

Odabir davatelja u liječenju transplantacijom krvotvornih matičnih stanica

Bokšić, Antonia

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:646371>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-09**

Repository / Repozitorij:



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

[Repository of the University Department for Health Studies, University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Antonia Bokšić

**ODABIR DAVATELJA U LIJEČENJU
TRANSPLANTACIJOM KRVOTVORNIH MATIČNIH
STANICA**

Završni rad

Split, 2015.god.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Antonia Bokšić

**ODABIR DAVATELJA U LIJEČENJU
TRANSPLANTACIJOM KRVOTVORNIH MATIČNIH
STANICA**

**SELECTION OF DONORS FOR TRANSPLANTATION OF
BLOOD STEM CELLS**

Završni rad / Bachelor thesis

Mentor:

Dr.sc. Esma Čečuk Jeličić

Split, 2015.god.

Popis kratica

HLA- *humani leukocitni antigeni*

G-CSF- *engl. Granulocyte colony-stimulating factor*

GVHD- *engl. Graft versus Host Disease; bolest transplantata protiv primatelja*

TKMS- *transplantacija krvotvornih matičnih stanica*

GVT- *engl. Graft versus Tumor*

MHC- *engl. Major Histocompatibility Complex, glavni sustav tkivne snošljivosti*

Tc- *citotoksični limfociti*

Th- *engl. T helpers; pomoćnički limfociti*

EDTA- *engl. Ethylenediaminetetraacetic acid; etilendiamintetraoctena kiselina*

MLCT- *engl. Microlymphocytotoxicity test; test mikrolimfocitotoksičnosti*

PCR SSP- *engl. Polymerase Chain Reaction-Single Specific Primer*

MLC- *engl. Mixed Lymphocyte Culture; test miješanih limfocita*

BMDW- *engl. Bone Marrow Database Worldwide*

ALL- *engl. Acute lymphatic leukemia; akutna limfatična leukemija*

PCR SSO- *engl. Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotide*

Sadržaj

1. UVOD	6
1.1. Krvotvorne matične stanice	7
1.2. Izvori krvotvornih matičnih stanica.....	7
1.2.1. Koštana srž.....	8
1.2.2. Periferna krv	8
1.2.3. Krv iz pupkovine	8
1.3. Alogenična transplantacija krvotvornih matičnih stanica (TKMS).....	9
1.4. Autologna transplantacija krvotvornih matičnih stanica	10
1.5. Bolest transplantata protiv primatelja (GvHD)	11
1.6. Sustav HLA	11
1.6.1. Antigeni HLA razreda I	13
1.6.2. Antigeni HLA razreda II.....	14
1.7. Davatelji krvotvornih matičnih stanica	15
1.8. Postupak pronalaženja davatelja krvotvornih matičnih stanica unutar obitelji	16
1.9. Postupak pronalaženja nesrodnih davatelja krvotvornih matičnih stanica.....	17
1.10. Tipizacija HLA za izbor nesrodnog davatelja	19
1.11. Prijava nesrodnih davatelja i upis u Registar dobrovoljnih davatelja	20
2. CILJ RADA	22
3. MATERIJALI I METODE	23
3.1. MATERIJALI.....	23
3.2. METODE	23
3.2.1. Test mikrolimfocitotoksičnosti (MLCT)	24
3.2.2. Metoda PCR-SSO (Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotids).....	25
4. REZULTATI.....	29

5. RASPRAVA	31
6. ZAKLJUČCI.....	32
7. LITERATURA	33
8. SAŽETAK.....	35
9. SUMMARY	36
10. ŽIVOTOPIS.....	37

1. UVOD

Transplantacija krvotvornih matičnih stanica široko je prihvaćena terapijska opcija za liječenje raznih vrsta malignih bolesti (leukemije, limfomi, mijelomi) i ne-malignih bolesti (Fanconijeva anemija, talasemije, aplastične anemije, imunodeficijencije). Postoje dvije osnovne vrste transplantacije krvotvornih matičnih stanica: autologna i alogenična. Izbor između autologne i alogenične transplantacije ponajprije ovisi o vrsti bolesti koja se liječi, a zatim i dobi bolesnika, raspoloživosti davatelja kao i odluci transplantacijskog tima centra gdje se bolesnik liječi. Alogenične transplantacije matičnih krvotvornih stanica od HLA (humani leukocitni antigeni) podudarnog davatelja pružaju mogućnost optimalnog liječenja velikog broja bolesnika s bolestima krvotvornog sustava. Kod alogenične transplantacije bolesnik prima matične stanice od zdravog HLA podudarnog davatelja. Obično se radi o krvnom srodniku, bratu ili sestri, koji je tkivno podudaran. U tom slučaju govorimo o HLA identičnom srodnom davatelju hematopoetskih matičnih stanica (MRD- Matched Related Donor). Ako ne postoji srodan davatelj onda se preko banke davatelja (Bone Marrow Donors WorldWide) (Slika 1.) traži nesrodni davatelj koji je fenotipski HLA podudaran (MUD- Matched Unrelated Donor). Danas u svijetu postoji 26 157 303 dobrovoljnih davatelja iz 74 nacionalna registra iz 53 zemlje i 51 banke umbilikalne krvi iz 34 zemlje. ⁽¹⁾



Slika 1. BMDW

Izvor: WEB ⁽¹⁸⁾

1.1. Krvotvorne matične stanice

Pluripotentne matične stanice su ishodišne stanice svim ostalim stanicama. Način na koji se one diferenciraju još nije jasan, ali dijeljenjem matične stanice nova stanica može ostati matična ili postati drugi tip stanice sa specijaliziranom funkcijom. Ono što razlikuje matične stanice od ostalih je što nisu specijalizirane, imaju mogućnost samoobnavljanja odnosno proliferacije i to kroz duže vrijeme. Također, pod određenim uvjetima mogu biti inducirane da postanu stanice specifične za neki organ ili tkivo. Matične stanice koje sudjeluju u stvaranju krvnih i imunih stanica u koštanoj srži zovu se hematopoetske odnosno krvotvorne matične stanice koje nisu morfološki definirane, ali izgledom podsjećaju na mali ili srednje veliki limfocit. Odgovorne su za stalno obnavljanje krvi tako što proizvode bilijune novih krvnih stanica svaki dan. Izvori krvotvornih matičnih stanica su koštana srž, periferna krv, umbilikalna krv te fetalni hematopoetski sustav i embrijske matične stanice važni u istraživanju, ali ne i u kliničkoj upotrebi. Postoje dvije vrste hematopetskih matičnih stanica : dugoročne matične stanice koje imaju sposobnost samoobnavljanja i kratkoročne ili progenitorske koje se mogu odmah obnoviti, ali pod normalnim okolnostima to ne mogu raditi kroz duže vrijeme. Progenitorske stanice su relativno nezrele stanice koje su prekursori diferenciranim stanicama određenog tkiva te mogu proliferirati, ali s ograničenom sposobnošću diferenciranja u određeni tip stanice. ⁽²⁾

1.2. Izvori krvotvornih matičnih stanica

Izvor krvotvornih matičnih stanica za transplantaciju može biti koštana srž, mobilizirana periferna krv i krv iz pupkovine.

1.2.1. Koštana srž

Matične stanice iz koštane srži prikupljaju se iz najčešće zdjelične kosti dok je davatelj pod anestezijom i nakon njihove ekstrakcije moraju proći kroz niz filtera da se uklone fragmenti tkiva ili kosti i zatim se stave u plastičnu vrećicu iz koje dalje mogu infuzijom ući u venu primatelja. Ovaj zahvat je relativno bolan za davatelja koji može nekoliko dana osjećati bol u donjem dijelu leđa, ali i razviti anemiju zbog izgubljenih crvenih krvnih stanica no unatoč tome oporavak za davatelja je brz i uspješan i nema težih komplikacija. ⁽³⁾

1.2.2. Periferna krv

Dobivanje matičnih stanica iz periferne krvi je postupak koji se sve češće koristi umjesto transplantacije koštane srži pogotovo kod autolognih transplantacija. Proces započinje kada davatelj uzima lijek koji potiče odlazak matičnih stanica iz koštane srži u perifernu krv (G-CSF) nakon čega krv iz davateljeve vene prolazi kroz aparat za aferezu gdje se krv razdvaja u četiri komponente : crvene krvne stanice, plazmu, bijele krvne stanice i trombocite. Leukociti i trombociti koji sadrže matične stanice se prikupljaju dok se eritrociti i plazma vraćaju u krv davatelja. Ovaj postupak traje otprilike 4-5 sati, a davatelj mora doći na aferezu više puta da bi se prikupilo dovoljno stanica. Postupak je bezbolan iako davatelj, kratko vrijeme nakon postupka, može osjećati glavobolje i simptome prehlade nakon uzimanja G-CSF lijeka. ⁽³⁾⁽⁴⁾

1.2.3. Krv iz pupkovine

Krv pupčane vrpce djeteta predstavlja bogat izvor matičnih stanica zbog čega se sve više potiče buduće majke da doniraju krv iz pupkovine bankama umbilikalne krvi (javne banke) ili da je zamrznu i čuvaju za potrebe vlastite obitelji (privatne banke umbilikalne krvi). Postoje prednosti umbilikalne krvi u odnosu na perifernu krv i koštanu srž, a to su dostupnost krvi koja je već testirana i spremna za upotrebu, manja

vjerojatnost GvHD-a (*Graft versus Host Disease*), manji rizik od prijenosa infekcija i veća mogućnost pronalaska davatelja. Za transplantaciju KMS (krvotvornih matičnih stanica) iz krvi pupkovine podudarnost u genima sustava HLA između primatelja i davatelja može biti manja (4/6) s obzirom na specifičnost krvotvornih matičnih stanica iz pupkovine. ^{(3) (4)}

1.3. Alogenična transplantacija krvotvornih matičnih stanica (TKMS)

Alogenična transplantacija standardna je metoda liječenja mnogih zloćudnih tumora (leukemije, limfomi, mijelomi) i nekih prirodnih i stečenih bolesti koštane srži, a od HLA podudarnog davatelja pruža mogućnost optimalnog liječenja velikom broju bolesnika s gore navedenim bolestima krvotvornog sustava.

Alogeničnom TKMS zamjenjuje se krvotvorno tkivo domaćina onim od davatelja, a indicirana je u bolesnika u kojih bi nastavak liječenja konvencionalnom kemoterapijom doveo do značajno kraćeg preživljavanja bez znakova bolesti (Slika 2). Uspješnost alogenične transplantacije ovisi o nizu čimbenika:

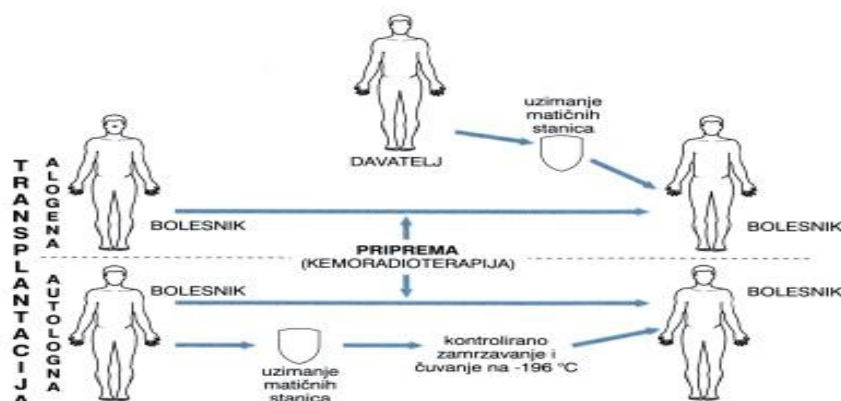
- » dijagnozi
- » stadiju bolesti
- » izvoru krvotvornih matičnih stanica
- » podudarnosti sustava HLA
- » dobi davatelja (veći prinos KMS od mlađih davatelja)
- » spolu davatelja (veća incidencija GvHD u kombinaciji žena- davatelj muškarcu)
- » citomegalovirus status davatelja

Najbolje rezultate liječenja alogeničnom TKMS postižu bolesnici liječeni u ranoj fazi bolesti.

Za pacijente koji su stariji, imaju infekciju ili brzo progresivnu bolest obično se ne uzima u obzir alogenična TKMS jer oni često ne mogu podnijeti pre-transplantacijske postupke pogotovo ako im ne funkcioniraju unutarnji organi pa se za ove pacijente može koristiti alogenična TKMS smanjenog intenziteta (mini-alotransplantacija). Ovo je modificirana verzija alogenične transplantacije u kojoj su smanjene doze zračenja ili kemoterapije, ali su dovoljno visoke da suprimiraju imuni sustav i omoguće *graft versus tumor* efekt (GVT).^{(5) (6)}

1.4. Autologna transplantacija krvotvornih matičnih stanica

Autologna TKMS postupak je zamjene hematopoetskog tkiva pacijenta njegovim vlastitim krvotvornim matičnim stanicama. Pacijent mora proći kroz visoke doze zračenja ili kemoterapije da bi se kontrolirala bolest i smanjio broj tumorskih stanica u koštanoj srži i krvi (Slika 2). U fazi kad je pacijent u remisiji uzmu se njegove matične stanice i zamrznu. Pacijent opet prima visoku dozu zračenja nakon čega mu se kroz venu ubrizgaju njegove prethodno uzete krvotvorne matične stanice. Za razliku od alogenične transplantacije, kod autologne ne postoji rizik od GvHD-a, ali ni od GVT-a kada stanice davatelja napadaju tumorske stanice. Međutim, kao i kod alogenične TKMS postoji opasnost od komplikacija zbog kemoterapije ili zračenja te mogućnost stvaranja infekcije zbog smanjenog broja krvnih stanica.⁽⁷⁾



Slika 2.

Izvor : WEB

1.5. Bolest transplantata protiv primatelja (GvHD)

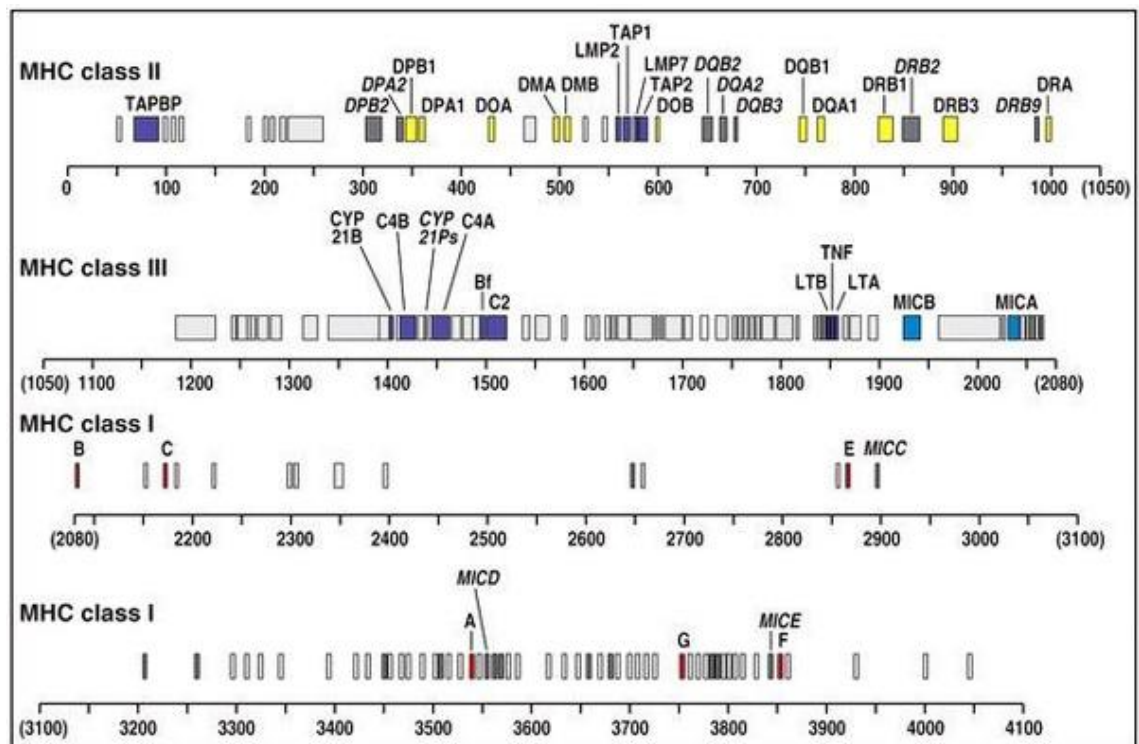
GvHD je bolest u kojoj nakon alogenične transplantacije imunokompetentne stanice davatelja napadaju stanice primatelja što uzrokuje simptome poput osipa, mučnine, povraćanja, abdominalnih grčeva, žutice uzrokovane oštećenjem jetre. Može se raditi o akutnoj ili kroničnoj bolesti ovisno o razlici tkiva između pacijenta i davatelja. Akutni GvHD se pojavljuje ubrzo nakon transplantacije i može ugroziti život pacijenta dok se kronični GvHD događa otprilike tri ili više mjeseci nakon transplantacije i to obično kod pacijenata koji su patili od akutnog GvHD-a. Simptomi su obično vezani uz kožu : osip, svrbež, boja kože potamni, a površina postaje tvrda. Ostali simptomi su gubitak kose, stvaranje ulkusa, problemi s plućima te oštećenje jetre. Da bi se ovo spriječilo razvijeni su lijekovi i terapije koji preveniraju ili smanjuju učinke GvHD-a, a to su imunosupresivni lijekovi, deplecija T-limfocita davatelja i što veća podudarnost u genima HLA. ⁽⁸⁾

1.6. Sustav HLA

Sustav HLA naziv je za glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. Major Histocompatibility Complex, MHC) u čovjeka. Sadrži velik broj gena koji sudjeluju u imunološkoj reakciji. Glavna zadaća imunološkog sustava je razlikovanje vlastitog od tuđeg zbog održavanja integriteta vlastitog organizma i pokretanje učinkovitog imunološkog odgovora na tuđe antigene.

Uloga sustava HLA je regulacija imunološkog prepoznavanja stranog antigena (imunogena), regulacija proizvodnje specifičnih protutijela, kontrola sinteze tkivnih antigena te regulacija proizvodnje komplementa i drugih medijatora imunološke reakcije. Sustav HLA nalazi se na kraćem kraku kromosoma 6, na odsječku 6p21.1-21.3 i obuhvaća otprilike 4 milijuna parova baza. Regija HLA dijeli se u 3 subregije :

- geni HLA razreda I koji su smješteni telomerično,
- geni HLA razreda II smješteni centromerično
- geni HLA razreda III smješteni između njih (Slika 3.)



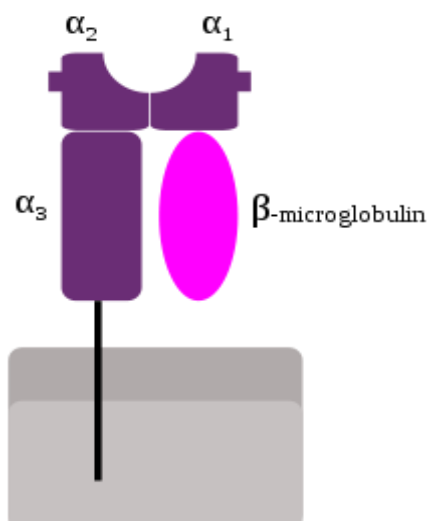
Slika 3. Smještaj regije HLA na kraćem kraku kromosoma 6

Izvor: WEB⁽¹⁹⁾

Produkti gena HLA razreda I i II su antigeni HLA podijeljeni u dva razreda dok su geni HLA razreda III odgovorni za sintezu komponenti komplementa. Osobitosti sustava HLA su nepravilna tkivna zastupljenost, pravilna segregacija, crossing over, rasna i populacijska specifičnost te izraziti polimorfizam odnosno velika raznolikost u nukleotidima između pojedinih alela funkcionalnih gena HLA.⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾

1.6.1. Antigeni HLA razreda I

Antigeni HLA razreda I kodirani su genima koji se nalaze na kraćem kraku kromosoma 6, a po građi su glikoproteini. Nalaze se na svim stanicama s jezgrom i trombocitima te su podijeljeni u tri lokusa : HLA-A, HLA-B, HLA-C koji pripadaju skupini klasičnih antigena dok u neklasične antigene ubrajamo HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-H, HLA-J, HLA-K, HLA-L i HLA-P. Molekula antigena HLA razreda I građena je od lakog i teškog lanca. Teški lanac α građen je od oko 350 aminokiselina (približno 45 kD), a sastoji se od tri izvanstanične domene (α_1 , α_2 i α_3), hidrofobnog transmembranskog dijela te hidrofилnog citoplazmatskog dijela dok je laki lanac β_2 mikroglobulin čija je funkcija učvrstiti molekulu i ne sudjeluje u prezentaciji stranih antigena. (Slika 4.) Uloga antigena HLA razreda I je predočavanje stranog antigena citotoksičnim limfocitima (Tc) tako što se strani antigen razgradi na male peptide koje zatim molekula HLA veže na sebe i eksplicira ih na površini stanice. Domene α_1 i α_2 stvaraju žlijeb u koji se veže strani antigen. Domena α_3 slična je konstantnom dijelu imunoglobulina i sadrži vezno mjesto za stanični receptor citotoksičnog limfocita T. Polimorfizam molekule HLA razreda I odnosi se na raspored aminokiselina u domenama α_1 i α_2 .⁽⁹⁾⁽¹¹⁾

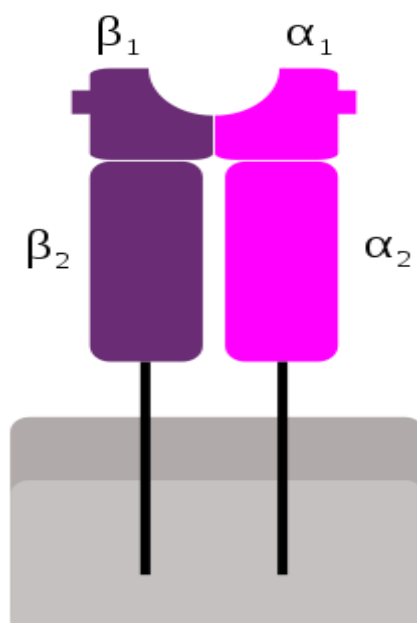


Slika 4. Shematski prikaz molekule HLA razreda I

Izvor: WEB⁽²⁰⁾

1.6.2. Antigeni HLA razreda II

Antigeni HLA razreda II kodirani su genima koji su smješteni centromerično na kraćem kraku kromosoma 6 (odsječak 6p21.3) te su organizirani u više podregija to jest lokusa: HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, HLA-DM i HLA-DX. Svaka od ovih podregija ima gene koji kodiraju sintezu α i β lanaca. Molekula antigena HLA razreda II građena je od jednog α lanca koji ima domene α_1 i α_2 te jednog β lanca koji ima domene β_1 i β_2 . Molekula se dijeli u 4 regije. Domene α_1 i β_1 čine prvu regiju u kojoj je najveći polimorfizam, nepromjenjive domene α_2 i β_2 čine drugu regiju koja je slična imunoglobulinu, treća regija je transmembranska i sadrži hidrofobne aminokiseline dok je četvrta regija citoplazmatska i sadrži mjesto za fosforilaciju (Slika 5.). Funkcija antigena HLA razreda II je predočavanje stranog antigena pomoćničkim limfocitima Th egzogenim putem koji započinje fagocitozom. U fagolizozomu strani antigen se razgradi na male peptide, a molekula HLA sintetizirana u endoplazmatskoj mrežici transportira se u fagolizozom gdje se od nje odcijepi invarijantni lanac i veže antigeni peptid te zajedno odlaze na staničnu membranu gdje se limfociti Th vežu na β_2 domenu molekule. ^{(9) (11)}



Slika 5. Shematski prikaz molekule HLA razreda II

Izvor: WEB⁽²¹⁾

1.7. Davatelji krvotvornih matičnih stanica

Izuzetna važnost gena HLA u transplantaciji tkiva i organa je u tome što je podudarnost u genima HLA izravno povezana s izlječenjem od bolesti te prihvaćanjem, odnosno odbacivanjem presatka.

Davatelji mogu biti :

- » srodni genotipski podudarni davatelj gdje je HLA podudarnost 10/10
- » srodni fenotipski podudarni davatelj (roditelji)
- » srodni davatelj s razlikom u jednom HLA lokusu odnosno s podudarnošću 5/6 ili 9/10
- » nesrodni podudarni davatelj HLA tipizacijom – 10/10, 9/10 ili iznimno 8/10
- » davatelj umbilikalne krvi gdje je HLA podudarnost 6/6 ili 5/6
- » iznimno haploidentični srodni davatelj

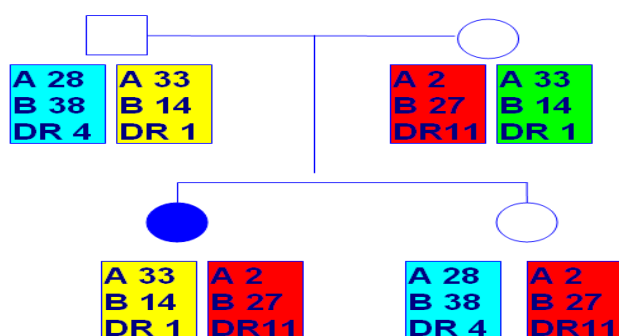
Idealan davatelj je srodni genotipski podudarni davatelj (brat, sestra) gdje je HLA podudarnost 10/10 i nesrodni fenotipski podudaran davatelj HLA podudarnosti 10/10 što znači da su davatelj i pacijent identični u antigenima lokusa HLA. Naime, unutar obitelji približno 30% bolesnika ima genotipski HLA identičnog davatelja, mali broj bolesnika ima fenotipski HLA identičnog jednog od roditelja, a za većinu bolesnika davatelj za TKMS se traži unutar Registra dobrovoljnih darivatelja krvotvornih matičnih stanica (nesrodni fenotipski HLA identični davatelj).⁽⁴⁾⁽¹²⁾

1.8. Postupak pronalaženja davatelja krvotvornih matičnih stanica unutar obitelji

Da bi se mogla napraviti cjelokupna obrada bolesnika i članova obitelji potrebna je valjana uputnica HZZO-a koja glasi na bolesnika. Nakon primanja ove uputnice bolesniku i svim članovima uže obitelji uzimaju se uzorci krvi: 30 ml krvi s heparinom i 15 ml krvi s EDTA dok se samo bolesniku uzima i 5 ml krvi bez antikoagulansa. Pretrage koje se obavljaju iz ovih uzoraka su tipizacija antigena i gena HLA razreda I (HLA-A, -B, -C) i razreda II (-DRB1, -DQB1), određivanje anti-HLA antitijela u serumu primatelja i test križne reakcije (cross-match). Antigene razreda I određujemo testom mikrolimfocitotoksičnosti (MLCT) dok gene HLA razreda I i razreda II određujemo molekularnim metodama (PCR-SSP, PCR-SSO).

S obzirom da za gene HLA vrijedi zakon mendelskog nasljeđivanja, vjerojatnost da će braća ili sestre pacijenta biti podudarni davatelji iznosi 25%, a ako roditelji nose česte alele gena HLA postoji šansa da će i jedan od njih biti mogući fenotipski identični davatelj (Slika 6.). U slučaju da postoje 2 ili više HLA identičnih srodnika odluku kojeg srodnika izabrati ovisno o dobi, spolu, krvnoj grupi i kliničkim parametrima donosi transplantacijski tim. Prije konačnog odabira davatelja potrebno je uzeti novi uzorak krvi primatelja i davatelja te ponoviti prethodno navedene pretrage i napraviti test križne reakcije (cross-match) između stanica davatelja i seruma primatelja (MLCT).

(13)



Slika 6. Fenotipski HLA identični roditelji

Izvor : Prezentacija

1.9. Postupak pronalaženja nesrodnih davatelja krvotvornih matičnih stanica

Kada se unutar obitelji pacijenta ne može naći podudarni davatelj, započinje postupak pronalaženja nesrodnog fenotipski HLA identičnog davatelja kroz Nacionalni registar dobrovoljnih davatelja pojedine zemlje odnosno kroz Svjetski registar nesrodnih dobrovoljnih davatelja (Bone Marrow Donors Worldwide; BMDW). Podudarnost u genima HLA uz dijagnozu, stadij bolesti, životnu dob bolesnika je ključan čimbenik za uspješan ishod TKMS. U programu nesrodne TKMS postoje protokoli, a koji će se od njih primijeniti ovisi o broju podudarnosti HLA para primatelj- davatelj: 6/6 (HLA-A, -B, -C), 8/8 (HLA-A, -B, -C, -DRB1), 10/10 (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1) TE 12/12 (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DPB1). ⁽¹⁴⁾

Pretraživanje BMDW-a započinje nakon što je učinjena tipizacija HLA bolesnika i njegove obitelji te je ustanovljeno da unutar obitelji bolesnika nema HLA identičnog davatelja. Procjenom transplantacijskog tima koji se sastoji od stručnjaka različitih profila (hematolog, pedijatar, imunogenetičar, transfuziolog, infektolog, imunolog..) indicira se liječenje transplantacijom alogenične koštane srži od nesrodnog davatelja. Nakon odluke transplantacijskog tima i odobrenja HZZO-a bolesniku se uzima uzorak krvi za potvrdnu HLA tipizaciju. Nakon završene tipizacije Hrvatski registar dobrovoljnih davatelja započinje pretraživanje BMDW-a. U slučaju da je pronađen potencijalni davatelj u nacionalnom registru (RDDKMS) dogovara se potvrdna tipizacija potencijalnog davatelja iz novog uzorka krvi (PCR-SSP visoka rezolucija). Nakon potvrde HLA podudarnosti primatelj-davatelj liječnici Transplantacijskog centra predlažu termine prikupljanja transplantata prema kojima Registar dobrovoljnih davatelja krvotvornih matičnih stanica dogovara točan datum s davateljem. Liječnici Transplantacijskog centra predlažu tip transplantata (koštana srž ili periferna krv), a davatelj se odlučuje prema njihovim sugestijama, ali i prema vlastitom izboru.

U slučaju da nije pronađen davatelj u RDDKMS nastavlja se pretraživanje BMDW-a. Na temelju rezultata preliminarnog pretraživanja Svjetskog registra šalje se preliminarni upit u Nacionalne registre gdje postoje potencijalni davatelji. Upućuje se zahtjev za uzorak krvi za potvrdnu tipizaciju HLA koji se tipizira u kliničkim jedinicama za

tipizaciju tkiva i nakon HLA tipizacije odabire se fenotipski najpodudarniji nesrodni davatelj.

Ukoliko se transplantacijski tim odluči za transplantat umbilikalne krvi te se u BMDW-u nađe moguća odgovarajuća doza po završenoj tipizaciji organizira se dostava smrznutog transplantata krvi iz pupkovine. (Slika 7. i 8.)

BMDW Match Programs
Run Date: 24-May-2010

Match Results - Cord Blood Match Program
[Back to Menu](#) | [Select different match \(options\)](#) | [Show Summary](#) |

Search determinants: **A:** 2, 24 **B:** 65, 35 **DR:** 7, 11

■ Addition data included ■ Only identical and 1 allele/antigen mismatch ■ Sorted on TNC

A	B	C	DOB1	DOB1	Reg #	Additional details ID	TNC (10 ⁷)	Vol. (mL)	CD34+MN (10 ⁶)	Sex	Age	CMV	CMV date
Potentially (Allele) Matched: 2													
2	24	65	35										
02:CZRV	24:CZRV	14:02	35:CGZS	04:CPFD	08:AEY	11:04	07:01			NYCB	406573	120	107
						11:04	07:TM			UACB	OCL0000603222	98	75
HLA-A or -B Allele Split Antigen Mismatched: 3													
2	24	14	35			11:XX	07:01			ICB	MICB0198Q3D6899	148	
02:XX	24:XX	14:01	35:02			11:04	07:01			ICB	MICB-0120060914	86	
02:XX	24:XX	14:01	35:XX			11:04	07:01			UICB	998902903	76	55
HLA-DR Allele Split Antigen Mismatched: 3													
2	24	65	35			11:01	07:01			NYCB	201108	182	117
02:XX	24:XX	14:XX	35:XX			11:01	07:01			ECB	SPUCBAR0039514	168	121
2	24	65	35			11:01	07:01			NYCB	501261	73	88
HLA-A Antigen Mismatched: 32													
24:XX	24:XX	14:XX	35:XX			11:XX	07:XX			LCB	143703	185	134
02:XX	02:XX	14:XX	35:XX			11:XX	07:XX			ICB	045152	167	
2	24	65	35			11:04	07:01			NYCB	207776	161	101
2	24	14	35			11:XX	07:XX	02:XX	03:XX	ECB	SPUCMAL00004415	146	75
24:XX	24:XX	14:XX	35:XX			11:ARV	07:MT			UICB	998075843	132	85
1	24	14	35			11:04	07:01			NYCB	300409	124	82
2	—	14	35			11:04	07:01			NYCB	206310	122	112
24:XX	24:XX	14:XX	35:XX			11:XX	07:XX			LCB	170846	119	
24:XX	24:XX	14:XX	35:XX			11:XX	07:XX			LCB	117883	112	86
24	24	14	35			11:XX	07:01			ICB	MICB0198C5649	112	
24	24	65	35			11:04	07:01			NYCB	211656	112	106
2	2	14	35			11	7			ECB	SPUCMAL00004032	111	35
24	24	65	35			11:04	07:01			NYCB	406491	111	112
2	24	14	35			11:XX	07:XX			BCB	ULB1293	110	39
02:XX	24:XX	14:XX	35:XX			11:RAY	07:MT			ACCB	6512762	104	60

Slika 7. Program podudarnosti u BMDW-u

Izvor: WEB⁽²²⁾

1.11. Prijava nesrodnih davatelja i upis u Registar dobrovoljnih davatelja

Davatelji krvotvornih matičnih stanica mogu biti sve zdrave osobe između 18 i 55 godina iako se ova dobna granica razlikuje od zemlje do zemlje. Nakon dolaska na Odjel za transfuziju u Laboratorij za tipizaciju tkiva davatelj ispuni pristupnicu (Slika 9.) i nakon potpisa pristanka, uzima se jedna epruveta krvi (oko 7 ml) (Slika 11.) da bi se odredili antigeni tkivne snošljivosti (HLA tipizacija). Darivateljstvo je dobrovoljno i anonimno tako da osobne podatke i tipizaciju HLA davatelja ima samo Klinička jedinica za tipizaciju tkiva Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju KBC-a Zagreb. Ukoliko se nađe bolesnik koji ima iste antigene tkivne snošljivosti kao i davatelj, Registar dobrovoljnih davatelja krvotvornih matičnih stanica iz KBC-a Zagreb kontaktira davatelja i ponovno traži njegov pristanak na darivanje stanica. ⁽¹⁾



Slika 9. Primjer pristupnice za upis u Registar

Izvor: WEB



Slika 10. Dobrovoljno darivanje krvi za upis u Registar DDKMS

Izvor : WEB



Slika 11. Uzorak krvi za tipizaciju HLA

Izvor: WEB⁽²³⁾

2. CILJ RADA

Cilj rada je istražiti koji su kriteriji odnosno smjernice za odabir davatelja za liječenje trasplantacijom krvotvornih matičnih stanica te metode za određivanje podudarnosti između davatelja i primatelja.

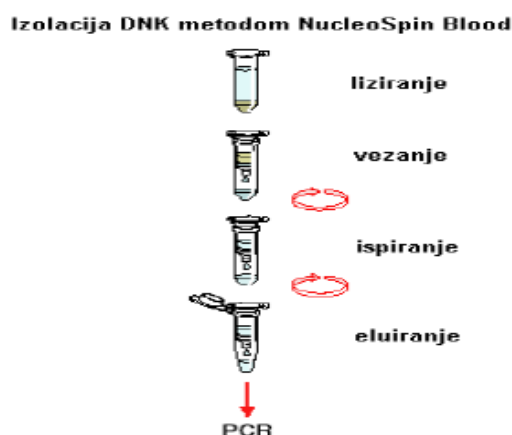
3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

U Laboratorij za tipizaciju tkiva Centra za transfuzijsku medicinu s Odjela za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC-a Split upućen je pacijent koji je bolovao od akutne limfatične leukemije (ALL) . Uz pacijenta upućeni su i članovi obitelji (roditelji i brat) da bi se odredili antigeni i geni sustava HLA za mogućnost liječenja alogeničnom transplantacijom krvotvornih matičnih stanica.

3.2. METODE

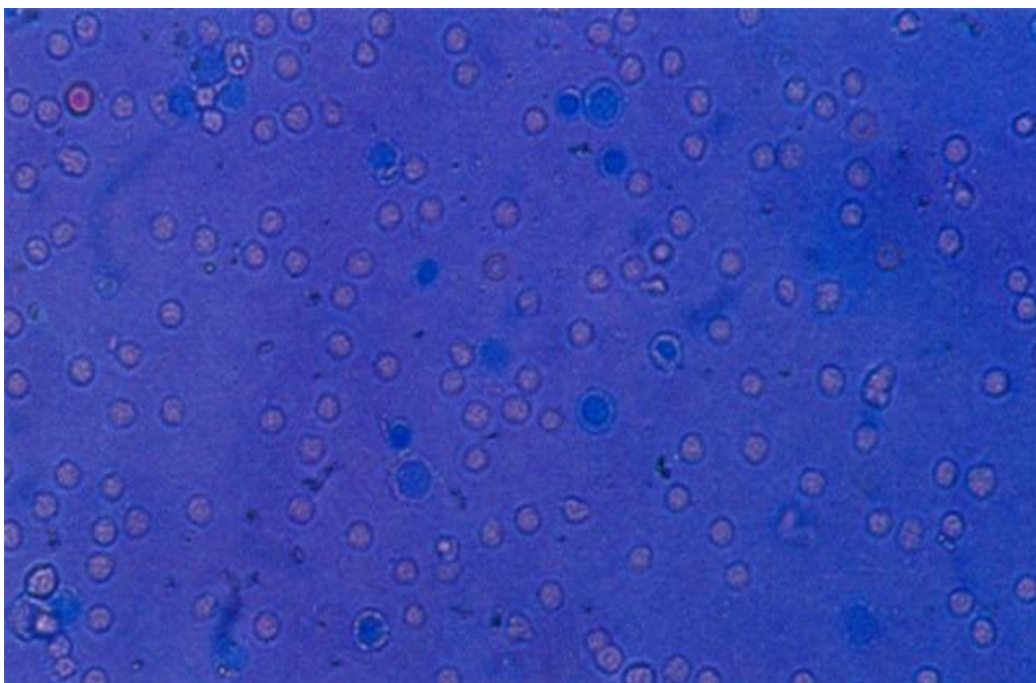
Za određivanje antigena i gena sustava HLA potrebno je 2 ml uzorka periferne krvi ispitanika s antikoagulansom EDTA iz koje je izolirana DNA pomoću komercijalnog seta za izolaciju DNA (Nucleospin) koji se sastoji od: pufera B1, reagensa B2, pufera B5, BW, BE i B3, proteinaze K te Nucleospin epruvete i kolone. Ova metoda izolacije zasniva se na specifičnom vezanju molekula DNA na silikatnu membranu unutar Nucleospin kolone. (Slika 12.) Ispitanicima je uzet i uzorak 7 ml krvi s heparinom za izvođenje testa mikrolimfocitotoksičnosti (MLCT). Krvni uzorci pacijenta i članova obitelji uzeti su u Laboratoriju za tipizaciju tkiva KBC-a Split.



Slika 12. Izolacija DNA

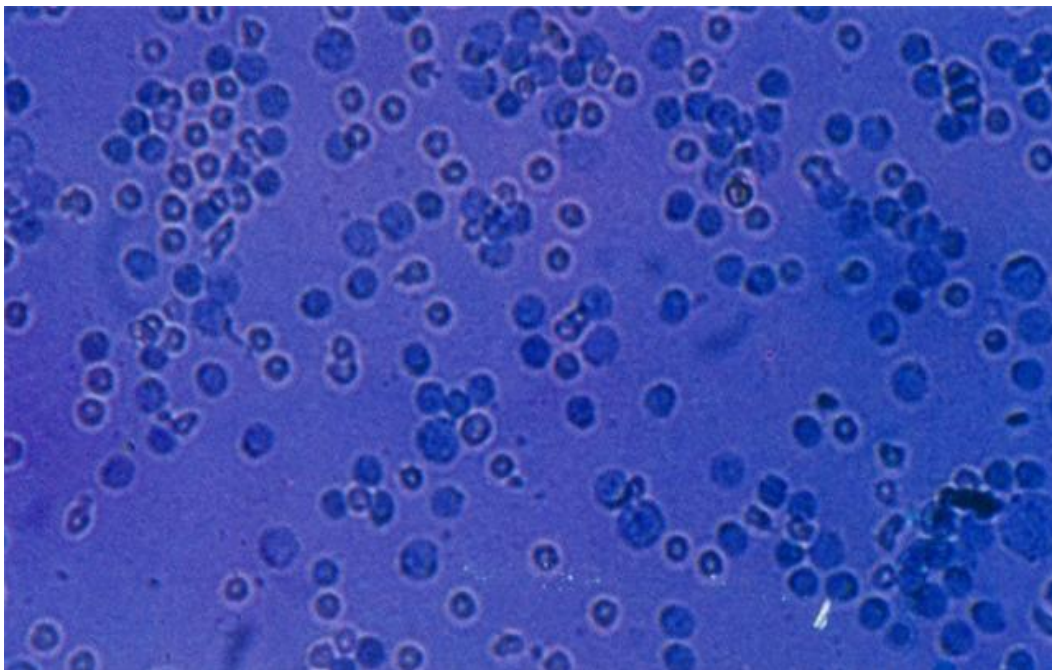
3.2.1. Test mikrolimfocitotoksičnosti (MLCT)

Testom MLCT određuju se antigeni sustava HLA razreda I i II kao i prisutnost antitijela u serumu ispitanika. Osnova testa mikrolimfocitotoksičnosti je specifična reakcija između antigena HLA na membranama limfocita i antitijela HLA prisutnima u serumu. Iz uzorka krvi bolesnika separacijom na gradijentu gustoće odvoje se limfociti koji se nakon točno podešene koncentracije dodaju u Terasakijeve pločice u kojima se nalaze specifični anti-HLA serumi. Nakon inkubacije od pola sata dodaje se komplement kunića, a nakon dodatne inkubacije od sat vremena Terasakijeve pločice se istresaju i boje se tripan plavom bojom. Pozitivne reakcije (pod svjetlosnim mikroskopom plavo obojane stanice) (Slika 14.) upisuju se u tipizacijske listiće i po planu baterije sa specifičnim serumom određuju se tkivni antigeni ispitanika. ⁽¹⁶⁾



Slika 13. Negativni test MLCT

Izvor: WEB



Slika 14. Pozitivan test MLCT

Izvor: WEB

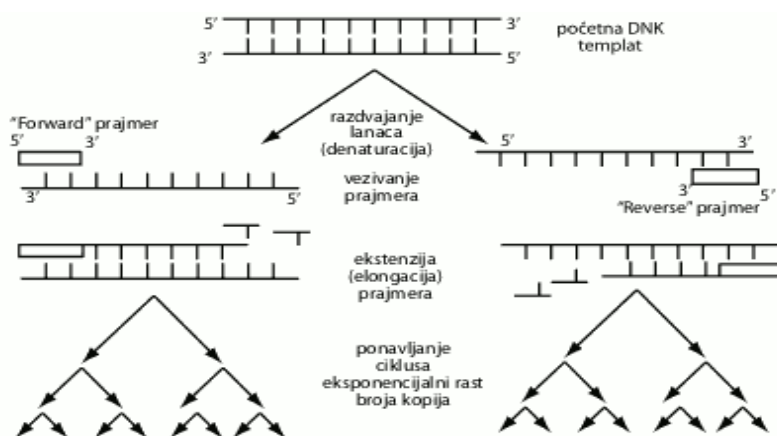
3.2.2. Metoda PCR-SSO (Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotids)

Za određivanje gena sustava HLA korištena je metoda PCR-SSO.pomoću setova: GenProbe Lifecodes typing kits (Gen-Probe Inc., Stamford, USA) i Luminex aparata (Luminex Corporation, Austin, Tx, USA). Metoda se temelji na hibridizaciji biotinom označenih produkata amplifikacije na specifične oligonukleotidne probe (SSO) koje su vezane na površini mikrosfera i koje su ispunjene crvenim i infracrvenim fluorokromom. Testovi se izvode u pločicama s 96 bazenčića gdje dolazi do umnažanja reakcijom PCR egzona 2 i 3 za određivanje alela HLA razreda I i egzona 2 za određivanje alela HLA razreda II.

Umnažanje gena sustava HLA metodom PCR-SSO

Nakon dobivanja potrebne koncentracije DNA (150-200 ng/ml) započinje umnažanje DNA slijedeći protokol proizvođača testova (Tepnel- Lifecodes: PCR), a produkt umnažanja su dvostruke i jednostruke molekule DNA koje nakon denaturacije sudjeluju

u hibridizacijskoj reakciji. Ukupni volumen jedne reakcije PCR iznosi 20 μl (8,8 μl H₂O, 0,2 μl polimeraze Taq koncentracije 5 U/ μl , 6 μl reakcijskog pufera i 5 μl uzorka DNA). U procesu hibridizacije specifično umnoženi slijedovi DNA inkubiraju se sa suspenzijom mikrosfera koje imaju pojedinačno jedinstvenu fluorescenciju, a na njihovoj površini su vezane specifične SSO probe. Ukupni volumen jedne hibridizacijske reakcije iznosi 20 μl (5 μl PCR produkta i 15 μl otopine mikrosfere). Proces hibridizacije odvija se kroz 20 minuta. Po završetku, hibridizacijskoj reakciji se doda 170 μl pripremljene otopine fluorescentne boje za obilježavanje (170 μl pufera za razrjeđenje i 0,85 μl streptavidina, SA-PE (R- fikoeritrin konjugirani streptavidin)) (Slika 15.). Streptavidin označi dijelove DNA vezane s probama na određenim mikrosferama, a detekcija vezanosti se očitava na Luminex aparatu pomoću dva lasera te se razlikuje kombinacija proba s pozitivnim signalom na osnovu njihove vezanosti s mikrosferama te kvantificira relativnu količinu amplifikata koji je hibridiziran sa svakom pojedinom mikrosferom (Slika 16. i 17.). Analiza pozitivnih i negativnih rezultata hibridizacije i određivanje gena HLA svakog pojedinog ispitanika provodi se u aparatu Luminex analitičkim programom MATCH IT! (verzija 1.1.6). ^{(16) (17)}



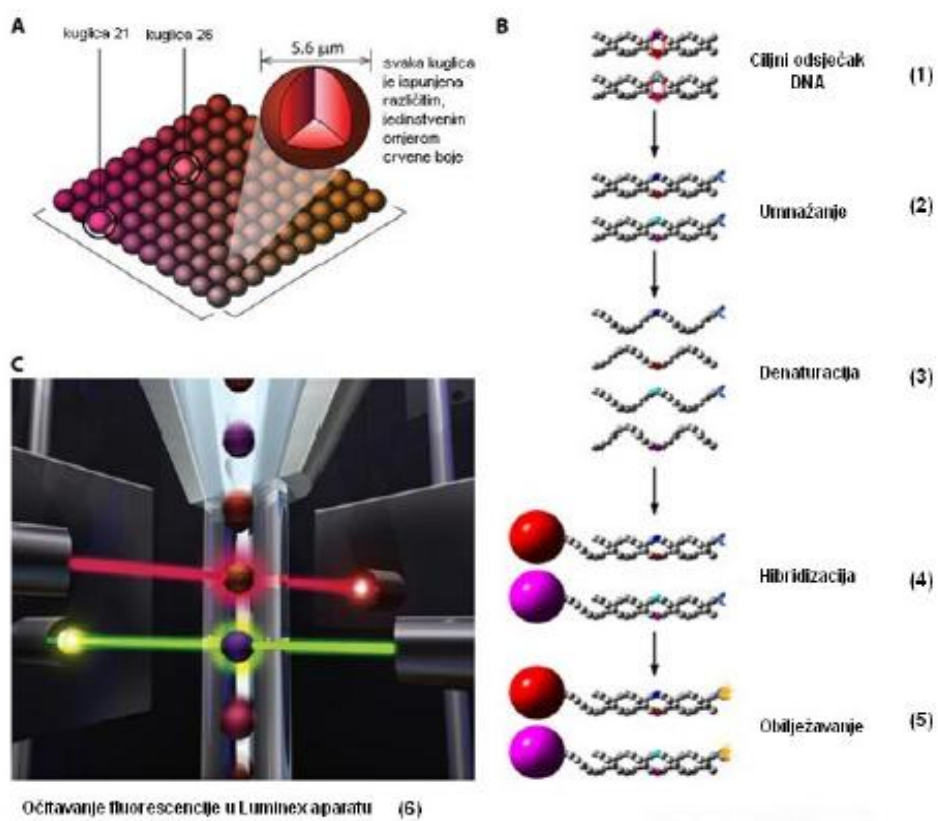
Slika 15. PCR postupak

Izvor: WEB



Slika 16. Luminex aparat

Izvor: WEB



Slika 17. Shematski prikaz metode PCR-SSO korištenjem Luminex aparata

Izvor: WEB

4. REZULTATI

Antigene razreda I (HLA-A, -B) ispitaniku i članovima obitelji odredili smo testom mikrolimfocitotoksičnosti dok smo alele lokusa razreda I i II (HLA-DRB1) sustava HLA odredili (potvrdom tipizacijom) DNK metodom niskog/srednjeg razlučivanja (PCR-SSO; Luminex metoda).

Analiza rezultata HLA tipizacije ispitanika i članova obitelji (roditelji i brat) pokazala je da ispitanik nema HLA podudarnog davatelja. S majkom je ispitanik bio podudaran za alele lokusa HLA-A, jedan alel lokusa HLA-B i jedan alel lokusa HLA-DRB1 (4/6). Otac je očekivano bio poluidentičan s ispitanikom (3/6). Brat i ispitanik su bili različiti u svim alelima lokusa sustava HLA. (Slika 20.)

Rezultat screening testa kod pacijenta bio je negativan. (0/30)

Dobiveni rezultati tipizacije HLA proslijeđeni su liječniku ispitanika i Transplantacijskom timu (KBC Zagreb). Na temelju dijagnoze i stanja bolesti ispitanika, indicirano je liječenje transplantacijom krvotvornih matičnih stanica s fenotipski identičnog nesrodnog davatelja (BMDW).

KLINIČKI BOLNIČKI CENTAR-SPLIT
 LABORATORIJ ZA TIPIZACIJU TKIVA
 CENTAR ZA TRANSFUZIJSKU MEDICINU

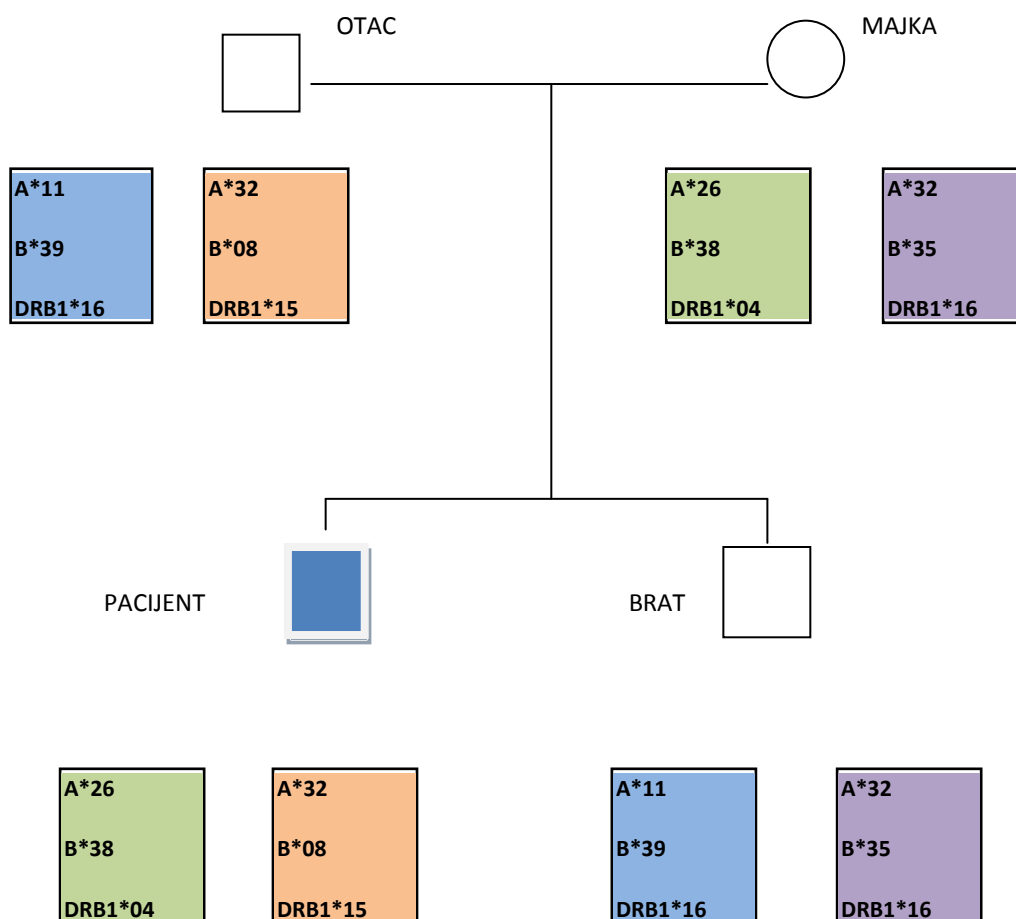
OBITELJ: XXX

Kontakt (mob xxxxxxxx)

Dijagnoza: ALL

Liječnik: XXX

Centar : XXX



PRA: 0/30

Slika 20. Shematski prikaz ispitanika i članova obitelji

5. RASPRAVA

Transplantacija krvotvornih matičnih stanica je metoda liječenja različitih zloćudnih i ne-zloćudnih tumora, a počeci ovakvog načina liječenja sežu već od sredine prošlog stoljeća. Sve veće razumijevanje imunoloških procesa u organizmu i uloga pojedinih čimbenika dovelo je do poboljšanja ishoda transplantacije i sve duljeg preživljavanja bolesnika. Jedan od glavnih čimbenika za uspjeh TKMS je otkriće sustava HLA te njegova izuzetna važnost u izboru davatelja. Nakon ovog značajnog otkrića transplantacija KMS postaje sve prihvaćenija opcija liječenja. Danas se zna da se pacijenti koji boluju od teških hematoloških bolesti mogu liječiti alogeničnom transplantacijom (pronalaženjem srodnika unutar obitelji ili odgovarajućeg nesrodnog davatelja KMS) i autolognom transplantacijom. Međutim, unatoč napretku molekularne biologije, imunologije i medicine GvHD javlja se još uvijek kao veliki izazov u liječenju TKMS.

Kod tipizacije srodnika uobičajeno je tražiti davatelja koji je podudaran u 6/6 lokusa (HLA-A, -B, -DRB1). Budući da se HLA geni nasljeđuju u haplotipu i da je crossing over kromosoma u toj regiji rijedak, tipizacijom 6 lokusa sustava HLA moguće je utvrditi da su dva srodnika potpuno podudarna. U slučaju nesrodnog davatelja potrebna je podudarnost u 10/10 lokusa (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1). Zahvaljujući sve djelotvornijem učinku imunosupresivnih lijekova moguće je provesti liječenje transplantacijom KMS i kad se transplantirane stanice davatelja razlikuju od primatelja u jednom do dva lokusa. HLA nepodudarnost na jednom ili više lokusa povećava toksičnost transplantacije te je prihvatljiva u bolesnika s visokorizičnom bolesti gdje rizik same bolesti nadmašuje povećani rizik transplantacije.

Cilj ovog rada bio je istražiti na koji način se mogao liječiti pacijent koji je bolovao od teške ALL odnosno da li je imao HLA identičnog davatelja unutar obitelji.

Rezultati analize tipizacije HLA našeg pacijenta i članova njegove obitelji pokazali su da ne postoji podudarnost unutar obitelji. Zbog toga je bilo isključeno liječenje alogenom srodnom transplantacijom i pacijentu je odlukom Transplantacijskog tima indicirano liječenje transplantacijom s nesrodnog davatelja.

6. ZAKLJUČCI

1. Transplantacija krvotvornih matičnih stanica važna je i opće prihvaćena metoda liječenja različitih malignih i ne-malignih bolesti
2. Postoje dvije osnovne vrste transplantacije krvotvornih matičnih stanica: autologna i alogenična. Izvor krvotvornih matičnih stanica za transplantaciju može biti koštana srž, mobilizirana periferna krv i krv iz pupkovine.
3. Prvi ograničavajući faktor u liječenju TKMS je pitanje HLA identičnog davatelja KMS. Unutar obitelji približno 30% bolesnika ima genotipski HLA identičnog davatelja.
4. U nedostatku HLA podudarnog srodnika izvor krvotvornih matičnih stanica može biti alogenični presadak od nesrodnog HLA podudarnog davatelja ili HLA podudarne ili djelomice podudarne (5/6 zajedničkih lokusa) nesrodne umbilikalne krvi.
5. Nesrodni davatelji nalaze se u Registrima dobrovoljnih davatelja krvotvornih matičnih stanica bilo da je riječ o nacionalnom Hrvatskom registru ili Svjetskom registru (BMDW).
6. Budući da naš ispitanik nije imao HLA identičnog srodnika odlukom Transplantacijskog tima, nesrodnog davatelja smo tražili u Nacionalnom i Svjetskom registru dobrovoljnih davatelja krvotvornih matičnih stanica.

7. LITERATURA

1. Cecuk-Jelicic E, Kerhin-Brkljacic V, Grubic Z, Labar B, (World's registry of bone marrow donors. Croatian), Svjetski registar dobrovoljnih darivatelja kostane srzi, Acta Medica Croatica. 63(3):251-3, 2009 Jun.
2. Stem Cell Basics: Introduction; Bethesda MD: National Institutes of Health
3. <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/bonemarrowandperipheralbloodstemcelltransplant/stem-cell-transplant-stem-cell-sources>
4. Serventi- Seiwerth R, Mikulić M, Mrić 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.
5. <http://www.lls.org/treatment/types-of-treatment/stem-cell-transplantation/allogeneic-stem-cell-transplantation>
6. <http://www.lls.org/treatment/types-of-treatment/stem-cell-transplantation/reduced-intensity-allogeneic-stem-cell>
7. <http://www.lls.org/treatment/types-of-treatment/stem-cell-transplantation/autologous-stem-cell-transplantation>
8. <http://www.lls.org/treatment/types-of-treatment/stem-cell-transplantation/graft-versus-host-disease>
9. Thorsby E, A short history of HLA- Review article; Tissue antigens 2009;74:101,16
10. Wassmuth R. Primers on the HLA System, Basic Concepts-Medical Relevance-Laboratory Methods-Quality Management. Heidelberg-München-Landsberg-Frechen-Hamburg: Verlagsgruppe Hüthig jehle Rehm GmbH; 2010, str.118
11. Marsh SGE, Parham P, Barber LD, The HLA FactsBook. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Academic Press ; 2000 str.398.
12. Serventi Seiwerth R. Bilten KROHEMA Vol 4, br 2, Studeni 2012; Nacrt smjernica za liječenje alogeničnom transplantacijom
13. Paediatr Croat, 2013; 57 (Supl 1): 263-267 Rajić Lj.

14. Mikulić M, Grubić Z. Postupak pronalaženja nesrodnog darivatelja Krvotvornih matičnih stanica. Bilten KROHEMA 2012; 4(2): 39-41
15. Grubić Z. Bilten KROHEMA-Vol 4.br.2;Tipizacija HLA u procjeni kompatibilnog darivatelja
16. Grubić Z, Burek Kamenarić M, Mikulić 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
17. Andreis I., Batinić D., Čulo F. i sur (2004.) : Imunologija, Medicinska naklada, Zagreb
18. <http://www.bmdw.org/>
19. <http://jchchen0127.pixnet.net/blog>
20. https://en.wikipedia.org/wiki/MHC_class_I
21. https://en.wikipedia.org/wiki/MHC_class_II
22. http://www.cordblood.org.il/w/en/Registry_Search_Process.html
23. <http://www.wisegeekhealth.com/what-are-the-symptoms-of-mild-gastritis.htm>

8. SAŽETAK

Uvod: Transplantacija krvotvornih matičnih stanica postala je važan postupak u liječenju raznih malignih i ne-malignih bolesti. Ovisno o davatelju dijeli se na autolognu i alogeničnu transplantaciju, a sami izvori KMS mogu biti koštana srž, periferna krv i krv iz pupkovine. Da bi se odobrila transplantacija potrebna je tipizacija humanih leukocitnih antigena (HLA) pacijenta i davatelja čime dobijemo informaciju o njihovoj podudarnosti.

Cilj: Svrha ovog rada je uvrstiti način odabira darivatelja kroz različite metode provjere podudarnosti između pacijenta i davatelja.

Materijali i metode: Pacijentu koji boluje od ALL potrebna je transplantacija krvotvornih matičnih stanica zbog čega njegova obitelj dolazi u Laboratorij za tipizaciju tkiva gdje im se vadi krv koja dalje prolazi kroz serološke i DNK metode radi utvrđivanja podudarnosti.

Rezultati: Utvrđeno je da ne postoji podudarnost između pacijenta i članova njegove obitelji te se dalje pristupa Svjetskom registru dobrovoljnih darivatelja.

Zaključak: Kod tipizacije srodnika uobičajeno je tražiti davatelja koji je podudaran u 6/6 lokusa (HLA-A, -B, -DRB1). Budući da se HLA geni nasljeđuju u haplotipu i da je crossing over kromosoma u toj regiji rijedak, tipizacijom 6 lokusa sustava HLA moguće je utvrditi da su dva srodnika potpuno podudarna. U slučaju nesrodnog davatelja potrebna je podudarnost u 10/10 lokusa (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1).

Ključne riječi: transplantacija krvotvornih matičnih stanica, HLA; nesrodni davatelj; Registar dobrovoljnih davatelja KMS; BMDW

9. SUMMARY

Selection of donors for transplantation of blood stem cells

Introduction: Transplantation of blood stem cells has become an important procedure for curing malignant and non-malignant diseases. Depending on the donor it can be allogeneic and autologous transplantation and the sources of blood stem cells are bone marrow, peripheral blood and umbilical cord blood. To approve a transplantation, typing of human leukocyte antigens (HLA) of patients and donors is necessary to gain information about their compatibility.

Objective: The purpose of this paper is to determine how the donors are chosen through different methods of compatibility searches.

Materials and methods: A patient suffering from ALL is in need of a blood stem cell transplantation which is why his family arrives at the Tissue Typing Laboratory where a blood sample is taken. The sample then goes through different serological and DNA methods to determine compatibility.

Results: It is determined that the patient and members of his family do not match therefore the search continues in the Bone Marrow Database WorldWide .

Conclusion: When typing a relative it is usual to search for one who is a match in 6/6 loci (HLA-A, -B, -DRB1). Since HLA genes are haplotypically inherited and the crossing over of chromosomes is very rare in that region, by typing all of the 6 loci it is possible to determine that the donor and the recipient are a match. In case of a non relative donor a match in 10/10 loci is necessary (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1).

Key words: transplantation of blood stem cells; HLA; non relative donor; Registry of donors; BMDW

10. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODACI

Ime i prezime: Antonia Bokšić

Datum rođenja: 23.12.1993

Adresa stanovanja: Slanice 11c, Stobreč

Telefon: 021/324-958

Mobitel: 099 414 6162

e-mail: boksicantonia@gmail.com

OBRAZOVANJE

2000.-2008. Osnovna škola Kamen-Šine, Split

2008.-2012. I. Gimnazija (jezični odjel), Split

2012.-2015. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija u Splitu- Medicinsko laboratorijska dijagnostika

Jezici : engleski, njemački, španjolski, talijanski jezik

Sudjelovanja u natjecanjima:

Osvojeno 1. Mjesto u Školskom i Županijskom natjecanju te 5.mjesto u Državnom natjecanju iz španjolskog jezika u 4.razredu srednje škole

Osvojeno 1. Mjesto u Školskom i Županijskom natjecanju iz talijanskog natjecanja u 3.razredu srednje škole

