Uloga alela gena HLA-DPB1 u ishodu transplantacije krvotvornih matičnih stanica s nesrodnog davatelja

Grba, Adriana

Master's thesis / Diplomski rad

2014

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:754464

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Adriana Grba

ULOGA ALELA GENA HLA-DPB1 U ISHODU TRANSPLANTACIJE KRVOTVORNIH MATIČNIH STANICA S NESRODNOG DAVATELJA

Diplomski rad

Zagreb, 2014.

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

Zahvaljujem svojoj mentorici, prof.dr.sc. Zorani Grubić, koja je oblikovala ideju, nesebično prenosila na mene svoje znanje te me svojim znanstvenim i stručnim savjetima vodila kroz izradu ovog diplomskog rada. Želim zahvaliti i svim djelatnicima KJ za tipizaciju tkiva na susretljivosti i ugodnoj radnoj atmosferi, a posebice mag.mol.biol. Mariji Maskalan, koja mi je svojom strpljivošću olakšala rješavanje svih problema na koje sam naišla tijekom istraživanja.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na ljubavi i bezuvjetnoj podršci tijekom svih mojih godina studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek Diplomski rad

ULOGA ALELA GENA HLA-DPB1 U ISHODU TRANSPLANTACIJE KRVOTVORNIH MATIČNIH STANICA S NESRODNOG DAVATELJA

Adriana Grba

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U ovom radu analizirali smo podudarnost HLA među parovima primatelj-nesrodni davatelj u programu nesrodne transplantacije krvotvornih matičnih stanica (TKMS). Unutar ispitivane skupine odredili smo raspodjelu alela HLA-DPB1 među bolesnicima, njihovim nesrodnim davateljima i kontrolama, broj nepodudarnosti na lokusima HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 i –DPB1 između primatelja i nesrodnog davatelja te ispitali povezanost dopuštenih i nedopuštenih nepodudarnosti HLA-DPB1 s ishodom TKMS. Skupina je obuhvatila 57 parova primatelj-davatelj kojima su određeni aleli HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 i –DPB1 metodom lančane reakcije polimerazom i specifičnim početnicama ili probama za alele HLA (metode: PCR-SSP i PCR-SSO). Među bolesnicima najčešći alel bio je HLA-DPB1*04:01 (42,1%) što je u skladu s rezultatima za kontrolnu skupinu. Unutar cjelokupne skupine bolesnika nije otkrivena statistički značajna razlika u preživljavanju između bolesnika s 0, 1 ili 2 nepodudarnosti DPB1. Statistički značajno bolje preživljavanje bolesnika s 2 nepodudarnosti za alele DPB1 uočeno je samo u skupini bolesnika koji su imali davatelja 10/10. Nije uočena statistički značajna razlika u preživljavanju između bolesnika s dopuštenim i onih s nedopuštenim nepodudarnostima DPB1. Za donošenje konačnog zaključka o nepodudarnosti za alele HLA-DPB1 u ishodu TKMS neophodno je provesti veći broj istraživanja.

(36 stranica, 23 slike, 2 tablice, 17 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

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

Voditelj: dr.sc. Zorana Grubić, izvanredni profesor, Klinički bolnički centar Zagreb

Ocjenitelji: dr.sc. Nada Oršolić, redoviti profesor, PMF Sveučilišta u Zagrebu

dr.sc. Milorad Mrakovčić, redoviti profesor, PMF Sveučilišta u Zagrebu

dr.sc. Zlatko Liber, izvanredni profesor, PMF Sveučilišta u Zagrebu

Rad prihvaćen: 04.09.2014.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

THE ROLE OF HLA-DPB1 ALLELES ON OUTCOME OF HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION FROM UNRELATED DONOR

Adriana Grba

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

In the present study the correlation between HLA mismatches among recipient-unrelated donor in hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) were analyzed. Tested group comprised of 57 pairs. The distribution of DPB1 alleles in the group of patients, unrelated donors and healthy controls was compared. The next goal was to analyze the number of mismatches at HLA-A,-B,-C, -DRB1, -DQB1 and -DPB1 loci between recipient-donor pairs and their correlation on the outcome of HSCT. HLA alleles were tested by Polymerase Chain Reaction and specific primers or probes (PCR-SSP and PCR-SSO methods). Among all three tested groups DPB1*04:01 allele was the most frequent (42.1%). No statistically significant difference in survival after HSCT was observed between patients with 0, 1, or 2 mismatches at DPB1 locus. In the group of 10/10 matched pairs significantly better survival was observed for patients with 2 DPB1 mismatches. There was no statistically significant difference in survival between patients with permissive and non-permissive DPB1 mismatches. For the final conclusion about the necessity of matching for HLA-DPB1 alleles it is required to enlarge the number of studies.

(36 pages, 23 figures, 2 tables, 17 references, original in: croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: HLA- DPB1, bone marrow transplantation, GvHD

Supervisor: Zorana Grubić, Ph.D., Associate Professor, University Hospital Centre Zagreb

Reviewers: Nada Oršolić, Ph.D., Full Professor, Faculty of Science, University of Zagreb

Milorad Mrakovčić,Ph.D.,Full Professor, Faculty of Science, University of Zagreb

Zlatko Liber, Ph.D., Associate Professor, Faculty of Science, University of Zagreb

Thesis accepted: 04.09.2014.

Sadržaj:

1. UVOD 1

1.1. SUSTAV HLA 1

1.1.1. Osobine sustava HLA 1

1.1.2. Smještaj i organizacija sustava HLA 2

1.1.3. Geni HLA 3

1.1.4. Molekule HLA razreda I 4

1.1.5. Molekule HLA razreda II 5

1.2. GENI HLA-DPA1 I HLA-DPB1 7

1.3. TRANSPLANTACIJA KRVOTVORNIH MATIČNIH STANICA 10

1.3.1. Izvori matičnih stanica 11

1.3.2. Tipovi transplantacija prema genetskom odnosu primatelja i davatelja 11

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 14

3. MATERIJAL I METODE 15

3.1. MATERIJAL 15

3.1.1. Ispitanici 15

3.1.2. Kontrola 16

3.2. METODE 16

3.2.1. Izolacija DNA 16

3.2.2. Određivanje gena HLA-DPB1 metodom PCR-SSP 16

3.2.3. Određivanje gena HLA-DPB1 metodom PCR-SSO 17

3.2.4. Statistička obrada 18

4. REZULTATI 19

4.1. BROJ PODUDARNOSTI PAROVA PRIMATELJ – DAVATELJ KMS NA LOKUSIMA HLA-A, -B, -C, -DRB1 I -DQB1 19

4.2. RASPODJELA ALELA HLA-DPB1 U SKUPINI BOLESNIKA I KONTROLI 20

4.3. RASPODJELA ALELA HLA-DPB1 U SKUPINI NESRODNIH DAVATELJA KMS 21
4.4. ANALIZA NEPODUDARNOSTI NA LOKUSU HLA-DPB1 IZMEĐU BOLESNIKA I NJIHOVIH NESRODNIH DAVATELJA 22
4.5. PREŽIVLJAVANJE BOLESNIKA NAKON TKMS 24
4.6. PREŽIVLJAVANJE BOLESNIKA NAKON TKMS S OBZIROM NA BROJ NEPODUDARNOSTI NA LOKUSIMA HLA-A, -B, -C, -DRB1 I -DQB1 24
4.7. PREŽIVLJAVANJE BOLESNIKA NAKON TKMS S OBZIROM NA NEPODUDARNOSTI NA LOKUSU HLA-DPB1 26
5. RASPRAVA 311
6. ZAKLJUČAK 314
7. LITERATURA 355

1. UVOD

1.1. SUSTAV HLA

Sustav HLA (engl. *Human Leukocyte Antigens*) glavni je sustav gena tkivne podudarnosti u čovjeka, a produkti tih gena, molekule HLA, nalaze se na površini gotovo svih stanica u ljudskom organizmu. Prvotno su otkrivene na leukocitima po čemu je cijeli sustav i nazvan. Glavna uloga molekula HLA je održavanje genske ravnoteže cijelog organizma, a sudjeluju i u obrani organizma od napada stranih antigena koji bi mogli narušiti tu ravnotežu.

1.1.1. Osobine sustava HLA

Sustav HLA najpolimorfniji je genski sustav u čovjeka s više od 10 000 različitih alela (15), a taj broj se neprekidno povećava jer se uvođenjem novih metoda određivanja alela HLA stalno otkrivaju novi. Među genima HLA najpolimorfniji je gen HLA-B na kojem je do danas poznato 3455 različitih alela (15). Veliki polimorfizam ostvaren je genskim mehanizmima kao što su genska konverzija (zamjena dijelova gena ulomcima drugih gena), genska rekombinacija između različitih alela istog lokusa i točkaste mutacije (promjene na razini nukleotida)(1).

Alele HLA, s obzirom na njihovu zastupljenost, možemo podijeliti na:

a) vrlo česte (učestalost >5,0%) – zastupljeni u cijelom svijetu (npr. A*02:01)

b) česte (učestalost 1,0-5,0%) – zastupljeni u velikom broju populacija (npr. A*25:01)

c) rijetke (učestalost 0,1-1,0%) – zastupljeni u manjem broju populacija (npr. B*27:14)

d) vrlo rijetke (učestalost <0,1%) – zastupljeni u nekoliko populacija (npr. B*14:11).

S obzirom na broj do sada poznatih alela HLA na lokusima HLA-A, -B i -C moguće je složiti više od $6x10^9$ različitih kombinacija tih alela, odnosno fenotipova HLA, a uključimo li još i alele HLA-DRB1 i -DQB1 onda je broj različitih fenotipova HLA veći od $10x10^{13}$. Međutim, stvarni broj različitih fenotipova HLA je znatno manji od toga zbog nepravilne raspodjele alela HLA u populaciji, odnosno neravnoteže udruživanja (engl. *linkage disequilibrium*, LD) alela HLA u haplotipove HLA. Neravnoteža udruživanja je pojava da se aleli usko vezanih lokusa HLA pojavljuju u istom haplotipu češće nego što bi to bilo očekivano na temelju njihovih pojedinačnih učestalosti. Što su dva lokusa HLA bliže

smještena na kromosomu to je manja vjerojatnost rekombinacije između njih i neravnoteža udruživanja je veća (2).

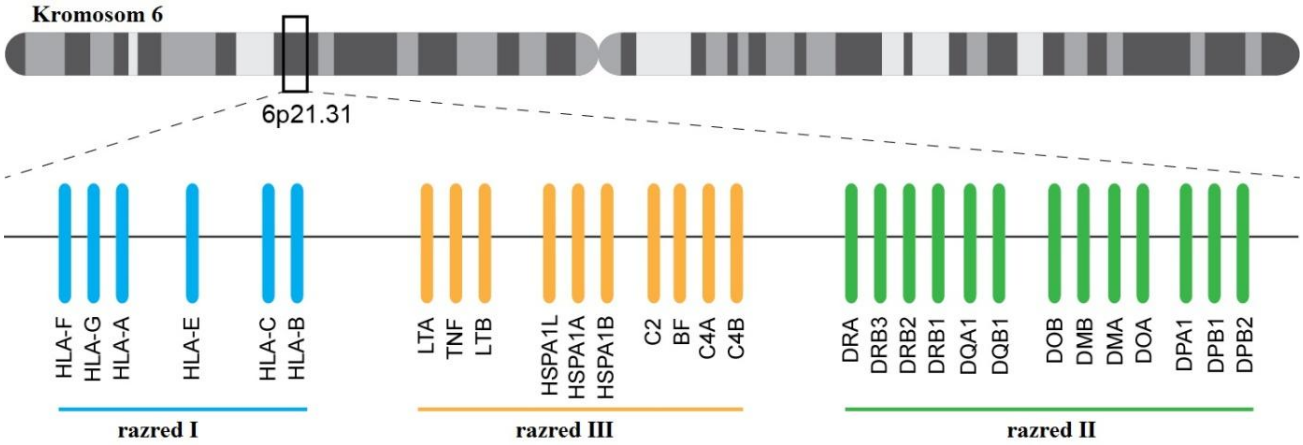
Kombinacija alela gena HLA na jednom kromosomu 6 tvori haplotip HLA koji nasljeđujemo po jedan od svakog roditelja. Kako tijekom mejoze ponekad dolazi do izmjene dijelova kromatida (engl. *crossing over*) i rekombinacije genetičkog materijala, tako može doći do promjene haplotipa HLA. Međutim, budući da su pojedini lokusi HLA smješteni vrlo blizu na kromosomu, ova je pojava u regiji HLA vrlo rijetka (učestalost je 4% u svakoj mejozi) te se kombinacija alela HLA na jednom kromosomu uglavnom nasljeđuje zajedno (1).

1.1.2. Smještaj i organizacija sustava HLA

Regija HLA dijeli se u tri subregije: HLA razred I, HLA razred II i HLA razred III (slika 1). Genska regija HLA razreda I smještena je najbliže telomeri kromosoma 6 i u njoj nalazimo klasične i neklasične gene HLA. Klasične gene HLA (geni -A, -B i -C) odlikuje velika raznovrsnost i velika tkivna zastupljenost dok su neklasični geni HLA (geni -E, -F i -G) manje polimorfni i ograničene zastupljenosti na stanicama te njihova uloga i važnost u transplantacijskoj imunologiji nije do kraja razjašnjena. Geni HLA razreda I kodiraju molekule HLA razreda I, tj. njihov teški lanac.

Regija HLA razreda II nalazi se na centromeričnom kraju kromosoma i čini ju 6 subregija (DM, DN, DO, DP, DQ i DR). Unutar pojedine subregije postoje minimalno dva aktivna gena HLA razreda II, gen A (npr. DQA1, DRA1), koji kodira za α lanac molekule HLA razreda II, i gen B (npr. DQB1, DPB1), koji kodira za β lanac molekule HLA razreda II. Unutar subregije DR prisutan je samo jedan gen A (DRA1) i 9 gena B (od DRB1 do DRB9) od kojih su neki funkcionalni a neki nisu. Subregije DO i DN imaju samo po jedan gen (DOB i DNA) i to su najstariji geni HLA koji su najvjerojatnije nekada činili jedan par.

Između regije HLA razreda I i razreda II nalazi se regija HLA razreda III, tj. centralna regija. Ona ne sadrži klasične gene HLA već gene koji kodiraju pojedine komponente komplementa (C2, C4, CFB), zatim gene za citokine (TNF, LTA, LTB) kao i mnoge druge gene koji uopće nemaju očiglednu ulogu u imunološkoj reakciji.

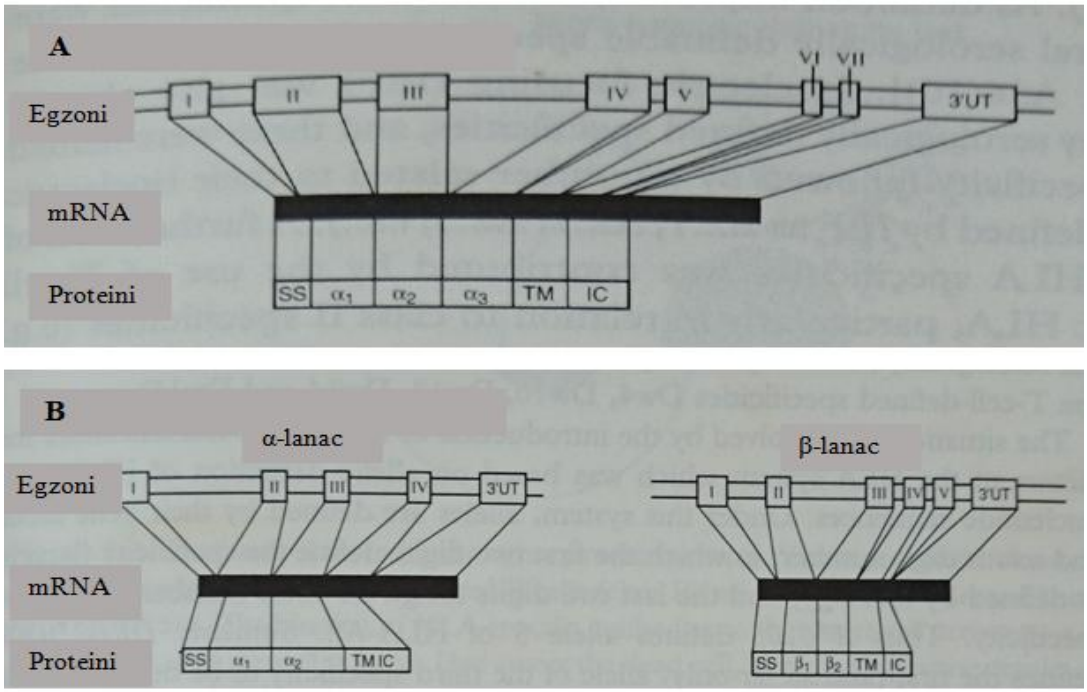


Slika 1. Shematski prikaz regije HLA na kraćem kraku kromosoma 6

1.1.3. Geni HLA

Analiza gena HLA ima široku primjenu – u transplantaciji, populacijskim istraživanjima, sudskoj medicini, transfuzijskom liječenju te u dijagnostici različitih bolesti. Zbog njegove važnosti sustav HLA je najistraživaniji i najpolimorfniji genski sustav u čovjeka iako ga čini segment od samo 3,6 Mb i obuhvaća oko 0,13% genoma (3). Smješten je na kraćem kraku kromosoma 6, na dijelu 6p21.31 i obuhvaća oko 4 000 kilobaza koje tvore više od 200 usko vezanih gena (1).

Geni HLA razreda I i razreda II imaju različitu strukturu egzona i introna (slika 2). Većina polimorfizama parova baza kod gena HLA razreda I smještena je u egzonima 2 i 3 teškog lanca, a kod gena HLA razreda II u egzonu 2 i lakog i teškog lanca. Egzoni kodiraju polipeptidne domene koje u molekuli HLA tvore pukotinu za vezanje peptida, pa su razlike među pojedinim alelima smještene upravo u tim egzonima. Puno je manje razlika između alela HLA pronađeno izvan ovog područja iz čega se može pretpostaviti da je evolucija polimorfizama HLA u većini slučajeva bila uvjetovana mutacijama i raznolikošću vezanja različitih peptida (4).



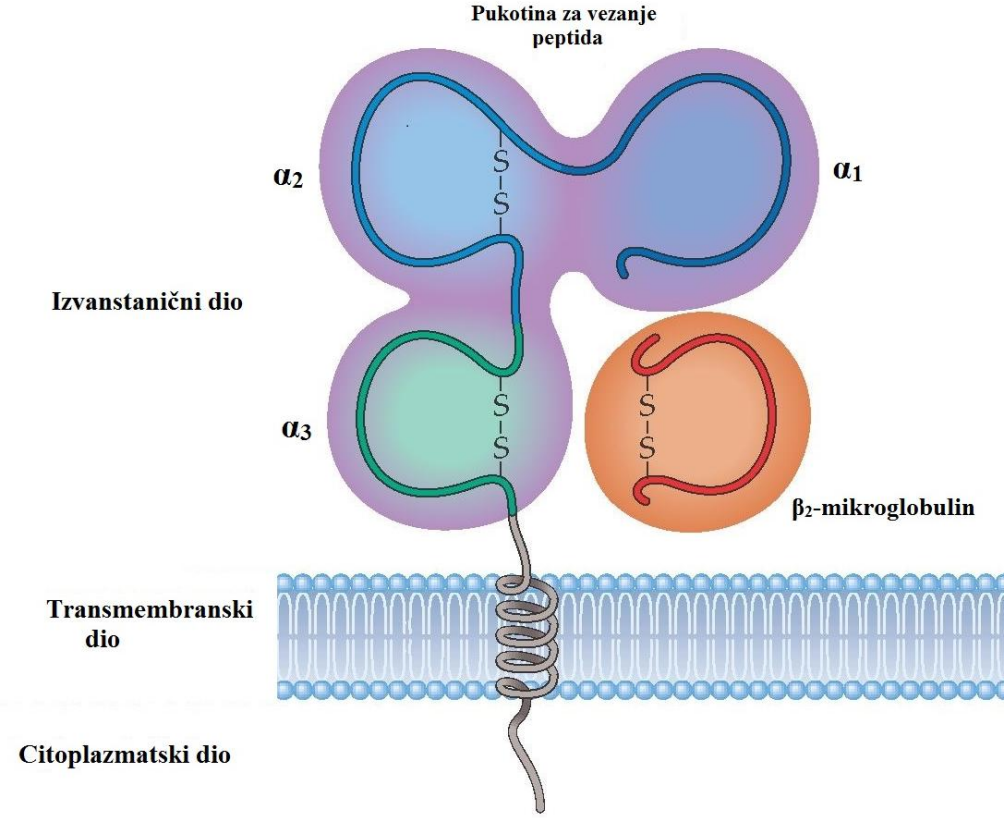
Slika 2. Egzoni teškog lanca HLA razreda I (A) i lakšeg (α-lanac) i težeg (β-lanac) lanca HLA razreda II (B) te polipeptidne domene HLA molekula koje ti egzoni kodiraju

Ponekad zbog mutacija u sekvencama pojedinih alela HLA mogu nastati aleli koji uopće nemaju ekspresiju molekula HLA na površini stanica ("null" aleli) ili koji imaju vrlo malu ekspresiju na stanicama ("L" aleli). Mutacije koje do toga dovode su insercije, delecije i točkaste mutacije koje uzrokuju pojavu stop kodona ili pogrešno spojenih produkata. "Null" aleli mogu se uočiti samo serološkom tipizacijom alela HLA, dok tipizacija temeljena na metodama DNA pokazuje postojanje tog alela koji u stvari nema ekspresiju na površini stanice. Takva tipizacija HLA je pogrešna i predstavlja rizik kod transplantacije krvotvornih matičnih stanica jer bolesnik i njegov davatelj na tom alelu HLA u stvari nisu podudarni (4).

1.1.4. Molekule HLA razreda I

Molekula HLA razreda I građena je od dva polipeptidna lanca, lakog i teškog, koji su međusobno povezani nekovalentnim vezama (slika 3). Teški lanac (α-lanac) kodiraju geni HLA razreda I i njegova molekularna masa iznosi oko 45 kD. Laki lanac (β_2-mikroglobulin) veže se za α-lanac i nije kodiran genima HLA već genom na kromosomu 15. Molekularna masa mu je puno manja, oko 12 kD, i nije polimorfan. Teški lanac sastoji se od tri izvanstanične domene (α_1, α_2 i α_3), hidrofobnog transmembranskog dijela te hidrofilnog citoplazmatskog dijela. Laki lanac ne prolazi kroz staničnu membranu već se nalazi u cijelosti

izvan stanice. Izvanstanične domene α_1 i α_2 tvore pukotinu koja je najvažniji dio molekule HLA jer veže peptide, odnosno prerađene tuđe antigene, i tako tvori kompleks koji prepoznaju T limfociti. Upravo je ta pukotina sastavljena od najvarijabilnijih aminokiselina koje se razlikuju u pojedinim molekulama HLA što ih određuju različiti alelni oblici gena HLA. Molekule HLA razreda I prisutne su na površini gotovo svih stanica s jezgrom i predočuju unutarstanične antigene (npr. tumorski i virusni antigeni) CD8+ citotoksičnim limfocitima T (1).

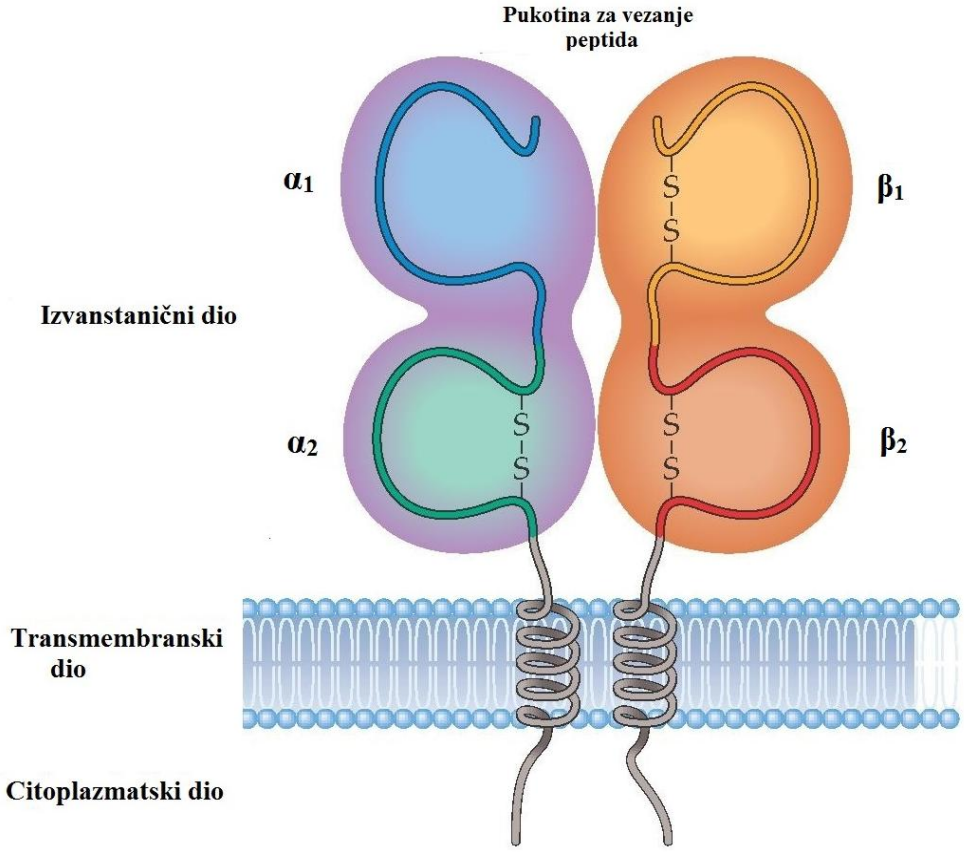


Slika 3. Shematski prikaz molekule HLA razreda I

1.1.5. Molekule HLA razreda II

Molekula HLA razreda II također je građena od dva lanca, težeg (α) i lakšeg (β), povezanih nekovalentnim vezama (slika 4). Oba su polimorfna i vrlo slična, a relativna molekularna masa im iznosi oko 30 kD. Teži lanac (α-lanac) kodiraju A geni HLA razreda II (npr. HLA-DRA1), a lakši lanac (β-lanac) kodiran je B genima HLA razreda II (npr. HLA-DRB1). Svojom strukturom, molekule HLA razreda II nalikuju molekulama HLA razreda I, također imaju izvanstanični dio, transmembranski i citoplazmatski dio. Izvanstanični dio tvore

domene α_1 i α_2 te β_1 i β_2. Domene α_1 i β_1 formiraju pukotinu koja je vezno mjesto za strani peptid. Kao i kod molekula HLA razreda I, veliki polimorfizam gena HLA zaslužan je za stvaranje različitih stereokemijskih površina pukotine. Za razliku od molekula HLA razreda I, molekule HLA razreda II nisu prisutne na membranama svih stanica već samo na stanicama koje predočuju strane antigene (dendritične stanice, makrofagi, monociti, B limfociti) CD4+ pomoćničkim T limfocitima koji potiču sintezu odgovarajućih protutijela za taj antigen (1).

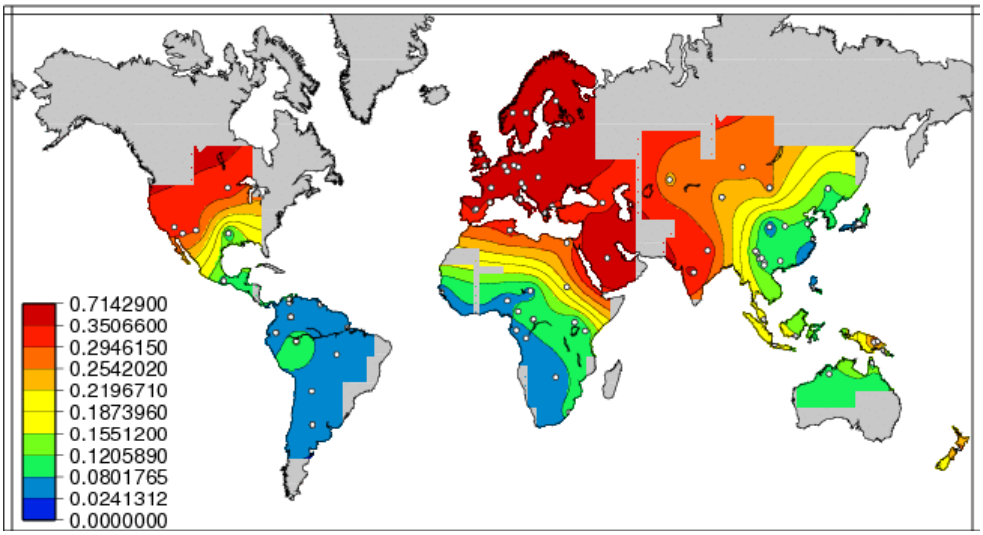


Slika 4. Shematski prikaz molekule HLA razreda II

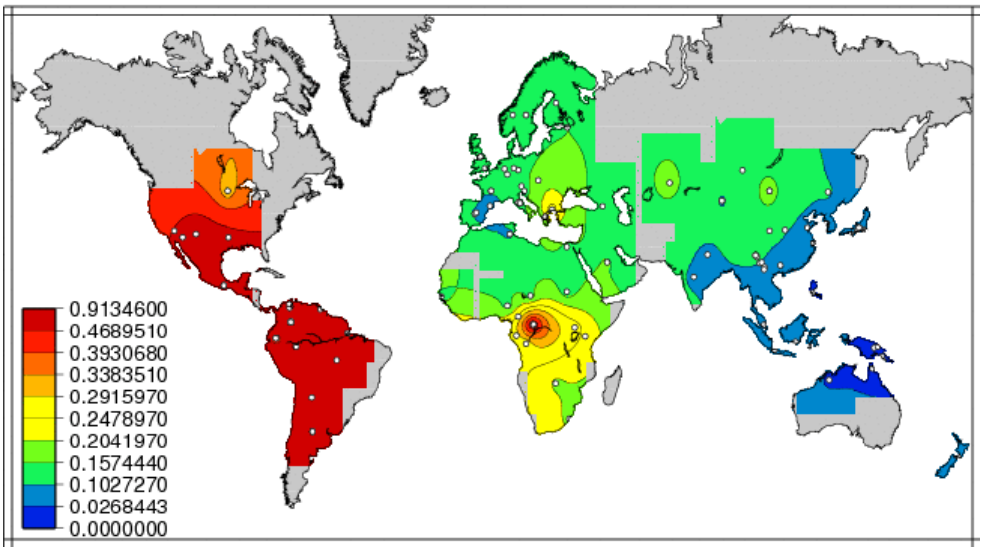
1.2. GENI HLA-DPA1 I HLA-DPB1

Subregija HLA-DP pripada regiji HLA razreda II i na kromosomu 6 nalazi se centromerično u odnosu na subregije HLA-DQ i -DR. Subregija HLA-DP prvi put je opisana 1980. godine kao zasebna skupina gena HLA razreda II koja izaziva odgovor T limfocita. Molekule HLA-DP strukturno su slične svim ostalim molekulama HLA razreda II. Sastoje se od α lanca koji je kodiran nisko polimorfnim genom DPA1 (do danas je poznato 38 alela koji kodiraju 19 proteina), i β lanca za koji kodira visoko polimorfan gen DPB1 (do danas poznato 344 alela koji kodiraju 286 proteina) (15). Učestalost rekombinacije između lokusa HLA-DP i ostalih lokusa HLA razreda II je povećana što ukazuje na slabu neravnotežu udruživanja (engl. *linkage disequilibrium*) između HLA-DP i ostalih gena HLA razreda II.

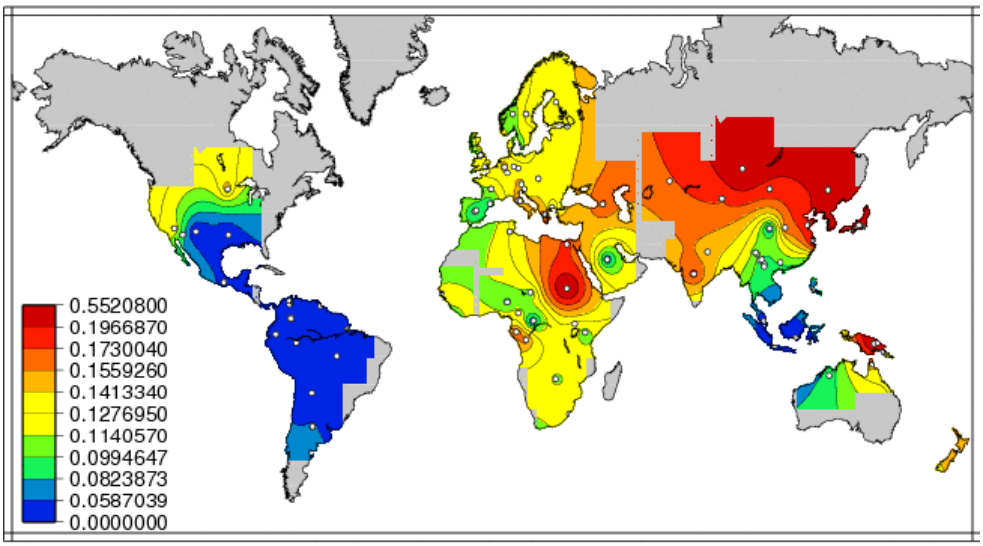
Najčešći alel HLA-DPB1 u Europi i Sjevernoj Americi je DPB1*04:01 (slika 5). Njegova učestalost u Sj. Americi smanjuje se kako idemo prema jugu, a ujedno se povećava učestalost alela HLA-DPB1*04:02, pa u središnjoj i Južnoj Americi prevladava upravo taj alel (slika 6). Alel HLA-DPB1*04:01 ima veliku učestalost u istočnoj Aziji, ali kako idemo prema zapadu sve veću učestalost ima alel HLA-DPB1*02:01 koji i prevladava u zapadnoj Aziji (slika 7).



Slika 5. Raspodjela alela HLA-DPB1*04:01 u svijetu



Slika 6. Raspodjela alela HLA-DPB1*04:02 u svijetu



Slika 7. Raspodjela alela HLA-DPB1*02:01 u svijetu

Imena novootkrivenim alelima HLA-DPB1 dodjeljivana su u okviru postojećeg sustava nomenklature. Na primjer, alel otkriven nakon alela HLA-DPB1*04 nazvan je DPB1*01:02, sljedeći je nazvan DPB1*02:02 itd. O ovakvom načinu imenovanja alela odlučeno je zbog složenih genetskih svojstava alela HLA-DPB1 u odnosu na ostale alele HLA. Naime, većina alela HLA-DPB1 ne može se jednostavno grupirati na temelju njihovih nukleotidnih sekvenci. Nakon ažuriranja nazivlja sustava HLA 2010. godine, svim alelima DPB1, osim alelima DPB1*02:02 i DPB1*04:02, otkrivenima nakon alela DPB1*99:01

dodijeljena su nova imena. Tako je npr. alel DPB1*01:02 postao DPB1*100:01, a DPB1*02:03 postao je DPB1*101:01 (16).

Za razliku od vrlo istraženih gena subregije HLA-DQ i -DR, o genu HLA-DPB1 ne postoji tako velik broj istraživanja niti se uzima u obzir pri odabiru davatelja za transplantaciju krvotvornih matičnih stanica (TKMS), a njegova biološka funkcija i dalje ostaje slabo razjašnjena. Razlog tome je pretpostavka da molekule HLA-DP ne igraju tako važnu ulogu u imunološkoj reakciji u odnosu na molekule HLA-DR i -DQ. Uz to, i ekspresija molekula HLA-DP na stanicama je znatno niža od zastupljenosti molekula HLA-DR i -DQ. Prisutne su na svim stanicama na kojima su i ostale molekule HLA razreda II, ali ih je zbog male ekspresije na stanicama teže posebno izolirati.

Istraživanja pokazuju da nisu sve nepodudarnosti u alelima HLA-DPB1 jednako imunogenične. Razlike u polimorfizmima aminokiselina na specifičnim mjestima u molekuli HLA, pogotovo onima koje su uključene u prepoznavanje T limfocita, mogu tvoriti štetnije nepodudarnosti koje su temeljene na odgovoru T limfocita na aloantigene. Prema tome, T limfociti jače, odnosno slabije prepoznaju određene alele HLA i temeljem toga su okarakterizirani kao nedopuštene, odnosno dopuštene nepodudarnosti alela između bolesnika i davatelja. Temeljeći se na križnoj aloreaktivnosti T limfocita, Zino i suradnici su 2004. okarakterizirali nepodudarnosti između bolesnika i davatelja za alele HLA-DPB1*03:01, *09:01, *10:01, *14:01, *17:01, i *45:01 kao nedopuštene, a nepodudarnosti u ostalim alelima HLA-DPB1 kao dopuštene. Istraživanja pokazuju da su nedopuštene nepodudarnosti povezane s učestalijom pojavom GvHD (engl. *graft versus host disease*) i manjim preživljavanjem bolesnika nakon TKMS (5).

1.3. TRANSPLANTACIJA KRVOTVORNIH MATIČNIH STANICA

Izuzetna važnost gena HLA je u transplantaciji tkiva i organa, gdje je podudarnost u genima HLA izravno povezana s izlječenjem od bolesti te prihvaćanjem, odnosno odbacivanjem presatka. Najveći problem kod TKMS su imunološke reakcije koje se događaju kao odgovor na strane antigene HLA. To može dovesti do pojave imunoreakcije primatelja na transplantirane strane antigene HLA davatelja (engl. *host versus graft disease*, HvGD) koja će uzrokovati odbacivanje transplantata. To se događa zbog toga što imunološki aktivne stanice primatelja (T limfociti i NK stanice) prepoznaju i reagiraju na strane antigene na stanicama tkiva davatelja i uništavaju ih te presadak bude odbačen. Problem kod TKMS još je i to što imunokompetentne stanice davatelja mogu pokrenuti imunološku reakciju protiv primateljevih stanica, tzv. GvHD (engl. *graft versus host disease*). Važan mehanizam učinka transplantacije na malignu bolest je poželjna reakcija presatka protiv tumora, tzv. GvL (engl. *Graft versus Leukemia*) tijekom koje imunokompetentne stanice davatelja prepoznaju i uništavaju maligne stanice u davatelju.

Uz druge faktore kao što su opće stanje bolesnika, vrsta bolesti i priprema za transplantaciju, podudarnost u genima HLA ključna je za uspješnost TKMS. Danas je dokazano da je nepodudarnost u genima HLA povezana s povećanim rizikom od odbacivanja transplantata, pojave GvHD i smanjenim ukupnim preživljavanjem nakon TKMS.

Transplantacija KMS koristi se prvenstveno u terapiji raznih malignih (akutne i kronične leukemije, Hodgkinov i non-Hodgkinov limfom, multipli mijelom) i nemalignih (zatajenja koštane srži, autoimuni poremećaji) oboljenja. Krvotvorne matične stanice (KMS) imaju jedinstvenu sposobnost samoobnavljanja i služe kao doživotan izvor krvnih stanica. Zbog toga se kod bolesnika s oštećenjem koštane srži pristupa transplantaciji takvih stanica koje će preuzeti funkciju hematopoeze kod primatelja, a imunološki aktivne stanice davatelja ubit će tumorske stanice. Samoj transplantaciji prethodi priprema bolesnika koja uključuje mijeloablaciju, odnosno uništavanje stanica koštane srži a time i tumora. To se postiže pomoću kemoterapije i/ili radijacijom cijelog tijela (6). Potrebno je provesti i imunosupresiju bolesnika prije ili poslije transplantacije. Nakon pripreme matične stanice se transplantiraju u primatelja direktno u venu, poput transfuzije krvi. Nakon nekog vremena cirkuliranja one se zaustave u koštanoj srži gdje započinju svoju funkciju hematopoeze, odnosno proizvode zdrave krvne stanice.

Prvu uspješnu transplantaciju KMS iz koštane srži u svijetu izveo je dr. Donnall Thomas 1956. godine u SAD-u. U Hrvatskoj, transplantacija koštane srži započela je 1983. godine u KBC-u Zagreb, a izveo ju je liječnički tim u Zavodu za hematologiju pod vodstvom prof. dr. sc. Borisa Labara.

1.3.1. Izvori matičnih stanica

Koštana srž korištena je kao glavni izvor KMS u početcima transplantacije. Problem kod presađivanja koštane srži je to što ona nije solidan organ već tkivo unutar kosti koje nije direktno dostupno. Stanice se prikupljaju najčešće iz kostiju zdjelice dok je davatelj pod općom anestezijom, oporavak od zahvata je brz i uspješan a ozbiljne komplikacije su izuzetno rijetke.

Stanice iz koštane srži ulaze i u krvotok pa je i periferna krv dobar izvor KMS i sve češće se koristi umjesto transplantacije iz koštane srži, pogotovo za autologne transplantacije. Broj matičnih stanica u perifernoj krvi puno je manji u odnosu na broj stanica u koštanoj srži, ali može se povećati tako da se potakne njihovo napuštanje koštane srži pomoću čimbenika poticanja granulocitnih kolonija (G-CSF). On uzrokuje proliferaciju neutrofila i otpuštanje proteaza koje degradiraju proteine koji "drže" matične stanice u koštanoj srži te ih oslobađaju i one ulaze u krvotok. Sam postupak prikupljanja matičnih stanica iz krvi zove se leukafereza i provodi se pomoću aparata u koji krv ulazi, centrifugira se i iz nje se odvajaju matične stanice, a ostatak krvi vraća se u davatelja.

Još jedan izvor KMS je i krv iz pupčane vrpce. Prikuplja se odmah nakon rođenja djeteta te zamrzava i, iako je nema puno, bogata je matičnim stanicama. Za transplantaciju matičnih stanica iz pupkovine nije potrebna toliko velika podudarnost u genima HLA kao za transplantaciju iz ostalih izvora matičnih stanica. To je dobro za pripadnike manjinskih populacija i sve ostale bolesnike koji nemaju HLA identičnog davatelja (7).

1.3.2. Tipovi transplantacija prema genetskom odnosu primatelja i davatelja

Kod autologne transplantacije izvor matičnih stanica ista je osoba koja ih kasnije prima u svrhu obnavljanja hematopoetskog sustava nakon kemoterapije. Matične stanice prikupljaju se prije kemoterapije te zamrzavaju. Nakon primjene kemoterapije koja će ubiti tumorske stanice, matične stanice vraćaju se istom bolesniku. Ovim postupkom omogućava se primjena velikih doza kemoterapije bez opasnosti od oštećenja koštane srži. Prednost ovakve transplantacije je što osoba dobiva svoje vlastite stanice pa nema opasnosti od infekcija ili

HvGD-a što bi izazvalo odbacivanje presatka. Nedostatak ovog postupka je mogućnost da se prilikom prikupljanja matičnih stanica iz bolesnika slučajno prikupe i tumorske stanice koje će onda biti vraćene u bolesnika i prouzročiti relaps bolesti.

Singenična transplantacija označava transplantaciju matičnih stanica s jedne na drugu genetički identičnu osobu – jednojajčanog blizanca. Ovakvom transplantacijom također nema opasnosti od odbacivanja, a i prednost u odnosu na autolognu transplantaciju je što u transplantatu sigurno nema tumorskih stanica.

Kod alogenične transplantacije matične stanice uzimaju se od davatelja koji ima što veću podudarnost u genima HLA s primateljem. Najidealniji davatelj je genotipski identičan član uže obitelji i to je najčešće brat ili sestra bolesnika s istim haplotipovima HLA. U tom slučaju smo sigurni da je cijeli odsječak regije HLA između lokusa koji se određuju isti između primatelja i davatelja jer u tom odsječku ne nalaze se samo geni HLA, već i drugi geni koji sudjeluju u imunološkom odgovoru. U slučaju da bolesnik nema takvog davatelja u svojoj obitelji, traži se davatelj iz njegove proširene obitelji koji s njim dijeli jedan haplotip HLA, a bilo bi dobro da imaju još koji alel HLA podudaran. Kod odabira srodnog davatelja traži se HLA podudarnost 6/6 (u genima HLA-A, -B i -DRB1), a ponekad davatelj može biti i član obitelji s razlikom u jednom HLA lokusu (HLA podudarnost 5/6). Budući da samo jedna trećina bolesnika pronađe svog davatelja unutar obitelji, često je potrebno pronaći fenotipski HLA identičnog dobrovoljnog nesrodnog davatelja. Transplantacija KMS s nesrodnog davatelja nosi povećan rizik od odbacivanja transplantata i GvHD-a pa su kriteriji za odabir nesrodnog davatelja stroži. Danas se pri odabiru nesrodnog davatelja gleda podudarnost u genima HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1 i traži se HLA podudarnost 10/10, 9/10 ili iznimno 8/10 kod bolesnika s bolesti visokog rizika.

Nesrodni davatelj traži se putem nekog od registara dobrovoljnih davatelja krvotvornih matičnih stanica u pojedinoj državi. U Hrvatskoj to je Registar dobrovoljnih darivatelja krvotvornih matičnih stanica (RDDKMS) Kliničkog bolničkog centra Zagreb koji trenutno broji 36,802 tipizirana nesrodnih davatelja. On je, zajedno s 73 drugih nacionalnih registara iz 52 zemlje, dio Svjetskog registra dobrovoljnih darivatelja koštane srži (engl. *Bone Marrow Donors Worldwide*, BMDW) koji sadrži podatke o 24,082,067 dobrovoljnih davatelja i krvi iz pupkovine (17).

Pretraživanje registra započinje nakon što je tipizacijom HLA bolesnika i njegove obitelji ustanovljeno da bolesnik nema genotipski ni fenotipski HLA identičnog davatelja u

obitelji. U slučaju da se potencijalni davatelj pronađe u RDDKMS-u, radi se potvrdna tipizacija potencijalnog davatelja. Zatim se dogovara tip transplantata (periferna krv ili koštana srž), datum prikupljanja transplantata te termin medicinske obrade davatelja. Nakon toga se bolesnik podliježe kemoterapiji i na kraju i samoj TKMS. Ako davatelj nije pronađen u RDDKMS-u, dalje se pretražuje BDMW (8).

Zbog velikog polimorfizma gena HLA, vjerojatnost da su dvije nesrodne osobe HLA podudarne vrlo je mala i stoga je potreban veliki broj nesrodnih dobrovoljnih davatelja, kako bi vjerojatnost pronalaženja HLA identičnog davatelja bila što veća. Vjerojatnost pronalaženja podudarnog nesrodnog davatelja najviše ovisi o alelima HLA koje ima primatelj jer povećanje broja davatelja u BMDW – u ne znači da će svaki bolesnik lako naći podudarnog davatelja. Naime, bolesnici s čestim alelima HLA imaju puno veću šansu pronaći podudarnog davatelja nego oni s rijetkim alelima HLA. Isto tako bolesnici s uobičajenim haplotipovima HLA (npr. HLA-A*01:01, -B*08:01, -C*07:01, -DRB1*03:01, -DQB1*02:01) imaju veću vjerojatnost pronalaska odgovarajućeg davatelja nego oni s neuobičajenim haplotipovima ili neuobičajenim kombinacijama HLA-B, -C (npr. HLA-B*35:01, -C*07:01) ili HLA-DRB1, -DQB1 (npr. HLA-DRB1*16:01, -DQB1*06:03). Zbog toga je važno da svaka zemlja ima svoj nacionalni registar jer svaka populacija ima i svoje specifičnosti s obzirom na učestalost pojedinih alela i haplotipova HLA.

Prednosti alogenične transplantacije su što matične stanice davatelja stvaraju vlastite imunološke stanice koje će uništiti tumorske stanice i što u transplantatu sigurno nema tumorskih stanica. Nedostatci su to što zbog genetičke neidentičnosti primatelja i davatelja može doći do HvGD, ali može se dogoditi i da davateljeve stanice ne napadnu samo tumorske već i zdrave primateljeve stanice, tzv. GvHD. Uvijek postoji i mogućnost prijenosa nekih infekcija putem transplantata koje za primatelja koji je imunosupresiran mogu biti pogubne.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Unutar skupine od 57 parova primatelj – nesrodni davatelj u programu TKMS odrediti broj nepodudarnosti na lokusima HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1.
2. Odrediti učestalosti alela HLA-DPB1 u skupini bolesnika i njihovih nesrodnih davatelja u programu nesrodne TKMS.
3. Usporediti učestalosti alela HLA-DPB1 između bolesnika i kontrolne skupine.
4. Odrediti nepodudarnosti na lokusu HLA-DPB1 između primatelja i njihovih nesrodnih davatelja.
5. Ispitati povezanost nepodudarnosti na lokusu HLA-DPB1 s ishodom TKMS.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno na uzorku od 57 parova bolesnika i njihovih nesrodnih davatelja. Bolesnici su iz različitih regija Republike Hrvatske i svi su međusobno nesrodni te liječeni TKMS u Zavodu za hematologiju Klinike za internu medicinu KBC-a Zagreb. Njihovi davatelji su nesrodni, dobrovoljni davatelji iz hrvatskog Registra ili iz BMDW-a. Svim ispitanicima su prethodno određeni aleli HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1 i to iz dva različita uzorka krvi. Iz drugog uzorka su određivani aleli HLA-DPB1. Osnovne osobine bolesnika i njihovih nesrodnih davatelja prikazane su u tablici 1.

Tablica 1. Osnovne osobine bolesnika i njihovih nesrodnih davatelja

SPOL	**n (%)**
Svi ispitanici (N=109)	
M	65 (59%)
Ž	45 (41%)
Bolesnici (N=57)	
M	32 (56%)
Ž	25 (44%)
DIJAGNOZA BOLESNIKA (N=57)	**n (%)**
AML	22 (39%)
ALL	9 (16%)
MDS	6 (11%)
HL	4 (7%)
NHL	4 (7%)
MM	3 (5%)
CML	2 (3%)
ostalo	7 (12%)

DOB	medijan (raspon)
Bolesnici (N=44)	34,05 (2-60)
Davatelji (N=51)	34,31 (20-58)
ODNOS BOLESNIK/DAVATELJ PREMA SPOLU (N=53)	**n (%)**
M/M	22 (41%)
Ž/Ž	11 (21%)
Ž/M	9 (17%)
M/Ž	11 (21%)
PORIJEKLO DAVATELJA (N=57)	**n (%)**
Hrvatska	10 (17%)
svijet	47 (83%)

Legenda: AML-akutna mijeloična leukemija; ALL-akutna limfoblastična leukemija; MDS-mijelodisplastični sindrom; HL-Hodgkinov limfom; NHL-ne-Hodgkinov limfom; MM-multipli mijelom; CML-kronična mijeloična leukemija

3.1.2. Kontrola

Kontrolnu skupinu činilo je 214 zdravih, nesrodnih osoba iz različitih regija Republike Hrvatske. Njima su u sklopu prethodnog istraživanja određeni aleli lokusa HLA-DPB1.

3.2. METODE

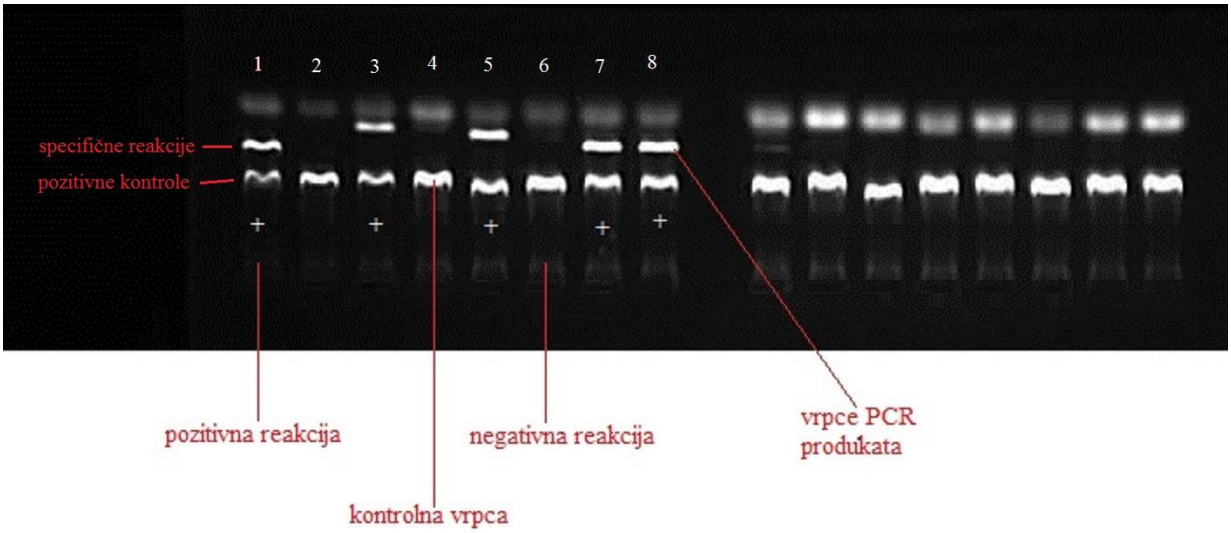
3.2.1. Izolacija DNA

Izolacija DNA provedena je iz 200 µl uzorka pune krvi pomoću komercijalnog seta za izolaciju DNA (NucleoSpin® Blood, Macherey-Nagel, Düren, Njemačka) prema uputama proizvođača. Izolacija se temelji na reverzibilnom vezanju DNA na silikatnu membranu te njenom eluacijom nakon višestrukog ispiranja membrane puferima. Postupkom se iz 200 µl pune krvi dobije 100 µl DNA koncentracije 20 – 30 ng/µl.

3.2.2. Određivanje gena HLA-DPB1 metodom PCR-SSP

Za određivanje alela gena HLA-DPB1 niskom rezolucijom (na dvije znamenke) korištena je metoda PCR-SSP (engl. *Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific*

Primers). Metoda se temelji na vezanju specifičnih početnica za određenu sekvencu DNA, tj. umnažanju određene sekvence – alela HLA-DPB1. Reakcijska smjesa za PCR sadrži set specifičnih početnica za određeni alel, kontrolne početnice, reakcijski pufer, uzorak DNA i Taq polimerazu. Nakon umnažanja PCR produkti se provjeravaju elektroforezom na agaroznom gelu. Gel se fotografira (slika 8) i analizom pojedine reakcije svaka se prema veličini specifičnih PCR produkata označava kao pozitivna (vidljivi su PCR produkt i pozitivna kontrola) ili negativna (vidljiva samo pozitivna kontrola). Prema specifičnosti pozitivnih reakcija određuju su aleli HLA-DPB1 ispitanika.



Slika 8. Fotografija agaroznog gela s PCR produktima

Legenda: Na pozicijama 1, 3, 5, 7 i 8 su umnoženi specifični PCR produkti, dok su na preostalim pozicijama umnoženi samo kontrolni produkti

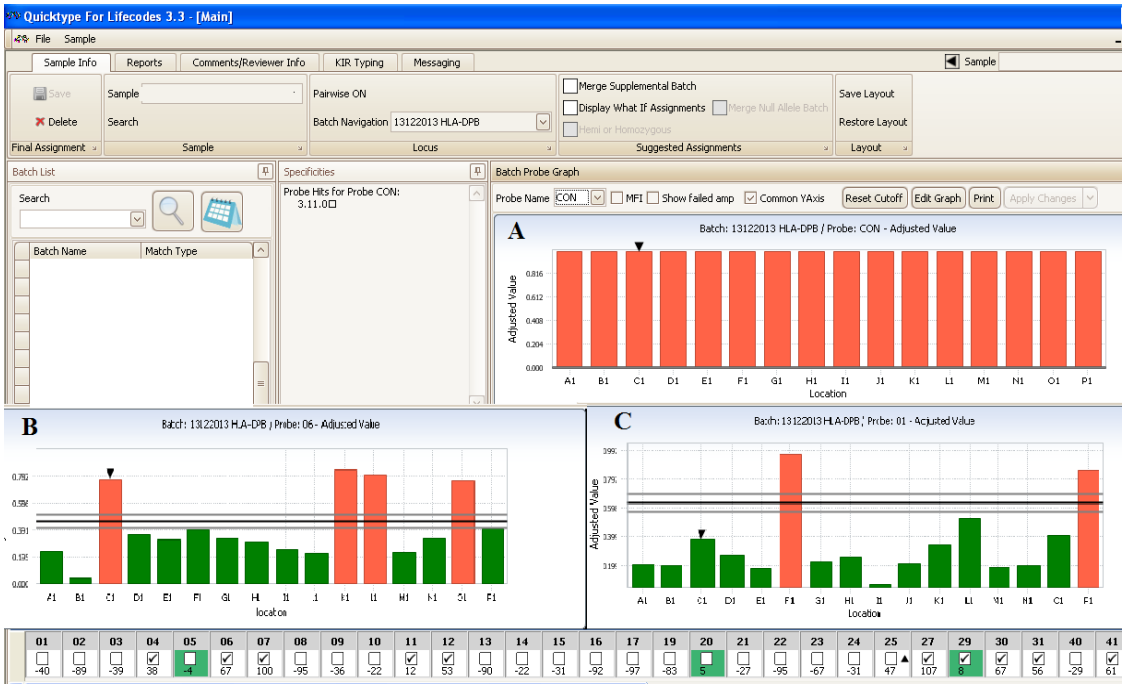
3.2.3. Određivanje gena HLA-DPB1 metodom PCR-SSO

Aleli gena HLA-DPB1 visokom rezolucijom (na četiri znamenke) određeni su pomoću metode PCR-SSO (engl. *Sequence Specific Oligonucleotides*) i Luminex aparata (The Luminex® 200™ System). Metoda se temelji na hibridizaciji umnoženih produkata na specifične oligonukleotidne probe koje su vezane na površini mikrosfera.

Hibridizaciji prethodi umnažanje gena HLA-DPB1 korištenjem seta početnica specifičnih za taj gen. Tijekom hibridizacije umnoženi produkti gena označeni biotinom inkubiraju se s mikrosferama koje na površini imaju vezane SSO probe za određene alele DPB1. Odmah po završetku hibridizacije reakcijskoj smjesi dodaje se fluorescentna boja SA-

PE (engl. *streptavidin-phycoerythrin*) koja se veže za biotinom označeni dio DNA koji je nakon hibridizacije specifično vezan s probama na određenim mikrosferama.

Očitavanje se dalje obavlja pomoću Luminex aparata koji detektiranjem fluorescencije očitava koju su se probe vezale na naš DNA uzorak. Analiza rezultata hibridizacije i samo određivanje alela HLA-DPB1 provodi se analitičkim programom Quicktype For Lifecodes (slika 9). Izračunavanjem vrijednosti očitane fluorescencije za svaku mikrosferu, prisutnost gena očitava se kao pozitivna mikrosfera, odnosno negativna mikrosfera ako alel nije prisutan.



Slika 9. Analiza rezultata u programu Quicktype For Lifecodes. Proba CON (A) je kontrolna proba i mora biti pozitivna za svih 16 uzoraka. Na uzorku C1 mikrosfera 06 je pozitivna (B), a mikrosfera 01 je negativna (C).

3.2.4. Statistička obrada

Raspodjela alela HLA-DPB1 procijenjena je izravnim brojenjem. Aleli ispitanika homozigotnih za taj alel brojeni su dva puta. Za usporedbu raspodjele alela HLA-DPB1 između bolesnika i kontrolne skupine korišten je χ^2 test. Procjena preživljavanja bolesnika nakon transplantacije provedena je uporabom Kaplan-Meierove analize. Razina statističke značajnosti je bila $P<0,05$.

4. REZULTATI

4.1. BROJ PODUDARNOSTI PAROVA PRIMATELJ – DAVATELJ KMS NA LOKUSIMA HLA-A, -B, -C, -DRB1 I -DQB1

Rezultati analize podudarnosti na lokusima HLA-A, -B,-C, -DRB1 i -DQB1 prikazani su u tablici 2. Utvrđeno je da je 39 bolesnika bilo podudarno sa svojim davateljima na svim lokusima (10/10), 15 ih je imalo jednu nepodudarnost (9/10), a samo troje ih je imalo dvije nepodudarnosti (8/10). U skupini bolesnika s jednom nepodudarnosti HLA, najveći broj nepodudarnosti uočen je za alele HLA-DRB1. Analiza nepodudarnosti po razredima HLA pokazala je da je u alelima HLA razreda I postojalo 10, a u alelima HLA razreda II 11 nepodudarnosti.

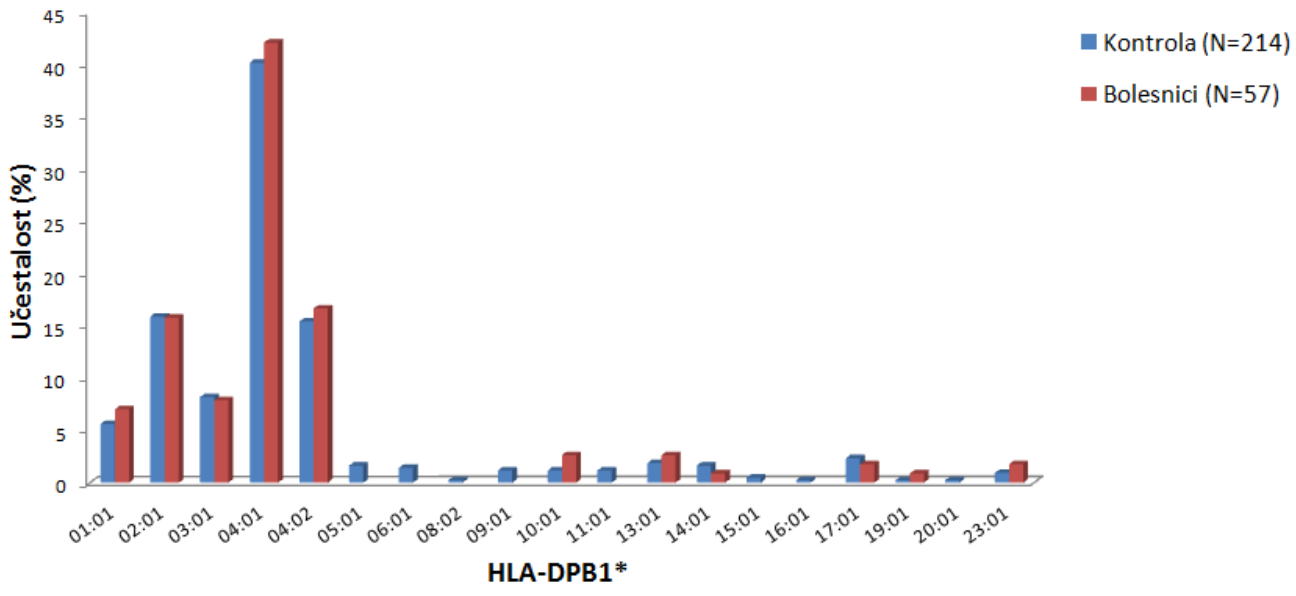
Tablica 2. Broj nepodudarnosti bolesnika (N=57) s nesrodnim davateljima na lokusima HLA-A, -B,-C, -DRB1 i -DQB1 te broj nepodudarnosti na pojedinim lokusima i po razredima HLA

Nepodudarnost HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 (N=57)	**n**
10/10	**39**
9/10	**15**
Nepodudarnost HLA-A	3
Nepodudarnost HLA-B	1
Nepodudarnost HLA-C	3
Nepodudarnost HLA-DRB1	7
Nepodudarnost HLA-DQB1	1
8/10	**3**
Nepodudarnost HLA-A + HLA-B	1
Nepodudarnost HLA-DRB1	1
Nepodudarnost HLA-B + HLA-DRB1	1
Nepodudarnosti po razredima HLA (N=57)	**n**
HLA razred I	10
HLA razred II	11

4.2. RASPODJELA ALELA HLA-DPB1 U SKUPINI BOLESNIKA I KONTROLI

Analizom raspodjele alela HLA-DPB1 u skupini bolesnika (N=57) otkriveno je ukupno 11 različitih alela HLA-DPB1. Rezultati analize prikazani su na slici 10. Najučestaliji aleli su HLA-DPB1*04:01 (42,11%) koji se pojavio 48 puta, HLA-DPB1*04:02 (16,67%) i HLA-DPB1*02:01 (15,79%). Ostali pronađeni aleli HLA-DPB1 u ovoj skupini javljali su se učestalošću manjom od 10%.

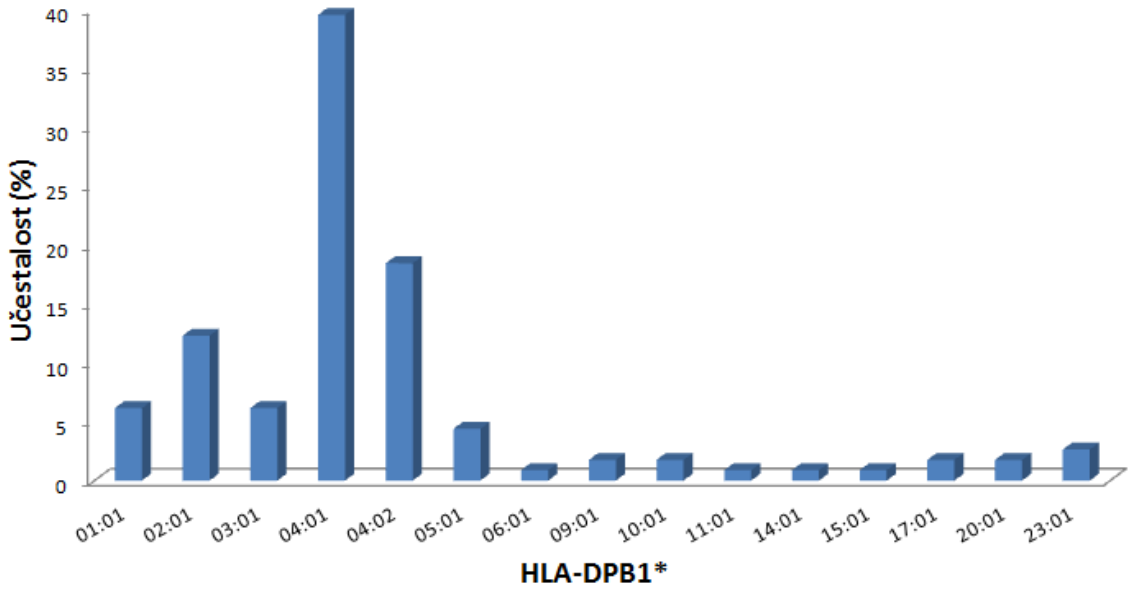
Rezultate analize raspodjele alela HLA-DPB1 usporedili smo s raspodjelom alela HLA-DPB1 u kontrolnoj skupini (N=214) koju čine zdrave osobe iz Republike Hrvatske. Rezultati pokazuju da nema značajne razlike u učestalosti najčešćih alela između skupine bolesnika i kontrolne skupine (slika 10). U kontrolnoj skupini javljaju se svi aleli koje smo pronašli i u bolesničkoj, te još neki dodatni aleli kojih nema u skupini bolesnika (HLA-DPB1*05:01, *06:01, *08:01, *09:01, *11:01, *15:01, *16:01 i *20:01) ali s vrlo malom zastupljenošću.



Slika 10. Raspodjela alela HLA-DPB1 u skupini bolesnika i kontroli

4.3. RASPODJELA ALELA HLA-DPB1 U SKUPINI NESRODNIH DAVATELJA KMS

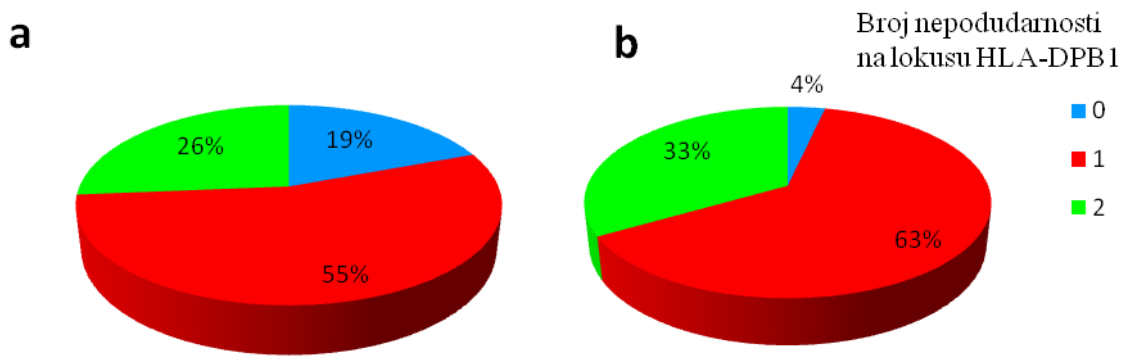
Skupinu nesrodnih davatelja (N=57) analizirali smo zasebno jer se radi o davateljima iz različitih zemalja svijeta pa nisu pogodni za usporedbu s bolesnicima i kontrolom iz Hrvatske. Njihovom tipizacijom otkriveno je ukupno 15 različitih alela HLA-DPB1 s nešto raznolikijom učestalošću nego što je bila kod bolesničke skupine (slika 11). Najčešći je opet bio alel HLA-DPB1*04:01 (39,47%), zatim HLA-DPB1*04:02 (18,42%), te alel HLA-DPB1*02:01 kojeg je imalo 12,28% davatelja. Ostali aleli u ovoj skupini uočeni su s učestalošću manjom od 10%.



Slika 11. Raspodjela alela HLA-DPB1 u skupini nesrodnih davatelja

4.4. ANALIZA NEPODUDARNOSTI NA LOKUSU HLA-DPB1 IZMEĐU BOLESNIKA I NJIHOVIH NESRODNIH DAVATELJA

Analizom nepodudarnosti na lokusu HLA-DPB1 unutar skupine bolesnika i njihovih nesrodnih davatelja (N=57) uočeno je da je najviše bolesnika nepodudarno sa svojim davateljima za jedan alel HLA-DPB1 (slika 12). Na niskoj rezoluciji nepodudarnih za jedan alel HLA-DPB1 je 31 (54,39%), a na visokoj rezoluciji 36 (63,16%). U samo 11 (19,3%) parova nije pronađena nepodudarnost za gene HLA-DPB1 na niskoj rezoluciji, dok je analiza nepodudarnosti za alele HLA-DPB1 na visokoj rezoluciji pokazala da su samo dva para (3,5%) potpuno podudarna.

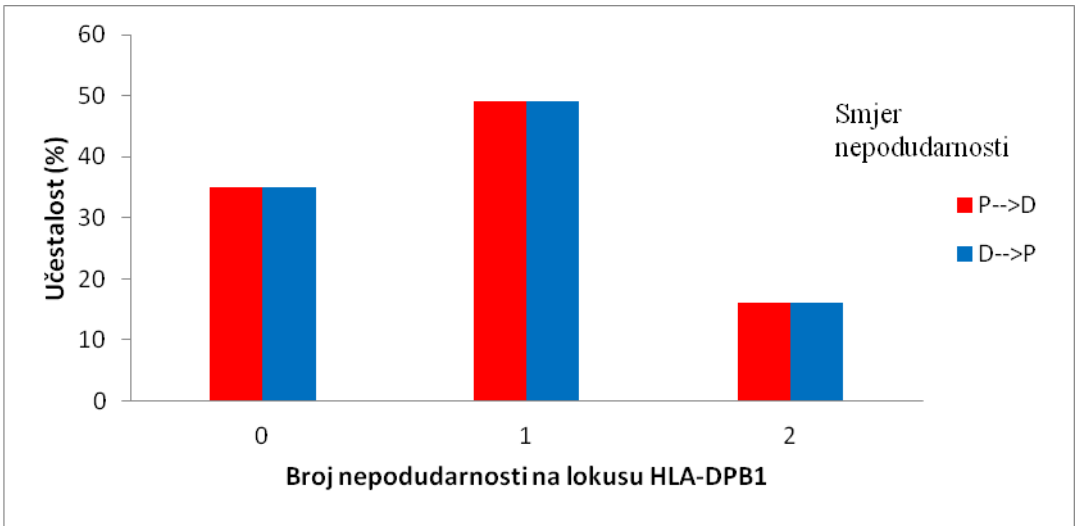


Slika 12. Učestalost nepodudarnosti na lokusu HLA-DPB1 između para primatelj-davatelj na niskoj (a) i visokoj (b) rezoluciji

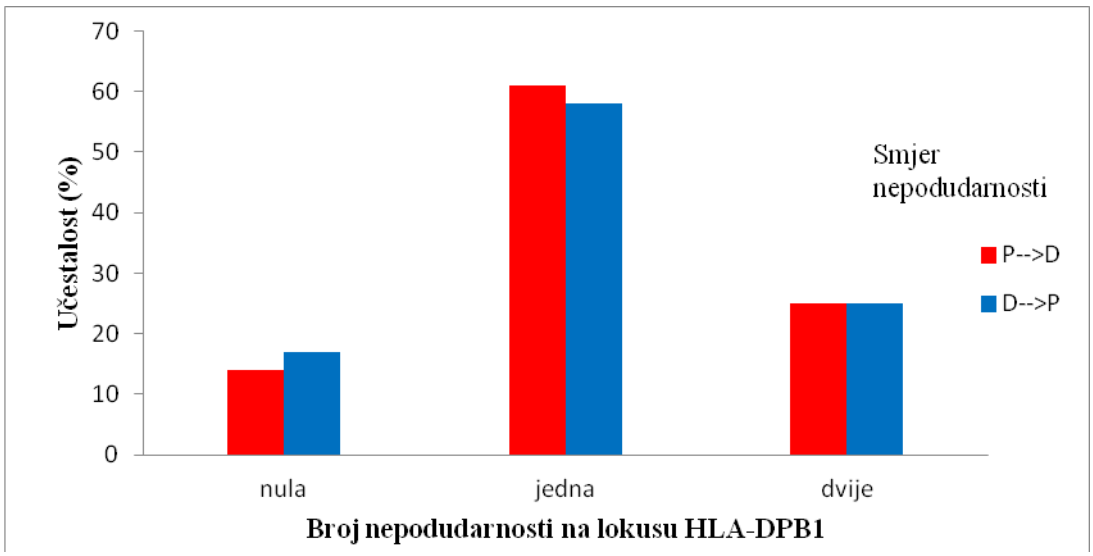
Usporedili smo i nepodudarnosti na lokusu HLA-DPB1 ovisno o smjeru nepodudarnosti koji može biti primatelj → davatelj ili davatelj → primatelj. Skupina je obuhvatila 57 parova. Analizom nepodudarnosti za alele lokusa HLA-DPB1 na niskoj rezoluciji (slika 13) uočeno je da 20 (35,09%) parova nije imalo nepodudarnost na lokusu HLA-DPB1 i u smjeru primatelj → davatelj i davatelj → primatelj. Najviše parova, njih 28 (49,12%), imalo je jednu HLA-DPB1 nepodudarnost, također u oba smjera. Devet parova (15,79%) imalo je dvije nepodudarnosti na lokusu HLA-DPB1 u oba smjera. Ukupan broj nepodudarnosti također je jednak u oba smjera i iznosi 46.

Analiza nepodudarnosti za alele lokusa HLA-DPB1 na visokoj rezoluciji (slika 14) pokazala je da osam (14,04%) parova nije imalo nepodudarnost na lokusu HLA-DPB1 u

smjeru primatelj → davatelj, a u smjeru davatelj → primatelj deset (17,54%) parova nije imalo nepodudarnost na lokusu HLA-DPB1. Broj parova s jednom nepodudarnosti na lokusu HLA-DPB1 u smjeru primatelj → davatelj je 35 (61,4%), a u smjeru davatelj → primatelj 33 (57,89%). Broj parova s dvije nepodudarnosti na lokusu HLA-DPB1 je jednak u oba smjera i iznosi 14 (24,56%). Ukupan broj nepodudarnosti na lokusu HLA-DPB1 u smjeru primatelj → davatelj je 63, a u smjeru davatelj → primatelj 61.



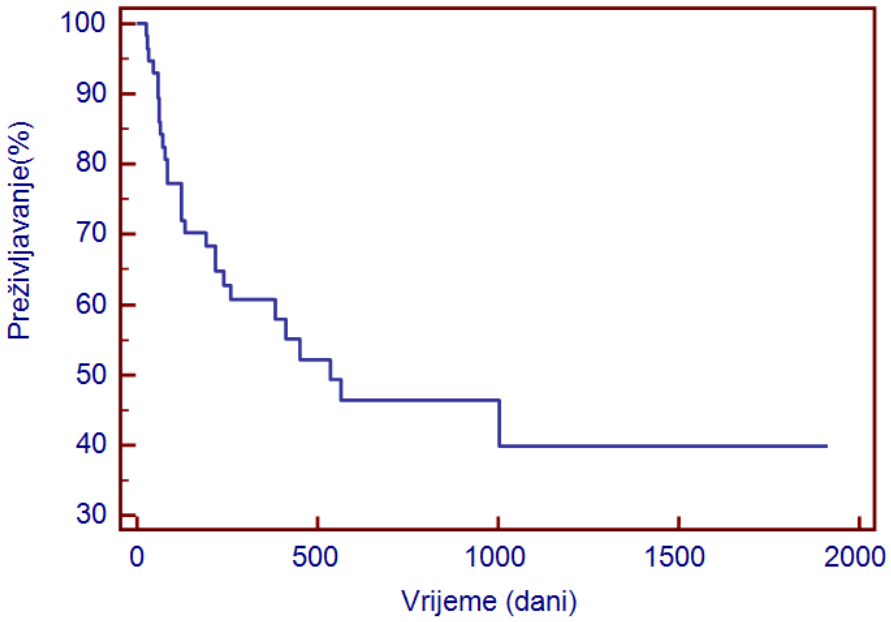
Slika 13. Učestalost nepodudarnosti na lokusu HLA-DPB1 između primatelja i davatelja ovisno o smjeru (niska rezolucija)
Legenda: P-primatelj, D-davatelj



Slika 14. Učestalost nepodudarnosti na lokusu HLA-DPB1 između primatelja i davatelja ovisno o smjeru (visoka rezolucija)
Legenda: P-primatelj, D-davatelj

4.5. PREŽIVLJAVANJE BOLESNIKA NAKON TKMS

Analizom preživljavanja svih bolesnika (N=57) nakon TKMS, bez obzira na nepodudarnosti na lokusima HLA, ustanovljeno je da je 80% njih živo 100. dan nakon transplantacije (slika 15).



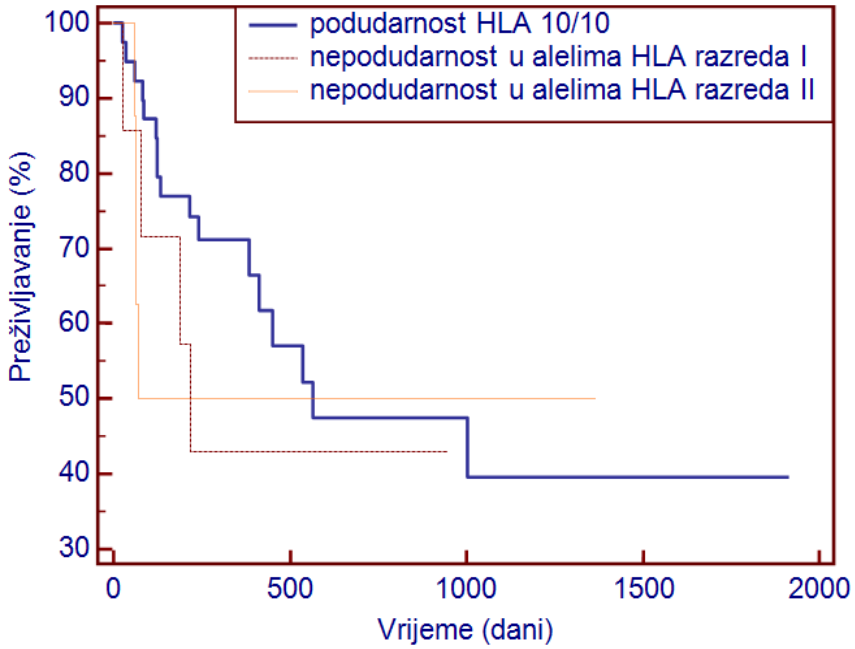
Slika 15. Preživljavanje bolesnika nakon TKMS (N=57)

4.6. PREŽIVLJAVANJE BOLESNIKA NAKON TKMS S OBZIROM NA BROJ NEPODUDARNOSTI NA LOKUSIMA HLA-A, -B, -C, -DRB1 I -DQB1

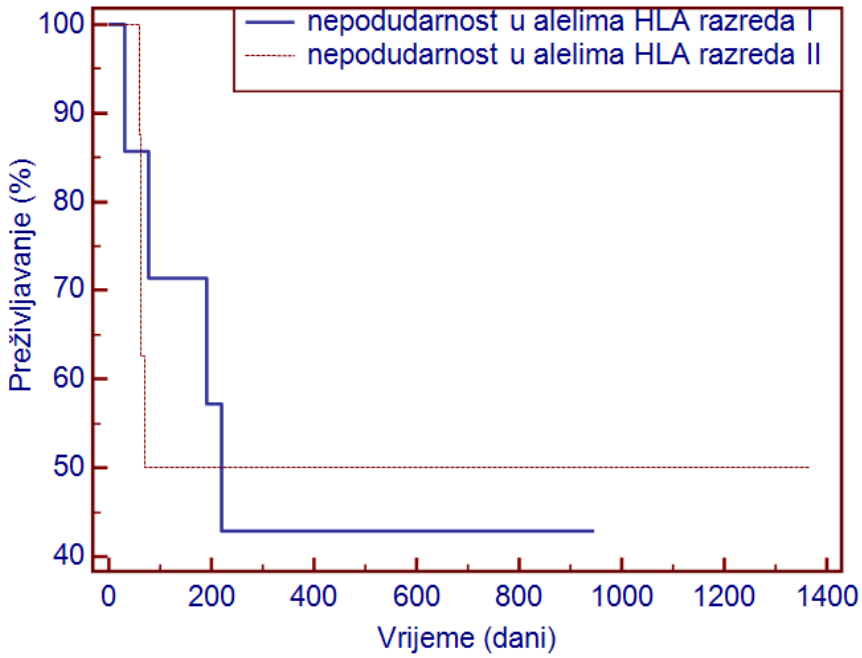
Nakon analize ukupnog preživljavanja bolesnika nakon TKMS, analizirali smo preživljavanje bolesnika s obzirom na nepodudarnosti na lokusima HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1. Statistički značajna razlika u preživljavanju između bolesnika potpuno podudarnih na tim lokusima i onih s jednom nepodudarnošću u alelima HLA razreda I ili HLA razreda II nije uočena (slika 16).

U skupini bolesnika s jednom nepodudarnošću na lokusu HLA-A, -B, -C, -DRB1 ili -DQB1 (N=15) također nije uočena statistički značajna razlika u preživljavanju između

bolesnika kod kojih je ta nepodudarnost bila u alelima HLA razreda I i onih s nepodudarnošću u alelima HLA razreda II (slika 17).



Slika 16. Preživljavanje bolesnika nakon TKMS s obzirom na broj nepodudarnosti na lokusima HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1 (N=54)

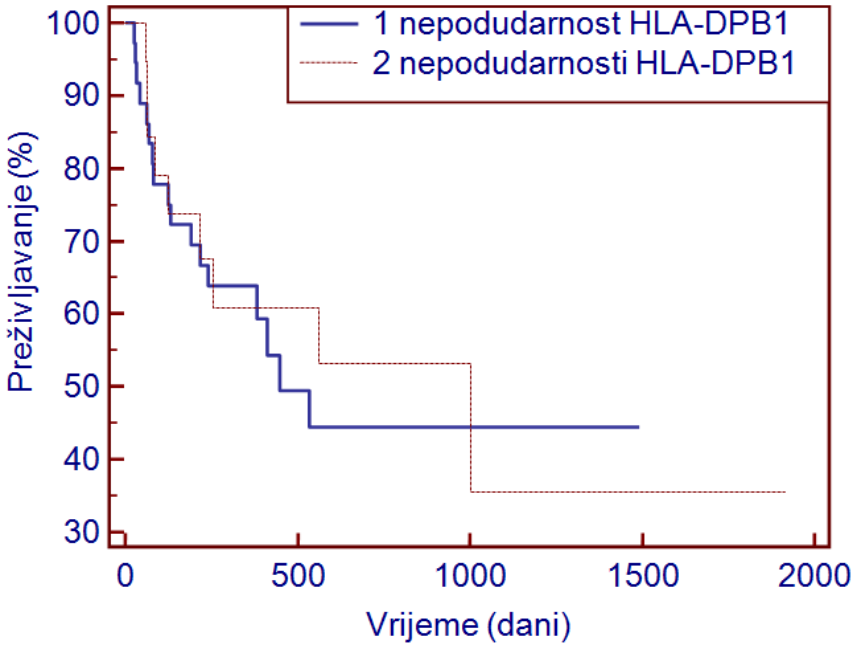


Slika 17. Usporedba preživljavanja nakon TKMS između bolesnika s nepodudarnošću za alele HLA razreda I i bolesnika s nepodudarnošću za alele HLA razreda II (N=15)

4.7. PREŽIVLJAVANJE BOLESNIKA NAKON TKMS S OBZIROM NA NEPODUDARNOSTI NA LOKUSU HLA-DPB1

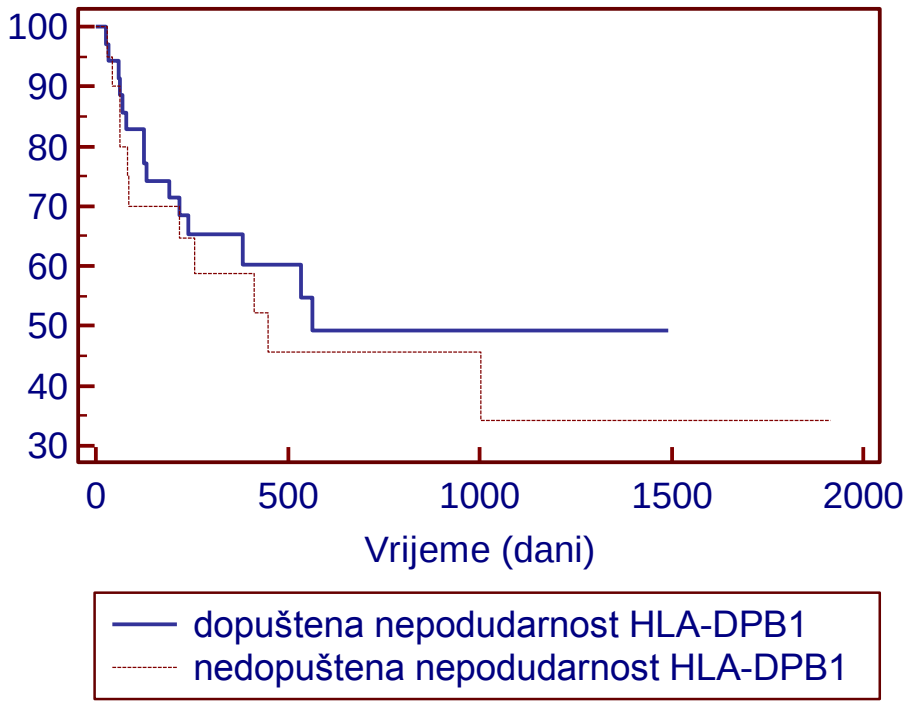
Na kraju je preostalo još analizirati preživljavanje bolesnika nakon TKMS uzevši u obzir nepodudarnosti za alele lokusa HLA-DPB1.

Između skupina bolesnika s jednom i onih s dvije nepodudarnosti HLA-DPB1 nije uočena statistički značajna razlika u preživljavanju nakon TKMS (slika 18).



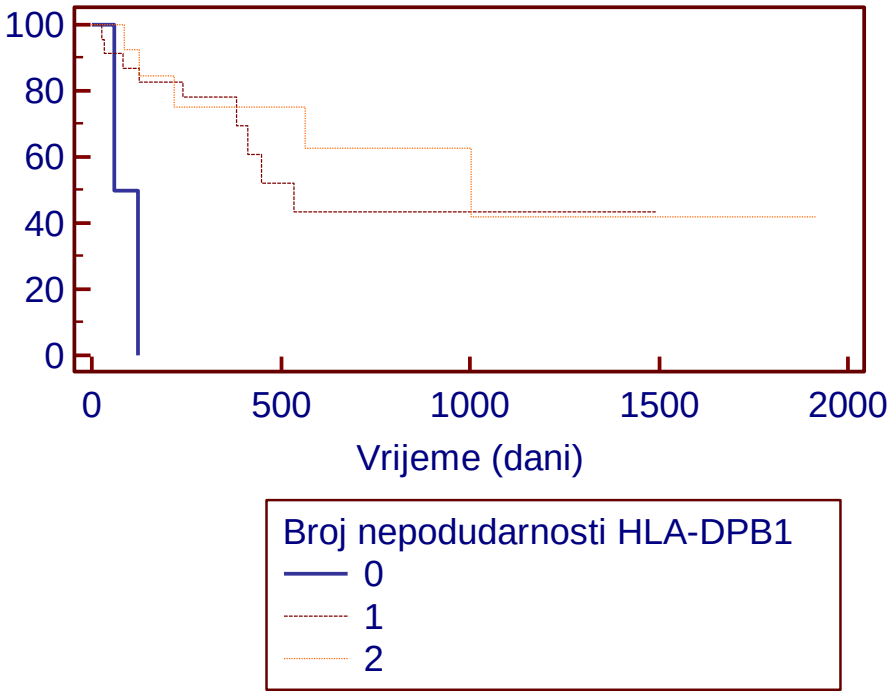
Slika 18. Preživljavanje unutar skupine bolesnika nakon TKMS obzirom na broj nepodudarnosti na lokusu HLA-DPB1 (N=55)

Analizirano je i preživljavanje bolesnika s obzirom na to je li njihova HLA-DPB1 nepodudarnost bila dopuštena ili nedopuštena (slika 19). Nedopuštene nepodudarnosti su HLA-DPB1*03:01, *09:01, *10:01, *14:01, *17:01 i *45:01, a dopuštene nepodudarnosti su HLA-DPB1*01:01, *02:01, *04:01, *04:02, *05:01, *06:01, *11:01, *13:01, *15:01, *19:01, *20:01 i *23:01. Između bolesnika s dopuštenom i nedopuštenom HLA-DPB1 nepodudarnošću nije uočena statistički značajna razlika u preživljavanju nakon TKMS.

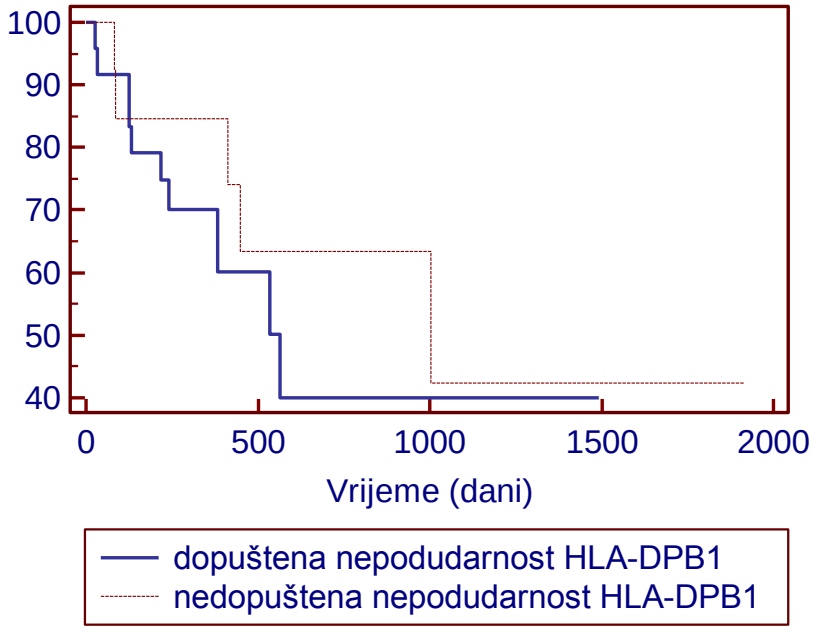


Slika 19. Preživljavanje bolesnika nakon TKMS s obzirom na dopuštenu/nedopuštenu nepodudarnosti na lokusu HLA-DPB1 (N=55)

Naredna analiza obuhvatila je samo bolesnike koji su na lokusima HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1 bili potpuno podudarni (podudarnost 10/10) sa svojim davateljima (N=38). U toj skupini bolesnika uočena je statistički značajna razlika (P=0,0016) u preživljavanju nakon TKMS između bolesnika s nula, jednom ili dvije nepodudarnosti HLA-DPB1. Bolesnici s dvije nepodudarnosti HLA-DPB1 imali su duže vrijeme preživljavanja od onih s jednom ili nula nepodudarnosti (slika 20). U istoj skupini bolesnika statistički značajna razlika u preživljavanju između onih bolesnika koji su imali dopuštenu i onih koji su imali nedopuštenu HLA-DPB1 nepodudarnost nije uočena (slika 21).

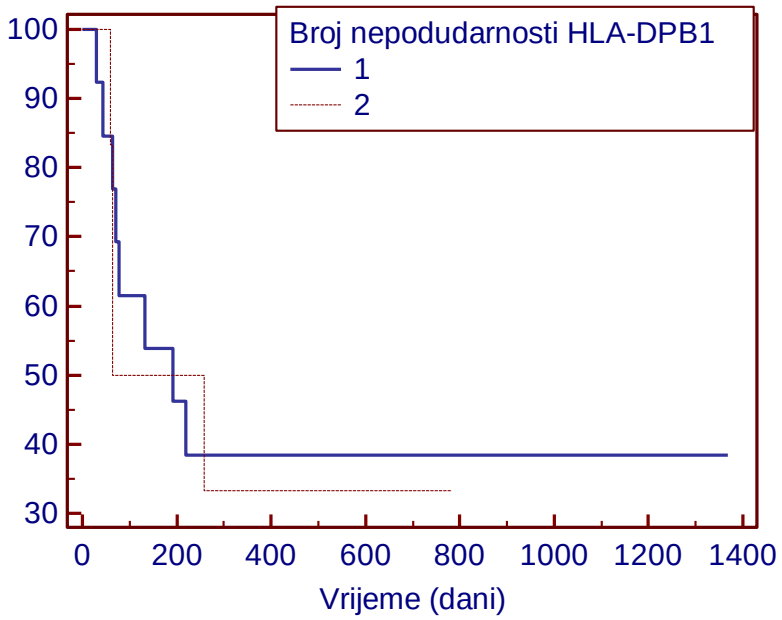


Slika 20. Preživljavanje bolesnika nakon TKMS s 10/10 podudarnog davatelja s obzirom na nepodudarnost na lokusu HLA-DPB1 (N=38)

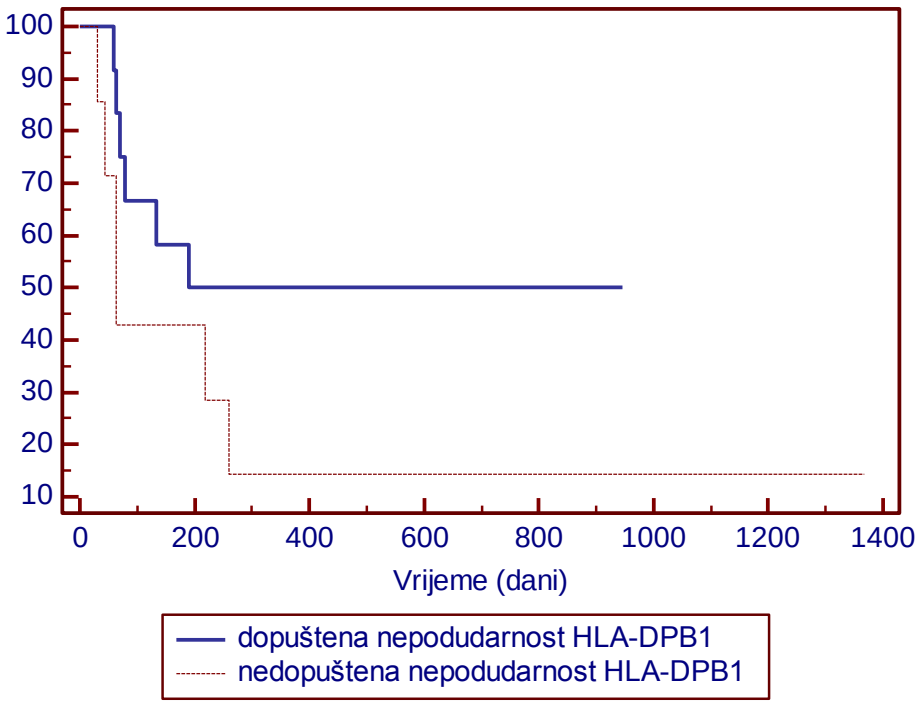


Slika 21. Preživljavanje bolesnika nakon TKMS s 10/10 podudarnog davatelja s obzirom na dopuštenu/nedopuštenu nepodudarnost na lokusu HLA-DPB1 (N=38)

Na kraju smo usporedili bolesnike koju su imali jednu ili dvije nepodudarnosti na lokusima HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1 s obzirom na broj nepodudarnosti na lokusu HLA-DPB1 (slika 22). U toj skupini bolesnika (N=19) nije uočena statistički značajna razlika u preživljavanju nakon TKMS između bolesnika s jednom i onih s dvije nepodudarnosti na lokusu HLA-DPB1. U istoj skupini bolesnika nije uočena statistički značajna razlika u preživljavanju nakon TKMS između bolesnika s dopuštenom i onih s nedopuštenom nepodudarnošću na lokusu HLA-DPB1 (slika 23).



Slika 22. Preživljavanje bolesnika nakon TKMS s 9/10 ili 8/10 podudarnog davatelja s obzirom na nepodudarnost na lokusu HLA-DPB1 (N=19)



Slika 23. Preživljavanje bolesnika nakon TKMS s 9/10 ili 8/10 podudarnog davatelja s obzirom na dopuštenu/nedopuštenu nepodudarnost na lokusu HLA-DPB1 (N=19)

5. RASPRAVA

Transplantacija KMS je metoda liječenja čitavog niza malignih i nemalignih oboljenja već više od 60 godina. Iako se u svojim početcima nije uvijek pokazala uspješnom, istraživanjem i sve većim razumijevanjem imunoloških procesa u organizmu, kao i ulogom pojedinih čimbenika, poboljšao se dobar ishod transplantacije i preživljavanje bolesnika. Jedan od glavnih čimbenika za uspjeh same TKMS je otkriće sustava HLA i njegove važnosti u izboru davatelja. Upravo je ovaj sustav jedan od najistraživanijih dijelova humanog genoma, no unatoč brojnim radovima na području TKMS i uloge gena HLA, i dalje su otvorena brojna pitanja. Jedno od najvažnijih pitanja je pronaći bolesnicima koji nemaju podudarnog davatelja unutar obitelji odgovarajućeg nesrodnog davatelja KMS. Naime, unatoč napretku molekularne biologije, imunologije i medicine, kao i usavršavanjem postupka za prihvaćanje transplantata i dalje nisu pronađeni odgovori na sve izazove koje pred znanstvenike stavlja sama TKMS. Jedan od takvih izazova je kako spriječiti pojavu brojnih komplikacija nakon TKMS, osobito GvHD, odnosno odbacivanje transplantata koje se javlja čak i ako je davatelj podudaran za alele HLA s bolesnikom 10/10 (aleli HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1). Zbog toga je velik znanstveni interes usmjeren ne samo na istraživanje uloge gena HLA na temelju kojih se traži nesrodni davatelj, već i na druge klasične gene HLA razreda I i razreda II koji mogu izazvati imunogeničnost i igraju ulogu u transplantacijskoj reakciji. Upravo jedan od takvih gena je HLA-DPB1 čija važnost u TKMS nije do kraja istražena, a time ni definirana njegova važnost u transplantaciji.

Stoga je i cilj ovog rada bio istražiti utjecaj podudarnosti, odnosno nepodudarnosti, na lokusu HLA-DPB1 između primatelja i nesrodnog davatelja na ishod TKMS i time dodati jedan komadić u slaganje slike o njegovoj važnosti u transplantaciji. Brojni autori smatraju da alel HLA-DPB1 ima ulogu u nastanku GvHD, relapsu bolesti i preživljavanju bolesnika nakon transplantacije (9,10). Unatoč većem broju istraživanja provedenih u posljednjih desetak godina diljem svijeta, jedinstvenog zaključka još uvijek nema, a rezultati pojedinih studija su suprotni (11,12).

Rezultati našeg istraživanja o broju nepodudarnosti između para primatelj-davatelj koji su transplantirani pokazali su da se najveći broj parova razlikovao za alele lokusa HLA-DRB1 što je u skladu s istraživanjima drugih autora koji su prikazali slične rezultate (13). Razlog tome vjerojatno leži u činjenici da je unutar pojedinih specifičnosti HLA-DRB1 (*04, *11,

*13) učestalost većeg broja alela podjednaka (npr. DRB1*11:01), tj nema predominantnog. Naime, to znači da ako je osoba DRB1*11 da će biti DRB1*11:01, odnosno DRB1*11:04. Nasuprot tome, kod većine najzastupljenijih gena HLA-A uvijek prevladava jedan podtip tj. alel (npr. unutar skupine od preko 200 do danas poznatih alela A*02 unutar naše populacije A*02:01 se javlja s učestalošću od 96%) (14).

Analiza raspodjele alela HLA-DPB1 među bolesnicima pokazala je da je najčešći alel DPB1*04:01 (40,1%), što je u skladu s velikim istraživanjem provedenim 2007. godine na uzorku od 5929 parova primatelj – nesrodni davatelj (9). Ovo istraživanje je potvrdilo da u našoj populaciji, kao i drugim populacijama Europe i sjeverne Amerike (populacije europskog porijekla), prevladava alel DPB1*04:01 (14). Naime, za razliku od raspodjele alela na drugim klasičnim lokusima HLA, na lokusu HLA-DPB1 je uvijek jedan alel zastupljen s učestalošću od skoro 50%.

Ovaj rad je pokazao da je samo mali broj bolesnika (4%) podudaran sa svojim nesrodnim davateljem za alele lokusa HLA-DPB1, što je u skladu s istraživanjem provedenim 2007. godine (9). Razlog tome je što je LD između alela HLA-DQB1 i -DPB1 puno manji od nego između ostalih alela HLA, što rezultira velikom nepodudarnošću za alele HLA-DPB1 između primatelja i nesrodnog davatelja KMS koji su na ostalim lokusima podudarni. Dodatno objašnjenje za izostanak podudarnosti na lokusu HLA-DPB1 između parova primatelj-davatelj leži i u činjenici da između lokusa DQB1 i DPB1 postoji tzv „vruće mjesto“ za rekombinaciju i stoga je učestalost crossingover-a na tom odsječku kromosoma 6 česta (9). Nalaz da je najviše parova s jednom nepodudarnošću za alele DPB1 je očekivan jer i drugi autori iznose slične podatke (9,11).

Preživljavanje naših bolesnika nakon TKMS nakon pet godina je u skladu s rezultatima drugih transplantacijskih centara (11). Uočen je trend boljeg preživljavanja bolesnika s nepodudarnošću s davateljem za alele HLA razreda I u odnosu na one koji su imali davatelja nepodudarnog za alele HLA razreda II. Objašnjenje za to leži ulozi koje molekule HLA razreda II imaju u organizmu. Glavni uzrok smrti bolesnika su infekcije, akutni GvHD II – IV stupnja u kombinaciji s infekcijom ili bez nje, zatajenje organa, odnosno relaps (6).

Ovo istraživanje pokazalo je trend boljeg preživljavanja onih bolesnika koji su sa svojim davateljima nepodudarni za samo jedan alel HLA-DPB1, ali bez statističke značajnosti u usporedbi sa skupinom bolesnika koji su imali dvije nepodudarnosti na lokusu HLA-DPB1. Stoga su rezultati ovog istraživanja u skladu s onim radovima koji su također pokazali da je jedna nepodudarnost bolja, nego dvije. Međutim, treba istaknuti da su rezultati istraživanja

provedenih o utjecaju nepodudarnosti HLA-DPB1 na pojavu GvHD, relaps bolesti i preživljavanje vrlo proturječni. Istraživanje iz 2006. godine utvrdilo je povezanost GvHD i nepodudarnosti na lokusu HLA-DPB1, manju pojavu relapsa bolesti i veće ukupno preživljavanje, ali samo kod bolesnika liječenih od akutne limfoblastične leukemije (12). Ovo je u u skladu s našim radom u kojem smo otkrili veće preživljavanje kod bolesnika s dvije nepodudarnosti za alele HLA-DPB1 u odnosu na jednu ili nula nepodudarnosti, a koji su bili 10/10 podudarni za ostale alele HLA. Mogući razlog za to je da je određeni stupanj genetičke različitosti između bolesnika i davatelja potreban za postizanje GvL efekta. S druge strane, Ludajic sa suradnicima je pokazala da su dvije nepodudarnosti na lokusu HLA-DPB1 povezne s većim rizikom pojavljivanja akutnog GvHD-a i negativnim učinkom na sveukupno preživljavanje bolesnika (11). Slične rezultate iznio je Shaw koji je na velikom uzorku parova (N=5929) ukazao na veći rizik za pojavu GvHD te smrtnosti kod HLA-DPB1 nepodudarnih parova, ali također i manju vjerojatnost za relaps (9).

Analiza uloge dopuštenih i nedopuštenih nepodudarnosti na lokusu HLA-DPB1 unutar naše skupine parova nije pokazala nikakve statistički značajne razlike. U našoj cjelokupnoj skupini bolesnika (bez obzira na nepodudarnosti na drugim lokusima HLA) uočili smo trend boljeg preživljavanja onih s dopuštenim nepodudarnostima, međutim to nije bio slučaj unutar skupine bolesnika koji su imali HLA potpuno podudarnog davatelja 10/10. Stoga možemo reći da su naši podaci djelomično u skladu s radom iz 2009. godine u kojem autori iznose zaključak da bolesnici s dopuštenim nepodudarnostima imaju bolje sveukupno preživljavanje za razliku od onih s nedopuštenim nepodudarnostima (5).

Iako nema sumnje da geni HLA-DP imaju ulogu u imunološkom odgovoru, odabir nesrodnog davatelja KMS ne uključuje i podudarnost za alele HLA-DPB1 u većini transplantacijskih centara. U nekim centrima se jedino u slučaju većeg broja 10/10 HLA podudarnih davatelja provodi i tipizacija za alele HLA-DPB1 s ciljem odabira onog koji je najpodudarniji (9).

Međutim, neophodno je reći da je za donošenje konačnog zaključka o ulozi gena HLA-DP, a time i nužnosti njihovog određivanju u TKMS, potreban daleko veći broj istraživanja.

6. ZAKLJUČAK

1. Analiza broja podudarnosti na lokusima HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1 pokazala je da je 39 bolesnika bilo podudarno 10/10 sa svojim nesrodnim davateljem, 15 bolesnika bilo je podudarno 9/10, a samo troje je bilo podudarno 8/10. Najveći broj nepodudarnosti uočen je za alele lokusa HLA-DRB1.
2. Najučestaliji aleli HLA-DPB1 unutar naše skupine bolesnika bili su DPB1*04:01 (42,1%), DPB1*04:02 (16,7%) i DPB1*02:01 (15,8%).
3. Nije uočena statistički značajna razlika između raspodjele alela HLA-DPB1 između bolesničke skupine i zdrave kontrole.
4. Analizom broja nepodudarnosti za alele lokusa HLA-DPB1 unutar para primatelj-davatelj uočeno je da je najveći broj parova imao jednu nepodudarnost (n=36; 63%), 19 (33%) parova je imalo dvije nepodudarnosti, dok su samo dva para (4%) bila podudarna za alele HLA-DPB1.
5. Ispitivanje povezanosti broja nepodudarnosti HLA-DPB1 i ukupnog preživljenja bolesnika nakon TKMS u skupini bolesnika koji su imali davatelja 10/10 uočeno je statistički značajno bolje preživljavanje bolesnika s dvije nepodudarnosti za alele HLA-DPB1.
6. Unutar cjelokupne skupine bolesnika nije otkrivena statistički značajna razlika u preživljavanju između bolesnika s nula, jednom ili dvije nepodudarnosti na lokusu HLA-DPB1.
7. Nije uočena statistički značajna razlika u preživljavanju između bolesnika s dopuštenim i onih s nedopuštenim nepodudarnostima za alele HLA-DPB1, bez obzira na broj podudarnost na drugim lokusima HLA.

7. LITERATURA

1. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, Marušić M, Taradi M, Višnjić D. Imunologija. Medicinska naklada 2009.
2. Grubić Z. Tipizacija HLA u procjeni kompatibilnog darivatelja. Bilten KROHEMA 2012; 4(2): 42-5.
3. Shiina T, Hosomichi K, Inoko H, Kulski J. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. Journal of Human Genetics 2009; 54: 15-39.
4. Browning M, McMichael A. HLA and MHC: genes, molecules and function. Academic press 1999.
5. Crocchiolo R, Zino E, Vago L i sur. Nonpermissive HLA-DPB1 disparity is a significant independent risk factor for mortality after unrelated hematopoietic stem cell transplantation. Blood 2009; 114(7): 1437-44.
6. Serventi-Seiwerth R, Mikulić M, Mrsić M, Grubić Z, Bojanić I, Štingl K, Labar B. Transplantacija alogenih krvotvornih matičnih stanica od HLA podudarnog nesrodnog darivatelja. Medicina Fluminensis 2011; 47(4): 381-8.
7. Copelan E. Hematopoietic Stem Cell Transplantation. The New England Journal of Medicine 2006; 354: 1813-26
8. Mikulić M, Grubić Z. Postupak pronalaženja nesrodnog darivatelja Krvotvornih matičnih stanica. Bilten KROHEMA 2012; 4(2): 39-41
9. Shaw B, Gooley T, Malkki M, Madrigal A, Begovich A, Horowitz M, Gratwohl A. The importance of HLA-DPB1 in unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. Blood 2007; 110: 4560-6.
10. Fernandez-Vina M, Klein J, Haagenson M, Spellman S i sur. Multiple mismatches at the low expression HLA loci DP, DQ and DRB3/4/5 associate with adverse outcomes in hematopoietic stem cell transplantation. Blood 2013; 121(22): 4603-10.

11. Ludajic K, Balavarca Y, Bickeboller H, Pohlreich D i sur. Impact of HLA-DPB1 allelic and single amino acid mismatches on HSCT. British Journal of Haematology 2008; 142: 436-43.

12. Shaw B, Marsh S, Mayor N, Russell N, Madrigal A. HLA-DPB1 matching status has significant implications for recipients of unrelated donor stem cell transplants. Blood 2006; 107(3): 1220-6.

13. Grubic Z, Burek Kamenaric M, Mikulic M, Stingl Jankovic K, Maskalan M, Zunec R. HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 allele and haplotype diversity among volunteer bone marrow donors from Croatia. Int J Immunogenet. 2014; 41(3): 211-21.

14. Lancaster K, Single RM, Solberg OD, Nelson MP, Thomson G. "PyPop update - a software pipeline for large-scale multilocus population genomics" Tissue Antigens 2007; 69 (s1): 192-197.

15. www.ebi.ac.uk

16. http://en.wikipedia.org/wiki/HLA-DP

17. https://www.bmdw.org/