

# Uloga HLA u transplantaciji krvotvornih matičnih stanica

---

Jurić, Josipa

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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:176:933741>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-20**

Repository / Repozitorij:



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



SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Josipa Jurić**

**ULOGA HLA U TRANSPLANTACIJI KRVOTVORNIH  
MATIČNIH STANICA**

**Završni rad**

Split, 2016.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Josipa Jurić**

**ULOGA HLA U TRANSPLANTACIJI KRVOTVORNIH  
MATIČNIH STANICA**

**THE ROLE OF HLA IN HAEMATOPOIETIC STEM CELL  
TRANSPLANTATION**

**Završni rad / Bachelor thesis**

Mentor:

**Dr.sc. Esma Čečuk Jeličić**

Split, 2016.

## Popis kratica

**BMDW**- engl. *Bone Marrow Donors WorldWide*; Svjetski registar davatelja KMS

**CBMDR**- engl. *Croatian Bone Marrow Donor Registry*, Hrvatski registar davatelja KMS

**DMSO**- dimetilsulfoksid

**EDTA**- engl. *Ethylenediaminetetraacetic acid*; etilendiamintetraoctena kiselina

**G-CFS**- engl. *Granulocyte- colony stimulating facto*; stimulirajući faktor rasta granulocita

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

**GvL**- engl. *Graft versus Leukemia*; učinak davateljevih stanica protiv tumora

**HLA**- engl. *Human Leukocyte Antigen*; humani leukocitni antigen

**KIR**- engl. *Killer Immunoglobulin-like receptor*

**KMS**- krvotvorne matične stanice

**LD**- engl. *Linkage disequilibrium*; neravnoteža udruživanja

**mHA**- engl. *Minor Histocompability Antigens*

**MHC**- engl. *Major Histocompability Complex*; glavni sustav tkivne podudarnosti

**MLCT**- engl. *microlymphocitotoxicity test*; test mikrolimfocitotoksičnosti

**MRD**- engl. *Matched Related Donor*; podudarni srodni davatelj

**MUD**- engl. *Matched Unrelated Donor*; podudarni nesrodni davatelj

**NK**- engl. *Natural Killer*; stanice ubojice

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

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

**SAPE**- engl. *Streptavidin-Phycoerytherin*; R-fikoeritrin konjugirani streptavidin

**Tc**- citotoksični limfociti

**Th**- pomoćnički limfociti

**TKMS**- transplantacija krvotvornih matičnih stanica

**TNF**- engl. *Tumor Necrosis Factors*

1.	UVOD .....	1
1.1.	Krvotvorne matične stanice.....	1
1.1.1.	Prikupljanje KMS iz koštane srži .....	1
1.1.2.	Prikupljanje KMS iz periferne krvi.....	1
1.1.3.	Prikupljanje KMS iz krvi pupkovine .....	2
1.2.	Pohrana KMS .....	3
1.3.	Glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. <i>Major Histocompatibility Complex</i> , MHC).....	4
1.3.1.	HLA sustav.....	4
1.4.	Građa i funkcija HLA molekula.....	7
1.4.1.	HLA razred I.....	7
1.4.2.	HLA razred II.....	8
1.5.	Nasljeđivanje HLA.....	9
1.6.	Nomenklatura gena i antigena HLA sustava.....	9
1.7.	Određivanje antigena i alela sustava HLA .....	11
1.8.	GvHD (engl. <i>Graft versus Host Disease</i> ).....	12
1.8.1.	Akutna GvHD (aGvHD) .....	13
1.8.2.	Kronična GvHD (cGvHD).....	14
1.9.	Transplantacija krvotvornih matičnih stanica .....	14
1.9.1.	Alogena transplantacija KMS.....	15
1.9.2.	Autologna transplantacija KMS .....	17
1.10.	Receptori prirodnoubilačkih stanica sličnih imunoglobulinu .....	19
2.	CILJ.....	20
3.	METODE .....	21
3.1.	Serološko određivanje .....	21
3.1.1.	Izvođenje testa .....	22
3.2.	Molekularno određivanje .....	23

3.2.1. PCR-SSO (engl. <i>Polymerase chain reaction-Sequence Specific Oligonucleotids</i> ).....	24
3.2.1.1. Izvođenje testa PCR-SSO .....	24
3.2.2. PCR-SSP (engl. <i>Polymerase chain reaction-Sequence Specific Primer</i> ) .....	26
3.2.2.1. Izvođenje testa PCR-SSP .....	27
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	29
5. ZAKLJUČAK .....	32
6. LITERATURA.....	33
7. SAŽETAK.....	35
8. SUMMARY .....	36
9. ŽIVOTOPIS .....	37

# 1. UVOD

## 1.1. Krvotvorne matične stanice

Glavna karakteristika pluripotentnih matičnih stanica je to što nisu diferencirane i što nemaju specijaliziranu funkciju zbog čega služe kao ishodište svim ostalim stanicama u tijelu. Pluripotentne matične stanice imaju mogućnost obnavljanja i proliferacije kroz duži vremenski period, a njihovom diferencijacijom nastaju stanice koje su specijalizirane za određene funkcije u organizmu ili stanice specifične samo za određeni organ ili tkivo (16).

Pluripotentne matične stanice koje se nalaze u koštanoj srži se još nazivaju i krvotvorne matične stanice (KMS). Ove stanice izgledom podsjećaju na male limfocite, a njihovom diferencijacijom i proliferacijom nastaju progenitorske stanice koje daju stanice kćeri koje zadržavaju osobine matične stanice. Ovim mehanizmom tijelo stvara doživotni izvor krvnih stanica (4).

Izvori krvotvornih matičnih stanica su: koštana srž, periferna krv, krv iz pupkovine (umbilikalna krv) te krv iz fetalnog hematopoetskog sustava (ove stanice se ne upotrebljavaju u kliničkoj praksi iz etičkih razloga) (2). Transplantacija krvotvornih matičnih (TKMS) stanica je postupak kojim se prikupljene pluripotentne matične stanice upotrebljavaju u liječenju raznih bolesti.

### 1.1.1. Prikupljanje KMS iz koštane srži

Matične stanice iz koštane srži prikupljaju se iz zdjelične kosti, a prikupljena koštana srž zatim ide na obradu gdje joj se uklanja krv i zaostali koštani fragmenti. Postupak traje oko jedan sat i relativno je bolan te se izvodi dok je davatelj pod općom ili lokalnom anestezijom.

Zahvat nosi i određene rizike među kojima su najznačajniji korištenje anestezije i bol na mjestu punkcije koja može potrajati nekoliko dana. Jedan dio davatelja može razviti anemiju uslijed gubitka eritrocita i u tom slučaju oporavak ovisi o težini bolesti i imunološkom stanju davatelja te može trajati od 2 do 3 dana do čak 3 do 4 tjedna (12).

### 1.1.2. Prikupljanje KMS iz periferne krvi

Danas je sve češće korišten način prikupljanja KMS onaj iz periferne krvi, pogotovo kod autolognih transplantacija. Davatelj nekoliko dana prije transplantacije uzima faktor rasta

granulocita (G-CSF) (engl. *Granulocyte Colony Stimulating Factor*) koji potiče prelazak krvotvornih matičnih stanica iz koštane srži u perifernu krv, nakon čega se procesom afereze iz davateljeve krvi razdvajaju četiri komponente: crvene krvne stanice, plazma, bijele krvne stanice i trombociti. Eritrociti i plazma se vraćaju u davateljev krvotok čime se sprječava razvoj anemije, a leukociti i trombociti koji sadrže krvotvorne matične stanice se prikupljaju i idu na daljnju obradu.

Ovaj postupak traje 4-5 sati tijekom kojih kroz aparat prođe i do 25 litara krvi, a može se ponavljati i nekoliko puta, sve dok se ne prikupi dovoljan broj stanica. Broj prikupljenih KMS iz periferne krvi procjenjuje se uz pomoć markera CD34 koji je jedan od predstavnika leukocitnih diferencijalnih antigena (biljega) koji se nalazi na površini KMS. Ovi antigeni se određuju monoklonskim protutijelima koja omogućuju razlikovanje pojedine leukocitne loze i još važnije stadija zrelosti stanica. Da bi povećali broj KMS koje su CD34+ stanice potrebno je da davatelj uzima G-CSF. Broj CD34+ u transplantatu izračunava se metodom protočne citometrije (engl. *flow cytometry*). Princip ove metode je da u tekućem mediju mjeri više parametara svake stanice u suspenziji uz pomoć lasera i fotodetektora iz kojeg saznajemo veličinu i granuliranost stanice. Krajnji rezultat je jasno vidljiv na računalu u obliku citograma (točkastog prikaza) (4, 13).

Postupak je bezbolan i ne nosi nikakve veće rizike za davatelja. Simptomi koje davatelj može osjećati su glavobolja, vrtoglavica, povraćanje, slabost i poteškoće sa spavanjem, no oni nestaju 2 do 3 dana nakon prestanka uzimanja G-CSF lijekova.

### **1.1.3. Prikupljanje KMS iz krvi pupkovine**

Iako je volumenom mala, krv koja nakon poroda ostaje u pupkovini (umbilikalna krv) sadrži veliki broj krvotvornih matičnih stanica koje nalikuju onima u koštanoj srži. Ove se stanice mogu diferencirati u sve ostale krvne stanice, a mogu obnoviti i koštanu srž pa se stoga mogu transplantirati umjesto koštane srži hematološkim pacijentima i onima oboljelim od drugih malignih bolesti. U praksi se najčešće daju maloj djeci umjesto KMS iz periferne krvi ili koštane srži nesrodnog davatelja. Odraslim osobama se daju ukoliko se dovoljno brzo ne može naći podudaran davatelj (4).

Postupak prikupljanja krvotvornih matičnih stanica iz pupkovine je najbezbolniji i najmanje invazivan način dobivanja KMS koji se izvodi neposredno nakon poroda djeteta, ali prije poroda posteljice. Sam proces je jednostavan, traje 5 do 10 minuta, lako se uči i ne



zahtijeva dodatno osoblje. U postupku prikupljanja umbilikalne krvi prikupi se 75 do 100 mL krvi koja se zatim u roku od 48 sati mora obraditi i pohraniti (2).

Bitno je naglasiti da se prije poroda treba tražiti suglasnost majke, a tijekom poroda se na niti jedan način ne smije ugroziti život majke ili djeteta. Jako je važno da zdravstveni radnici na vrijeme upoznaju majku s ovom mogućnosti te joj odgovore na sva postavljena pitanja. Iz ovog razloga je bitno da zdravstveni radnici koji se u svom poslu susreću s trudnicama budu pravilno educirani o načinu prikupljanja KMS iz umbilikalne krvi, kao i o mogućnostima pohrane iste.

Umbilikalnu krv je moguće pohraniti u javnim i privatnim (obiteljskim) bankama krvi iz pupkovine. Ukoliko se krv iz pupkovine pohranjuje u javnim bankama, stanice mogu biti transfundirane bilo kojem HLA podudarnom primatelju, bilo gdje u svijetu. Privatne banke umbilikalne krvi stanice čuvaju u slučaju da član obitelji u jednom trenutku zatreba transfuziju.

Prednost ove metode, osim što je bezbolna i neinvazivna, je i ta što se prilikom transplantacije KMS iz pupkovine testira samo 6 lokusa HLA sustava, o čemu će više govora biti u drugom dijelu rada. Glavni nedostatak ove metode je mali broj prikupljenih stanica (10).

## **1.2. Pohrana KMS**

Krvotvorne matične stanice pohranjene u električnim zamrzivačima te u tekućem ili plinovitom dušiku na temperaturi nižoj od  $-120^{\circ}\text{C}$  mogu se čuvati više desetaka godina. Ranije su problemi prilikom pohrane KMS nastajali zbog intra- ili ekstracelularnih kristalića leda koji su se stvarali prilikom zamrzavanja i oštećivali staničnu strukturu. Intracelularni kristali nastaju ukoliko je zamrzavanje brzo zbog čega dolazi do mehaničkog oštećenja stanice s posljedičnom apoptozom. Sporim zamrzavanjem nastaju ekstracelularni kristali leda koji sprječavaju slobodan ulazak soli u stanicu pa stanica dehidrira. Da bi se izbjegao ovaj problem i sačuvala kvaliteta transplantata prije samog zamrzavanja KMS se dodaje glicerol i dimetilsulfoksid (DMSO) čije krioprotektivno svojstvo sprječava dehidraciju stanica te njihovo oštećenje (18).

### **1.3. Glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. *Major Histocompatibility Complex, MHC*)**

Glavni sustav tkivne podudarnosti je skupni naziv za gene koji kodiraju proteine koji se nalaze na površini imunokompetentnih stanica. Ovi geni prvotno su pronađeni na miševima te im je dan naziv H-2, a glavna uloga im je predočavanje patogenih peptida stanicama obrambenog sustava domaćina.

U čovjeka su ovi antigeni najprije identificirani na leukocitima te su nazvani HLA sustav (engl. *Human Leukocyte Antigen*) odnosno humani leukocitni antigen. Daljnjim proučavanjem sustava antigeni su otkriveni na gotovo svim stanicama u tijelu.

#### **1.3.1. HLA sustav**

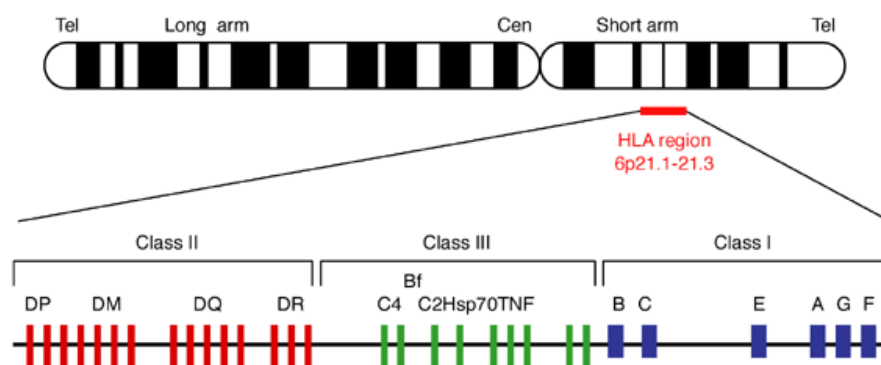
Najvažnija svojstva HLA sustava su polimorfizam i poligenost. Ovaj sustav je najpolimorfiji genski sustav jer sadrži veliki broj genskih produkata, što omogućuje prepoznavanje različitih patogena. Poligenost kojoj je glavna značajka postojanje više razreda unutar jednog sustava omogućuje da se molekule na različite načine vežu na patogene peptide.

Sustav HLA je najsloženiji genski sustav u čovjeka koji ima značajnu ulogu u regulaciji imunološkog odgovora. Molekule HLA predočuju vlastite i strane dijelove molekula citotoksičnim i pomoćničkim T-limfocitima te su glavni dio antigen-prezentirajućeg kompleksa na površini stanica. HLA sustav ima i veliku ulogu u transplantaciji KMS i organa, naime većim podudaranjem u HLA antigenima između davatelja i primatelja smanjuje se mogućnost odbacivanja organa. Pored ovoga otkriveno je da HLA geni pridonose razvitku nekih autoimunih bolesti kao što su: celijakija, psorijaza, reumatoidni artritis i dr. (Tablica 1).

Tablica 1. Prikaz bolesti povezanih s antigenima/alelima HLA sustava

BOLEST	HLA ANTIGEN/ALEL
Ankilozantni spondilitis	HLA-B27/-B*27
Reiterov sindrom	HLA-B27/-B*27
Akutni prednji uveitis	HLA-B27/-B*27
Bechet bolest	HLA-B51
Sistemski lupus eritematosus	HLA-B8; -DR3/-B*08; -DRB1*03
Reumatoidni artritis	HLA-DR1,-DR4/DRB1*01,-DRB1*04
Psorijatični artritis	HLA-B13,-B27,-B57; -Cw6; -DR7
Sjörgen-ov sindrom	HLA-B8;-DR3
Psorijaza	HLA-B13,-B17; -Cw6; -DR7
Celijakija	HLA-DQ2,-DQ8/-DQB1*02,-DQB1*08
Narkolepsija	HLA-DR15/-DRB1*0602; -DQA1*0102
Inzulini ovisni dijabetes melitus	HLA-DR3,-DR4
Hemokromatoza	HLA-A3

HLA sustav se nalazi na kraćem kraku šestog kromosoma (6p21) i sadrži otprilike  $4 \times 10^6$  parova baza DNA te je podijeljen u tri razreda: HLA razred I, HLA razred II i HLA razred III (Slika 1) (20).



Slika 1. Položaj sustava HLA na kraćem kraku šestog kromosoma (izvor: Narinder, Gene map of the human leukocyte antigen (HLA) region (15))

Regija razreda HLA I je smještena telomerno i sadrži klasične i neklasične gene. Klasični geni su HLA-A, HLA-B i HLA-C koji kodiraju teški lanac molekule razreda I. Neklasični geni su HLA-E, HLA-F i HLA-G koji su znatno slabijeg polimorfizma te imaju specifične funkcije. Tablica 2 prikazuje broj prisutnih alela na pojedinom genu ovoga razreda.

Tablica 2. Broj alela u HLA razredu I

(prema: <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html> (8))

GENI	ALELI
<b>A</b>	3,492
<b>B</b>	4,358
<b>C</b>	3,111
<b>E</b>	21
<b>F</b>	22
<b>G</b>	53

Razred HLA II sadrži 6 podregija: HLA-DP, HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DM, HLA-DN, HLA-DO smještenih centromerno, a svaka od njih ima A i B gene koji kodiraju  $\alpha$  i  $\beta$  lance. Podregije HLA -DP, -DQ i -DR kodiraju molekule HLA razreda koje se izražavaju na membrani stanica makrofaga, B-limfocita i dendritičkih stanica koje se nazivaju antigen prezentirajuće stanice. HLA-DM, -DN i -DO kodiraju molekule koje se nalaze u citoplazmi. Tablica 3 prikazuje broj alela na genima podregija koji kodiraju HLA molekule na površini stanica.

Tablica 3. Broj alela u HLA razredu II

(prema: <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html> (8))

GENI	ALELI
<b>DPA1</b>	43
<b>DPB1</b>	671
<b>DQA1</b>	73
<b>DQB1</b>	940
<b>DRA</b>	7
<b>DRB</b>	2135

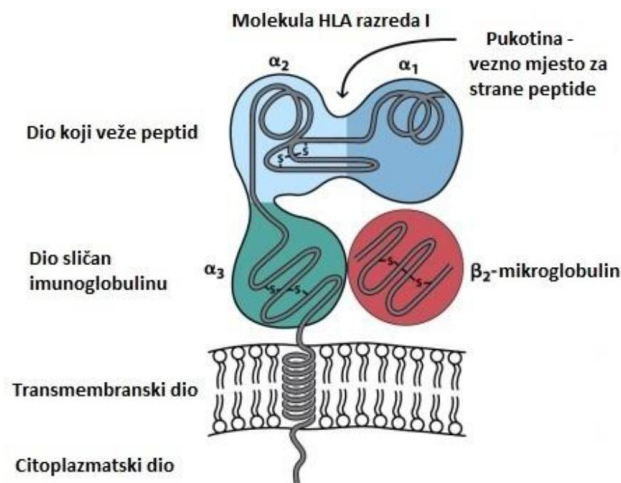
Regija HLA razreda III se naziva još i centralna regija te ne kodira HLA molekule, ali sadrži gene za komponente komplementa (C2, C4, faktor B); citokine TNF- $\alpha$  i TNF- $\beta$  (engl. *Tumor Necrosis Factors*) te još neke molekule koje nemaju jasnu ulogu u imunološkoj reakciji.

## 1.4. Građa i funkcija HLA molekula

### 1.4.1. HLA razred I

Na gotovo svim stanicama s jezgrom možemo pronaći molekule HLA razreda I. Molekule su građene od dva polipeptidna lanca međusobno povezana kovalentnim vezama. Teški lanac  $\alpha$ , veličine 45kD, kodiraju molekule HLA -A, -B i -C, dok se laki lanac  $\beta$ , veličine 12kD, koji se naziva i  $\beta_2$  mikroglobulin kodira na kromosomu 15.

Molekula je građena od tri dijela: citoplazmatskog, transmembranskog i ekstracelularnog dijela s tri domene  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  i  $\alpha_3$  na koji se vežu peptidni ulomci. Četvrti dio tvori laki lanac  $\beta$  i njegova uloga je isključivo u učvršćivanju molekule te on ne sudjeluje u imunološkim reakcijama.  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  domene tvore pukotinu na koju se vežu peptidi (8-11 aminokiselina), ovo je ujedno najpolimorfiji dio molekule na koji se može vezati veliki broj različitih antigena.  $\alpha_3$  dio molekule reagira sa staničnim receptorom za T-limfocite i služi kao vezno mjesto (Slika 2). Nakon što se strani antigen razgradi na manje peptide unutar stanice, a molekula HLA se sintetizira unutar iste, dio antigena se veže na pukotinu te bude prezentiran CD8+ citotoksičnim T limfocitima (Tc) koji se s određenim afinitetom vežu za strani antigen i za površinu HLA molekule mehanizmom tkz. spregnutog prepoznavanja. Na ovaj način molekule HLA razreda I predočuju unutarstanične (endogene) antigene poput tumorskih i virusnih antigena (1).



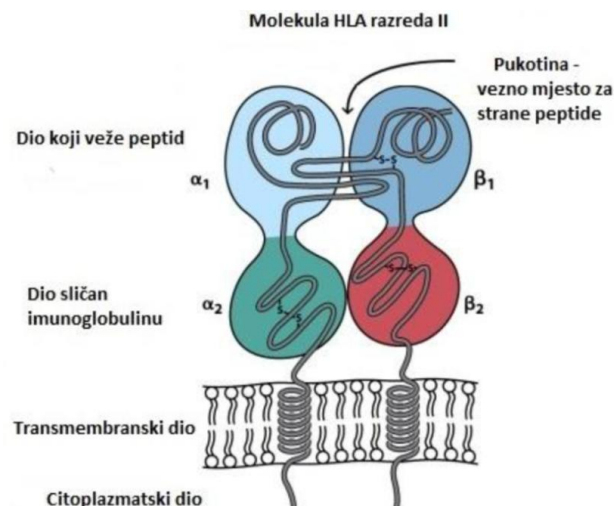
Slika 2. Shematski prikaz molekule HLA razreda I

(izvor: Kindt, Kuby Immunology (11))

## 1.4.2. HLA razred II

Molekule HLA razreda II nalazimo na antigen prezentirajućim stanicama (makrofazi, dendritičke stanice, B-limfociti), CD34+ pomoćničkim T-limfocitima koji su odgovorni za proizvodnju protutijela za odgovarajuće antigene. Molekule su građene od dva polipeptidna lanca povezana nekovalentnim vezama. Za razliku od HLA razreda I ovdje oba lanca kodiraju HLA molekule. Teški  $\alpha$ -lanac veličine 30-34 kD kodiraju A geni (npr. geni HLA-DRA1, -DPA1), a laki  $\beta$ -lanac kodiraju B geni (npr. geni HLA-DRB1, -DPB1). HLA-DRA ima samo jedan gen (HLA-DRA1), dok HLA-DRB ima 9 različitih gena (HLA-DRB1 do -DRB9) što ga čini najpolimorfnijim genom u HLA razredu II. Geni HLA-DP i HLA-DQ imaju samo jedan gen za sintezu lakog i teškog lanca.

Molekula je građena od citoplazmatskog, transmembranskog i ekstracelularnog dijela koji se sastoji od  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  te  $\beta_1$  i  $\beta_2$  domene. Najpolimorfniji dio molekule čine promjenjive  $\alpha_1$  i  $\beta_1$  domene koje formiraju vanjsku pukotinu koja je vezno mjesto za strane peptide (Slika 3). Krajevi pukotine su otvoreni i na njih se mogu vezati peptidi veličine 10-30 aminokiselina.  $\alpha_2$  i  $\beta_2$  čine nepromjenjivu regiju te se na  $\beta_2$  dio vežu pomoćnički T-limfociti. Nakon što strani antigeni uđu u organizam bivaju fagocitirani do malih peptida veličine 10-30 aminokiselina. U isto vrijeme počinje sinteza HLA molekula koje zatim vežu strani peptid te ga predočuju antigen CD4+ pomoćničkim T-limfocitima (Th). Ovim načinom molekule HLA razreda II predočuju izvanstanične (egzogene) antigene (1).

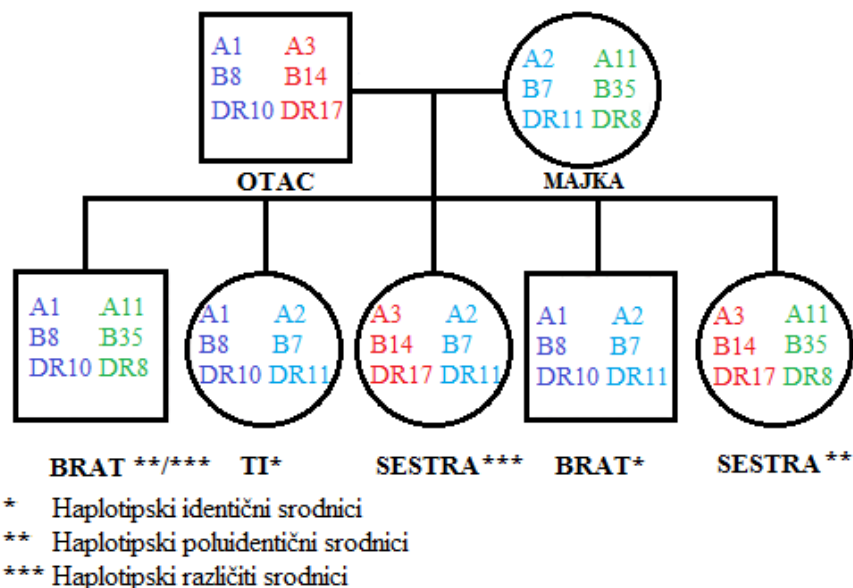


Slika 3. Shematski prikaz molekule HLA razreda II

(izvor: Kindt, Kuby Immunology (11))

## 1.5. Nasljeđivanje HLA

HLA geni se nasljeđuju od oba roditelja prateći Mendelove zakone nasljeđivanja. Geni se nasljeđuju kodominantno, što znači da dijete dobiva po jedan HLA haplotip (kombinacija gena na jednom kromosomu) od oba roditelja. Obzirom na moguće kombinacije HLA haplotipa među djecom moguća su tri ishoda: u slučaju da dvoje srodnika naslijede iste haplotipove od oba roditelja tada su oni haplotipski HLA identični, ukoliko dvoje srodnika naslijede samo jedan isti haplotip tada su oni HLA poluidentični, najnepovoljnija mogućnost (ukoliko nekom iz obitelji bude potrebna TKMS) je ona u kojoj se naslijede različiti geni od roditelja te tada oni ne dijele isti HLA materijal (Slika 4) (20).

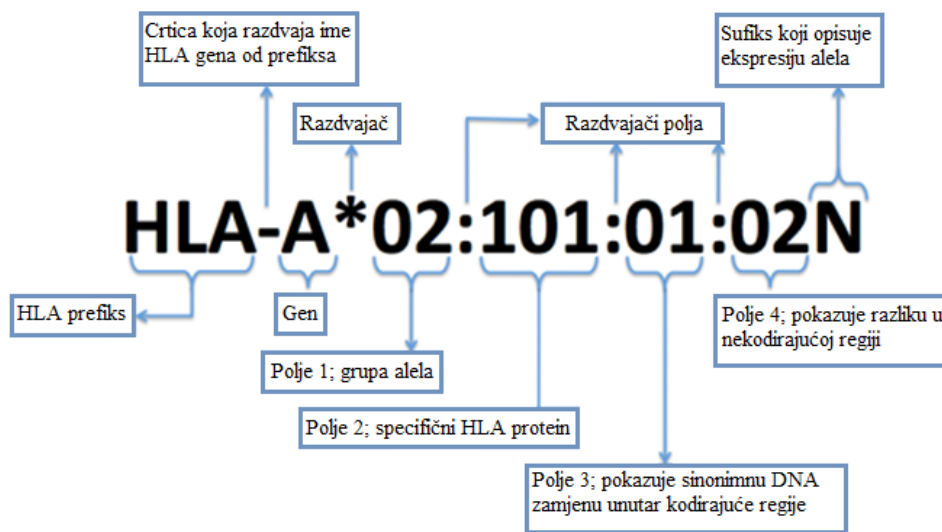


Slika 4. Prikaz HLA haplotipova u obitelji

## 1.6. Nomenklatura gena i antigena HLA sustava

Sustav HLA prvi je put otkriven 1958. godine, a tijekom nekoliko idućih godina različiti su znanstvenici koristeći vlastite tehnike i metode otkrili veliki broj HLA gena. Vrlo često se događalo da različiti znanstvenici iste gene nazivaju različitim imenima pa je stoga bilo potrebno osnovati odbor za nomenklaturu. Taj odbor, koji postoji još i danas, naziva se Odbor za nazivlje HLA sustava pod pokroviteljstvom Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *The WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System*), osnovan je 1968. godine i odgovoran je za davanje službenih imena gena i antigena HLA sustava. Prije davanja imena sve novootkrivene sekvence prolaze stroge kontrole i analize i ukoliko se utvrdi da se radi o

dosad neotkrivenoj sekvenci, ta sekvenca zajedno s imenom se objavljuje u bazi podataka IPD-IMGT/HLA Database (14).



Slika 5. Nomenklatura sustava HLA

(izvor: <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html> (8))

Svaki alel pojedinog lokusa HLA ima svoj jedinstveni broj koji se sastoji od četiri seta znamenaka odvojenih dvotočkom. Svi aleli se označavaju s minimalno četiri broja, dok se dulji nazivi dodjeljuju po potrebi. Brojevi prije prve dvotočke opisuju alel koji u najvećem broju slučajeva odgovara određenoj serološkoj specifičnosti i dobivaju se metodom niske rezolucije. Nakon prve dvotočke slijedi set brojeva koji opisuju podtipove nekog gena HLA, a njih se dobije ukoliko se uzorak određuje metodom visoke rezolucije. Treće i četvrto polje sadrži brojeve koji označuju mutacije koje mogu biti u kodirajućoj ili nekodirajućoj regiji, a uzrokuju razlike između pojedinih alela (Slika 5). Podtipovi su dobivali brojeve redom kako su im se određivali sljedovi DNA. Određeni aleli imaju sufiks koji opisuje ekspresiju tog alela (14). Neki primjeri gena i njihova nomenklatura sa značenjem prikazani su u Tablici 4.



Tablica 4. Nomenklatura HLA

(prema: <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html> (8))

Nomenklatura	Značenje
<b>HLA</b>	regija HLA ili prefiks koji se odnosi na gene HLA
<b>HLA-DRB1</b>	određeni lokus HLA, dakle lokus DRB1
<b>HLA-DRB1*13</b>	skupina alela koja kodira antigen DR13
<b>HLA-DRB1*13:01</b>	alel HLA
<b>HLA-DRB1*13:01:02</b>	alel HLA koji se razlikuje u sinonimnoj mutaciji od alela DRB1*13:01:01
<b>HLA-DRB1*01:01:02</b>	alel HLA koji sadrži mutaciju izvan kodirajuće regije u odnosu na alel DRB1*13:01:01
<b>HLA-A*29:09N</b>	„Nul alel“, alel HLA koji nema ekspresiju
<b>HLA-A*30:14L</b>	alel HLA koji kodira protein čija je zastupljenost na površini stanice niska
<b>HLA-A*24:02:01:02L</b>	alel HLA koji kodira protein čija je zastupljenost na površini stanice niska, gdje je mutacija utvrđena izvan kodirajuće regije
<b>HLA-B*44:02:01:02S</b>	alel HLA koji kodira protein koji je zastupljen samo kao „skrivena“ molekula
<b>HLA-A*32:11Q</b>	alel HLA koji ima mutaciju za koju je ranije utvrđeno da ima značajan učinak na zastupljenost proteina na površini stanice, ali to nije potvrđeno pa njegova zastupljenost ostaje „upitna“

## 1.7. Određivanje antigena i alela sustava HLA

Nakon pronalaska potencijalnog davatelja, potrebno je visokom rezolucijom odrediti gene i antigene sustava HLA te osobe, tj. gene lokusa HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 i u idealnom slučaju bi podudarnost između primatelja i davatelja trebala biti 10/10, tj. primatelj i davatelj bi trebali imati identične gene i antigene kako bi šansa za potpuni oporavak bila najveća, a mogućnost komplikacija neznatna. No ukoliko je primatelj u kritičnom stanju i potrebna mu je hitna transplantacija ili spada u mali postotak ljudi s određenim rijetkim genima i antigenima HLA sustava, tada je moguća transplantacija ukoliko je tkivna podudarnost manja, odnosno 9/10 ili jako iznimno 8/10 (19).

Iznimka je kada kao izvor KMS služi krv iz pupkovine gdje se testira samo 6 lokusa, a testiraju se lokusi HLA-A i -B metodom niske razlučivosti i HLA-DRB1 metodom visoke

razlučivosti. Poželjno je da podudarnost bude 6/6, ali može i manja (4/6). Razlog manjeg broja testiranih lokusa je taj što stanice iz pupkovine imaju manji imunogeni potencijal te ne izazivaju snažnu imunološku reakciju, a posebno GvHD (engl. *Graft versus Host Disease*) odnosno učinak presatka protiv primatelja (21).

### **1.8. GvHD (engl. *Graft versus Host Disease*)**

*Graft versus Host Disease* (GvHD) ili učinak presatka protiv primatelja je najčešća i najozbiljnija komplikacija koja nastaje nakon alogene transplantacije KMS i dijeli se u dvije skupine: akutnu i kroničnu. Prvotna podjela bila je rađena na temelju vremenskog perioda proteklog od same transplantacije te se ukoliko se bolest razvila do stotog dana nakon transplantacije bolest nazivala akutna, a sve nakon kronična. Međutim ova podjela nije bila sasvim točna pa se danas GvHD dijeli prema simptomima i specifičnim znakovima u akutnu i kroničnu, a svaka od njih ima dvije podskupine. Akutna se dijeli na klasičnu (do 100 dana) i odgođenu (nakon 100 dana), a kronična na klasičnu i „overlap syndrome“ (obje su bez vremenskog limita).

GvHD nastaje kada se u tkivu oštećenom od bolesti nakupljaju upalni citokini koji u primatelja aktiviraju antigen (Ag) - prezentirajuće stanice na koje zatim reagiraju davateljevi T-limfociti čijim zajedničkim djelovanjem dolazi do oštećenja organa. GvHD se može pojaviti unatoč tome što je primatelj bio podvrgnut imunosupresivnoj profilaksi i što je pronađen kompatibilni odnosno HLA-identični srodni davatelj. Sigurni znakovi GvHD su apoptoza epitelnih stanica, uključujući bazalne i suprabazalne stanice epiderme, crijevnog epitela i epitela žučnog mjehura odgovornih za proliferaciju i regeneraciju tkiva. Na pogođenim tkivima i organima pojavljuju se karakteristične lezije koje se nazivaju „satelitske nekroze stanica“ (engl. *sattelite cell necrosis*), koje karakterizira infiltracija imunskih stanica u blizini stanica koje su doživjele apoptozu.

Rizik od GvHD je veći ukoliko su primatelj i davatelj nepodudarni, ako je primatelj homozigot za jedan HLA lokus, a davatelj je heterozigot, ukoliko je davatelj višerotkinja i ako je primatelj starija osoba. Rizik ovisi i o tipu presatka, transplantacija umbilikalne krvi ima niži postotak, a transplantacija periferne krvi ima viši postotak pojave GvHD od transplantacije koštane srži.

Na pojavu GvHD ne utječe samo sustav HLA nego i drugi genski sustavi. „*Minor histocompatibility antigens*“ (mHA) su antigeni koji se nalaze na površini stanica davatelja i

moгу uzrokovati GvHD iako su češće povezani sa učinkom davateljevih stanica protiv tumora (engl. *Graft versus Leukemia*, GvL). Obzirom da upalni citokini i kemokini te njihovi receptori mogu svojim djelovanjem potaknuti stvaranje GvHD, postoji mogućnost da će se u budućnosti osim standardnih testova koji prethode transplantaciji KMS izvoditi i testovi kojima bi se umanjio rizik od komplikacija koje mogu nastati nakon transplantacije (3).

### **1.8.1. Akutna GvHD (aGvHD)**

Akutna GvHD zahvaća više organskih sustava, no prvi simptomi se primjećuju na koži i to u obliku makulopapilarnog osipa na dlanovima i tabanima. Lezije koje nastaju mogu svrbjeti i/ili biti bolne, a osip se može proširiti po cijelom tijelu te u najtežim slučajevima može uzrokovati bolno ljuštenje kože. Prvi znaci širenja bolesti i uključenosti gastrointestinalnog trakta su mučnina i vodenasti zeleni proljevi, a daljnjim napredovanjem bolesti javljaju se jaki abdominalni bolovi i krvava dijareja te veliki gubitak tekućine. U blažem obliku uključeni su samo gornji dijelovi gastrointestinalnog trakta i manifestiraju se anoreksijom i mučninom bez proljeva, koji se lako liječe imunosupresivnom terapijom. Povišeni kolestatski enzimi su također jedan od simptoma koji se uz kolestatsku bolest jetre povezuje s aGvHD iako navedeno nije sasvim specifično. Od ostalih simptoma pojavljuju se vrućica i gubitak težine.

Postoje dvije metode kojima se utvrđuje koliko je bolest napredovala, a obje se temelje na principu gradiranja odnosno objektivne procjene funkcije organa. Jedan princip osim gradiranja uzima u obzir i subjektivnu procjenu "performansi" zahvaćenog organa. Nakon što se ustanovi da primatelj boluje od GvHD svaki se organ rangira na skali od 0 do 4, ovisno o simptomima i zahvaćenosti pojedinog organa, te se zatim iz toga izvodi ukupna ocjena stanja pacijenta. Klinički značajnim se smatraju ona stanja koji imaju ocjenu 2 ili više.

Iako do danas još nije pronađen najbolji način u borbi protiv aGvHD, kombinacija inhibitora kalcineurina i metotreksata se pokazala kao najučinkovitija u liječenju kod kompatibilnih srodnih davatelja. Jedna od mogućnosti je *in vitro* ili *in vivo* smanjenje T-limfocita u transplantatu, ali ono povećava rizik od infekcije (sam proces ima imunosupresivno djelovanje) i relapsa bolesti (smanjuje GvL efekt). Osim preventivne terapije, pacijenti primaju i suportivnu terapiju koja pomaže u borbi protiv infekcija i pomaže organizmu u njegovu oporavku (3).

## **1.8.2. Kronična GvHD (cGvHD)**

Kronična GvHD se najčešće pojavljuje 3 godine nakon transplantacije KMS te je primarni uzrok kasnog obolijevanja i smrti kod transplantiranih osoba. Bolest se može ograničiti na samo jedno tkivo ili organ, ili na više njih.

Indikacije za ovu bolest su jednake kao i za aGvHD, a dodatan rizik imaju pacijenti koji su već preboljeli aGvHD. Također dokazana je i povezanost korištenja KMS dobivenih iz periferne krvi s većim rizikom obolijevanja od cGvHD.

Neki od simptoma cGvHD su grčevi u mišićima, miositis, gubitak vida, bolesti pluća, kronične imunosupresije, poikiloderma, makulopapularni osip, depigmentacija kože i alopecija. Česta je i anoreksija te strikture jednjaka. U svrhu lakšeg postavljanja dijagnoze simptomi su podijeljeni u 4 skupine: dijagnostički (temeljem kojih se može postaviti dijagnoza), karakteristični (temeljem kojih se ne može postaviti dijagnoza), ostali (nespecifični) i zajednički (nađeni i u aGvHD i cGvHD). Nakon postavljene dijagnoze zahvaćenost organa se gradira na isti način kao i kod aGvHD.

Terapija koja se koristi već jako dugo i koja se pokazala kao jedina uspješna terapija je kombinacija kalcineurina i prednisona. Ovisno o razvoju bolesti doza lijeka i dužina terapije se može povećavati. I u ovom slučaju pored primarne terapije potrebno je pacijentu dati i suportivnu terapiju (3).

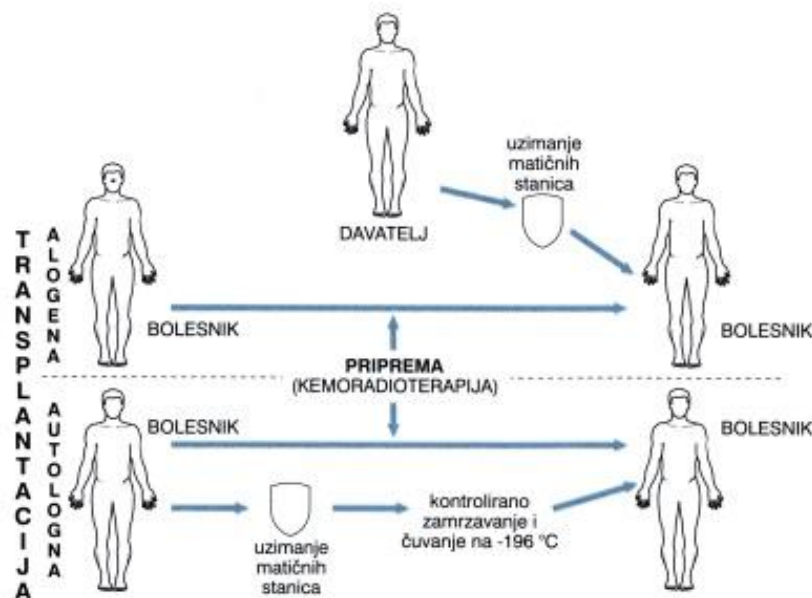
## **1.9. Transplantacija krvotvornih matičnih stanica**

Većina matičnih stanica nalazi se u koštanoj srži, a tek jedan manji dio u perifernoj krvi pa je donedavno zbog toga glavni način prikupljanja krvotvornih matičnih stanica bila isključivo punkcija koštane srži. Danas se zahvaljujući lijekovima KMS koje se nalaze u koštanoj srži mogu mobilizirati i dospjeti u perifernu krv, a razvio se i način prikupljanja KMS iz pupkovine. Tako se termin „transplantacija koštane srži“ zamjenjuje terminom „transplantacija krvotvornih matičnih stanica“.

Ranije je transplantacija bila zadnji izbor u liječenju bolesti, ali razvojem medicine te učenjem o mogućim ishodima i komplikacijama, transplantacija je postala jedno od ključnih rješenja u liječenju malignih i nemalignih bolesti te imunoloških poremećaja kao što su leukemija, limfomi, aplastična anemija i nasljedni metabolički poremećaji. Najbolji se ishod postiže ukoliko je transplantacija napravljena u ranijoj fazi bolesti, kada je tumor još uvijek

ograničen na malo područje i na njega se može djelovati kemoterapijom, koja u kombinaciji sa transplantacijom može dovesti do izlječenja. Transplantacije koje su učinjene u kasnijim fazama bolesti imaju veću stopu neželjenih reakcija i relapsa bolesti. Transplantacija se provodi i ukoliko je liječenje prvotnom terapijom bilo neuspješno. Komplikacije mogu nastati uslijed pojave infekcija, otkazivanja organa ili odbacivanja transplantata (7,18).

Postoje tri vrste transplantacije krvotvornih matičnih stanica: autologna i alogena (Slika 6) te transplantacija KMS iz krvi pupkovine. Nekoliko faktora utječe na izbor vrste transplantacije: vrsta tumorske bolesti koja se liječi, dob bolesnika, dostupnost podudarnog davatelja, mogućnost prikupljanja uzorka bez prisutnih tumorskih stanica, faza i status bolesti (13).



Slika 6. Alogena i autologna transplantacija

(izvor: Labar, Hematologija (13))

### 1.9.1. Alogena transplantacija KMS

Posljednjih nekoliko godina raste broj alogenih transplantacija KMS, glavni razlog ovakvog porasta je sve veći broj ljudi upisan u registar dobrovoljnih davatelja krvotvornih matičnih stanica, čime raste vjerojatnost pronalaska podudarnog davatelja. Svakom davatelju se prije upisa u registar određuju geni HLA-A, -B, -DRB1 te se kao takvi upisuju u registar.

Mali broj država ima svoj registar dobrovoljnih davatelja, a Hrvatska je među njima. U Hrvatski registar dobrovoljnih davatelja krvotvornih matičnih stanica (engl. *Croatian Bone*

*Marrow Donor Registry*, CBMDR) upisano je više od 51 200 zdravih osoba. Glavna zadaća registra je pronalženje i prikupljanje što većeg broja uzoraka kako bi se oboljelim od hematoloških i malignih bolesti u što kraćem roku omogućila transplantacija KMS.

U slučaju da država nema svoj registar ili nema podudarnog davatelja, davatelj se traži u Svjetskom registru dobrovoljnih davatelja KMS (engl. *Bone Marrow Donors Worldwide*, BMDW) koji je najveći registar i trenutno se u njemu nalazi više od 28 000 000 davatelja te preko 690 000 KMS dobivenih iz pupkovine. Osim uzoraka iz hrvatskog registra BMDW sadrži uzorke odraslih dobrovoljnih davatelja KMS iz 52 zemlje (74 registra) te uzorke iz krvi pupkovine iz 35 zemalja (52 Banke krvi iz pupkovine) (9).

Kod alogene transplantacije pacijenti primaju krvotvorne matične stanice od podudarnog HLA davatelja. Davatelj može biti krvni srodnik primatelju, brat ili sestra te se on tada naziva HLA identični srodni davatelj krvotvornih matičnih stanica (engl. *matched related donor*, MDR). Međutim, samo mali broj pacijenata unutar obitelji ima podudarnog HLA davatelja. Ukoliko ne postoji podudarnost među krvnim srodnicima tada se taj davatelj naziva HLA podudarani nesrodni davatelj (engl. *matched unrelated donor*, MUD). Prosječno vrijeme pronalaska MUD-a je 2.1 je mjesec u CBMDR te 3.7 mjeseci u BMDW. Prosječan broj davatelja koji se pritom testira je 1.5 (1 do 3) kod CBMDR i 2.1 (od 1 do 12) kod BMDW (5).

Idealan nesrodni davatelj se s primateljem mora podudarati u 10/10 testiranih HLA lokusa, dok se kod pacijenata s bolestima visokog rizika nesrodni davatelj može podudarati u 9/10 ili 8/10 ispitanih lokusa budući je u takvim slučajevima rizik od komplikacija bolesti veći nego rizik od nepodudarne transplantacije (19).

Alogena transplantacija se primjenjuje u liječenju mnogih zloćudnih tumora te prirodnih i stečenih bolesti koštane srži. Glavne indikacije za alogenu transplantaciju su: aplastična anemija, teški kombinirani deficit imunskog sustava (SCID), talasemija, akutna mijeloična leukemija, kronična mijeloična leukemija i mijelodisplastični sindrom. Glavni cilj alogenične transplantacije je zamjena bolesnog krvotvornog sustava primatelja s onim zdravog domaćina. Da bi se smanjila mogućnost odbacivanja presatka prije same transplantacije potrebno je suprimirati imunološki sustav pacijenta što se postiže kombinacijom citostatika i zračenja. Ovim postupkom se također ubijaju tumorske stanice prisutne u pacijenta (19).

Glavna prednost ove vrste transplantacije je ta što imunokompetentne stanice davatelja mogu prepoznati antigene na stanicama zloćudnog tumora u primatelja i djelovati na njih.

Ova reakcija je poznata pod imenom GvL (engl. *Graft versus Leukemia*) ili učinak presatka protiv tumora gdje T-limfociti davatelja koji su imunokompetentni napadaju preostale T-limfocite primatelja ili napadaju primateljev tumor, što u nekim slučajevima može dovesti do remisije bolesti. Glavni neželjeni toksični učinak alogene transplantacije je mogućnost pojave reakcije presatka protiv primatelja (engl. *Graft versus Host Disease*, GvHD). Posljedice ove reakcije su relaps ili progresija zloćudnog tumora, pojava teških infekcija te u najtežim slučajevima smrt bolesnika. Ova reakcija može biti i kronična te kao takva značajno umanjuje kvalitetu života pacijenta. Druge neželjene reakcije su infekcije praćene pancitopenijom i imunosupresijom (3,6).

Prvi znakovi oporavka opažaju se porastom broja granulocita u perifernoj krvi 8-12 dana nakon transplantacije, a za potpuni oporavak potrebna su 4 tjedna. Zbog relativno dugog vremena oporavka granulocita moguća je pojava bakterijemije sa slikom sepse te sustavne gljivične i virusne infekcije, a da bi se to spriječilo primatelju se daje suportivna terapija antibioticima i antifungicima. Ukoliko se infekcija dogodi u ranom poslijetransfuzijskom razdoblju može završiti smrtnim ishodom (5-10%).

### **1.9.2. Autologna transplantacija KMS**

Autologna transplantacija KMS iz koštane srži ili periferne krvi je zahvat kojim se pacijentu oboljelom od zloćudnih bolesti prije liječenja citostaticima uzimaju KMS. Naime, kod pojedinih stadija bolesti jedina metoda liječenja je primjena ekstremno visoke doze kemoterapije i/ili zračenja prilikom čega nastaje ireverzibilno oštećenje koštane srži. Ekstremno visoke doze citostatika mogu pomoći kod bolesti gdje uobičajene doze lijeka više ne pomažu, ali kako je krvotvorno tkivo najosjetljivije na citotoksične tvari ono se najviše oštećuje. Kako bi se izbjegao ovakav problem pacijentu se prije samog liječenja izvade i zamrznu KMS. Osim što se ovakvim načinom prikupljanja KMS izbjegava potreba za općom anestezijom, smanjuje se mogućnost kontaminacije transplantata tumorskim stanicama. Nakon liječenja citostaticima pacijentu se infuzijom vraćaju njegove odmrznute KMS te se na ovaj način prevladava problem toksičnosti kemoterapije za krvotvorni sustav. Da bi infuzija KMS bila uspješnija potrebne su i potporne mjere liječenja: prevencija i liječenje ozbiljnih infekcija antibioticima i antifungicima, dobra transfuzijska terapija i primjena faktora rasta koje pomažu organizmu u vremenu koje je potrebno da se uspostavi normalna hematopoeza i imunopoeza (13).

Još jedna posebnost autologne transplantacije KMS je ta da se sakupljene matične stanice obrađuju i po potrebi „čiste“ od rezidualnih malignih stanica nakon čega se zamrzavaju. Redukcija broja tumorskih stanica se postiže *in vivo* ili *in vitro* metodom te postupkom zamrzavanja uzorka. *In vivo* metoda uključuje intenziviranje terapije citostaticima prije samog sakupljanja transplantata. *In vitro* metodom redukcija broja tumorskih stanica može se postići na više načina. Metodom *negativne selekcije* gdje se stanice inkubiraju *in vitro* te se primjenom kemijskih agensa i monoklonskih protutijela koji su usmjereni na tumorske antigene smanjuje broj tumorskih stanica. Druga *in vitro* metoda je *pozitivna selekcija* gdje su krvotvorne matične stanice CD34+, a tumorske stanice CD34- te se na temelju ove razlike mogu izdvojiti zdrave stanice iz transplantata.

Iako se autologna transplantacija KMS primjenjuje već dugi niz godina, tek se u novije vrijeme bilježi rast u broju autolognih transplantacija KMS. Glavni razlog tomu je što se transplantacija osim kod hematoloških bolesti počela primjenjivati i kod solidnih tumora i autoimunih bolesti. Indikacije za autolognu transplantaciju su: maligni ne-Hodgkinov limfom, Hodgkinove bolesti, akutne leukemije te multipli mijelom. Dobri rezultati se postižu i u liječenju solidnih tumora, npr. karcinom dojke, tumor testisa i neuroblastoma. Značajan napredak pri izvođenju autologne transplantacije KMS primijećen je i kod učestalosti smrtnih ishoda, s prijašnjih 15-20% pao je na 5%.

Glavna prednost autologne transplantacije je ta što pacijentu ne treba HLA podudarni davatelj. Rizik od pojave GvHD ili odbacivanja presatka, koji je glavni uzrok smrti kod alogenih transplantacija, ovdje ne postoji. Glavni nedostatak je u tome što postoji mogućnost kontaminacije vlastitim malignim stanicama ukoliko se one dobro ne „očiste“ što dovodi do relapsa tumora. Kao rezultat agresivne kemoterapije u pacijenta se može razviti mijelosupresija i pancitopenija, a postoji i veći rizik razvoja mijelodisplazije i sekundarne akutne leukemije (17). Primjenom autologne transplantacije izostaje važan imunosni učinak davateljevih stanica protiv tumora GvL. Zbog izostanka navedene reakcije u autolognoj transplantaciji postoji veća mogućnost povrata bolesti u odnosu na alogenu transplantaciju.



## 1.10. Receptori prirodnoubilačkih stanica sličnih imunoglobulinu

Receptori prirodnoubilačkih stanica sličnih imunoglobulinu (engl. *Killer Immunoglobulin-like receptor*, KIR) nalaze na stanicama ubojicama (engl. *Natural killer*, NK) i na T-limfocitima. Glavna uloga im je da reguliraju aktivnost ovih stanica u interakciji s HLA razredom I što mogu činiti na dva načina: aktivacijski i inhibitorno. Većina KIR receptora djeluje inhibitorno te ukoliko prepoznaju MHC molekule u stanici smanjuju njenu citotoksičnu aktivnost. Tek manji dio djeluje suprotno, tj. povećava citotoksičnu aktivnost ukoliko na stanici prepozna MHC molekulu. Ligandi za KIR receptore se nalaze na HLA razredu I i to najvećim dijelom na HLA-C, te nešto manjim na HLA-B, a najmanji dio se nalazi na HLA-A antigenima. KIR receptori se kodiraju na 19 kromosomu i za sada je poznato 15 KIR gena i 2 pseudogena. Glavna osobine KIR gena su poligenost i polimorfizam, što znači da je mogućnost da dvoje nesrodnih osoba dijeli KIR genotip jako mala, te da se genske sekvence uvelike razlikuju između pojedinaca.

KIR geni, ovisno o tome jesu li inhibicijski ili aktivacijski, imaju citoplazmatske nastavke različite duljine. Inhibicijski KIR receptori imaju dugi (engl. *long*, L) citoplazmatski nastavak i stoga oni u svom nazivu imaju „L“. Za razliku od njih aktivacijski KIR receptori imaju kratki (engl. *short*, S) citoplazmatski nastavak te imaju „S“ u nazivu. Također, obje vrste KIR receptora mogu imati 2 ili 3 ekstracelularne domene te ovisno o broju u nazivu mogu imati ili 2D ili 3D. Zadnji broj u njihovu nazivu naznačuje red kojim su ovi geni opisani (npr. KIR2DL1, KIR2DS2 ili KIR3DL1).

Nepodudarnost u KIR genima može dovesti do aloreaktivnosti NK stanica što može utjecati i na uspjeh TKMS. Aloreaktivnost je svojstvo T-limfocita da reagira na antigene tkivne podudarnosti druge jedinice iste vrste. Iz ovog razloga počela su istraživanja gdje se određuju genotipovi HLA-A, -B, -C te KIR receptora da bi se utvrdilo na koji način, pozitivni ili negativni KIR geni utječu na uspješnost TKMS (16).

## **2. CILJ**

Kako bi transplantacija tkiva i organa bila uspješna potrebno je odrediti antigene i gene sustava HLA pomoću serološke metode (test mikrolimfocitotoksičnosti) i metoda molekularne biologije (PCR-SSO, PCR-SSP). Cilj ovog rada bio je objasniti ulogu HLA sustava u transplantaciji krvotvornih matičnih stanica u svrhu liječenja teških hematoloških bolesti, opisati metode koje se koriste u svrhu određivanja antigena i gena sustava HLA te odrediti glavne razlike među njima odnosno prikazati njihove prednosti i nedostatke.

### 3. METODE

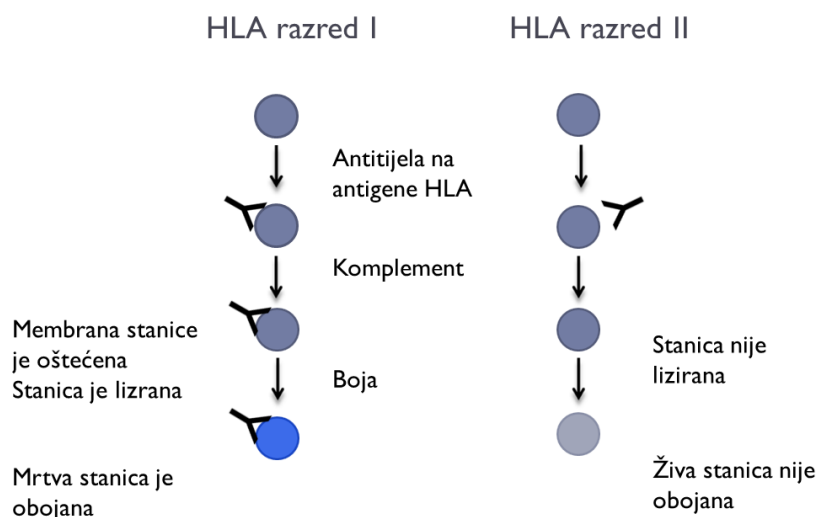
Antigene i gene sustava HLA možemo odrediti na dva načina: serološkim i molekularnim testiranjem. Načini testiranja ovise o potrebama i mogućnostima laboratorija.

U Laboratoriju za tipizaciju tkiva, Centra za transfuzijsku medicinu, KBC-a Split, imala sam priliku vidjeti, a djelomično i sudjelovati u radu tijekom izvođenja testa serološke metode (MLCT) i metode molekularne biologije (PCR-SSO, Luminex metoda). Molekularnu metodu određivanja alela sustava HLA (PCR-SSP) koristila sam u radu prilikom Erasmus stručne prakse u Hirsfeld Institutu za imunologiju i eksperimentalnu terapiju u Poljskoj.

#### 3.1. Serološko određivanje

Serološki test naziva se još i test mikrolimfocitotoksičnosti (MLCT, engl. *microlymphocitotoxicity test*) i služi za određivanje antigena sustava HLA razreda I i II. Test se temelji na reakciji između poznatih protutijela i antigena koji se nalaze na limfocitima pacijenta te posljedičnom aktiviranju komplementa. Poznata protutijela se dobivaju iz seruma aloimuniziranih žena koje imaju više djece, a čija su protutijela određena koristeći već poznate HLA antigene dok se monoklonska protutijela dobivaju koristeći imunizirane miševe.

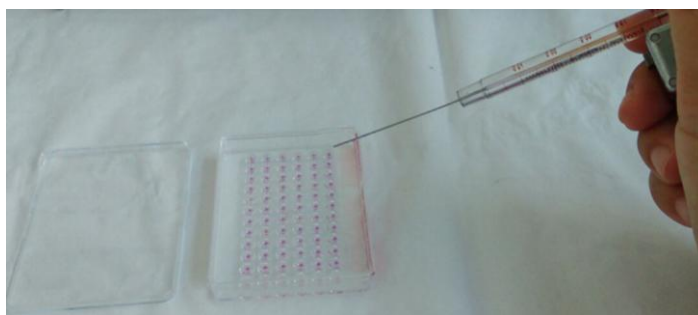
Nakon što se poznatim protutijelima doda serum pacijenta dolazi do reakcije između poznatih protutijela i antigena u serumu. Ukoliko su protutijelo i antigen komplementarni dolazi do stvaranja kompleksa antigen-protutijelo, a ukoliko nisu kompleks antigen-protutijelo se ne stvara. Da bi se odredilo koji i koliki broj antigena se vezao za protutijela potrebno je označiti vezana protutijela. Označavanje protutijela se postiže dodavanjem antihumanog komplementa koji se veže za protutijelo iz nastalog kompleksa antigen-protutijelo. Komplement oštećuje membranu stanice zbog čega stanica lizira, a boja prodire u stanicu. Obojenje je vidljivo pod mikroskopom i označava pozitivan rezultat. Ukoliko nije došlo do stvaranja kompleksa antigen-protutijelo neće doći do kasnijeg vezanja komplementa i prodora boje u stanicu te je taj rezultat negativan (Slika 7).



Slika 7. Princip testa mikrolimfocitotoksičnosti

### 3.1.1. Izvođenje testa

Za izvođenje testa mikrolimfocitotoksičnosti od ispitanika je potrebno uzeti 7 ml periferne krvi s heparinom kao antikoagulantom. Test se započinje izdvajanjem pacijentovih limfocita iz uzorka krvi separacijom na gradijentu gustoće i određivanjem koncentracije. Koncentracija se podešava uz pomoć Burker-Turk-ove komorice. Nakon što se pomiješa 5 $\mu$ l suspenzije limfocita i 5 $\mu$ l boje (tripansko modriilo) suspenzija se stavlja na Burker-Turk-ovu komoricu i pod mikroskopom se određuje koncentracija brojanjem obojenih stanica. Za tipizaciju antigena HLA sustava potrebno je imati 5-6 obojenih stanica ili 10-12 neobojenih stanica po kvadratiću. Ukoliko je potrebno koncentracija limfocita se podešava razrjeđivanjem ili ponovnim centrifugiranjem suspenzije limfocita. Uzorak se zatim uz pomoć Hamilton mikrolitarske šprice stavlja na Terasakijeve pločice na kojima se nalaze već poznata protutijela za određeni razred HLA (Slika 8).



Slika 8. Postupak stavljanja suspenzije limfocita na Terasakijevu pločicu (fotografirano u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split)

Svaka jažica na pločici sadrži protutijela za jedan ili više antigena razreda koji se određuje. Nakon inkubacije od pola sata dodaje se komplement dobiven od kunića te slijedi inkubacija od jednog sata nakon čega se Terasakijeve pločice istresaju, kako bi se odstranio višak nevezanog komplementa, te se uzorak boja tripan modrilom. Jažice koje sadrže dovoljan broj obojenih mrtvih stanica (Tablica 5) upisuju se u tipizacijske listiće te se odrede tkivni antigeni pacijenta.

Tablica 5. Interpretacija rezultata

Postotak mrtvih stanica	Rezultat	Interpretacija
0-10	1	Negativno
11-20	2	Pozitivno/negativno (+)
21-50	4	Slabo pozitivno (++)
51-80	6	Pozitivno (+++)
81-100	8	Jako pozitivno (++++)

### 3.2. Molekularno određivanje

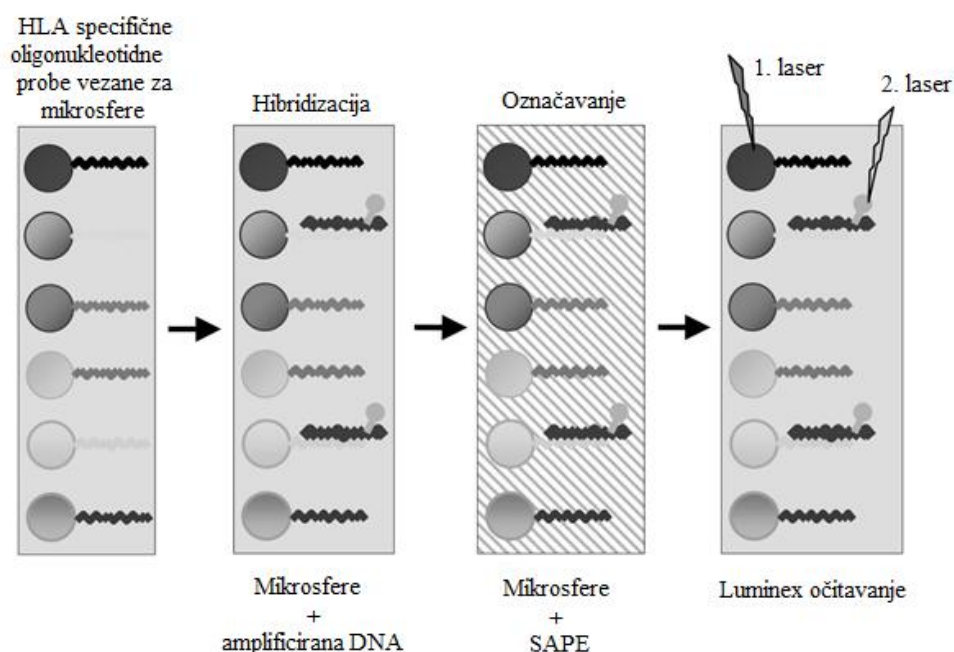
Molekularno određivanje omogućuje da se aleli sustava HLA odrede većom rezolucijom, čime se dobivaju pouzdaniji rezultati koji se kasnije koriste prilikom transplantacije KMS.

Postoje dvije metode molekularnog određivanja alela HLA sustava osobe: PCR-SSO (engl. *Polymerase chain reaction-Sequence Specific Oligonucleotids*) i PCR-SSP (engl. *Polymerase chain reaction-Sequence Specific Primer*) metoda.

U oba testa za uzorak se koristi izolirana DNA pacijenta. Uzorak potreban za molekularno određivanje alela HLA sustava pacijenta je 2 ml periferne krvi s antikoagulansom EDTA. Sam proces izolacije DNA se izvodi u nekoliko koraka pri čemu se koristi kit za izolaciju (NucleoSpin® Dx Blood). U prvom koraku se dodaje proteinaza K koja razgrađuje proteinske molekule i na taj način oslobađa DNA koja se nalazi u jezgri stanice. Nakon denaturacije proteina oslobođenoj molekuli DNA se dodaje etanol kako bi se onemogućio prolaz molekule kroz membranu nakon čega se nizom ispiranja različitim reagensima dobiva čista DNA koja se koristi u daljnjim testovima.

### 3.2.1. PCR-SSO (engl. *Polymerase chain reaction-Sequence Specific Oligonucleotids*)

Ova metoda se temelji na principu specifičnog vezanja amplificiranog DNA produkta iz uzorka za mikrosfere. Mikrosfere su sintetski dobivene čestice na čijoj se površini nalaze specifične oligonukleotidne probe, odnosno specifični slijedovi DNA uz pomoć kojih je moguće ispitivati prisutnost ili odsutnost određenog HLA lokusa u uzorku, a obojane su kombinacijom crvene i infracrvene boje. Za očitavanje rezultata nastalih kompleksa koristi se uređaj Luminex (Luminex LX200 Analyser) koji koristi princip protočne citometrije da mikrosfere jednu po jednu dovede do lasera. Zahvaljujući različitoj kombinaciji boja prisutnoj na svakoj mikrosferi, Luminex identificira svaku mikrosferu koristeći dva lasera. Jedan laser klasificira mikrosferu i određuje probu koja se vezala, a drugi kvantificira relativnu količinu vezane probe na svakoj pojedinoj mikrosferi na temelju čega se očitava rezultat (Slika 9) (14).



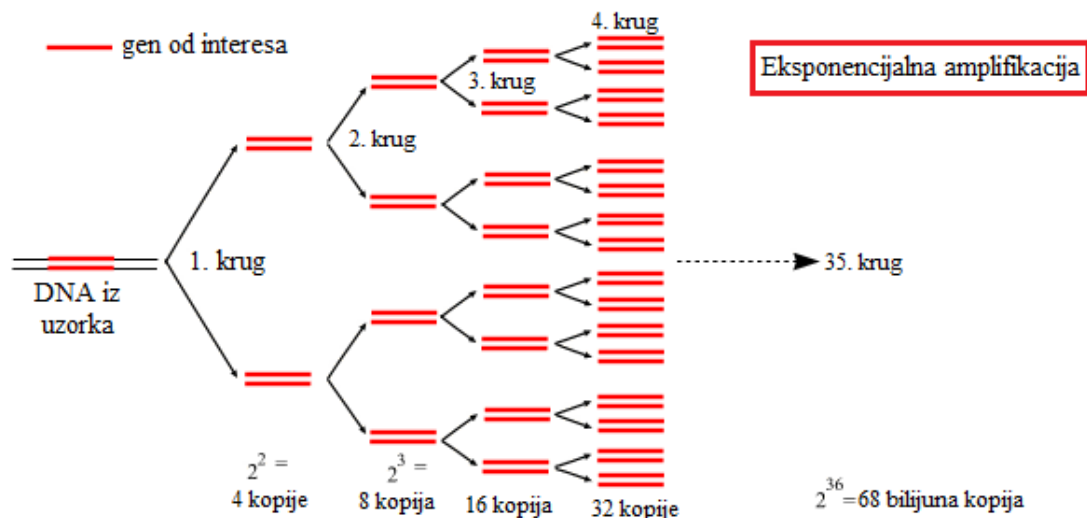
Slika 9. Princip PCR-SSO metode

(izvor: Heinemann, HLA Genotyping and Antibody Characterization Using the Luminex™ Multiplex Technology (7))

#### 3.2.1.1. Izvođenje testa PCR-SSO

Uzorak za izvođenje testa je izolirana DNA koju je potrebno umnožiti odnosno amplificirati, a u tu svrhu se koristi PCR (engl. *Polymerase chain reaction*). Da bi

amplifikacija bila uspješna potrebno je napraviti reakcijsku mješavinu za HLA lokus koji se tim testom želi ispitati. Reakcijska mješavina sadrži Taq polimerazu (0,2μl), reakcijski pufer odnosno Master MIX (6μl) u kojem se nalaze oligonukleotidne početnice (engl. *Primer*) te destiliranu vodu (8,8μl). Reakcijskoj smjesi se doda 5μl DNA te smjesa zatim ide u „Thermocycler“ (LXAMPF RAPID) gdje se amplificira. Tijekom PCR reakcije Taq polimeraza prepoznaje komplementarne dijelove DNA na koje se zatim vežu oligonukleotidne početnice. Program se obično ponavlja 30 puta, a kao rezultat dobijemo 68 milijuna kopija DNA (Slika 10).

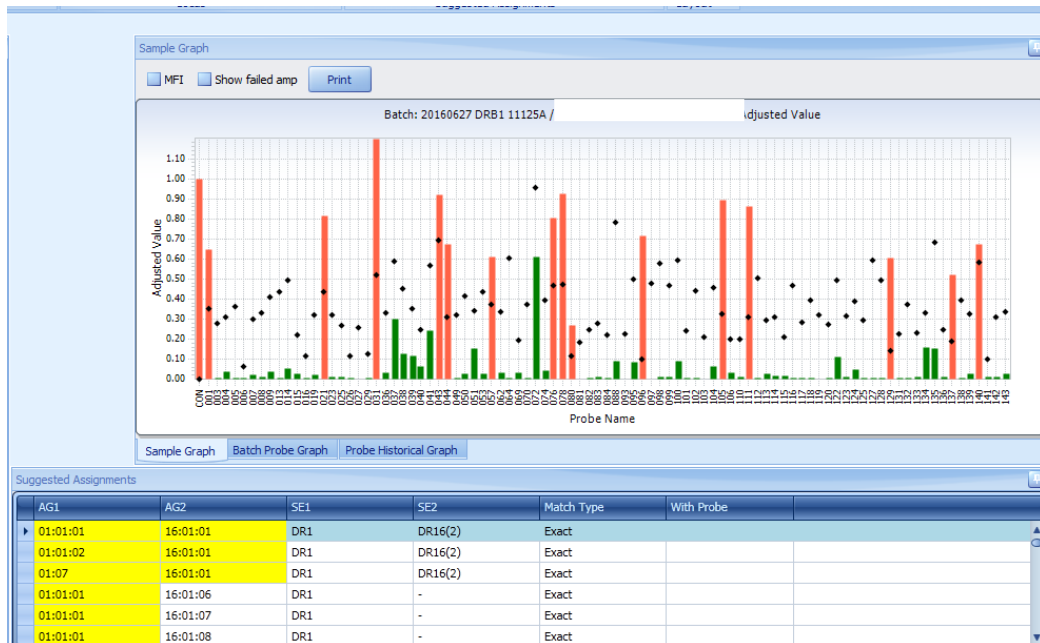


Slika 10. PCR metoda

(izvor: Vierstraete, Principle of the PCR (22))

Nakon PCR reakcije slijedi proces hibridizacije (Lyh hibrid rapid). Volumen potreban za proces hibridizacije je 20μl, tj. 5μl PCR produkta i 15 μl suspenzije mikrosfera. Tijekom hibridizacije, koja traje 20 minuta, dolazi do vezanja PCR produkta na specifične oligonukleidne probe na mikrosferama. Za vizualizaciju nastalog kompleksa dodaje se 170 μl fluorescentne boje za obilježavanje koja se prethodno pripremi uz pomoć 170 μl dilucijske otopine i 0,75 μl streptavidina (R-fikoeritrin konjugirani streptavidin, engl. *Streptavidin-Phycoerytherin*, SAPE). Jedan dio boje veže se za biotin prisutan na početnicama, a drugi dio se veže za nastali kompleks ukoliko je došlo do nastanka istog. Nakon hibridizacije, Coster pločica na kojoj se izvodi test stavlja se u Luminex aparat gdje se vrši očitavanje. Nakon završene analize rezultati hibridizacije služe da se uz pomoć programa (Match IT DNA) odrede geni i antigeni HLA sustava ispitanika (Slika 11). Ovaj program sadrži bazu poznatih,

već određenih gena i antigena sustava HLA koje uspoređuje s rezultatom dobivenim PCR-SSO metodom.

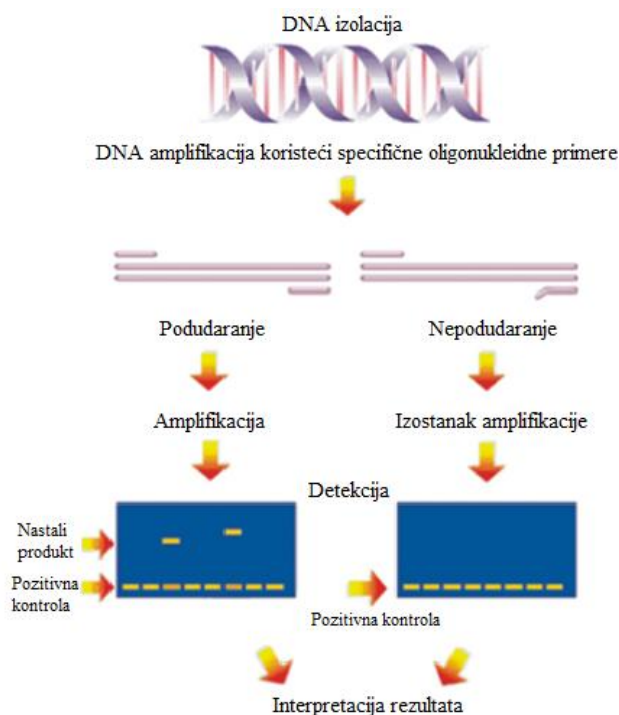


Slika 11. Rezultati dobiveni PCR-SSO metodom u MATCH IT DNA (fotografirano u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split)

### 3.2.2. PCR-SSP (engl. *Polymerase chain reaction-Sequence Specific Primer*)

Ova metoda se temelji na komplementarnosti oligonukleidnih primera s jednim alelom ili grupom alela, ovisno o rezoluciji koja se zahtjeva testom. Ukoliko su početnice neodgovarajuće neće doći do amplifikacije DNA i rezultat je negativan, pozitivan rezultat se dobiva ukoliko je došlo do amplifikacije DNA. PCR-SSP metoda zahtjeva i izvođenje gel elektroforeze gdje nastali amplificirani DNA produkt putuje gelom te se zahvaljujući razlici u duljini fragmenta drukčije prikazuje na gelu i moguće je očitati rezultat (Slika 12).

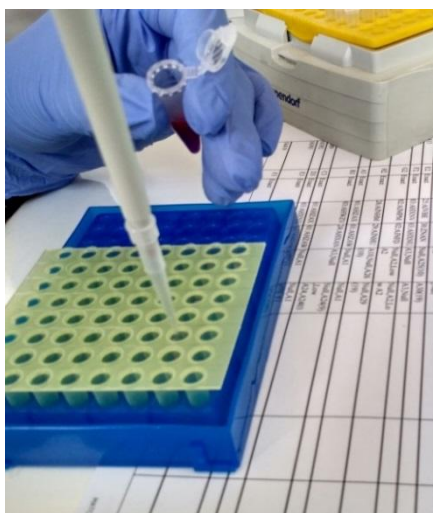




Slika 12. Princip PCR-SSP metode

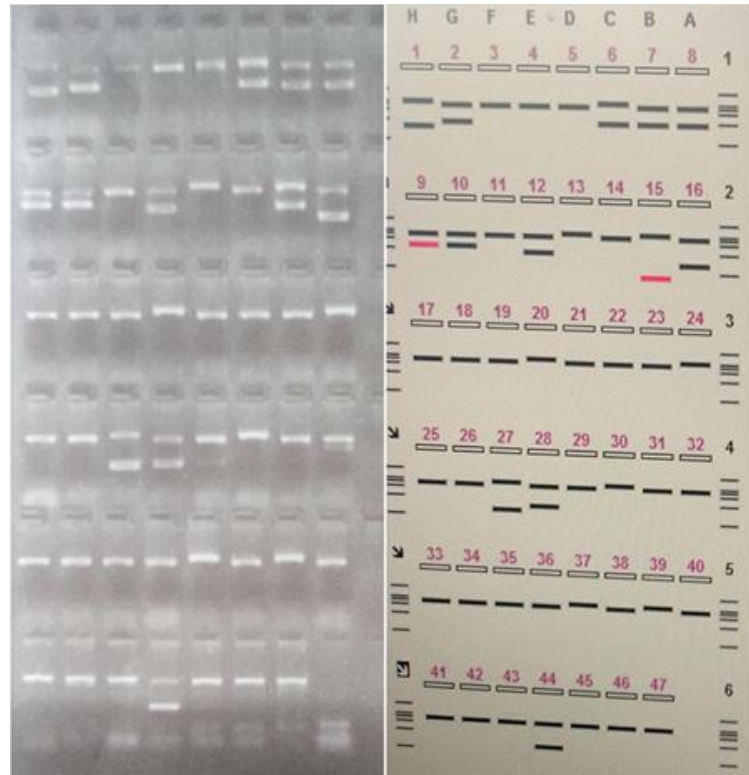
### 3.2.2.1. Izvođenje testa PCR-SSP

Reakcijska mješavina potrebna za ovu metodu priprema se s Master MIX-om koji sadrži Taq polimerazu i denaturiranom vodom te uzorkom odnosno izoliranom DNA. 10  $\mu$ l reakcijske smjese se zatim pipetira u jažice u kojima se nalazi dehidrirana otopina početnica. Olerup SSP<sup>®</sup> pločica se stavlja u Thermocycler (OLERUP program) gdje se DNA amplificira.



Slika 13. Postupak stavljanja reakcijske mješavine u Olerup SSP<sup>®</sup> pločice (fotografirano u Hirszfeld Institutu za imunologiju i eksperimentalnu terapiju)

Nakon amplifikacije PCR-SSP produkt se stavlja na gel elektroforezu zajedno sa bojom (etidni bromid, Simply Safe) te se nakon elektroforeze (15 min) uz pomoć UV svijetla vizualizira rezultat (Slika 14). Program koji se koristi je Proxima AQ-4. Uz uzorke potrebno je staviti i negativnu kontrolu koja pokazuje koliko dobro je test izveden. Interpretacija rezultata se zasniva na prisutnosti ili odsutnosti produkta na gelu te se radi u programu Helmberg SCORE (Slika 14).



Slika 14. Prikaz rezultata dobivenog na gelu i u programu Helmberg SCORE (fotografirano u Hirszfild Institutu za imunologiju i eksperimentalnu terapiju)

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Transplantacija KMS je metoda liječenja koja se u prošlosti rijetko koristila zbog velikog broja mogućih komplikacija i visoke smrtnosti pacijenata. Otkrivanjem sustava HLA gena kao glavnog sustava tkivne podudarnosti omogućen je značajan napredak na polju transplantacijske medicine. Zahvaljujući otkriću sustava HLA transplantacija polako postaje prvi izbor u liječenju hematoloških i nehematoloških bolesti. Ispitivanjem HLA gena postroženi su kriteriji u odabiru potencijalnog davatelja, a rezultat toga je sve veći broj uspješnih transplantacija i smanjeni broj smrtnih slučajeva. Razvojem metoda molekularne biologije i sofisticiranih tehnologija olakšan je i unaprijeđen proces određivanja antigena i gena sustava HLA, prikupljanja transplantata i na kraju same transplantacije.

Najveći dio ovog rada posvećen je upravo metodama za određivanje antigena i gena sustava HLA u čijem izvođenju kao prvostupnik medicinsko-laboratorijske dijagnostike mogu sudjelovati. Tijekom 3 mjeseca Erasmus stručne prakse imala sam priliku vidjeti drukčije metode određivanja antigena i gena sustava HLA i usporediti ih s onima koje se koriste u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, Centra za transfuzijsku medicinu KBC-a Split.

Određivanje antigena i gena sustava HLA se provodi u specijaliziranim laboratorijima koji se bave problematikom iz područja imunogenetike i transplantacijske medicine. Osim tipizacije HLA pacijenata za alogeničnu srodničku i nesrodničku TKMS, tipizacija HLA se radi i u dijagnostičke svrhe ukoliko postoji sumnja na određenu bolest ili predispozicija za istu, budući je poznata povezanost sustava HLA i bolesti. Također, kao što je ranije navedeno, antigeni i geni sustava HLA određuju se i prilikom upisa dobrovoljnog davatelja KMS u registar, na temelju čega se vrši potraga za srodnim davateljem. Primatelju se prije početka traženja komplementarnog HLA davatelja odrede antigeni i geni sustava HLA serološkom ili molekularnom metodom niske rezolucije te HLA protutijela koja mogu biti prisutna u serumu. Ukoliko je davatelj kompatibilan sa primateljem potrebno je napraviti određivanje gena i antigena metodom visoke rezolucije koja je preciznija i daje nam više podataka o podtipovima već određenog gena. Nakon određivanja gena i antigena radi se križna proba (engl. *Crossmatching*) protutijela primatelja i limfocita potencijalnog davatelja kako bi se utvrdila moguća reakcija. Ukoliko je „crossmatching“ pozitivan, postoji velika opasnost od pojave GvHD, koja značajno umanjuje kvalitetu života primatelja, a može ga i životno ugroziti pa je potrebno pronaći novog davatelja čiji limfociti neće reagirati sa protutijelima primatelja.

Iako su i PCR-SSO i PCR-SSP metoda dio molekularnog određivanja gena i antigena sustava HLA, principi i način izvođenja ovih dviju metoda značajno se razlikuju. Prva razlika se odnosi na rezoluciju metode gdje veliku prednost ima PCR-SSP jer osim rezultata srednje rezolucije postoje kitovi koji daju rezultate visoke rezolucije koja ne zahtjeva daljnju provjeru. Glavni nedostatak PCR-SSP metode je količina uzorka koja je potrebna u jednoj reakciji. Količina može varirati ovisno o HLA-lokusu i visini rezolucije, ali potreban je veći broj jažica sa različitim početnicama u svakoj da bi se odredili geni samo jedne regije. Još jedan nedostatak ove metode je što zahtjeva korištenje kancerogenog etidnog bromida prilikom izvođenja elektroforeze. Također, rezultati dobiveni PCR-SSP metodom podliježu određenoj subjektivnoj procijeni te se, kao posljedica, postupak ponekad može nepotrebno ponavljati više puta, no ipak ovom metodom se dobivaju značajno brži rezultati što je u nekim situacijama od velikog značaja jer, ovisno o pacijentovu stanju, transplantacija može biti jako hitna.

PCR-SSO metoda daje rezultate niske ili srednje rezolucije koji, iako su dovoljni prilikom upisa davatelja u registar, nisu dovoljni u procesu testiranja primatelja i davatelja prilikom transplantacije KMS. Kod PCR-SSO metode jedna jažica sadrži uzorak samo jedne osobe i to je dovoljno da bi se odredili geni i antigeni HLA razreda koji se ispituje. Velika prednost PCR-SSO metode je jako mala količina DNA potrebna za analizu, i visoka reproducibilnost dobivenih rezultata.

Obje metode imaju svoje prednosti kao određene nedostatke zbog čega je potrebno daljnje razvijanje metoda kako bi se na što brži i jeftiniji, ali ipak dovoljno precizan, način mogli odrediti geni i antigeni sustava HLA neke osobe. Još jedan razlog za pronalazak brze i precizne metode je velika polimorfnost sustava uzrokovana rekombinacijama među HLA sustavom koje zajedno sa točkastim mutacijama (promjene na razini nukleotida) i genskim konverzijama (zamjena genskih dijelova ulomcima drugih gena) uzrokuju veliki polimorfizam HLA sustava. Do sada je u svijetu otkiveno više od 15 000 alela HLA razreda I i II što upućuje na veliku gensku raznolikost sustava. Među najpolimorfnijim genima svakako se ističe HLA-B lokus razreda I, dok je u razredu II najpolimorfniji HLA-DRB-1 (1).

Zbog velikog broja alela HLA i sve većeg broja gena HLA koji čine genotip (skup svih gena nekog organizma) mogući broj genotipova na razini populacije iznosi  $10^{13}$ . Međutim, zbog neravnoteže udruživanja (engl. *Linkage disequilibrium*, LD) stvaran broj genotipova u određenim populacijama i etničkim grupama je znatno manji, uz češće povezivanje određenih

alela u specifične kombinacije (1). Zbog navedene neravnoteže udruživanja potraga za kompatibilnim HLA davateljem KMS može u isto vrijeme biti olakšana i otežana. Ukoliko je riječ o kombinaciji gena i antigena koji imaju veliku učestalost, vjerojatnost pronalaska jednog ili više kompatibilnih HLA davatelja među određenom populacijom znatno se povećava. Haplotip koji ima vrlo veliku učestalost u svijetu je HLA-A\*01:01, -B\*08:01, -DRB1\*03:01 odnosno HLA-A\*01:01, -B\*08:01, -C\*07:01, -DRB1\*03:01, -DQB1\*02:01. Nažalost određene etničke grupe mogu imati jako rijetke haplotipove te je mogućnost pronalaska HLA podudarnog davatelja skoro pa nemoguća.

Upravo zbog velikog polimorfizma i nepravile raspodjele HLA gena među populacijom jako je važno osnovati registre unutar države i uključiti ih u BMDW jer se na taj način omogućuje i primateljima sa rijetkim HLA haplotipom pronalazak potencijalnog davatelja te mogućnost ozdravljenja. Da bi uopće postojala prilika za osnivanjem državnog registra potrebno je provesti edukaciju zdravstvenog osoblja, ali i građana kako bi ih senzibilizirali o ovoj temi i potakli da se i oni upišu u Hrvatski registar dobrovoljnih davatelja KMS.

## 5. ZAKLJUČAK

1. Transplantacija krvotvornih matičnih stanica je široko prihvaćena terapijska opcija za liječenje raznih vrsta malignih i ne-malignih hematoloških oboljenja
2. Indikacije za transplantaciju KMS su: aplastična anemija, teški kombinirani deficit imunskog sustava (SCID), talasemija, akutna mijeloična leukemija, kronična mijeloična leukemija i mijelodisplastični sindrom, maligni ne-Hodgkinov limfom, Hodgkinove bolesti te multipli mijelom. Dobri rezultati se postižu i u liječenju solidnih tumora, npr. karcinom dojke, tumor testisa i neuroblastoma.
3. Krvotvorne matične stanice (KMS) su nezrele krvne stanice koje imaju sposobnost diferencijacije i proliferacije u sve vrste krvnih stanica. Iako se većina matičnih stanica nalazi u koštanoj srži, postupcima mobilizacije omogućeno je njihovo prikupljanje iz periferne krvi, te se danas kao izvori krvotvornih matičnih stanica koriste koštana srž, periferna krv i pupkovina.
4. Tri su načina transplantacije: alogena (u kojoj su primatelj i davatelj različite osobe koje mogu biti u srodstvu, ali ne moraju), autogena (u kojoj je primatelj i davatelj ista osoba) i transplantacija KMS dobivenih iz pupkovine.
5. Alogenična transplantacija krvotvornih matičnih stanica (aloTKMS) je postupak u kojem primatelj dobiva krvotvorne matične stanice od HLA (engl. *Human Leukocyte Antigen*) podudarnog srodnog darivatelja, najčešće brata ili sestre. U obitelji sa dvoje djece vjerojatnost da bolesnik ima HLA podudarnog darivatelja je svega 25-30%. Ako u obitelji ne postoji HLA podudarni darivatelj isti se tada traži u registrima dobrovoljnih darivatelja krvotvornih matičnih stanica.
6. Aleli sustava HLA određuje se serološkim metodama i metodama molekularne biologije (PCR-SSP, PCR –SSO).

## 6. LITERATURA

1. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Marušić M, Lukinović-Škudar V i sur. *Imunologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
2. Armson BA, Allan DS, Casper RF. Umbilical Cord Blood: Counselling, Collection and Banking. *J Obstet Gynaecol Can*. 2015; 37(9): 832-846.
3. Devergie A. Graft versus host disease. *The EMBT handbook*. 2008; 11: 218-231.
4. Copelan EA. Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *N Engl J Me*. 2006; 354: 1813-1826.
5. Grubić Z, Janković KS, Maskalan M, Serventi-Seiwerth R, Mikulić M, Kamenarić MB i sur. HLA allele and haplotype polymorphisms among Croatian patients in an unrelated hematopoietic stem cell donor search program. *Transpl Immunol*. 2014; 31(3): 119-124.
6. Hans-Jochem K. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood*. 2008; 112: 4371-4383.
7. Heinemann FM. HLA genotyping and antibody characterization using the Luminex™ multiplex technology. *Transfus Med Hemother*. 2009; 36(4): 273-278.
8. <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>
9. <https://www.bmdw.org/information/registry-information>
10. Karen K, Ballen KK, Gluckman E, Broxmeyer HE. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood*. 2013; 122: 491-498
11. Kindt TJ, Osborne BA, Goldsby RA. *Kuby Immunology*. New York: Freeman, W. H. & Company; 2006.
12. Krans B. Bone Marrow Transplant. *Healthline*. 2016.
13. Labar B, Hauptmann E i sur. *Hematologija*. Zagreb: Školska knjiga; 2007.
14. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA i sur. Nomenclature for factors of the HLA system 2010. *Tissue Antigens*. 2010; 75(4): 291-455.
15. Narinder KM, Gurvinder K. Gene map of the human leukocyte antigen (HLA) region, *Cambridge University Press*. 2003.
16. Rajagopalan S, Long EO. Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease. *J Exp Med*. 2005; 201(7): 1025-1029.
17. Champlin R. Selection of Autologous or Allogeneic Transplantation. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 2003.

18. Sertić J. i sur. Klinička kemija i molekularna dijagnostika: Laboratorijski aspekti transplantacije krvotvornih matičnih stanica. Zagreb: Medicinska naklada; 2008. 19: 218-224.
19. Serventi-Seiwerth R, Mikulić M, Mrić M, Grubić Z, Bojanić I, Štingl K i sur. Transplantacija alogeni krvotvornih matičnih stanica od HLA podudarnog nesrodnog darivatelja. KBC Zagreb: Zavod za hematologiju: Klinika za unutarnje bolesti KBC Zagreb, Laboratorij za HLA tipizaciju, Zavod za transfuziju; 2011. 381-387
20. Choo, SY. The HLA System: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Med J.* 2007; 48(1): 11-23.
21. Vanderson R, Eliane G. Outcomes of transplantation in children with acute leukaemia. *The Lancet.* 2007; 9577: 1906-1908.
22. Vierstraete A. Principle of the PCR. University of Ghent. 1999.



## 7. SAŽETAK

**Uvod:** Krvotvorne matične stanice (KMS) su ishodište svim krvnim stanicama organizma. Osobi oboljeloj od teških hematoloških bolesti transplantacijom KMS potrebno je nadoknaditi vlastite nefunkcionalne matične stanice. Tri glavna izvora matičnih stanica su: koštana srž, periferna krv te krv iz pupkovine odnosno umbilikalna krv. Transplantacije se dijele na: alogenu, autolognu te transplantaciju KMS iz umbilikalne krvi.

Prije same transplantacije potrebno je odrediti primateljeve i davateljeve gene i antigene sustava HLA kao najsloženijeg genetskog sustava kod čovjeka. Za uspješnu alogenu transplantaciju potrebno je da podudarnost alela lokusa HLA između primatelja i davatelja bude 10/10 (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1).

**Cilj:** Cilj ovog rada je bilo objasniti ulogu sustava HLA u transplantaciji KMS te opisati i objasniti razlike između metoda koje se u tom procesu izvode.

**Materijali i metode:** Metode koje se koriste za određivanje antigena i alela sustava HLA su: serološka metoda (test mikrolimfocitotoksičnosti) te metode molekularne biologije: PCR-SSP i PCR-SSO.

**Rezultati i rasprava:** Otkrivanjem sustava HLA transplantacija KMS izbor je u liječenju mnogih hematoloških bolesti. Razvojem metoda određivanja gena i antigena sustava HLA povećana je uspješnost transplantacija krvotvornih matičnih stanica. Usavršavanje metoda molekularne biologije donosi i nove spoznaje o još većoj složenosti sustava HLA.

**Ključne riječi:** transplantacija krvotvornih matičnih stanica, HLA, srodni i nesrodni davatelji, test mikrolimfocitotoksičnosti, PCR-SSP, PCR-SSO

## 8. SUMMARY

**Introduction:** Hematopoietic stem cells (HSCs) are the stem cells that give rise to all the other blood cells through the process of haematopoiesis. Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) involves the intravenous infusion of autologous or allogeneic stem cells collected from bone marrow, peripheral blood, or umbilical cord blood to re-establish hematopoietic function in patients whose bone marrow or immune system is damaged or defective.

This procedure is often performed as part of therapy to eliminate a bone marrow infiltrative process, such as leukemia, or to correct congenital immunodeficiency disorders. Before transplantation it is necessary to determine HLA genes and antigens of recipients and donors. For successful allo-transplantation it is necessary to have 10 of 10 (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1) allele HLA loci compatibility between recipient and donor.

**Goal:** The aim of this thesis was to explain the role of HLA in transplantation of HSCs but also to describe and explain difference between the methods in use.

**Materials and methods:** The methods used for the determination of antigens and alleles of HLA are: serological method (microlymphocitotoxicity test) and molecular biology methods: PCR-SSP and PCR-SSO.

**Results and discussion:** After the discovery of HLA haematopoietic stem cells transplantation has become choice in treatment for many hemological diseases. The development of methods for gene and antigen HLA determination leads to increased efficacy in transplantation of HSC. Training methods of molecular biology bring new insights into the even greater complexities of the HLA.

**Key words:** haematopoietic stem cell transplantation, HLA, related and unrelated donors, microlymphocitotoxicity test, PCR-SSP, PCR-SSO.

## 9. ŽIVOTOPIS

### OPĆI PODACI

**Ime i prezime:** Josipa Jurić

**Datum i mjesto rođenja:** 03.11.1994., Split, Hrvatska

**Adresa:** Jurići 16, 21231 Klis

**Telefon:** 021 253 124

**Mobitel:** 091 974 88 22

**E-mail adresa:** [josipa.juric24@gmail.com](mailto:josipa.juric24@gmail.com)

### OBRAZOVANJE:

2001.-2009. Osnovna škola Petra Kružića, Klis

2009.-2013. Zdravstvena škola, Split; smjer: Medicinsko laboratorijski tehničar

2013.-2017. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija, Split; smjer: Medicinsko laboratorijska dijagnostika

01.06.2016.–30.09.2016. Stručna praksa; L. Hirszfild Institut za imunologiju i ekperimentalnu terapiju