se već tradicionalno održava na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Osim hrvatskim kao materinskim jezikom, odlično se služim engleskim i njemačkim jezikom. Manevriranje studentskim poslovima i fakultetskim obvezama, naučilo me odgovornosti, samostalnosti, ozbiljnosti, kolegijalnosti ali i probudilo u meni interes za novim znanjima. Kao svoje dodatne vještine navela bih i izvrsno snalaženje u paketu Microsoft Office, ali i vozačku dozvolu B kategorije.