

Povezanost povrata bolesti i gubitka nepodudarnog haplotipa HLA kod haploidentične transplantacije krvotvornih matičnih stanica

Bralić, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:217:966370>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Sara Bralić

POVEZANOST POVRATA BOLESTI I GUBITKA NEPODUDARNOG HAPLOTIPA
HLA KOD HAPLOIDENTIČNE TRANSPLANTACIJE KRVOTVORNIH MATIČNIH
STANICA

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

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

ZAHVALE

Prije svega zahvaljujem se svojoj dragoj mentorici, prof. dr. sc. Zorani Grubić, na ukazanom povjerenju, velikom strpljenju te brojnim stručnim i znanstvenim savjetima kojima me vodila kroz izradu ovog diplomskog rada. Hvala Vam na pruženoj prilici, uloženom trudu i vremenu te prenesenom znanju koje ću ponijeti dalje u život.

Također se zahvaljujem svim djelatnicima Odjela za tipizaciju tkiva KBC-a Zagreb na ugodnoj radnoj atmosferi i susretljivosti, a posebno mag. biol. mol. Mariji Maskalan i dr. sc. Katarini Štingl Janković na nesebičnoj pomoći i korisnim savjetima.

Posebno želim zahvaliti svojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci tijekom cijelog mog obrazovanja. Hvala vam na strpljenju, pomoći, razumijevanju i ljubavi.

Najiskrenije hvala mom dragom dečku Filipu koji je uvijek bio tu za mene i velika potpora i motivacija tijekom cijelog studiranja.

Hvala i svim mojim kolegama i prijateljima na stvaranju uspomena koje će me zauvijek sjećati na najljepše doba naših života.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

POVEZANOST POVRATA BOLESTI I GUBITKA NEPODUDARNOG HAPLOTIPA HLA KOD HAPLOIDENTIČNE TRANSPLANTACIJE KRVOTVORNIH MATIČNIH STANICA

Sara Bralić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Haploidentična transplantacija krvotvornih matičnih stanica (TKMS) je metoda liječenja za bolesnike koji nemaju genotipski HLA identičnog davatelja u obitelji ili fenotipski HLA podudarnog nesrodnog davatelja. Cilj rada bio je istražiti učestalost gubitka primateljevog nepodudarnog haplotipa HLA među bolesnicima s povratom bolesti nakon haploidentične TKMS primjenom metode lančane reakcije polimerazom i početnicama specifičnih sekvenci (PCR-SSP). Bolesnicima s relapsom bolesti važno je utvrditi radi li se o klasičnom povratu bolesti ili relapsu s gubitkom nepodudarnog haplotipa HLA zbog nastavka liječenja drugom transplantacijom. Istraživanje je obuhvatilo skupinu nesrodnih bolesnika (N=28) i njihovih HLA haploidentičnih srodnih davatelja. Svim bolesnicima praćen je status kimerizma, odnosno postotak primateljevih i davateljevih stanica nakon TKMS metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR). Bolesnicima s povratom bolesti, kao i njihovim davateljima, određeni su geni lokusa HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1 metodom PCR-SSP, te su im određeni informativni lokusi koji su dalje korišteni u praćenju gubitka nepodudarnog haplotipa HLA. Povrat bolesti utvrđen je kod devet (32,1%) bolesnika, od kojih je kod dva (22,2%) bolesnika utvrđen gubitak nepodudarnog haplotipa HLA. Određivanje gena HLA metodom PCR-SSP pokazalo se primjenjivim i u slučajevima malog udjela primateljevih stanica (2%) što govori u prilog osjetljivosti ove metode u analizama gubitka nepodudarnog haplotipa HLA.

(58 stranica, 26 slika, 6 tablica, 30 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: haploidentična transplantacija, nepodudarni haplotip HLA, geni HLA

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

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

Dr. sc. Ana Galov, izv. prof., PMF Zagreb

Dr. sc. Jasna Lajtner, izv. prof., PMF Zagreb

Rad prihvaćen: 28.11.2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

DISEASE RELAPSE AND LOSS OF MISMATCHED HLA HAPLOTYPE IN HAPLOIDENTICAL STEM CELL TRANSPLANTATION

Sara Bralić

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) from a haploidentical donor is a curative option for patients who lack an HLA genotypically identical donor or HLA matched unrelated donor. The aim of this study was to analyze the frequency of the genomic loss of the recipient's mismatched HLA haplotype (HLA loss) among patients who relapsed after haploidentical HSCT using the polymerase chain reaction and sequence specific primers (PCR-SSP) method. In the group of patients who relapsed it is important to determine whether it was a normal disease relapse or HLA loss relapse. Unrelated patients (N=28) and their HLA haploidentical related donors were included in this study. In all patients the percentage of recipient and donor cells after HSCT was determined using the Real-Time PCR (qPCR) method. HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 genes were typed in the group of patients who relapsed and their donors using the PCR-SSP method. Informative loci were defined and were used for HLA loss analysis. Disease relapse was detected in nine (32,1%) patients, and two (22,2%) of them had HLA loss. The results of this analysis demonstrated that PCR-SSP method is very sensitive in HLA loss analysis because it is possible to detect HLA genes even in cases of the small percentage of recipient cells (2%).

(58 pages, 26 figures, 6 tables, 30 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: haploidentical transplantation, mismatched HLA haplotype, HLA genes

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

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

Dr. Ana Galov, Assoc. Prof., Faculty of Science, University of Zagreb

Dr. Jasna Lajtner, Assoc. Prof., Faculty of Science, University of Zagreb

Thesis accepted: 28.11.2019.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. GLAVNI SUSTAV TKIVNE PODUDARNOSTI	1
1.1.1. OSOBINE SUSTAVA HLA.....	1
1.1.2. SMJEŠTAJ I GRAĐA SUSTAVA HLA	3
1.1.3. GRAĐA I ULOGA MOLEKULA HLA	4
1.1.4. PRIMJENA ODREĐIVANJA GENA HLA.....	5
1.2. TRANSPLANTACIJA KRVOTVORNIH MATIČNIH STANICA	6
1.2.1. SRODNA TKMS	9
1.2.2. NESRODNA TKMS.....	11
1.2.3. HAPLOIDENTIČNA TKMS	13
1.2.3.1. GUBITAK NEPODUDARNOG HAPLOTIPA HLA	15
1.2.3.2. POVEZANOST POVRATA BOLESTI I HLA-LOSS-A	16
1.3. PRAĆENJE PRIHVAĆANJA TRANSPLANTATA NAKON TKMS	16
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	20
3. MATERIJALI I METODE	21
3.1. ISPITANICI.....	21
3.2. METODE.....	23
3.2.1. IZOLACIJA DNA	23
3.2.2. ODREĐIVANJE GENA HLA METODOM PCR-SSP	24
3.2.3. ODREĐIVANJE STATUSA KIMERIZMA METODOM qPCR	26
4. REZULTATI.....	28
4.1. PRIKAZ REZULTATA ZA BOLESNIKA BROJ 1	32
4.2. PRIKAZ REZULTATA ZA BOLESNIKA BROJ 2	35
4.3. PRIKAZ REZULTATA ZA BOLESNIKA BROJ 3	37
4.4. PRIKAZ REZULTATA ZA BOLESNIKA BROJ 4	39
4.5. PRIKAZ REZULTATA ZA BOLESNIKA BROJ 5	41
4.6. PRIKAZ REZULTATA ZA BOLESNIKA BROJ 6	43
4.7. PRIKAZ REZULTATA ZA BOLESNIKA BROJ 7	45
4.8. PRIKAZ REZULTATA ZA BOLESNIKA BROJ 8	47
4.9. PRIKAZ REZULTATA ZA BOLESNIKA BROJ 9	49
5. RASPRAVA.....	51

6. ZAKLJUČAK	54
7. LITERATURA.....	55
8. ŽIVOTOPIS	58

1. UVOD

1.1. GLAVNI SUSTAV TKIVNE PODUDARNOSTI

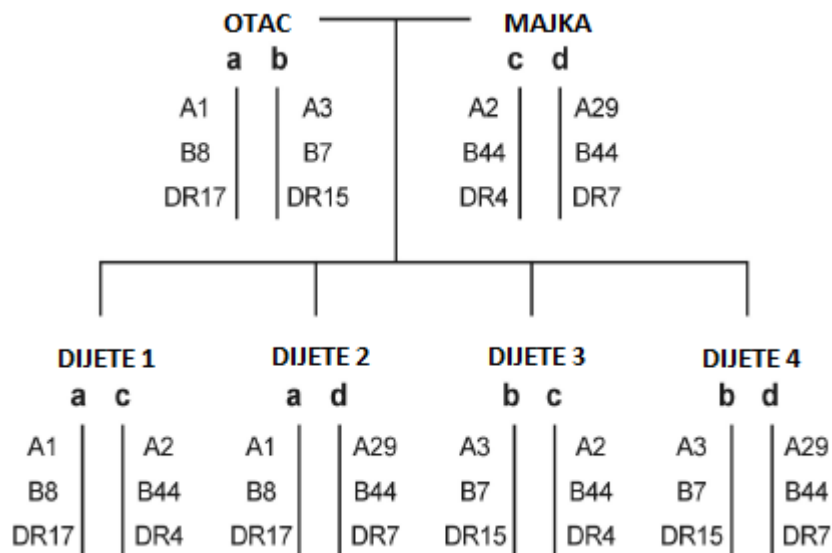
Imunološki sustav je složen biološki sustav čija je osnovna funkcija obrana organizma od infekcija i tumorskih stanica, održavanje antigenske i genske homeostaze te razlikovanje vlastitog od stranog. Razvijao se milijunima godina kao odgovor na suživot s mikroorganizmima. Na svakoj stanici u tijelu nalaze se mnogi proteini koji u tuđem organizmu mogu izazvati imunološku reakciju, dakle djeluju kao tkivni antigeni te mogu biti jaki i slabi. Jaki antigeni imaju važnu imunoregulacijsku funkciju, a njih kodira glavni sustav gena tkivne podudarnosti koji se nazivaju MHC (engl. *Major Histocompatibility Complex*). Produkti gena MHC su polimorfne molekule MHC koje se nalaze na površini različitih stanica u organizmu. U čovjeka je taj sustav prvo otkriven na leukocitima pa se zbog toga naziva sustav HLA (engl. *Human Leukocyte Antigen*). Sustav HLA je važan u transplantaciji i odbacivanju organa, ali primarna biološka uloga molekula HLA je regulacija imunološkog odgovora (Andreis i sur. 2010).

1.1.1. OSOBINE SUSTAVA HLA

Geni HLA usko su povezani i nasljeđuju se po Mendelovim zakonima, po jedan haplotip HLA od svakog roditelja (Slika 1). Haplotip je kombinacija alelnih oblika gena HLA na jednom kromosomu. Djeca imaju 25% šanse da su genotipski HLA identični (imaju isti haplotip HLA naslijeđen i od oca i od majke), 50% šanse haploidentični (imaju jedan zajednički haplotip HLA) i 25% šanse da nemaju nijedan zajednički haplotip HLA (naslijedili su različite haplotipove HLA od svojih roditelja). Oba haplotipa HLA izražavaju se kodominantno na staničnoj membrani. Određeni aleli i haplotipovi HLA pojavljuju se češće u nekim populacijama dok ih u drugim populacijama uopće nema (npr. alel HLA-B*27:30 koji je do sada otkriven u populacijama Bliskog Istoka od kuda se proširio u Europu, dok njegova prisutnost u Južnoj Americi ili Aziji nije poznata) (Reveille 2019). Postoji teoretska mogućnost velikog broja različitih kombinacija gena HLA u jednom haplotipu HLA, ali je zbog jednog obilježja sustava HLA taj broj znatno, znatno manji. Naime, za sustav HLA je karakteristična pojava genske neravnoteže udruživanja (engl. *Linkage Disequilibrium*, LD)

gdje se dva ili više različitih alela usko vezanih lokusa HLA pojavljuju češće u zajedničkom haplotipu HLA nego što bi to bilo za očekivati na temelju njihove pojedinačne učestalosti (npr. haplotip HLA-A*01~B*08~C*07~DRB1*03~DQB1*02 jedan je od najčešćih haplotipova HLA u populacijama europskog porijekla s jednim od najjačih vrijednosti LD-a) (<http://www.allelefrequencies.net/default.asp>).

Sustav HLA najpolimorfniji je genski sustav u čovjeka do danas poznat s preko 25 756 različitih alela (<http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>). Treba istaknuti da se neprekidno otkrivaju novi aleli, tako da navedena brojka sigurno nije definitivna. Najveći polimorfizam izražen je u pukotini molekula HLA u kojoj se vežu strani ili vlastiti antigeni. U njoj postoje različite aminokiseline koje mijenjaju oblik pukotine što utječe na specifičnost molekula HLA prema peptidima koji se vežu (Choo 2007). Polimorfizam HLA (raznolikost alelnih oblika) i poligenija (veći broj gena HLA u haplotipu) razvili su se radi veće mogućnosti vezanja različitih antigena na molekule HLA i lakšeg pokretanja imunološke reakcije. Polimorfizam se ostvaruje raznim genskim mehanizmima poput genske konverzije (zamjenom dijelova gena ulomcima drugog gena), točkastim mutacijama i rekombinacijom (Andreis i sur. 2010).



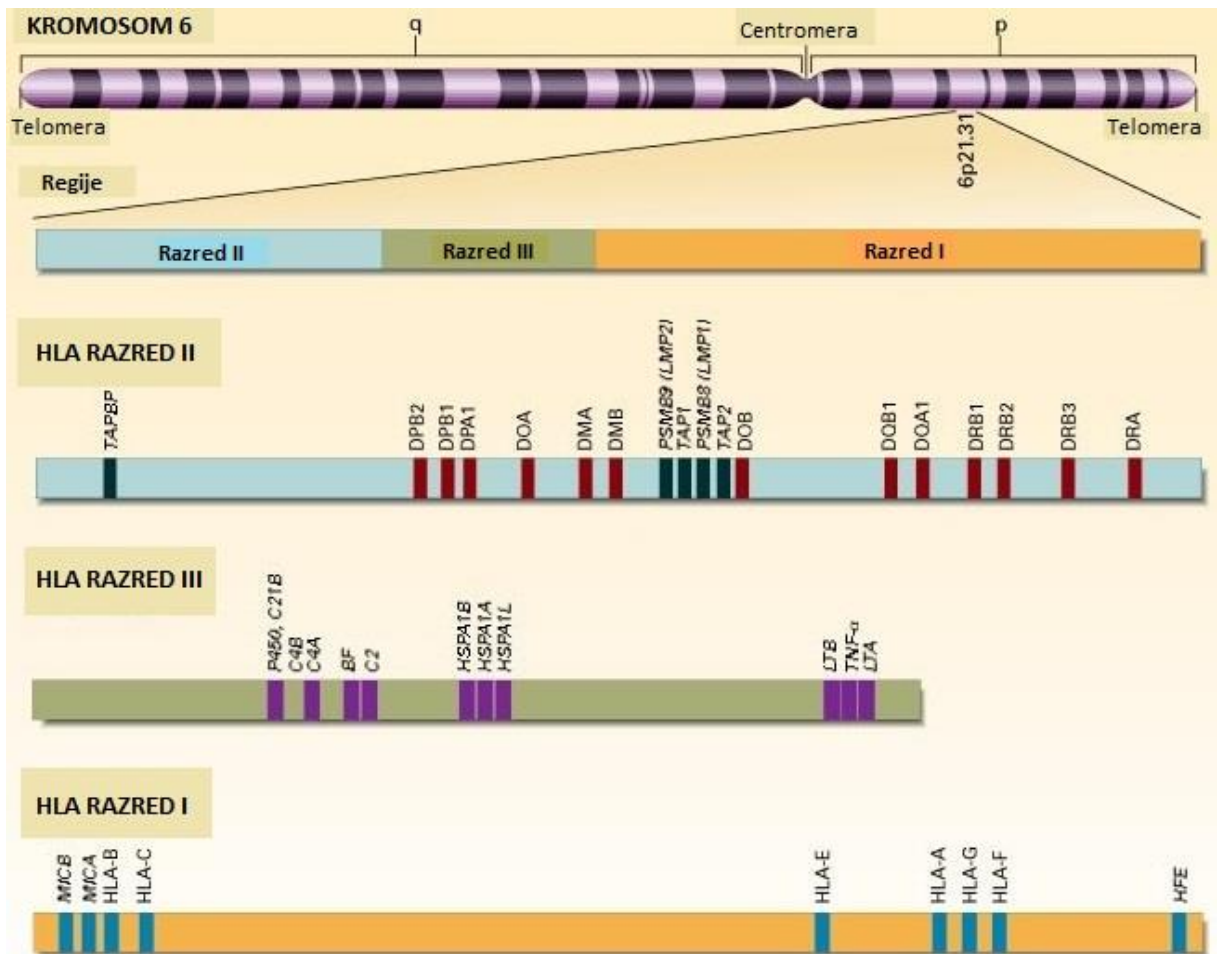
Slika 1. Prikaz Mendelovog nasljeđivanja haplotipova HLA u obitelji (Choo 2007)

1.1.2. SMJEŠTAJ I GRAĐA SUSTAVA HLA

Sustav HLA smješten je na kraćem kraku kromosoma 6 (odsječak 6p21), sadrži otprilike 3600 kB molekule DNA i podijeljen je u tri regije (Slika 2). Regija razreda I sastoji se od klasičnih gena HLA-A, -B i -C, neklasičnih gena HLA-E, -F i -G i pseudogena. Geni HLA razreda I kodiraju teške lance molekula HLA razreda I.

Regija HLA razreda II sastoji se od subregija HLA-DM, -DO, -DN, -DP, -DQ i -DR. Subregije HLA-DP, -DQ i -DR sadrže gene A i B koji kodiraju lance α i β molekula HLA. Obitelj gena HLA-DR sastoji se od jednog gena HLA-DRA (HLA-DRA1) i devet gena HLA-DRB (od HLA-DRB1 do HLA-DRB9), od kojih su neki aktivni (geni HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 i -DRB5), a neki su pseudogeni (HLA-DRB2, -DRB6, -DRB7, -DRB8 i -DRB9). Treba istaknuti da na jednom kromosomu 6 unutar subregije HLA-DR nisu prisutni svi ti geni, uvijek su prisutni HLA-DRA1 i -DRB1, a prisustvo ostalih gena ovisi o tome koja je specifičnost, odnosno alelna skupina prisutna na lokusu HLA-DRB1.

Regija HLA razreda III, naziva se još i centralna regija, ne sadrži gene HLA već razne druge gene koji sudjeluju u imunološkoj reakciji npr. gene za komponente komplemента, gene TNF (engl. *Tumor Necrosis Factor*), ali i gene koji ne sudjeluju u imunološkoj reakciji kao npr. gene za proteine toplinskog šoka (engl. *Heat Shock Proteins*, HSP) i gene za enzim 21-hidroksilazu (Choo 2007).



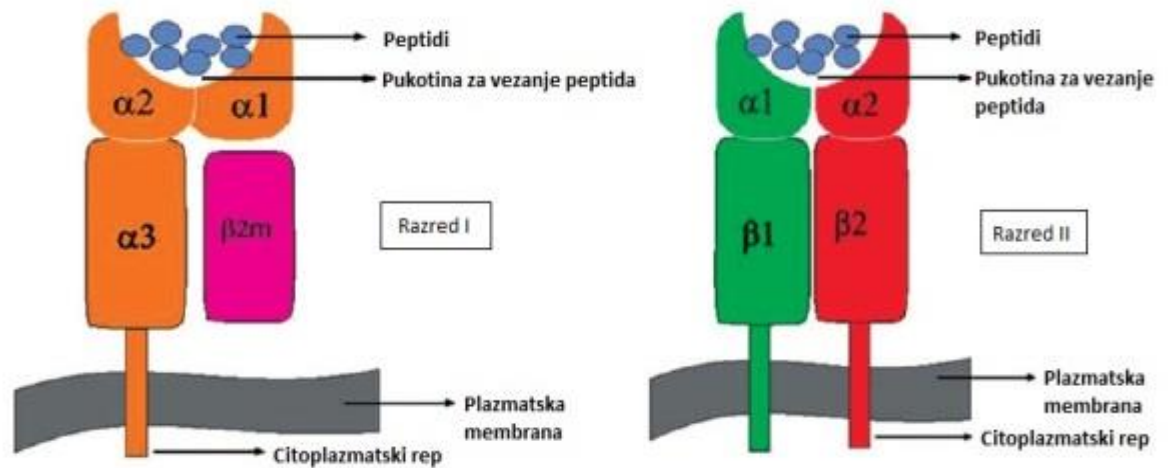
Slika 2. Smještaj sustava HLA na kraćem kraku kromosoma 6 (Klein i Sato 2000)

1.1.3. GRAĐA I ULOGA MOLEKULA HLA

Poznato je da su molekule HLA razreda I prisutne na površini svih stanica s jezgrom, dok su molekule HLA razreda II izražene samo na limfocitima B, antigen prezentirajućim stanicama (monociti, makrofagi, dendritičke stanice) i aktiviranim limfocitima T.

Molekule HLA razreda I građene su od teškog lanca kojeg kodiraju geni HLA razreda I i nekovalentno povezanog β_2 -mikroglobulina kojeg ne kodiraju geni HLA već gen smješten na kromosomu 15. Teški lanac sastoji se od izvanstanične regije koju tvore tri izvanstanične domene (α_1 , α_2 i α_3), transmembranske i citoplazmatske regije. Domene α_1 i α_2 sadrže varijabilne aminokiseline i one određuju antigensku specifičnost molekula HLA razreda I, odnosno zatvaraju pukotinu tj. mjesto gdje se vežu strani antigeni.

Molekule HLA razreda II su heterodimeri sastavljeni od dva nekovalentno vezana polipeptidna lanca: α i β . Oba lanca su transmembranska i imaju vrlo sličnu strukturu. Za razliku od molekula HLA razreda I, kod molekula HLA razreda II domene α_1 i β_1 tvore pukotinu u kojoj se vežu strani antigeni (Choo 2007).



Slika 3. Shematski prikaz građe molekule HLA razreda I i II (Deshpande 2017)

Molekule HLA razreda I i II imaju ključnu ulogu u preradi i predočavanju antigena. Limfociti T prepoznaju antigenske molekule tako da jednim dijelom receptora prepoznaju antigen, a drugim dijelom vlastitu molekulu HLA. Ako limfociti T ne prepoznaju kompleks molekule HLA i antigena, ne dolazi do imunološke reakcije. Molekule HLA razreda I prepoznaju endogene (unutarstanične) antigene (npr. viruse) dok molekule HLA razreda II prepoznaju egzogene (izvanstanične) antigene (npr. bakterije) (Andreis i sur. 2010).

1.1.4. PRIMJENA ODREĐIVANJA GENA HLA

Istraživanja sustava HLA provode se dugi niz godina, preciznije od šezdesetih godina prošlog stoljeća. Jedan od glavnih razloga je veliki klinički značaj gena HLA u transplantaciji tkiva i organa, ali i u populacijskoj genetici, forenzičkoj i sudskoj medicini, transfuzijskom liječenju te u dijagnostici brojnih bolesti (Andreis i sur. 2010). Upravo zbog svega navedenog, sustav HLA je najviše istražen genski sustav kod čovjeka.

Najvažnija primjena određivanja gena HLA jest presađivanje tkiva i organa. Molekule/antigeni HLA prvi puta su otkriveni kao uzrok odbacivanja alogeničnih transplantata (Andreis i sur. 2010). Brojna istraživanja pokazala su da uspješnost transplantacije ovisi o podudarnosti gena HLA između primatelja i davatelja (Grubić 2012). Stoga se tipizacija, odnosno određivanje gena HLA provodi prije transplantacije kako bi se izbjeglo odbacivanje organa. Tipizacija HLA je također našla veliku primjenu u dijagnostici brojnih bolesti koje su povezane s genima sustava HLA, uglavnom je riječ o bolestima autoimune prirode. Poznato je da geni HLA nisu uzročnici bolesti već osobe koje imaju određene alele HLA (npr. heterodimeri HLA-DQ2 i -DQ8 kod celijakije, HLA-B*27 kod ankilozantnog spondilitisa) češće oboljevaju od tih bolesti nego one koje ih nemaju.

Proučavanjem polimorfizma gena HLA i njihovim učestalostima među pojedinim populacijama bavi se populacijska genetika i na temelju raspodjele alela, odnosno haplotipova HLA moguće je pratiti migracije, izoliranost ili miješanje pojedinih populacija (Choo 2007; Andreis i sur. 2010).

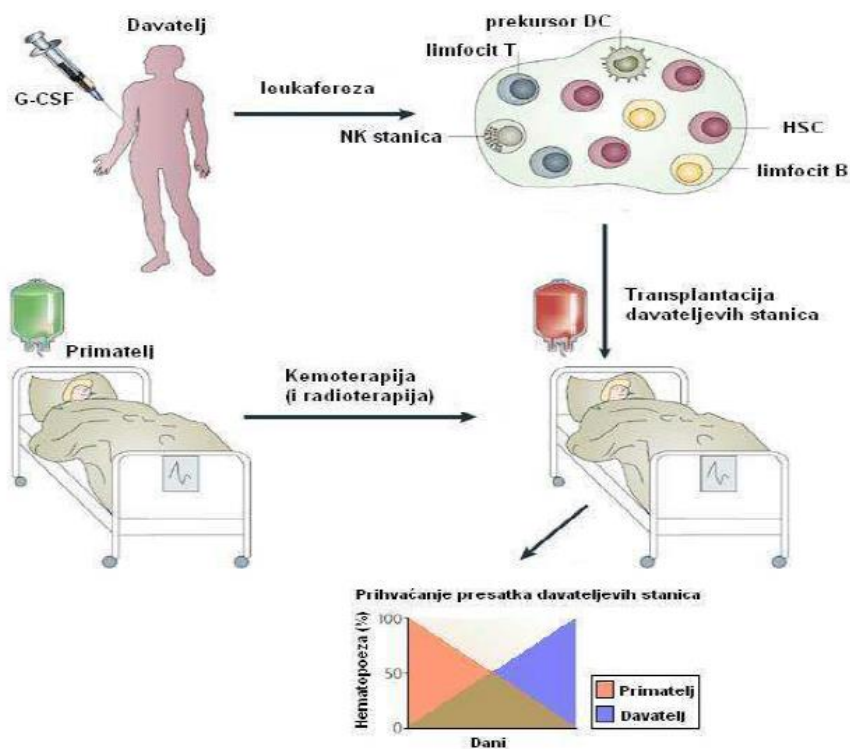
1.2. TRANSPLANTACIJA KRVOTVORNIH MATIČNIH STANICA

Transplantacija krvotvornih matičnih stanica (TKMS) jedna je od najčešćih metoda liječenja malignih i nemalignih hematoloških bolesti, kao što su akutna mijeloična leukemija ili mijelodisplastični sindrom te mnogi drugi hematološki poremećaji (Slika 4). Krajem šezdesetih godina 20. stoljeća TKMS bila je tek eksperimentalan postupak, a sedamdesetih godina 20. stoljeća, kada je spoznata uloga gena HLA, započela je moderna era TKMS (Parmesar i Raj 2016).

<i>Maligne bolesti</i>	<i>Nemaligne bolesti</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Akutna mijeloična leukemija (AML) • Akutna limfocitna leukemija (ALL) • Kronična mijeloična leukemija (CML) i mijeloproliferativni poremećaji • Kronična limfocitna leukemija (CLL) • Non-Hodgkinov limfom (NHL) • Hodgkinova bolest (HL) • Mijelodisplastični sindromi (MDS) • Multipli mijelom i amiloidoza • Solidni tumori: dojka, testis, jajnik i mikrocelularni karcinom pluća • Pedijatrijski solidni tumori: neuroblastom, Ewingov sarkom, meduloblastom, karcinom bubrežnih stanica, melanom 	<ul style="list-style-type: none"> • Aplastična anemija (AA) i srodna zatajenja koštane srži • Hemoglobinopatije: talasemija, anemija srpastih stanica • Kongenitalni poremećaji hematopoeze: Fanconijeva anemija i srodni sindromi • Kongenitalne imunodeficijencije: teška kombinirana imunodeficijencija, Wiskott-Aldrichev sindrom, kronična granulomatozna bolest i srodni sindromi • Urođene greške metabolizma • Autoimuni poremećaji

Slika 4. Bolesti koje se liječe transplantacijom krvotvornih matičnih stanica

Matične stanice su nediferencirane stanice koje imaju sposobnost samoobnavljanja, nalaze se u cijelom organizmu te iz njih nastaju specijalizirane stanice. Ovisno o mjestu gdje se nalaze u organizmu, imaju drugačiju funkciju. Krvotvorne matične stanice (KMS) su nezrele pluripotentne stanice koje imaju mogućnost diferencijacije u sve vrste krvnih stanica i proliferacijsku sposobnost. Hematopoeza je kontinuirani proces stvaranja novih krvnih stanica (Hatzimichael i Tuthill 2010). Postupak TKMS uključuje uzimanje zdravih matičnih stanica iz koštane srži, periferne krvi ili iz umbilikalne krvi te njihovu reinfuziju bolesniku kojeg je potrebno prethodno kondicionirati primjenom kemoterapije ili radioterapije (Slika 5).

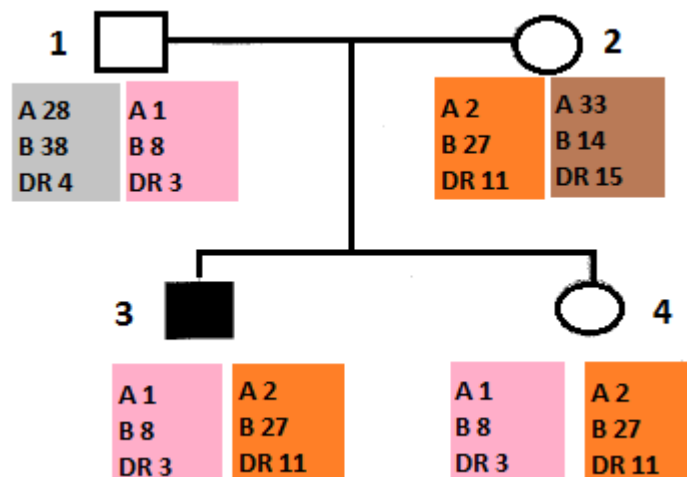


Slika 5. Shematski prikaz postupka transplantacije krvotvornih matičnih stanica

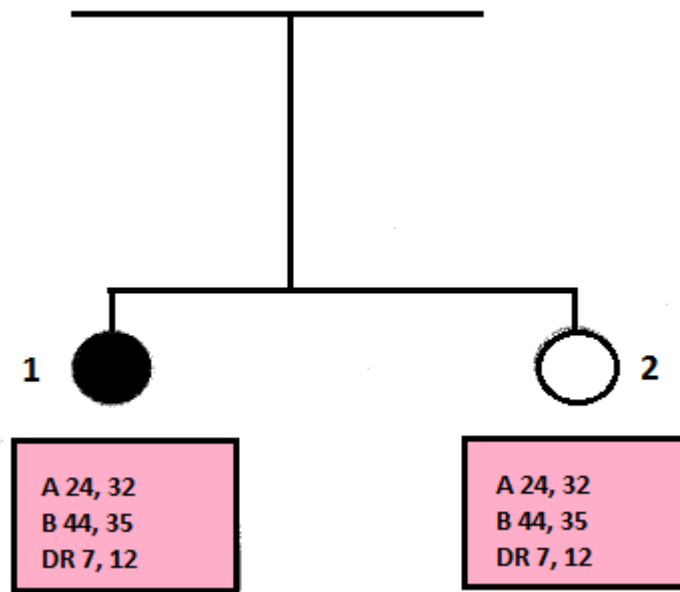
Dvije su glavne vrste TKMS: autologna i alogena. U autolognoj TKMS davatelj je sam bolesnik, a u alogenoj davatelj KMS može biti član obitelji genotipski ili fenotipski identičan s primateljem za gene ili fenotipski HLA identičan nesrodni davatelj iz nacionalnog ili svjetskog registra dobrovoljnih davatelja KMS. Čimbenici koji uz sustav HLA utječu na ishod TKMS su dob i spol davatelja/primatelja, izvor KMS, stanje bolesnika i dijagnoza, kondicioniranje bolesnika te drugi geni koji mogu utjecati na transplantaciju (Serventi-Seiwerth i sur. 2011). Unatoč velikom broju dobrovoljnih davatelja u svijetu (N=36207209 na dan 03.10.2019.) (<https://wmda.info/>), neki bolesnici nemaju podudarnog ni srodnog, ni nesrodnog davatelja KMS. Za takve bolesnike postoji mogućnost liječenja TKMS od HLA haploidentičnog srodnog davatelja (Parmesar i Raj 2016).

1.2.1. SRODNA TKMS

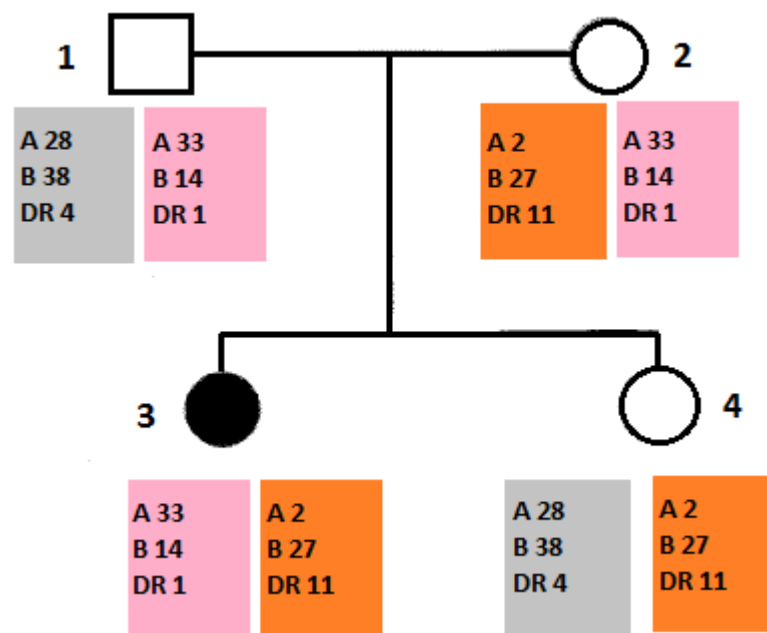
Postupak pronalaska podudarnog davatelja započinje određivanjem gena HLA bolesnika i članova njegove uže obitelji. Najbolji davatelj je genotipski HLA identičan član uže obitelji i to je najčešće brat ili sestra bolesnika koji s bolesnikom dijele iste haplotipove HLA (Slika 6). U tom je slučaju cijeli odsječak regije HLA između lokusa koji se određuju isti između primatelja i davatelja jer se u tom odsječku ne nalaze samo geni HLA, već i drugi geni koji sudjeluju u imunološkom odgovoru. Unutar uže obitelji davatelji mogu biti i fenotipski identična sestra ili brat (Slika 7) ili fenotipski identični roditelji (Slika 8).



Slika 6. Prikaz obitelji u kojoj bolesnik ima genotipski HLA identičnu sestru (kazalo: 1-otac; 2-majka; 3-bolesnik; 4-sestra)



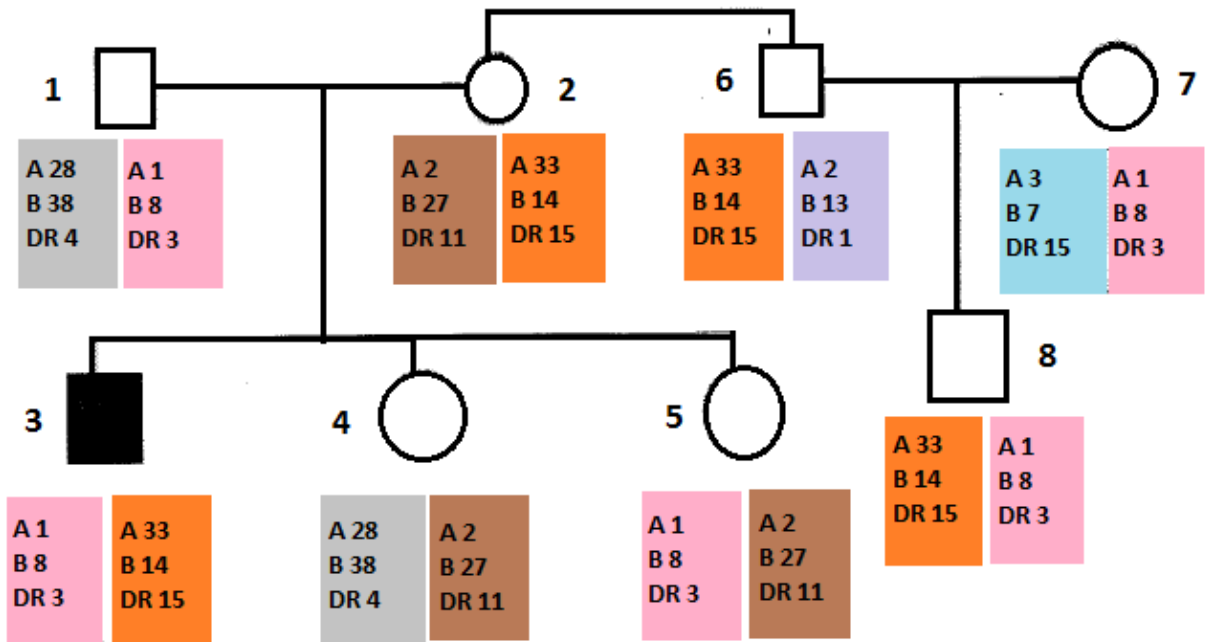
Slika 7. Prikaz obitelji u kojoj bolesnica ima fenotipski HLA identičnu sestru (kazalo: 1-bolesnica; 2-sestra)



Slika 8. Prikaz obitelji u kojoj bolesnica ima fenotipski HLA identičnu majku (kazalo: 1-otac; 2-majka; 3-bolesnica; 4-sestra)

U slučaju da bolesnik nema takvog davatelja u svojoj užoj obitelji, može se tražiti davatelj unutar proširene obitelji (Slika 9). To je u zatvorenim sredinama gdje dolazi do većeg miješanja srodnika. Kod odabira srodnog davatelja traži se podudarnost HLA 10/10 (u genima HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1), a ponekad davatelj može biti i član obitelji s razlikom u

jednom alelu određenog lokusa HLA (podudarnost HLA 9/10). Budući da samo jedna trećina bolesnika pronađe svog davatelja unutar obitelji, često je potrebno pronaći fenotipski HLA identičnog dobrovoljnog nesrodnog davatelja (Serventi-Seiwerth i sur. 2011).



Slika 9. Prikaz obitelji u kojoj bolesnik ima fenotipski HLA identičnog člana proširene obitelji (kazalo: 1-otac; 2-majka; 3-bolesnik; 4-sestra; 5-sestra; 6-ujak; 7-ujna; 8-brat; bolesnik i osoba broj 8 su fenotipski HLA identični)

1.2.2. NESRODNA TKMS

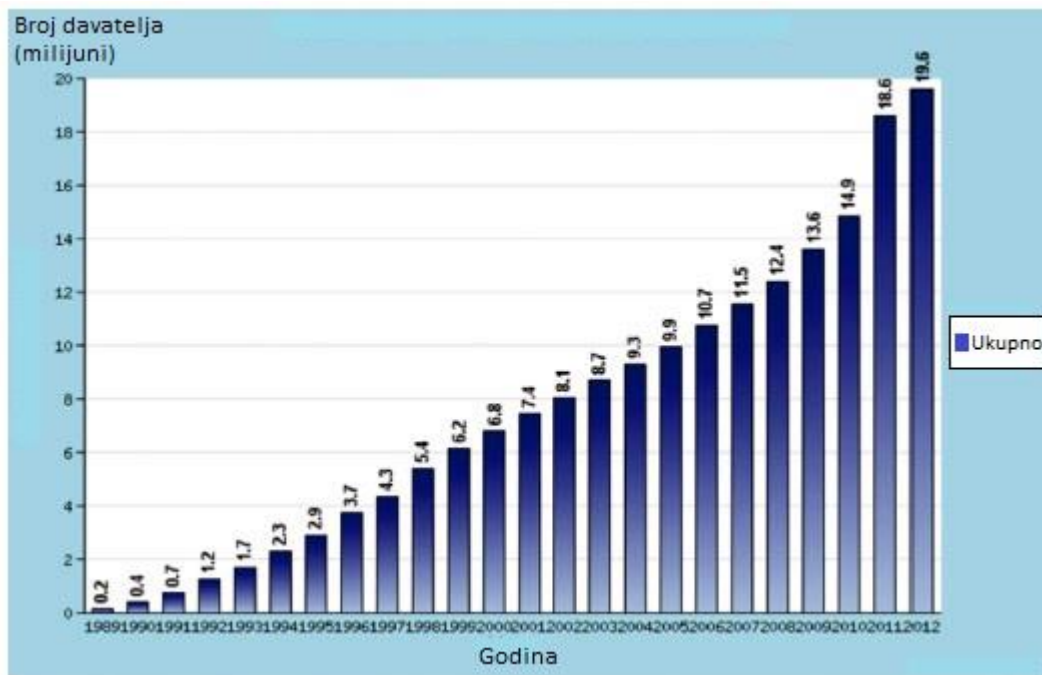
Rezultati nesrodne transplantacije dugo su vremena zaostajali za rezultatima transplantacije od podudarnog HLA srodnog davatelja te se alogenična TKMS od podudarnog HLA nesrodnog davatelja smatrala „posljednjom terapijskom metodom“. Primjenom tipizacije gena HLA visoke rezolucije na razini alela rezultati liječenja alogeničnom TKMS su poboljšani pa više nema razlike u odnosu na TKMS od podudarnog HLA srodnog davatelja (Ciurea i sur. 2018).

U programu nesrodne TKMS postoji nekoliko protokola ovisno o broju podudarnosti HLA para primatelj/davatelj: podudarnost 8/8 (HLA-A, -B, -C i -DRB1), podudarnost 10/10 (HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1) i podudarnost 12/12 (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 i -DPB1). Transplantacijski centar odlučuje koji od navedenih protokola će slijediti.

U KBC Zagreb, jedinom centru u Hrvatskoj u kojem se izvode TKMS s nesrodnog davatelja protokol je da se primatelj i davatelj testiraju za pet lokusa HLA, odnosno da primatelj i nesrodni davatelj trebaju biti podudarni HLA 10/10 ili 9/10 (Grubić 2012).

Nepodudarnost u genima HLA povezana je s povećanim rizikom od odbacivanja presatka te smanjenim ukupnim preživljavanjem nakon transplantacije (Ciurea i sur. 2018). Primjenom TKMS od nesrodnog davatelja podudarnog za gene HLA omogućena je primjena transplantacije za približno 70% bolesnika (Grubić 2012).

Fenotipski HLA identičan nesrodni davatelj traži se putem nacionalnog ili svjetskog registra dobrovoljnih davatelja KMS. U Hrvatskoj postoji Hrvatski registar dobrovoljnih darivatelja KMS (Hrvatski registar DDKMS) koji u ovom trenutku obuhvaća preko 50 000 tipiziranih nesrodnih davatelja. On je dio Svjetskog registra dobrovoljnih darivatelja koštane srži (engl. *World Marrow Donor Association*, WMDA) koji sadrži podatke o više od 36 milijuna dobrovoljnih davatelja (<https://wmda.info/>). Broj dobrovoljnih davatelja KMS u svijetu raste iz godine u godinu (Slika 10).



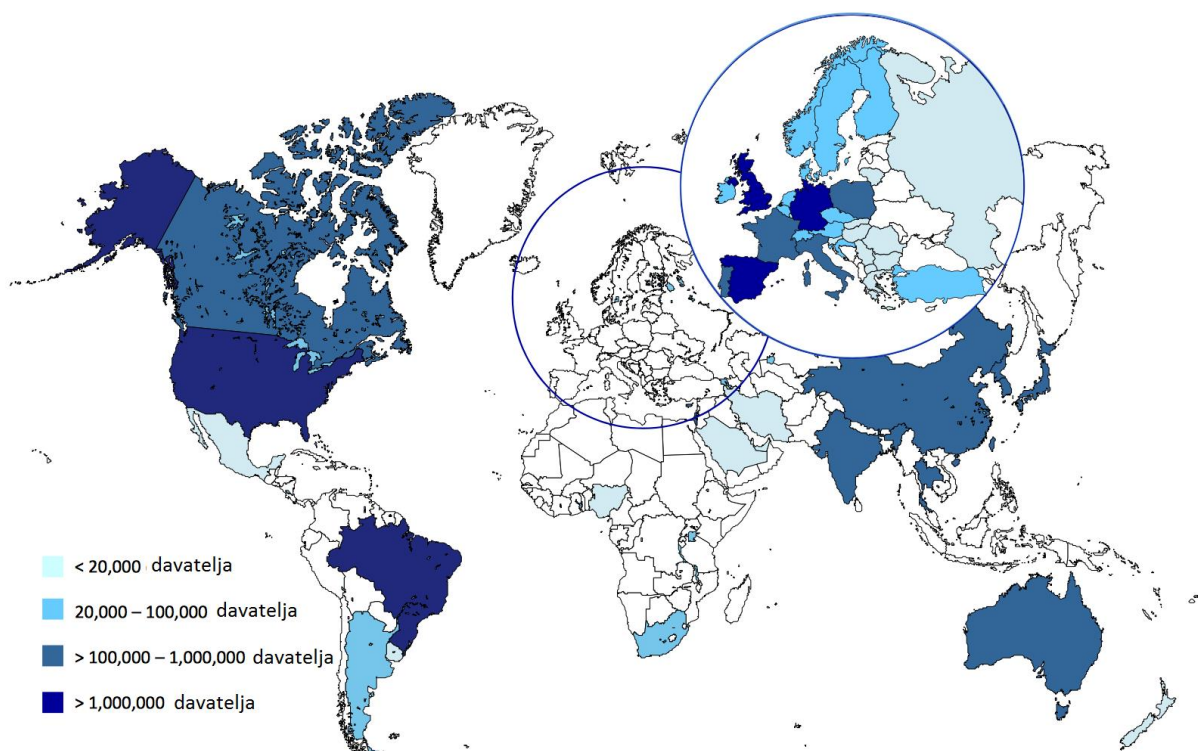
Slika 10. Prikaz rasta broja dobrovoljnih davatelja krvotvornih matičnih stanica u svijetu (<https://wmda.info/>)

1.2.3. HAPLOIDENTIČNA TKMS

Haploidentična TKMS je transplantacija od djelomično podudarnog srodnog davatelja (člana obitelji) s kojim bolesnik dijeli samo jedan podudaran haplotip HLA, dok im se drugi haplotip HLA razlikuje. Presadak od takvog davatelja naziva se haploidentični presadak. Haploidentična TKMS u zadnjem je desetljeću postala obećavajuća terapija za bolesnike koji boluju od hematoloških karcinoma i kod kojih postoji veliki rizik za povrat bolesti (relaps) te rješenje za približno 70% bolesnika koji ne mogu pronaći HLA podudarnog srodnog ili nesrodnog davatelja. Brojne prednosti haploidentične TKMS su da skoro svi bolesnici imaju haploidentičnog davatelja unutar obitelji (roditelja, brata, sestru ili članove proširene obitelji) (Parmesar i Raj 2016). U radu iz 2012. godine procijenjeno je da 95% bolesnika može pronaći barem jednog haploidentičnog davatelja, dok je prosjek dva davatelja ili više (Fuchs 2012). Imus i suradnici su u svom radu iz 2017. godine iznijeli kliničke dokaze koji pokazuju da je za neke bolesnike koji su imali relaps nakon alogene TKMS pri drugoj transplantaciji bolji izbor nepodudaran HLA davatelj nego podudaran davatelj (Imus i sur. 2017).

Haploidentična TKMS također omogućava u brojnim slučajevima i bolji izbor davatelja što se tiče godina, spola, statusa citomegalovirusa i podudarnosti u sustavu krvnih grupa AB0. Također, haploidentična TKMS nudi lakši pristup posttransplantacijskoj terapiji kao što je infuzija davateljevih limfocita (engl. *Donor Lymphocyte Infusion*, DLI) koji pomažu obnovi imunološkog sustava nakon TKMS. U slučaju neprihvatanja presatka, nudi se mogućnost transplantacije novog presatka od istog ili drugog haploidentičnog davatelja unutar obitelji. Ovakvim oblikom TKMS povećava se broj bolesnika s brzo dostupnim davateljem što je jedna od najvažnijih prednosti ovog oblika TKMS, koja također može smanjiti nepotrebne troškove i to posebice u siromašnijim državama: naime u brojnim zemljama u svijetu ne postoje nacionalni registri dobrovoljnih davatelja (Slika 11) te im je preveliki trošak traženja nesrodnog podudarnog davatelja ograničavajući čimbenik za TKMS. Brza dostupnost davatelja posebno je važna za bolesnike kojima je transplantacija hitno potrebna (Parmesar i Raj 2016).

Nakon haploidentične TKMS javlja se snažniji učinak transplantata protiv leukemije (engl. *Graft versus Leukemia*, GvL) s obzirom na nepodudarnosti između primatelja i davatelja. Sam GvL efekt je jedan od učinkovitih oblika imunoterapije kod hematoloških karcinoma i postiže se uz pomoć DLI nakon transplantacije (Vago i sur. 2009).



Slika 11. Prikaz raspodjele dobrovoljnih davatelja krvotvornih matičnih stanica u svijetu (<https://wmda.info/>)

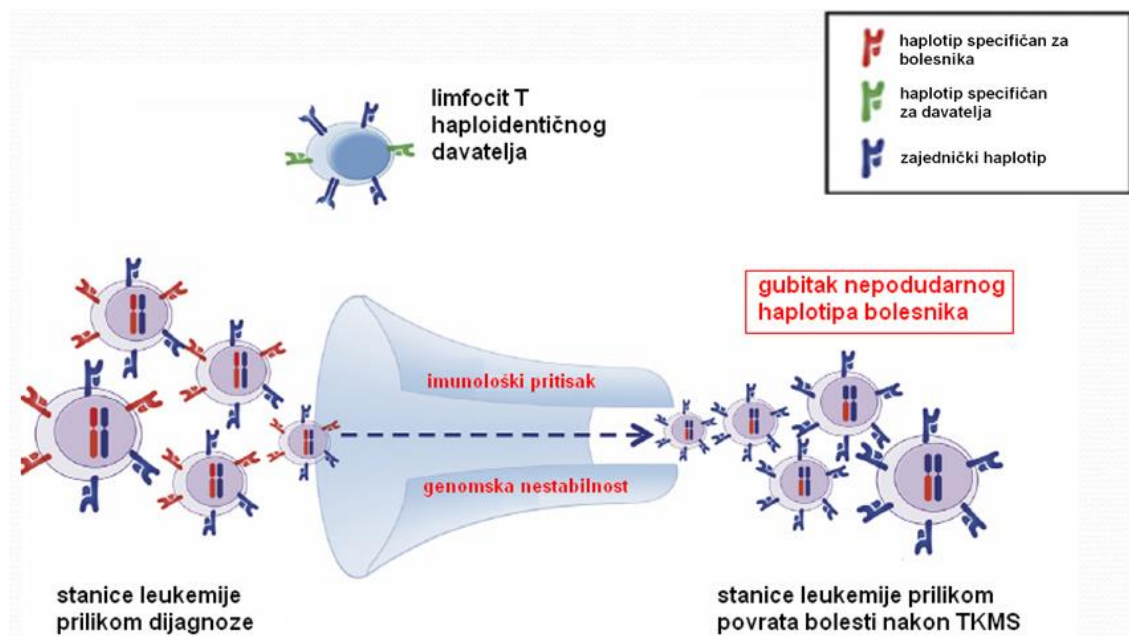
Najveće ograničenje ovakve vrste transplantacije je mogućnost pojave reakcije transplantata protiv primatelja (engl. *Graft versus Host Disease*, GvHD) koja se javlja zbog reakcije davateljevih stanica T na primateljev nepodudarni haplotip HLA. Bolesnici liječeni haploidentičnom TKMS razviju GvHD u 70% slučajeva za razliku od bolesnika s podudarnim davateljem kod kojih je vjerojatnost za razvoj GvHD-a 42% (Parmesar i Raj 2016). Stoga su tijekom vremena otkriveni načini kako spriječiti GvHD, kao što su DLI i imunosupresivni lijekovi. Nedostaci haploidentične TKMS su i sporije prihvatanje ili gubitak presatka te povrat bolesti (Vago i sur. 2009). Vjerojatnost povrata bolesti nakon haploidentične TKMS iznosi od 22% do 58% (Piemontese i sur. 2019). Do gubitka transplantata nakon haploidentične TKMS može doći u 27% slučajeva, dok kod alogene TKMS s podudarnim davateljem ta vjerojatnost iznosi 5,6% (Blanquer i Moraleda 2017).

1.2.3.1. GUBITAK NEPODUDARNOG HAPLOTIPA HLA

Dosadašnja istraživanja pokazala su da kod približno 30% slučajeva povrata bolesti nakon haploidentične TKMS dolazi do gubitka nepodudarnog haplotipa HLA (tzv. HLA-loss), odnosno do gubitka primateljevog nepodudarnog haplotipa HLA (Vago i sur. 2009).

Gubitak heterozigotnosti (engl. *Loss of Heterozygosity*, LOH) označava gubitak jednog od alela/haplotipova nekog gena u stanicama, tj. fizički gubitak DNA. Pojam LOH-a je prvi put spomenut tj. otkriven kod različitih vrsta tumora, u tumor supresor genima (p53).

Kod HLA-loss-a govorimo o *de novo* gubitku haplotipa HLA koji je nepodudaran između primatelja i davatelja u stanicama leukemije (Slika 12). Genomska nestabilnost značajka je mijeloičnih tumora i povezana je s gubitkom heterozigotnosti bez gubitka genetičkog materijala, tzv. uniparentalna disomija kromosoma 6p. Gubitkom heterozigotnosti stanice leukemije postaju nevidljive davateljevim stanicama T. Gubitak nepodudarnog haplotipa HLA javlja se kao jedan od mehanizama kojim tumorske stanice izbjegavaju imunološki pritisak aloreaktivnih davateljevih stanica T i reakciju GvL pa dolazi do relapsa bolesti (Vago i sur. 2009).



Slika 12. Shematski prikaz mehanizma gubitka nepodudarnog haplotipa HLA

1.2.3.2. POVEZANOST POVRATA BOLESTI I HLA-LOSS-A

Tipizacija primatelja nakon TKMS kod kojeg je došlo do relapsa (povrata) bolesti uslijed HLA-loss-a pokazuje prisutnost samo zajedničkog haplotipa HLA. Do ovakvog relapsa obično dolazi puno kasnije nakon TKMS u usporedbi s klasičnim povratom bolesti. Kod takvih bolesnika nema smisla nastaviti liječenje s DLI ili ponovnom TKMS od istog davatelja već je neophodno odabrati novog HLA haploidentičnog davatelja. Mehanizmi koji dovode do povrata bolesti praćenog gubitkom haplotipa HLA još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. U istraživanju iz 2009. godine Vago i suradnici pratili su povezanost haploidentične TKMS i DLI unutar skupine od 43 bolesnika od kojih je njih 17 imalo relaps bolesti. Daljnje analize pokazale su da je kod 29% bolesnika s povratom bolesti došlo do mutiranja stanica leukemije. U tim stanicama otkrili su i gubitak onog haplotipa HLA koji se razlikovao između primatelja i davatelja. Primateljeve i davateljeve stanice T nisu prepoznale mutirane stanice leukemije nakon TKMS dok su originalne stanice leukemije bile prepoznate i ubijene. Nakon haploidentične TKMS i DLI stanice leukemije mogu pobjeći od davateljevih antileukemijskih stanica T preko gubitka nepodudarnog haplotipa HLA što dovodi do povrata bolesti (Vago i sur. 2009). Na temelju dobivenih rezultata autori su zaključili da relaps praćen HLA-loss-om predstavlja kontraindikaciju za DLI i drugu transplantaciju od istog davatelja (Vago i Ciceri 2017).

1.3. PRAĆENJE PRIHVAĆANJA TRANSPLANTATA NAKON TKMS

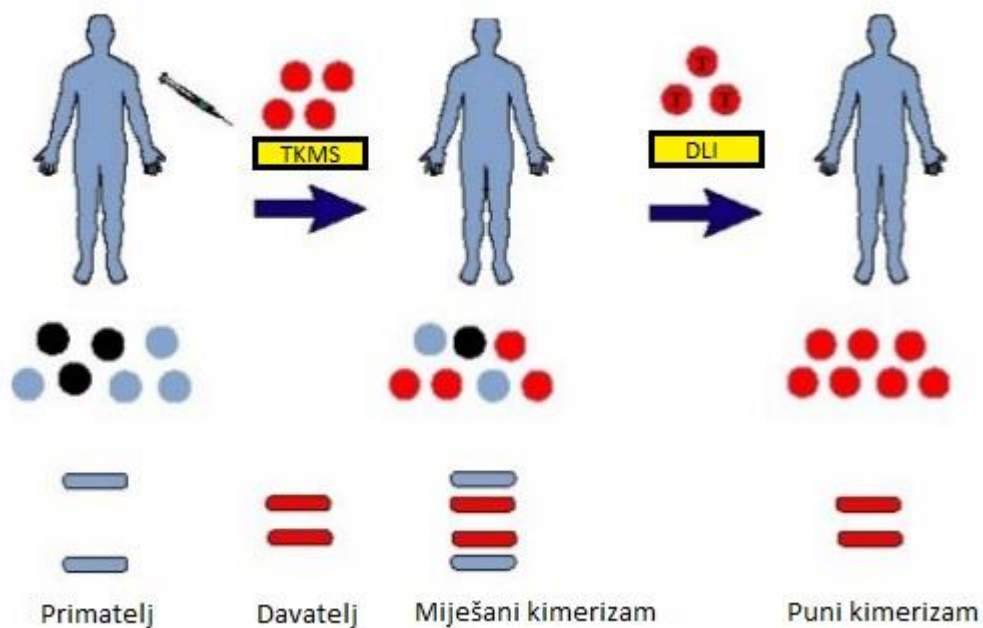
Analizom kimerizma određuje se genetsko porijeklo hematoloških stanica. Pojam kimerizam označava prisutnost staničnih populacija u tijelu koje su porijeklom iz dva genetski različita organizma. Postoje prirodne kimere, ali kimerizam nastaje i kao rezultat transfuzije krvi odnosno nakon TKMS.

Postupak praćenja kimerizma postao je nezaobilazan čimbenik u posttransplantacijskom praćenju bolesnika kojem je cilj predvidjeti negativne događaje poput povrata bolesti, odbacivanja transplantata, pojave minimalne ostatne bolesti (engl. *Minimal Residual Disease*, MRD) ili GvHD. Prisutnost primateljevih limfocita T nakon TKMS može ukazivati ili na preživljavanje tumorskih stanica ili na preživljavanje normalnih, zdravih hematopoetskih stanica primatelja ili oboje što je povezano s povećanim rizikom za relaps. Zbog navedenih razloga praćenje kimerizma bitna je metoda za praćenje ishoda TKMS koja

pruža važne informacije o prihvatanju transplantata i omogućuje bolji izbor terapije za bolesnika. Njome se utvrđuje porijeklo stanica u perifernoj krvi ili koštanoj srži bolesnika nakon TKMS te se dobivaju bitne informacije o uspješnosti same transplantacije (Lukanov i sur. 2018).

Ovisno o tome je li TKMS provedena u svrhu liječenja maligne ili nemaligne bolesti, različito je tumačenje nalaza kimerizma. Kod nemalighnih bolesti cilj TKMS je postizanje imunokompetentnosti i poboljšanje hematopoetske funkcije stoga nije nužno u potpunosti zamijeniti primateljev hematopoetski sustav s davateljevim (postići puni kimerizam), već je dovoljno bolesnika dovesti u stanje miješanog kimerizma. Za uspješno liječenje malignih bolesti sa TKMS ključno je postizanje statusa punog kimerizma. Puni kimerizam je stanje u kojem je nazočno 100% stanica davatelja što ukazuje na potpunu limfohematopoetsku zamjenu dok je miješani kimerizam stanje u kojem su nazočne i stanice primatelja i stanice davatelja (Slika 13) (Khan i sur. 2004). Postoje tri podtipa miješanog kimerizma ovisno o njegovoj stabilnosti, odnosno smjeru promjena omjera stanica primatelja i davatelja nakon TKMS. Prvi podtip je stabilni miješani kimerizam pri kojem se udjeli stanica primatelja i davatelja ne mijenjaju značajno s vremenom. Drugi podtip je padajući miješani kimerizam pri kojemu dolazi do porasta udjela stanica primatelja dok je treći podtip rastući miješani kimerizam pri kojemu dolazi do porasta udjela stanica davatelja. Treća vrsta kimerizma je „split“ kimerizam kod kojeg su u jednoj staničnoj liniji prisutne samo stanice primatelja, a u drugoj samo stanice davatelja (Grubić 2014).

Nakon TKMS prisutan je miješani kimerizam kod svih bolesnika, a za preživljavanje transplantata potrebno je postići stanje punog kimerizma te je zbog toga primjena DLI nužna kako bi se spriječio relaps bolesti (Bader i sur. 2005). Pokazano je da je posttransplantacijski kimerizam dinamičan proces i bolesnici s punim kimerizmom u posttransplantacijskom periodu mogu razviti miješani kimerizam i obratno-bolesnici s miješanim kimerizmom mogu razviti puni kimerizam (Lukanov i sur. 2018).



Slika 13. Shematski prikaz punog i miješanog kimerizma (plavi krugovi-primateljve stanice; crveni krugovi-davateljve stanice; crni krugovi-tumorske stanice)

Jedna od najnovijih i najosjetljivijih metoda za praćenje kimerizma je metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *Real-Time PCR*, qPCR). Metoda se temelji na uporabi fluorescentno obilježene probe koja je ugrađena između početnica 5' i 3' zbog čega se tijekom ciklusa PCR cijepa i na taj način emitira fluorescenciju. Budući se količina produkta PCR i količina pocijepane probe udvostručuje sa svakim ciklusom, postoji linearan odnos između logaritma početnog broja kopija molekule DNA i prvog ciklusa tijekom kojeg dolazi do značajnog porasta fluorescencije. Ovim postupkom može se postići brzo, precizno i osjetljivo određivanje udjela stanica primatelja (Khan i sur. 2004).

Postoje mnogi komercijalni setovi koji omogućavaju identifikaciju barem jednog informativnog markera za više od 99% parova primatelj/davatelj. Marker se smatra informativnim za bolesnika ako se u bolesnikovom uzorku javlja pozitivna reakcija, a u davateljevom uzorku negativna reakcija, dok je marker informativan za davatelja u obratnom slučaju. Moguće kombinacije prikazane su u Tablici 1. (Štingl Janković 2019).

Tablica 1. Primjeri mogućih rezultata genotipizacije metodom qPCR

MARKER	PRIMATELJ	DAVATELJ	INFORMATIVAN ZA	PRIMJENA
KMR013	POZITIVAN	NEGATIVAN	PRIMATELJA	PRAĆENJE MANJE POPULACIJE STANICA PRIMATELJA
KMR028	NEGATIVAN	POZITIVAN	DAVATELJA	PRAĆENJE MANJE POPULACIJE STANICA DAVATELJA
KMR037	POZITIVAN	POZITIVAN	NIJE INFORMATIVAN	/
KMR056	NEGATIVAN	NEGATIVAN	NIJE INFORMATIVAN	/

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj ovog istraživanja bio je utvrditi učestalost gubitka nepodudarnog haplotipa HLA među bolesnicima s povratom bolesti nakon haploidentične TKMS primjenom metode lančane reakcije polimerazom i početnica specifičnih sekvenci (engl. *Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer, PCR-SSP*).

Specifični ciljevi ovog rada bili su sljedeći:

1. U skupini bolesnika (N=28) odrediti status kimerizma nakon haploidentične TKMS.
2. Bolesnicima s relapsom bolesti (N=9) i njihovim davateljima odrediti gene lokusa HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1 te utvrditi informativne lokuse HLA.
3. Uzorke bolesnika (nakon TKMS) kod kojih je došlo do povrata bolesti testirati za informativne lokuse HLA i otkriti postoji li gubitak nepodudarnog haplotipa HLA.
4. Usporediti rezultate praćenja kimerizma i tipizacije HLA među bolesnicima s povratom bolesti.
5. Dobivene rezultate usporediti s podacima iz literature.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. ISPITANICI

Istraživanje je provedeno na skupini od 28 nesrodnih bolesnika liječenih haploidentičnom TKMS i njihovih srodnih davatelja. Podaci o ispitanicima prikazani su u Tablici 2. Srednja životna dob primatelja bila je 43 godine, a davatelja 40 godina. Omjer spolova primatelja bio je 1,15:1 u korist muškaraca. Bolesnici su liječeni u Zavodu za hematologiju, Klinike za internu medicinu, KBC Zagreb.

Svim bolesnicima i njihovim davateljima uzeto je 3mL periferne krvi s antikoagulansom EDTA u svrhu imunogenetskih testova koji prethode TKMS.

Bolesnicima su također uzimani uzorci krvi (3mL periferne krvi s EDTA) i nakon TKMS u svrhu praćenja kimerizma.

Tablica 2. Osobine ispitanika uključenih u istraživanje (N=28)





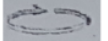
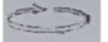

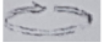

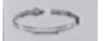
		RASPON GODINA (srednja životna dob)	
PRIMATELJI		19-63 god (43 god)	
DAVATELJI		17-67 god (40 god)	
BOLESNICI			
SPOL	n (%)	ODNOS SPOLOVA PRIMATELJ- DAVATELJ	n (%)
M	15 (53,57)	M-M	8 (28,57)
Ž	13 (46,43)	M-Ž	7 (25,00)
DIJAGNOZA	n (%)	Ž-M	4 (14,29)
ALL	2 (7,14)	Ž-Ž	9 (32,14)
AML	9 (32,14)	SRODSTVO PRIMATELJ- DAVATELJ	n (%)
HL	10 (35,72)	OTAC	1 (3,57)
NHL	4 (14,29)	MAJKA	7 (25,00)
MF	1 (3,57)	SIN	7 (25,00)
MDS	2 (7,14)	KĆER	4 (14,29)
POVRAT BOLESTI	n (%)	BRAT	3 (10,71)
DA	9 (32,14)	SESTRA	5 (17,86)
NE	19 (67,86)	UJAK	1 (3,57)

Kazalo: n-broj bolesnika; M-muškarci; Ž-žene; ALL-akutna limfocitna leukemija; AML-akutna mijeloična leukemija; HL-Hodgkinov limfom; NHL-Ne-Hodgkinov limfom; MF-mijelofibroza; MDS-mijelodisplastični sindrom

3.2. METODE

3.2.1. IZOLACIJA DNA

Izolacija DNA je izvedena korištenjem komercijalnog seta za izolaciju DNA (Nucleospin, Macherey Nagel, Düren, Njemačka). Set sadrži proteinazu K koja lizira stanice i omogućava izlazak DNA iz jezgre, zatim sadrži apsolutni etanol kao i pufere B3, B5, BW i BE koji služe za ispiranje i otapanje DNA (Slika 14). Metoda se temelji na specifičnom vezanju molekule DNA za silikatnu membranu koja se nalazi unutar Nucleospin kolumne.

Liziranje sastojaka krvi		200 µl krvi 25 µl proteinaze K 200 µl B3 Promiješati 70°C 10-15 min
Prilagoditi uvjete za vezanje DNA		210 µl etanola
Vezanje DNA	 	Promiješati sve 1 min 11 000 x g
Ispiranje silikatne membrane	  	500 µl BW 600 µl B5 1 min 11 000 x g 1 min 11 000 x g
Sušenje silikatne membrane	 	1 min 11 000 x g
Eluacija čiste DNA	 	100 µl BE (70°C) RT 1 min 1 min 11 000 x g

Slika 14. Shematski prikaz izolacije DNA pomoću komercijalnog seta za izolaciju DNA

3.2.2. ODREĐIVANJE GENA HLA METODOM PCR-SSP

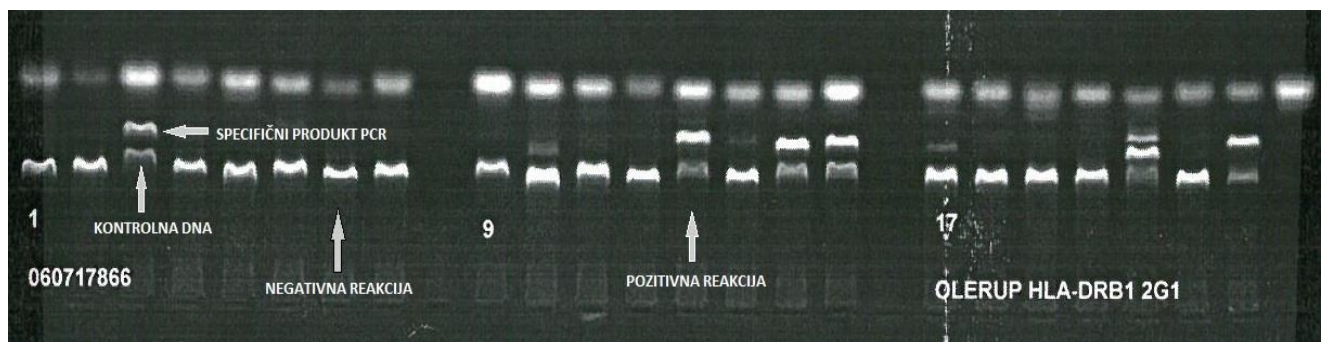
Za određivanje gena lokusa HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1 korištena je metoda lančane reakcije polimerazom i početnica specifičnih sekvenci (engl. *Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer*, PCR-SSP). Metoda PCR-SSP omogućava određivanje specifičnosti HLA na dvije razine (rezolucije): niska razina na nivou gena HLA (dvije znamenke, npr. HLA-A*02) i visoka razina tj. na nivou alela HLA (četiri znamenke, npr. HLA-A*02:01). Osnova metode je umnažanje određenih sljedova DNA na koje se vežu specifične početnice koje umnažaju točno određeni gen ili alel HLA (Bunce i Passey 2013).

U ovom radu korišteni su komercijalni setovi (West Chester, PA, SAD) za umnažanje gena HLA. Za svaki pojedini lokus HLA postoji različit broj specifičnih reakcija (za lokus HLA-A, -C, -DRB1 - po 24 reakcije, za lokus HLA-B - 48, a za lokus HLA-DQB1 - 13 reakcija). Uvjeti umnažanja gena HLA prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Uvjeti umnažanja gena HLA metodom PCR-SSP

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

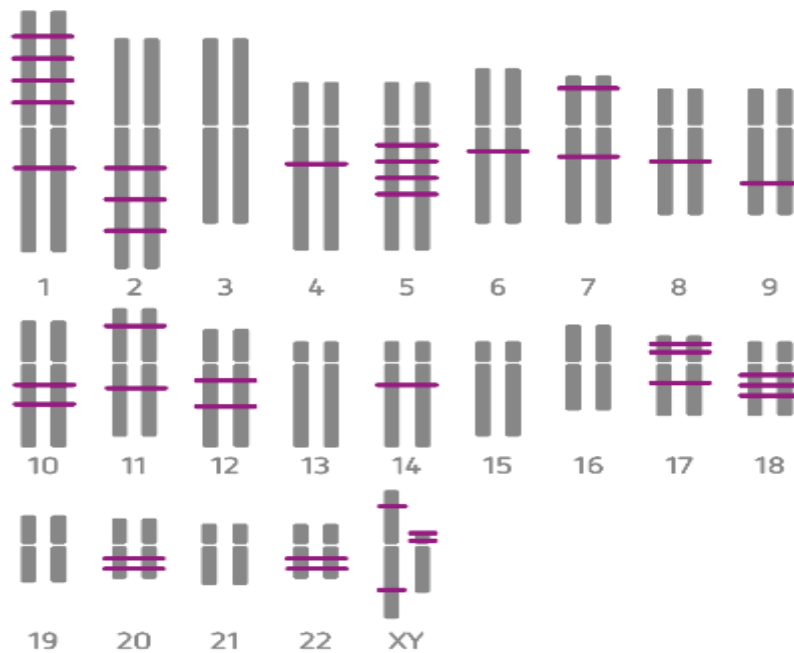
Nakon umnažanja slijedi elektroforeza PCR produkata kojom se produkti razdvajaju na 1,5% agaroznom gelu (u kojeg je zbog vizualizacije DNA dodana boja GelRed). Duži odsječci DNA putuju sporije kroz gel, za razliku od kraćih koji putuju brže. Nakon elektroforeze gel se slika pomoću kamere UV G: BOX (Syngene, Cambridge, UK), a dobiveni rezultati se očitavaju i potom analiziraju pomoću računalnog programa „Helmberg-StatSCORE“ (West Chester, PA, SAD). Pozitivne reakcije su u onim reakcijama tj. jažicama koje sadrže dvije vrpce (engl. *band*): kontrolnu i specifičnu koja označava specifični produkt PCR. U onim jažicama s negativnim reakcijama izostaje vrpca sa specifičnim produktom umnažanja (Slika 15).



Slika 15. Prikaz gela elektroforeze nakon PCR-SSP

3.2.3. ODREĐIVANJE STATUSA KIMERIZMA METODOM qPCR

Za određivanje statusa kimerizma pratio se postotak primateljevih i davateljevih stanica kod bolesnika nakon TKMS koristeći testove KMRtype i KMRtrack (GenDx, Utrecht, Nizozemska). Za genotipizaciju primatelja i davatelja testira se ukupno 30 markera raspoređenih na različitim kromosomima unutar genoma (Slika 16).

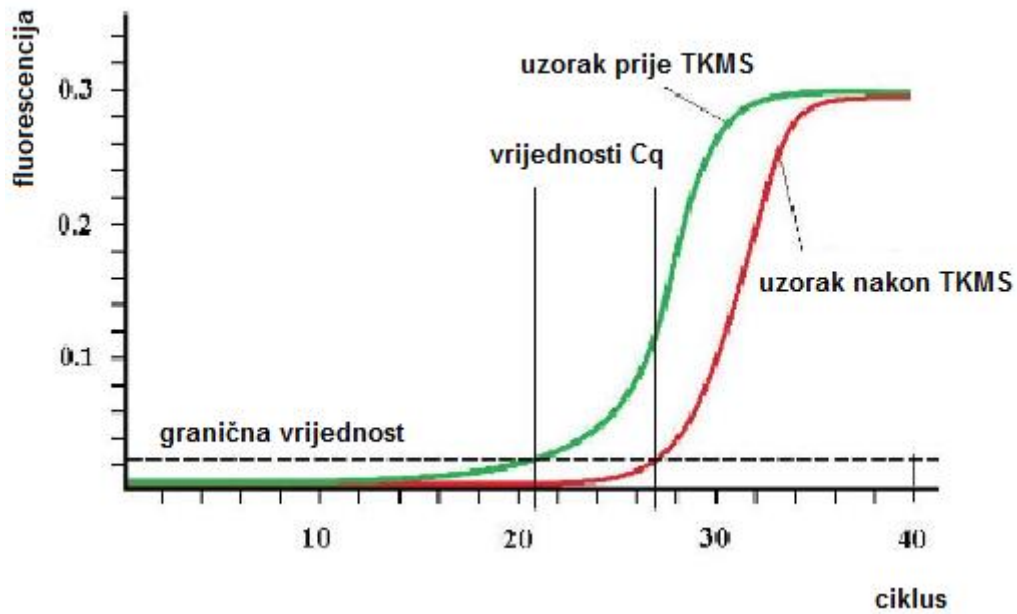


Slika 16. Položaj markera KMRtype unutar genoma

(<https://www.gendx.com/files/secure/1950-20171213-kmrtype-kmrtrack-ifu-ce-v1/file>)

U metodi qPCR također se koristi i referentni gen za standardizaciju rezultata qPCR-a. Nakon umnažanja i kvantifikacije dobivaju se rezultati o prisutnosti odnosno odsutnosti pojedinog markera koji će se dalje koristiti kod praćenja kimerizma. Pozitivnim rezultatom smatraju se sve vrijednosti C_q niže od 33, a negativnim vrijednosti iznad 38. Vrijednosti C_q između 33 i 38 smatraju se neinterpretabilne (Slika 17). Za određivanje statusa kimerizma koriste se dva uzorka, uzorak bolesnika prije TKMS i uzorak nakon TKMS te dva markera informativna za primatelja. Sve reakcije umnažanja izvode se u triplikatima, a za normalizaciju rezultata koristi se KMRassay referentni gen (GenDx, Utrecht, Nizozemska). Nakon umnažanja, rezultati se unose u program za analizu KMREngine (GenDx, Utrecht,

Nizozemska). Dobivene vrijednosti prikazuju postotak stanica primatelja i stanica davatelja u uzorku.



Slika 17. Vrijednosti fluorescencije u qPCR-u (<https://www.gendx.com/files/secure/1950-20171213-kmrtype-kmrtrack-ifu-ce-v1/file>)

4. REZULTATI

Podaci o nesrodnim bolesnicima (spol, dob, dijagnoza) koji su liječeni haploidentičnom TKMS kao i njihovim srodnim davateljima prikazani su u Tablici 2.

Među 28 bolesnika, kod njih deset (35,72%) razlog za transplantaciju bio je Hodgkinov limfom (HL), kod devet (32,14%) bolesnika razlog je bila akutna mijeloična leukemija (AML), četvero (14,29%) bolesnika imalo je Non-Hodgkinov limfom (NHL), po dvoje (7,14%) bolesnika imalo je akutnu limfocitnu leukemiju (ALL) i mijelodisplastični sindrom (MDS), a jedan (3,57%) bolesnik mijelofibrozu (MF) (Tablica 2). Od 28 bolesnika, njih devet je imalo povrat bolesti dok je 19 bolesnika bilo u remisiji tijekom istraživanja.

Analiza srodstva između primatelja i davatelja pokazala je da su u najvećem broju parova davatelji bili majke ili sinovi (25%), zatim sestre (17,86%), u slučaju četvero bolesnika davateljice su bile kćeri (14,29%), u tri slučaja davatelji su bili braća (10,71%), dok su dvojici bolesnika davatelji bili otac, odnosno ujak (3,57%). Omjer spolova davatelja bio je 1,33:1 u korist žena.

Svim bolesnicima uključenim u ovaj rad praćen je i status kimerizma koji je prikazan u Tablici 4 i Tablici 5. Broj praćenja kimerizma razlikovao se od bolesnika do bolesnika, a ovisio je o tijeku oporavka i kliničkoj slici bolesnika. Svim bolesnicima je prvi uzorak za praćenje kimerizma uziman 21. dan nakon TKMS.

Najveći broj praćenja kimerizma bio je kod bolesnika broj 1 (39 praćenja) te je kod njega kimerizam prelazio iz miješanog kimerizma u puni kimerizam te natrag u miješani kimerizam, a takav prijelaz je zabilježen kod 10,71% bolesnika. Najmanji broj praćenja kimerizma bio je kod bolesnika broj 23 (četiri praćenja) te je kod njega zabilježen puni kimerizam tijekom cijelog praćenja. Analize praćenja kimerizma pokazale su da je najviše bolesnika imalo puni kimerizam (50%), a kod najmanje bolesnika (3,59%) kimerizam je prelazio iz punog kimerizma u miješani kimerizam te natrag u puni kimerizam. Kod niti jednog bolesnika rezultat praćenja kimerizma nije bio prisustvo samo stanica primatelja.

Tablica 4. Prikaz praćenja kimerizma bolesnika u programu haploidentične TKMS (N=28)

REDNI BROJ BOLESNIKA	BROJ PRAĆENJA KIMERIZMA	TIJEK STATUSA KIMERIZMA
1	39	MK->PK->MK
2	19	PK->MK
3	31	MK->PK->MK
4	8	MK
5	8	MK->PK->MK
6	9	MK->PK->MK->PK
7	6	PK
8	8	PK->MK
9	9	PK->MK
10	5	PK
11	12	PK
12	9	PK
13	11	PK
14	15	PK
15	9	PK
16	9	PK
17	29	PK->MK->PK
18	5	PK
19	11	PK
20	5	MK->PK
21	6	PK
22	6	MK
23	4	PK
24	7	PK
25	8	PK
26	11	MK->PK->MK->PK
27	7	MK->PK
28	11	MK->PK

Kazalo: PK-puni kimerizam; MK-miješani kimerizam

Tablica 5. Zbirni prikaz bolesnika u programu haploidentične TKMS s obzirom na kimerizam (N=28)

TIJEK STATUSA KIMERIZMA	n (%)
PK	14 (50,00)
PK->MK	3 (10,71)
PK->MK->PK	1 (3,59)
MK	2 (7,14)
MK->PK	3 (10,71)
MK->PK->MK	3 (10,71)
MK->PK->MK->PK	2 (7,14)

Kazalo: n-broj bolesnika; PK-puni kimerizam; MK-miješani kimerizam

Kod devet od 28 bolesnika uključenih u istraživanje uočen je povrat bolesti (Tablica 6), od toga je kod sedam bolesnika u praćenju kimerizma otkriveno prisustvo primateljevih i davateljevih stanica, dok su kod preostala dva bolesnika uočene samo stanice davatelja tj. puni kimerizam.

Među bolesnicima s relapsom, u dva bolesnika (bolesnik broj 1 i 5) utvrđen je gubitak nepodudarnog haplotipa HLA (22,22%). Kod oba bolesnika s gubitkom nepodudarnog haplotipa HLA u trenutku relapsa uočen je miješani kimerizam: kod bolesnika broj 1 relaps se pojavio 2111. dan nakon TKMS, bolesnik je tada imao 20% davateljevih stanica. Kod bolesnika broj 5 povrat bolesti se javio 666. dan nakon TKMS, a bolesnik je tada imao 98% davateljevih stanica u uzorku periferne krvi.

Tablica 6. Lista bolesnika s povratom (relapsom) bolesti u programu haploidentične TKMS

BOLESNIK	ZADNJI DATUM PRAĆENJA KIMERIZMA	BROJ DANA NAKON TKMS	% DAVATELJEVIH STANICA	GUBITAK NEPODUDARNOG HAPLOTIPA HLA
1	30.03.2018.	2111	20	DA
2	14.06.2019.	842	52	NE
3	21.05.2019.	484	98	NE
4	10.08.2017.	162	16	NE
5	03.07.2019.	666	98	DA
6	28.05.2019.	377	100	NE
7	27.06.2019.	92	100	NE
8	15.05.2019.	237	17	NE
9	17.07.2019.	169	28	NE

Kazalo: TKMS-transplantacija krvotvornih matičnih stanica

Svim bolesnicima koji su imali relaps bolesti, usporedno s praćenjem kimerizma, određivani su geni HLA (informativnih lokusa) u svrhu utvrđivanja gubitka nepodudarnog haplotipa HLA. Informativan lokus HLA je onaj koji se razlikuje kod primatelja i davatelja, odnosno u slučaju haploidentične TKMS jedan gen informativnog lokusa HLA je isti kod primatelja i davatelja, dok je drugi gen različit. Dakle, ako su bolesnik i davatelj identični za oba gena HLA određenog lokusa, tada lokus nije smatran informativnim, kao i u slučaju kada je bolesnik bio homozigot za određeni lokus HLA. S druge strane, ako je davatelj bio homozigot na nekom od lokusa HLA na kojem je bolesnik bio heterozigot takav smo lokus HLA smatrali informativnim. Gubitak nepodudarnog haplotipa HLA može se pratiti samo na informativnim lokusima, tada u uzorku nakon TKMS nedostaje primateljev nepodudaran gen HLA informativnog lokusa pa se može zaključiti da je došlo do gubitka nepodudarnog haplotipa HLA.

4.1. PRIKAZ REZULTATA ZA BOLESNIKA BROJ 1

Tipizacija gena HLA za bolesnika broj 1 (bolesnik s relapsom i gubitkom nepodudarnog haplotipa HLA) te rezultat njegovog kimerizma prikazani su na Slici 18. Bolesnik je testiran za gene lokusa HLA-A, -B i -C jer su bili informativni, dok su na lokusu HLA-DRB1 i -DQB1 bolesnik i haploidentični davatelj bili identični te se nije mogao pratiti gubitak haplotipa HLA. Bolesnik je u trenutku relapsa imao miješani kimerizam s 20% davateljevih stanica.

Analiza umnažanja gena lokusa HLA-A pokazala je pozitivne specifične reakcije 3 i 13 što ukazuje samo na prisustvo gena HLA-A*03, ali ne i gena HLA-A*30 jer je reakcija broj 15 koja je specifična za ovaj gen bila negativna.

Na lokusu HLA-C pozitivne specifične reakcije ukazuju na prisutnost gena HLA-C*05 i -C*07, ali ne i bolesnikova gena HLA-C*16 (specifične reakcije broj 13 i 18 su bile negativne reakcije).

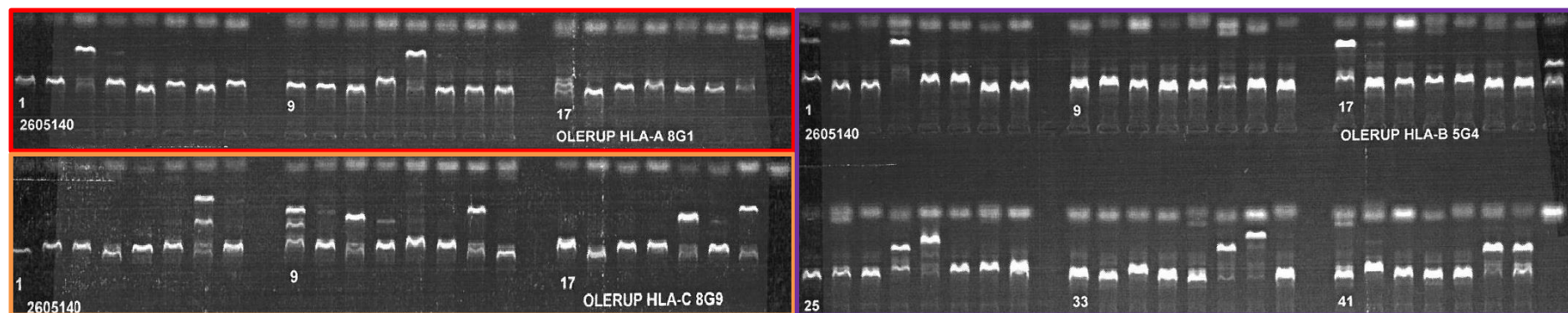
Rezultat tipizacije lokusa HLA-B bio je HLA-B*07, *44 i izostanak prisustva trećeg gena ovog lokusa, gena HLA-B*51.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je bolesnik broj 1 izgubio nepodudaran haplotip HLA-A*30~C*16~B*51~DRB1*11~DQB1*03.

	PRIMATELJ			DAVATELJ		INFORMATIVAN	KIMERIZAM	OČEKIVANI REZULTAT	DOBIVENI REZULTAT
HLA-A*	03	30	HLA-A*	03	03	DA	MK (80% P : 20% D)	HLA-A*03, *30	HLA-A*03, -
HLA-C*	05	16	HLA-C*	05	07	DA		HLA-C*05, *07, *16	HLA-C*05, *07
HLA-B*	44	51	HLA-B*	44	07	DA		HLA-B*07, *44, *51	HLA-B*07, *44
HLA-DRB1*	16	11	HLA-DRB1*	16	11	NE		/	/
HLA-DQB1*	05	03	HLA-DQB1*	05	03	NE		/	/

Kazalo: P-primatelj; D-davatelj; MK-miješani kimerizam

Slika 18. a) Prikaz tipizacije HLA bolesnika broj 1 s povratom bolesti i gubitkom nepodudarnog haplotipa HLA



Kazalo: HLA-A specifične reakcije br. 3, 13; HLA-C specifične reakcije br. 7, 9, 11, 15, 21, 23; HLA-B specifične reakcije br. 1, 4, 17, 24, 28, 29, 38, 39, 46, 47

Slika 18. b) Prikaz gela elektroforeze bolesnika broj 1

LOKUS A			LOKUS C			LOKUS B					
P	Gen HLA-A*	R	P	Gen HLA-C*	R	P	Gen HLA-B*	R	P	Gen HLA-B*	R
1	01, 36		1	01		1	07	+	25	40, 44, 48, 71	
2	02		2	02, 17		2	08		26	35, 37, 40, 41, 46, 47, 50	
3	03, 34	+	3	02, 03, 15		3	13		27	07, 41, 42	
4	01, 03, 11		4	03		4	13, 44	+	28	07, 35, 42, 45, 46, 54, 55, 56	+
5	23		5	03		5	14, 27		29	37, 40, 44	+
6	23, 80		6	02, 04		6	14		30	41, 44, 45, 51	
7	24		7	05	+	7	15		31	46, 53	
8	25, 66		8	06, 15		8	08		32	27, 47, 55, 56, 82	
9	32		9	07	+	9	15		33	15, 48	
10	26, 43		10	08		10	13		34	49, 59	
11	34, 66		11	02, 04, 05, 06, 15, 16, 17, 18	+	11	08, 38, 39		35	50, 51, 55, 56, 78	
12	31, 34		12	12		12	07, 15, 18		36	27, 51, 52, 57, 58	
13	03, 25, 26	+	13	04, 12, 16		13	37		37	40, 41, 45, 47	
14	29		14	06, 12		14	07, 70, 71, 75, 77		38	13, 27, 39, 44, 50, 52	+
15	30		15	02, 05, 15, 17	+	15	18		39	44, 45, 54	+
16	31, 32		16	14		16	27		40	35, 54, 55, 59, 78	
17	32		17	15		17	13, 15, 35, 44, 75, 77, 78	+	41	45, 49, 50, 56	
18	33		18	04, 16, 08		18	18		42	57	
19	74		19	17		19	15, 48, 82		43	56, 58	
20	68		20	01, 14, 18		20	37		44	18, 35, 51, 53, 78	
21	69		21	03, 04, 05, 15, 17, 18, 08	+	21	38, 39		45	15, 46, 73	
22	36		22	03		22	38		46	Bw4	+
23	80		23	06, 07, 16	+	23	38, 39		47	Bw6	+
24	NK		24	NK		24	07, 14, 15, 39, 41, 42, 45, 48, 50	+	48	NK	

Kazalo: P-pozicija na gelu; R-rezultat; NK-negativna kontrola; crveno osjenčano – negativna reakcija koja ukazuje na gubitak nepodudarnog haplotipa HLA

Slika 18. c) Očitavanje rezultata gel elektroforeze gena lokusa HLA-A, -C i -B za bolesnika broj 1

4.2. PRIKAZ REZULTATA ZA BOLESNIKA BROJ 2

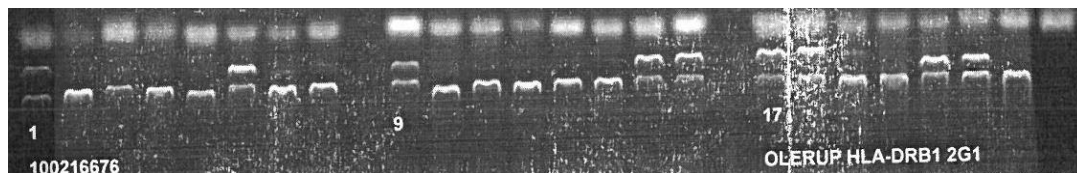
Analiza gena HLA bolesnika broj 2 i njegovog haploidentičnog davatelja pokazala je da su informativni svi lokusi HLA, osim lokusa HLA-A na kojem su primatelj i davatelj bili HLA identični (Slika 19).

Bolesnik je u trenutku relapsa imao miješani kimerizam, omjer primatelj : davatelj bio je 48% : 52%, a rezultat analize gena lokusa HLA-DRB1 pokazao je prisustvo tri gena (HLA-DRB1*01, *07, *13) što govori u prilog zaključku da bolesnik nije izgubio nepodudaran haplotip HLA (HLA-A*02~C*06~B*57~DRB1*07~DQB1*03). Iz fotografije gela prikazane na Slici 15 također se može vidjeti različiti intenzitet vrpce. Naime, vrpce u jažicama broj 1 i 9 koje su specifične za gene HLA-DRB1*01 i -DRB1*07 su slabijeg intenziteta od vrpce koje su specifične za gen HLA-DRB1*13 u jažicama broj 6, 15, 16 i 17. Gen HLA-DRB1*13 je kod bolesnika broj 2 prisutan u dvostruko većoj koncentraciji u stanicama nego druga dva gena HLA-DRB1 s obzirom da je taj gen dio haplotipa kojeg dijele bolesnik i njegov davatelj. Također, pozitivna je bila i reakcija 18 koja nije specifična za gene HLA-DRB1 primatelja i davatelja, ali je specifična za alel HLA-DRB4*01:03:01:02N, a prema poznatoj neravnoteži udruživanja pojavljuje se u haplotipu s HLA-DRB1*07~DQB1*03.

	PRIMATELJ			DAVATELJ		INFORMATIVAN	KIMERIZAM	OČEKIVANI REZULTAT	DOBIVENI REZULTAT
HLA-A*	68	02	HLA-A*	68	02	NE	MK (48% P : 52% D)	/	/
HLA-C*	16	06	HLA-C*	16	02	DA		/	/
HLA-B*	15	57	HLA-B*	15	27	DA		/	/
HLA-DRB1*	13	07	HLA-DRB1*	13	01	DA		HLA-DRB1*01, *07, *13	HLA-DRB1*01, *07, *13
HLA-DQB1*	06	03	HLA-DQB1*	06	05	DA		/	/

Kazalo: P-primatelj; D-davatelj; MK-miješani kimerizam

Slika 19. a) Prikaz tipizacije HLA bolesnika broj 2 s povratom bolesti i bez gubitka nepodudarnog haplotipa HLA



Kazalo: HLA-DRB1 specifične reakcije br. 1, 6, 9, 15, 16, 17, 18, 21 i 22

Slika 19. b) Prikaz gela elektroforeze bolesnika broj 2

LOKUS DRB1					
P	HLA-DRB1*	R	P	HLA-DRB1*	R
1	01	+	13	11	
2	01		14	12	
3	15		15	11, 13	+
4	16		16	08, 11, 13	+
5	03		17	03, 13, 14	+
6	03, 13	+	18	14	+
7	11, 13		19	14	
8	04		20	14	
9	07	+	21	DRB3	+
10	08		22	DRB4	+
11	09		23	DRB5	
12	10		24	NK	

Kazalo: P-pozicija na gelu; R-rezultat; NK-negativna kontrola

Slika 19. c) Očitavanje rezultata gel elektroforeze gena lokusa HLA-DRB1 za bolesnika broj 2

4.3. PRIKAZ REZULTATA ZA BOLESNIKA BROJ 3

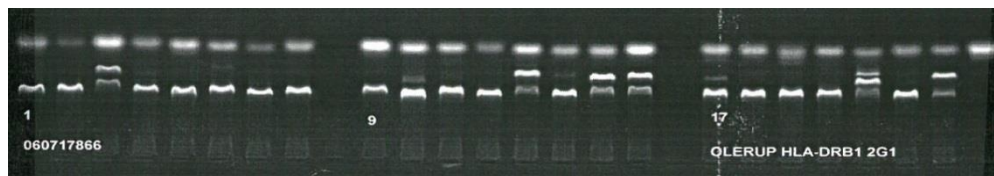
Na Slici 20 prikazani su tipizacija gena HLA i rezultat kimerizma za bolesnika broj 3. Kao i kod bolesnika broj 2, i kod bolesnika broj 3 informativni lokusi bili su HLA-C, -B, -DRB1 i -DQB1 dok lokus HLA-A nije bio informativan te je uzorak bolesnika broj 3 tipiziran za gene lokusa HLA-DRB1.

Rezultat kimerizma u trenutku relapsa bolesti bio je miješani kimerizam s malim postotkom primateljevih stanica (2%). S obzirom na mali udjel primateljevih stanica u uzorku koji je analiziran za gubitak nepodudarnog haplotipa HLA bilo je za očekivati da će gen HLA-DRB1*08 pokazati vrlo slabu pozitivnu reakciju (jažica broj 10). Očitavanje rezultata elektroforeze upravo je to i pokazalo, vrlo slabe reakcije za gen HLA-DRB1*08 i jake reakcije za gene HLA-DRB1*11 i -DRB1*15. Dobiveni rezultati ukazuju da su kod bolesnika broj 3 prisutna sva tri haplotipa HLA.

	PRIMATELJ			DAVATELJ		INFORMATIVAN	KIMERIZAM	OČEKIVANI REZULTAT	DOBIVENI REZULTAT
HLA-A*	24	02	HLA-A*	24	02	NE	MK (2% P : 98% D)	/	/
HLA-C*	12	14	HLA-C*	12	05	DA		/	/
HLA-B*	18	51	HLA-B*	18	44	DA		/	/
HLA-DRB1*	11	08	HLA-DRB1*	11	15	DA		HLA-DRB1*08, *11, *15	HLA-DRB1*08, *11, *15
HLA-DQB1*	03	04	HLA-DQB1*	03	06	DA		/	/

Kazalo: P-primatelj; D-davatelj; MK-miješani kimerizam

Slika 20. a) Prikaz tipizacije HLA bolesnika broj 3 s povratom bolesti i bez gubitka nepodudarnog haplotipa HLA



Kazalo: HLA-DRB1 specifične reakcije br. 3, 13, 15, 16, 21, 23 (jake reakcije); 10 (slaba reakcija)

Slika 20. b) Prikaz gela elektroforeze bolesnika broj 3

LOKUS DRB1					
P	HLA-DRB1*	R	P	HLA-DRB1*	R
1	01		13	11	+
2	01		14	12	
3	15	+	15	11, 13	+
4	16		16	08, 11, 13	+
5	03		17	03, 13, 14	
6	03, 13		18	14	
7	11, 13		19	14	
8	04		20	14	
9	07		21	DRB3	+
10	08	W	22	DRB4	
11	09		23	DRB5	+
12	10		24	NK	

Kazalo: P-pozicija na gelu; R-rezultat; NK-negativna kontrola, W-weak

Slika 20. c) Očitavanje rezultata gel elektroforeze gena lokusa HLA-DRB1 za bolesnika broj 3

4.4. PRIKAZ REZULTATA ZA BOLESNIKA BROJ 4

Kod bolesnika broj 4 svih pet lokusa HLA su bili informativni, a bolesnik je također testiran za gene lokusa HLA-DRB1. Tipizacija gena HLA-DRB1 i rezultat kimerizma za bolesnika broj 4 prikazani su na Slici 21. Bolesnik je u trenutku povrata bolesti imao miješani kimerizam sa 16% davateljevih stanica.

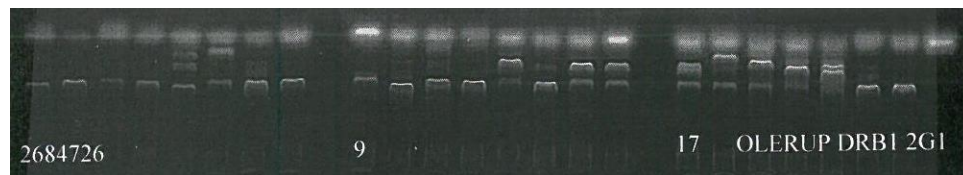
Bolesnikov haplotip HLA-A*03~C*04~B*35~DRB1*14~DQB1*05 dokazan je prisustvom gena HLA-DRB1*14 (reakcije broj 17, 18, 19 i 20 na gelu). Pozitivne specifične reakcije broj 13, 15 i 16 dokazuju prisustvo zajedničkog gena HLA-DRB1*11, odnosno haplotipa HLA-A*26~C*06~B*47~DRB1*11~DQB1*03. Haplotip HLA-A*01~C*07~B*08~DRB1*03~DQB1*02 dokazan je prisustvom gena HLA-DRB1*03 što se vidi na gelu jer su reakcije 5, 6 i 17 bile pozitivne.

S obzirom na prisutnost sva tri gena lokusa HLA-DRB1 u uzorku, može se zaključiti da kod bolesnika broj 4 nije došlo do gubitka nepodudarnog haplotipa HLA.

	PRIMATELJ			DAVATELJ		INFORMATIVAN	KIMERIZAM	OČEKIVANI REZULTAT	DOBIVENI REZULTAT
HLA-A*	26	03	HLA-A*	26	01	DA	MK (84% P : 16% D)	/	/
HLA-C*	06	04	HLA-C*	06	07	DA		/	/
HLA-B*	47	35	HLA-B*	47	08	DA		/	/
HLA-DRB1*	11	14	HLA-DRB1*	11	03	DA		HLA-DRB1*03, *11, *14	HLA-DRB1*03, *11, *14
HLA-DQB1*	03	05	HLA-DQB1*	03	02	DA		/	/

Kazalo: P-primatelj; D-davatelj; MK-miješani kimerizam

Slika 21. a) Prikaz tipizacije HLA bolesnika broj 4 s povratom bolesti i bez gubitka nepodudarnog haplotipa HLA



Kazalo: HLA-DRB1 specifične reakcije br. 5, 6, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21

Slika 21. b) Prikaz gela elektroforeze bolesnika broj 4

LOKUS DRB1					
P	HLA-DRB1*	R	P	HLA-DRB1*	R
1	01		13	11	+
2	01		14	12	
3	15		15	11, 13	+
4	16		16	08, 11, 13	+
5	03	+	17	03, 13, 14	+
6	03, 13	+	18	14	+
7	11, 13		19	14	+
8	04		20	14	+
9	07		21	DRB3	+
10	08		22	DRB4	
11	09		23	DRB5	
12	10		24	NK	

Kazalo: P-pozicija na gelu; R-rezultat; NK-negativna kontrola

Slika 21. c) Očitavanje rezultata gel elektroforeze gena lokusa HLA-DRB1 za bolesnika broj 4

4.5. PRIKAZ REZULTATA ZA BOLESNIKA BROJ 5

Za razliku od bolesnika broj 2, 3 i 4, kod bolesnika broj 5 uočen je gubitak nepodudarnog haplotipa HLA. Analiza njegove tipizacije gena HLA i kimerizma prikazana je na Slici 22.

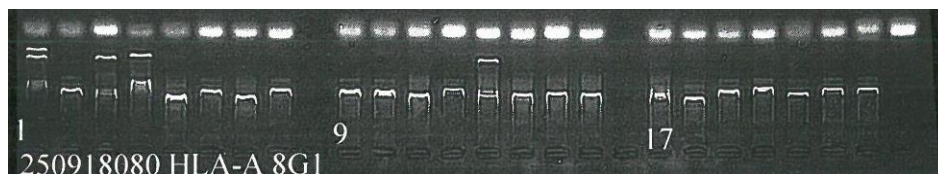
Gubitak nepodudarnog haplotipa HLA bilo je moguće pratiti jedino na lokusu HLA-A jer je lokus HLA-A jedini informativan jer su se mogla pratiti tri gena (HLA-A*01, -A*02 i -A*03). Na preostala četiri lokusa bolesnik je homozigot, dakle lokusi nisu informativni stoga nisu analizirani. Bolesnik je u trenutku relapsa imao miješani kimerizam s 98% davateljevih stanica. Pozitivna specifična reakcija broj 1 i 4 ukazuje na prisutnost davateljevog gena HLA-A*01, dok reakcije 3 i 13 ukazuju na prisutnost gena HLA-A*03 koji je zajednički primatelju i davatelju. Unatoč malom postotku primateljevih stanica (2%), za očekivati je da u uzorku bude prisutan i primateljev gen HLA-A*02 (reakcija broj 2), kao što je slučaj kod bolesnika broj 3 kod kojeg je rezultat praćenja kimerizma bio 2% primateljevih stanica. Međutim, pozicija 2 je pokazala jasno negativnu reakciju (prisutna samo kontrolna vrpca) koja ukazuje na gubitak gena HLA-A*02, odnosno cijelog haplotipa HLA kod bolesnika.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je bolesnik broj 5 izgubio nepodudaran haplotip HLA.

	PRIMATELJ			DAVATELJ		INFORMATIVAN	KIMERIZAM	OČEKIVANI REZULTAT	DOBIVENI REZULTAT
HLA-A*	03	02	HLA-A*	03	01	DA	MK (2% P : 98% D)	HLA-A*01, *02, *03	HLA-A*01, *03
HLA-C*	03	03	HLA-C*	03	07	NE		/	/
HLA-B*	15	15	HLA-B*	15	58	NE		/	/
HLA-DRB1*	04	04	HLA-DRB1*	04	08	NE		/	/
HLA-DQB1*	03	03	HLA-DQB1*	03	04	NE		/	/

Kazalo: P-primatelj; D-davatelj; MK-miješani kimerizam

Slika 22. a) Prikaz tipizacije HLA bolesnika broj 5 s povratom bolesti i gubitkom nepodudarnog haplotipa HLA



Kazalo: HLA-A specifične reakcije br. 1, 3, 4, 13

Slika 22. b) Prikaz gela elektroforeze bolesnika broj 5

LOKUS A					
P	HLA-A*	R	P	HLA-A*	R
1	01, 36	+	13	03, 25, 26	+
2	02		14	29	
3	03, 34	+	15	30	
4	01, 03, 11	+	16	31, 32	
5	23		17	32	
6	23, 80		18	33	
7	24		19	74	
8	25, 66		20	68	
9	32		21	69	
10	26, 43		22	36	
11	34, 66		23	80	
12	31, 34		24	NK	

Kazalo: P-pozicija na gelu; R-rezultat; NK-negativna kontrola;

crveno osjenčano – negativna reakcija koja ukazuje na gubitak nepodudarnog haplotipa HLA

Slika 22. c) Očitavanje rezultata gel elektroforeze gena lokusa HLA-DRB1 za bolesnika broj 5

4.6. PRIKAZ REZULTATA ZA BOLESNIKA BROJ 6

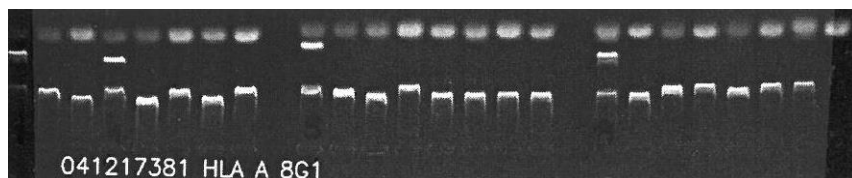
Tipizacija gena HLA provedena za bolesnika broj 6 kao i rezultat njegovog kimerizma prikazani su na Slici 23.

Bolesnik je u trenutku praćenja kimerizma bio 100% kimera, odnosno bile su prisutne samo stanice davatelja. Kod ovog bolesnika niti jedan od pet praćenih lokusa HLA nije bio informativan jer je bolesnik bio homozigot za sve lokuse. Ipak, napravljena je tipizacija gena lokusa HLA-A. Pozitivne specifične reakcije broj 1 i 4 upućuju na prisustvo gena HLA-A*01 koji je zajednički primatelju i davatelju, dok su reakcije 9 i 17 pozitivne zbog prisutnosti davateljevog gena HLA-A*32.

	PRIMATELJ			DAVATELJ		INFORMATIVAN	KIMERIZAM	OČEKIVANI REZULTAT	DOBIVENI REZULTAT
HLA-A*	01	01	HLA-A*	01	32	NE	PK (100% D)	HLA-A*01, *32	HLA-A*01, *32
HLA-C*	07	07	HLA-C*	07	03	NE		/	/
HLA-B*	08	08	HLA-B*	08	15	NE		/	/
HLA-DRB1*	03	03	HLA-DRB1*	03	11	NE		/	/
HLA-DQB1*	02	02	HLA-DQB1*	02	03	NE		/	/

Kazalo: P-primatelj; D-davatelj; PK-puni kimerizam

Slika 23. a) Prikaz tipizacije HLA bolesnika broj 6 s povratom bolesti i bez gubitka nepodudarnog haplotipa HLA



Kazalo: HLA-A specifične reakcije br. 1, 4, 9, 17

Slika 23. b) Prikaz gela elektroforeze bolesnika broj 6

LOKUS A					
P	HLA-A*	R	P	HLA-A*	R
1	01, 36	+	13	03, 25, 26	
2	02		14	29	
3	03, 34		15	30	
4	01, 03, 11	+	16	31, 32	
5	23		17	32	+
6	23, 80		18	33	
7	24		19	74	
8	25, 66		20	68	
9	32	+	21	69	
10	26, 43		22	36	
11	34, 66		23	80	
12	31, 34		24	NK	

Kazalo: P-pozicija na gelu; R-rezultat; NK-negativna kontrola

Slika 23. c) Očitavanje rezultata gel elektroforeze gena lokusa HLA-DRB1 za bolesnika broj 6

4.7. PRIKAZ REZULTATA ZA BOLESNIKA BROJ 7

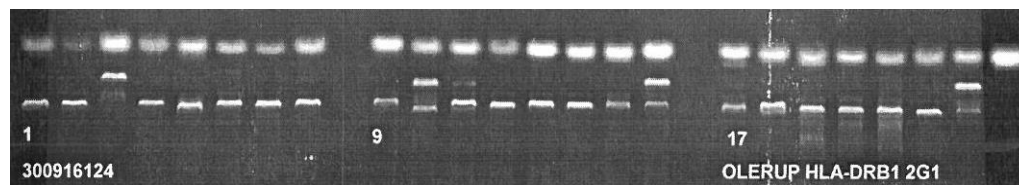
Slika 24 prikazuje tipizaciju gena HLA za bolesnika broj 7 te rezultat njegovog kimerizma.

Kod bolesnika broj 7 su, kao i kod bolesnika broj 6, u trenutku praćenja kimerizma bile prisutne samo davateljeve stanice, dakle bolesnik je bio 100% kimera. Informativni lokusi bili su HLA-B, -DRB1 i -DQB1, za razliku od ostalih lokusa koji nisu bili informativni jer su na tim lokusima bolesnik i haploidentični davatelj bili identični za gene HLA. Tipizacija gena HLA napravljena je na lokusu HLA-DRB1 te nam rezultat pokazuje prisutnost gena HLA-DRB1*15 koji je zajednički primatelju i davatelju (pozitivna specifična reakcija broj 3) te davateljevog gena HLA-DRB1*08 (pozitivne reakcije u jažici broj 10 i 16).

	PRIMATELJ			DAVATELJ		INFORMATIVAN	KIMERIZAM	OČEKIVANI REZULTAT	DOBIVENI REZULTAT
HLA-A*	03	01	HLA-A*	03	01	NE	PK (100% D)	/	/
HLA-C*	12	07	HLA-C*	12	07	NE		/	/
HLA-B*	07	08	HLA-B*	07	58	DA		/	/
HLA-DRB1*	15	04	HLA-DRB1*	15	08	DA		HLA-DRB1*08, *15	HLA-DRB1*08, *15
HLA-DQB1*	06	03	HLA-DQB1*	06	04	DA		/	/

Kazalo: P-primatelj; D-davatelj; PK-puni kimerizam

Slika 24. a) Prikaz tipizacije HLA bolesnika broj 7 s povratom bolesti i bez gubitka nepodudarnog haplotipa HLA



Kazalo: HLA-DRB1 specifične reakcije br. 3, 10, 16, 23

Slika 24. b) Prikaz gela elektroforeze bolesnika broj 7

LOKUS DRB1					
P	HLA-DRB1*	R	P	HLA-DRB1*	R
1	01		13	11	
2	01		14	12	
3	15	+	15	11, 13	
4	16		16	08, 11, 13	+
5	03		17	03, 13, 14	
6	03, 13		18	14	
7	11, 13		19	14	
8	04		20	14	
9	07		21	DRB3	
10	08	+	22	DRB4	
11	09		23	DRB5	+
12	10		24	NK	

Kazalo: P-pozicija na gelu; R-rezultat; NK-negativna kontrola

Slika 24. c) Očitavanje rezultata gel elektroforeze gena lokusa HLA-DRB1 za bolesnika broj 7

4.8. PRIKAZ REZULTATA ZA BOLESNIKA BROJ 8

Analiza gena HLA i rezultat praćenja kimerizma za bolesnika broj 8 prikazani na Slici 25 pokazali su da su informativni svi lokusi HLA, osim lokusa HLA-A na kojem su i primatelj i davatelj bili homozigoti.

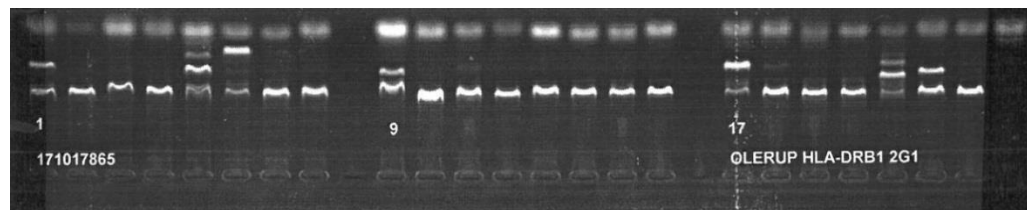
Kod bolesnika broj 8 je analizom rezultata kimerizma u trenutku povrata bolesti utvrđen miješani kimerizam sa 17% davateljevih stanica. Na slici gela vidljive su pozitivne specifične reakcije 5, 6 i 17 koje dokazuju prisustvo zajedničkog gena HLA-DRB1*03 odnosno haplotipa HLA-A*02~C*07~B*07~DRB1*03~DQB1*02. Haplotip HLA A*02~C*06~B*13~DRB1*07~DQB1*02 dokazan je prisustvom davateljevog gena HLA-DRB1*07 što se vidi na gelu jer je reakcija broj 9 bila pozitivna, dok pozitivna reakcija broj 1 ukazuje na prisutnost primateljvog gena HLA-DRB1*01.

S obzirom na to da je tipizacija gena lokusa HLA-DRB1 pokazala prisustvo sva tri gena lokusa HLA-DRB1 u uzorku, može se zaključiti da bolesnik nije izgubio nepodudaran haplotip HLA-A*02~C*04~B*15~DRB1*01~DQB1*05.

	PRIMATELJ			DAVATELJ		INFORMATIVAN	KIMERIZAM	OČEKIVANI REZULTAT	DOBIVENI REZULTAT
HLA-A*	02	02	HLA-A*	02	02	NE	MK (83% P : 17% D)	/	/
HLA-C*	07	04	HLA-C*	07	06	DA		/	/
HLA-B*	07	15	HLA-B*	07	13	DA		/	/
HLA-DRB1*	03	01	HLA-DRB1*	03	07	DA		HLA-DRB1*01, *03, *07	HLA-DRB1*01, *03, *07
HLA-DQB1*	02	05	HLA-DQB1*	02	02	DA		/	/

Kazalo: P-primatelj; D-davatelj; MK-miješani kimerizam

Slika 25. a) Prikaz tipizacije HLA bolesnika broj 8 s povratom bolesti i bez gubitka nepodudarnog haplotipa HLA



Kazalo: HLA-DRB1 specifične reakcije br. 1, 5, 6, 9, 17, 21, 22

Slika 25. b) Prikaz gela elektroforeze bolesnika broj 8

LOKUS DRB1					
P	HLA-DRB1*	R	P	HLA-DRB1*	R
1	01	+	13	11	
2	01		14	12	
3	15		15	11, 13	
4	16		16	08, 11, 13	
5	03	+	17	03, 13, 14	+
6	03, 13	+	18	14	
7	11, 13		19	14	
8	04		20	14	
9	07	+	21	DRB3	+
10	08		22	DRB4	+
11	09		23	DRB5	
12	10		24	NK	

Kazalo: P-pozicija na gelu; R-rezultat; NK-negativna kontrola

Slika 25. c) Očitavanje rezultata gel elektroforeze gena lokusa HLA-DRB1 za bolesnika broj 8

4.9. PRIKAZ REZULTATA ZA BOLESNIKA BROJ 9

Na Slici 26 prikazana je tipizacija gena HLA i rezultat kimerizma za posljednjeg bolesnika s relapsom (bolesnika broj 9) kod kojeg su informativni lokusi bili HLA-B, -DRB1 i -DQB1, dok se na lokusima HLA-A i -C nije mogao pratiti gubitak nepodudarnog haplotipa HLA jer je na tim lokusima bolesnik bio homozigot.

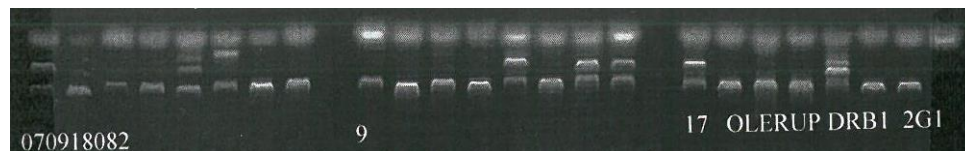
Bolesnik broj 9 je u trenutku relapsa imao miješani kimerizam, omjer primatelj : davatelj bio je 72% : 28%, a analiza umnažanja gena lokusa HLA-DRB1 pokazala je pozitivne specifične reakcije 13, 15 i 16 koje ukazuju na prisustvo bolesnikova gena HLA-DRB1*11, pozitivnu reakciju broj 1 za zajednički gen HLA-DRB1*01 te pozitivne reakcije broj 5, 6 i 17 koje dokazuju prisutnost davateljevog gena HLA-DRB1*03 u uzorku.

Na temelju dobivenih rezultata zaključuje se da ni kod bolesnika broj 9 nije uočen gubitak nepodudarnog haplotipa HLA (HLA-A*02~C*07~B*18~DRB1*11~DQB1*03).

	PRIMATELJ			DAVATELJ		INFORMATIVAN	KIMERIZAM	OČEKIVANI REZULTAT	DOBIVENI REZULTAT
HLA-A*	02	02	HLA-A*	02	24	NE	MK (72% P : 28% D)	/	/
HLA-C*	07	07	HLA-C*	07	07	NE		/	/
HLA-B*	44	18	HLA-B*	44	08	DA		/	/
HLA-DRB1*	01	11	HLA-DRB1*	01	03	DA		HLA-DRB1*01, *03, *11	HLA-DRB1*01, *03, *11
HLA-DQB1*	05	03	HLA-DQB1*	05	02	DA		/	/

Kazalo: P-primatelj; D-davatelj; MK-miješani kimerizam

Slika 26. a) Prikaz tipizacije HLA bolesnika broj 9 s povratom bolesti i bez gubitka nepodudarnog haplotipa HLA



Kazalo: HLA-DRB1 specifične reakcije br. 1, 5, 6, 13, 15, 16, 17, 21

Slika 26. b) Prikaz gela elektroforeze bolesnika broj 9

LOKUS DRB1					
P	HLA-DRB1*	R	P	HLA-DRB1*	R
1	01	+	13	11	+
2	01		14	12	
3	15		15	11, 13	+
4	16		16	08, 11, 13	+
5	03	+	17	03, 13, 14	+
6	03, 13	+	18	14	
7	11, 13		19	14	
8	04		20	14	
9	07		21	DRB3	+
10	08		22	DRB4	
11	09		23	DRB5	
12	10		24	NK	

Kazalo: P-pozicija na gelu; R-rezultat; NK-negativna kontrola

Slika 26. c) Očitavanje rezultata gel elektroforeze gena lokusa HLA-DRB1 za bolesnika broj 9

5. RASPRAVA

Haploidentična TKMS je metoda liječenja brojnih malignih bolesti i genetskih poremećaja krvotvornog sustava. Postupak se primjenjuje sve više i više, osobito u posljednjem desetljeću za sve one bolesnike koji nemaju podudarnog HLA srodnog ili nesrodnog davatelja KMS. Naime, ovakvim pristupom omogućeno je da skoro svi bolesnici imaju mogućnost liječenja alogeničnom TKMS. Međutim, nakon ovakve vrste alogenične TKMS često dolazi do povrata bolesti, koji je u približno 30% slučajeva praćen gubitkom primateljevog nepodudarnog haplotipa HLA (Vago i sur. 2009). Vrlo mali broj istraživanja se do sada bavio problematikom gubitka nepodudarnog haplotipa HLA i to onog kojeg ima bolesnik, a nema davatelj, te je stoga i cilj ovog rada bio utvrditi povezanost povrata bolesti i gubitka nepodudarnog haplotipa HLA u skupini od 28 bolesnika liječenih haploidentičnom TKMS u KBC Zagreb.

Jedna od velikih prednosti haploidentične TKMS je činjenica kako je unutar iste obitelji moguće imati više odgovarajućih davatelja (dijele s bolesnikom jedan haplotip HLA) te je stoga izvedivo napraviti izbor ne samo na osnovi podudarnosti HLA, već i na temelju dobi, odnosno spola. Naime, dosadašnji radovi ukazali su na to da su muški davatelji mlađe životne dobi bolji izbor u haploidentičnoj TKMS (Kongtim i Ciurea 2019). Rad Gonzalez-Vicent-a i suradnika je također potvrdio utjecaj dobi davatelja na ishod TKMS budući je pokazao kako dolazi do brže obnove imunološkog sustava te boljeg preživljenja kada bolesnik primi KMS od mlađeg davatelja (Gonzalez-Vicent i sur. 2017). I nedavno istraživanje Europskog društva za transplantaciju koštane srži (engl. *The European Society for Blood and Marrow Transplantation*, EBMT) pokazuje lošije preživljenje bolesnika s akutnom leukemijom kojima su davatelji bili stariji od 40 godina (Canaani i sur. 2018). U ovom radu prosječna životna dob davatelja bila je 40 godina što je u skladu s preporukama navedenih autora.

Provedena istraživanja u svijetu također govore u prilog izbora muškog davatelja, prije nego ženskog davatelja, zbog manjeg rizika od pojave GvHD-a i smrtnosti koja nije povezana s povratom bolesti (Kongtim i Ciurea 2019). Unutar naše skupine davatelja bilo je nešto više davatelja ženskog nego muškog spola (1,3:1), a razlog tome je mogući broj davatelja za svakog pojedinog bolesnika. U ovom radu su samo četiri bolesnika imala jednog mogućeg HLA haploidentičnog davatelja te nije niti bilo moguće napraviti bilo kakvu dodatnu

selekciju. S druge strane, unutar skupine od 24 bolesnika s više mogućih davatelja, kod njih 11 je izabran muški HLA haploidentični davatelj, dok je kod preostalih 13 bolesnika izabrana ženska HLA haploidentična davateljica. Kod pet od 13 bolesnika izbor je pao na žensku HLA haploidentičnu davateljicu zbog starije životne dobi muških davatelja, kod tri bolesnika nije bilo moguće izvesti haploidentičnu TKMS s muškim davateljem zbog medicinskih razloga, a pet bolesnika je imalo samo žene kao moguće HLA haploidentične davateljice.

U našem istraživanju povrat bolesti uočen je kod devet od 28 (32,1%) bolesnika uključenih u istraživanje što je nešto manje nego u istraživanjima provedenim prijašnjih godina. U istraživanju Vaga i suradnika iz 2009. godine povrat bolesti uočen je kod 39,5% od ukupno 43 bolesnika (Vago i sur. 2009), dok su autori iz Italije izvijestili o relapsu kod čak 40,8% od ukupno 169 bolesnika (Crucitti i sur. 2015). Dobivene razlike između našeg i istraživanja Crucitti-a i suradnika mogu biti rezultat različitog broja uključenih bolesnika jer je naša skupina bila približno šest puta manja.

Unutar bolesnika s povratom bolesti, kod dva od devet (22,2%) bolesnika utvrđeno je da je relaps praćen gubitkom nepodudarnog haplotipa HLA što je nešto manje nego u gore navedenim istraživanjima. U radu iz 2009. godine autori govore o gubitku nepodudarnog haplotipa HLA kod 29,4% bolesnika s relapsom (Vago i sur. 2009), dok je druga grupa uočila gubitak nepodudarnog haplotipa kod 33,3% bolesnika s relapsom (Crucitti i sur. 2015). Naše odstupanje od rezultata navedenih istraživanja može se objasniti manjim uzorkom bolesnika uključenih u istraživanje te bi stoga u daljnjim istraživanjima trebalo povećati broj ispitanika.

Treba istaknuti značaj ovog istraživanja u svjetlu metode kojom smo dokazivali gubitak nepodudarnog haplotipa HLA kod povrata bolesti, metodom PCR-SSP. Broj radova (do sada dostupnih) je vrlo oskudan. U prije spomenutim radovima za praćenje je korištena metoda umnažanja mikrosatelitskih lokusa lančanom reakcijom polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction-Short Tandem Repeats*, PCR-STR) (Vago i sur. 2009) ili metoda qPCR (Crucitti i sur. 2015). Naša ideja je bila da uz pomoć metode PCR-SSP koja je precizna, brza i informativna te ne zahtijeva dodatnu opremu ni testove koji se i inače koriste u određivanju gena HLA dobijemo pouzdane informacije o gubitku nepodudarnog haplotipa HLA.

Gubitak nepodudarnog haplotipa HLA mogao se pratiti samo na informativnim lokusima, odnosno na onim lokusima na kojima se geni HLA primatelja i davatelja razlikuju. U najvećem broju parova, kod čak sedam od devet parova (77,8%) informativni gen HLA bio

je gen na lokusu HLA-B, kod šest (66,7%) bolesnika gen na lokusu HLA-DRB1, odnosno gen na lokusu HLA-DQB1, a kod pet (55,6%) bolesnika to je bio gen na lokusu HLA-C. Iznenadjuće je da su geni lokusa HLA-A bili informativni kod najmanjeg broja parova (samo kod tri - 33,3%) s obzirom da je taj lokus polimorfnije nego lokusi HLA-C, HLA-DRB1 i HLA-DQB1. Rezultat o najvećoj informativnosti gena lokusa HLA-B je u skladu s polimorfizmom na tom lokusu, naime lokus HLA-B je najpolimorfnije od svih poznatih lokusa HLA, bilo razreda I ili razreda II.

Također treba spomenuti da smo unutar naše skupine bolesnika s povratom bolesti samo kod jednog bolesnika (bolesnik broj 6) imali slučaj da niti jedan od pet praćenih lokusa HLA nije bio informativan. Međutim, kod tog bolesnika rezultat praćenja kimerizma bio je potpuna kimerizacija i nije bilo niti moguće da je riječ o gubitku primateljevog nepodudarnog haplotipa HLA. Za tog bolesnika, odnosno u takvim slučajevima miješanog kimerizma testiranje bi trebalo proširiti na dodatne visokopolimorfne lokuse HLA (npr. HLA-DPB1) ili testirati bolesnika i njegovog davatelja metodom PCR-SSP na visokoj razini, odnosno na razini alela.

Zanimljivo je spomenuti da je navedeni bolesnik (bolesnik broj 6) bio potpuni homozigot za sve lokuse HLA te da je nosio jedan od najčešćih i visokokonzerviranih haplotipova HLA (HLA-A*01~C*07~B*08~DRB1*03~DQB1*02). To je najčešći haplotip HLA, ne samo u našoj populaciji, već i u velikom broju populacija europskog podrijetla (<http://www.allelefrequencies.net/default.asp>). Vjerojatnost da se navedeni genotip HLA pojavi u našoj populaciji iznosi 0,2%, odnosno 2 : 1000 ispitanika, te bi kod takvog vrlo malog broja bolesnika trebalo koristiti neku drugu metodu, kao što je npr. PCR-STR.

Metoda PCR-SSP se pokazala kao vrlo osjetljiva jer je bilo moguće odrediti prisutnost gena HLA u uzorku koji je imao postotak primateljevih stanica samo 2% (Slika 20, reakcija broj 10), a kod kojeg nije došlo do gubitka nepodudarnog haplotipa HLA. Treba istaknuti da bi u daljnjim istraživanjima koja će pratiti gubitak nepodudarnog haplotipa HLA ovu metodu trebalo testirati i na manjem postotku stanica bolesnika (npr. 1%).

6. ZAKLJUČAK

1. U skupini od 28 bolesnika povrat bolesti pojavio se kod 32,14% bolesnika liječenih haploidentičnom TKMS.
2. Gubitak nepodudarnog haplotipa HLA uočen je u 22,22% slučajeva povrata bolesti.
3. Tipizacija gena HLA sedmero bolesnika s relapsom bolesti u skladu je s rezultatima praćenja kimerizma, dok se kod dva bolesnika tipizacija gena HLA razlikuje od nalaza kimerizma zbog gubitka nepodudarnog haplotipa HLA.
4. Uočena je nešto manja pojava gubitka nepodudarnog haplotipa HLA kod bolesnika s povratom bolesti u odnosu na dostupne podatke iz literature što se objašnjava manjim brojem bolesnika uključenih u istraživanje.
5. Istraživanjem je utvrđena mogućnost primjene metode PCR-SSP u analizama gubitka nepodudarnog haplotipa HLA.

7. LITERATURA

Andreis I., Batinić D., Čulo F., Grčević D., Lukinović-Škudar V., Marušić M., Taradi M., Višnjić D. (2010): *Imunologija*. Medicinska naklada, Zagreb.

Bader P., Niethammer D., Willasch A., Kreyenberg H., Klingebiel T. (2005): How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplantation* **35**(2): 107-119.

Blanquer M., Moraleda M. J. (2017): Graft Failure and Rejection in Haploidentical Stem Cell Transplantation. U: Demirer, T. (ur.) *Haploidentical Stem Cell Transplantation, Stem Cell Biology and Regenerative Medicine*. Cham, Humana Press, str. 17-41.

Bunce M., Passey B. (2013): HLA typing by sequence-specific primers. *Methods Mol Biol.* **1034**: 147-159.

Canaani J., Savani B. N., Labopin M., Huang X. J., Ciceri F., Arcese W., Koc Y., Tischer J., Blaise D., Gülbas Z., Van Lint M. T., Bruno B., Mohty M., Nagler A. (2018): Donor age determines outcome in acute leukemia patients over 40 undergoing haploidentical hematopoietic cell transplantation. *Am J Hematol.* **93**(2): 246-253.

Choo S. Y. (2007): The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Med J.* **48**(1): 11-23.

Ciurea S. O., Bittencourt M. C. B., Milton D. R., Cao K., Kongtim P., Rondon G., Chen J., Konopleva M., Perez J. M. R., El Shazly M. F., Aljadayeh M., Alvarez M., Im J., Al-Atrash G., Mehta R., Popat U., Bashir Q., Oran B., Hosing C. M., Khouri I. F., Kebriaei P., Champlin R. E. (2018): Is a matched unrelated donor search needed for all allogeneic transplant candidates? *Blood Adv.* **2**(17): 2254-2261.

Crucitti L., Crocchiolo R., Toffalori C., Mazzi B., Greco R., Signori A., Sizzano F., Chiesa L., Zino E., Lupo Stanghellini M. T., Assanelli A., Carrabba M. G., Markt S., Marcatti M., Bordignon C., Corti C., Bernardi M., Peccatori J., Bonini C., Fleischhauer K., Ciceri F., Vago L. (2015): Incidence, risk factors and clinical outcome of leukemia relapses with loss of the mismatched HLA after partially incompatible hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia* **29**: 1143-1152.

Deshpande A. (2017): The human leukocyte antigen system...simplified. *Glob J Transfus Med.* **2**: 77-88.

Fuchs E. J. (2012): Haploidentical transplantation for hematologic malignancies: where do we stand? *ASH Education Book* **2012(1)**: 230-236.

Gonzalez-Vicent M., Molina B., Deltoro N., Sevilla J., Vicario J. L., Castillo A., Ramirez M., Diaz M. A. (2017): Donor age matters in T-cell depleted haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients: Faster immune reconstitution using younger donors. *Leuk Res.* **57**: 60-64.

Grubić Z. (2012): Tipizacija HLA u procjeni kompatibilnog darivatelja. *Bilten Krohema* **4(2)**: 42-44.

Grubić Z. (2014): Praćenje kimerizma u programu transplantacije krvotvornih matičnih stanica. *Bilten Krohema* **6(1)**: 35-40.

Hatzimichael E., Tuthill M. (2010): Hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cells Cloning* **3**:105-117.

Imus P. H., Blackford A. L., Bettinotti M., Iglehart B., Dietrich A., Tucker N., Symons H., Cooke K. R., Luznik L., Fuchs E. J., Brodsky R. A., Matsui W. H., Huff C. A., Gladstone D., Ambinder R. F., Borrello I. M., Swinnen L. J., Jones R. J., Bolaños-Meade J. (2017): Major Histocompatibility Mismatch and Donor Choice for Second Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* **23(11)**: 1887-1894.

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.

Klein J., Sato A. (2000): The HLA System. *N Engl J Med.* **343**: 702-709.

Kongtim P., Ciurea S. O. (2019): Who is the best donor for haploidentical stem cell transplantation? *Seminars in Hematology* **56**: 194-200.

Lukanov T., Ivanova-Shivarova M., Naumova E. (2018): Monitoring of Chimerism Following Hematopoietic Stem Cell Transplantation. U: Sharma, R. (ur.) *Stem Cells in Clinical Practice and Tissue Engineering*. IntechOpen, str. 78-93.

Parmesar K., Raj K. (2016): Haploidentical Stem Cell Transplantation in Adult Haematological Malignancies. *Adv Hematol.* **2016**: 1-16.

Piemontese S., Boumendil A., Labopin M., Schmid C., Ciceri F., Arcese W., Koc Y., Gulbas Z., Tischer J., Bruno B., Wu D., Blaise D., Beelen D., Irrera G., Ruggeri A., Houhou M., Mohty M., Nagler A. (2019): Leukemia relapse following unmanipulated haploidentical transplantation: a risk factor analysis on behalf of the ALWP of the EBMT. *J Hematol Oncol.* **12(1)**: 68.

Reveille J. D. (2019): Spondyloarthritis. U: Rich, R.R. (ur.) *Clinical Immunology, Principles and Practice.* Elsevier, str. 769-787.

Serventi-Seiwerth R., Mikulić M., Mrić M., Grubić Z., Bojanić I., Štingl K., Labar B. (2011): Transplantacija alogenih krvotvornih matičnih stanica od HLA podudarnog nesrodnog darivatelja. *Medicina Fluminensis* **47(4)**: 381-388.

Štingl Janković K. (2019): Quantitative PCR Technology in Chimerism Status Evaluation After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Molecular and Experimental Biology in Medicine* **1**: 44-47.

Vago L., Ciceri F. (2017): Choosing the Alternative. *Biol Blood Marrow Transplant.* **23(11)**: 1813-1814.

Vago L., Perna S. K., Zanussi M., Mazzi B., Barlassina C., Stanghellini M. T., Perrelli N. F., Cosentino C., Torri F., Angius A., Forno B., Casucci M., Bernardi M., Peccatori J., Corti C., Bondanza A., Ferrari M., Rossini S., Roncarolo M. G., Bordignon C., Bonini C., Ciceri F., Fleischhauer K. (2009): Loss of Mismatched HLA in Leukemia after Stem-Cell Transplantation. *N Engl J Med.* **361(5)**: 478-488.

Internetski izvori:

<https://wmnda.info/>, pristupljeno 03.10.2019.

<http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>, pristupljeno 19.11.2019.

<https://www.gendx.com/files/secure/1950-20171213-kmrtype-kmrtrack-ifu-ce-v1/file>, pristupljeno 20.11.2019.

<http://www.allelefreqencies.net/>, pristupljeno 21.11.2019.

8. ŽIVOTOPIS

Osnovni osobni podaci

Datum i mjesto rođenja: 04.06.1994., Beč, Republika Austrija

Obrazovanje

-listopad 2017. - danas – Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, diplomski studij eksperimentalne biologije, smjer fiziologija i imunobiologija

-listopad 2014. - rujan 2017. – Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, preddiplomski studij biologije: sveučilišna prvostupnica biologije

-rujan 2009. - srpanj 2013. – V. gimnazija, Zagreb, prirodoslovno-matematička gimnazija

Osobne vještine

-jezici: hrvatski (materinski), engleski, njemački

-odlične organizacijske sposobnosti i komunikacijske vještine, sposobnost timskog te samostalnog rada, odgovornost prema poslu, interes za kontinuiranom edukacijom, unapređenjem znanja i vještina

-digitalne vještine: MS Office, Internet, Outlook, Pascal, Java, Graphpad, statistički program R, Latex, Overleaf

-vozačka dozvola B kategorije

Ostale informacije

-sudjelovanje u projektu „Noć biologije“, PMF, Zagreb (2017. g.)

-LabAnim tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama, PMF, Zagreb (2018. - 2019. g.)

-laboratorijska stručna praksa u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, Zagreb (2018. g.)

-sudjelovanje na kongresima: „Vitamini“ (2015. g.) i „Mikrobiota i probiotici“ (2019. g.) - inPharma, Zagreb; East-West Immunogenetics Conference (2019. g.), Zagreb; Simpozij studenata bioloških usmjerenja (2018. i 2019. g.) – PMF, Zagreb; Simpozij studenata farmacije i medicinske biokemije (2019. g.) – Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb