

Uloga rezultata analize mikrosatelitskih lokusa u transplantaciji hematopoetskih matičnih stanica

Štingl, Katarina

Doctoral thesis / Disertacija

2009

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:582145>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-16**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Katarina Štingl

**Uloga rezultata analize
mikrosatelitskih lokusa u
transplantaciji hematopoetskih
matičnih stanica**

DISERTACIJA



Zagreb, 2009.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Katarina Štingl

**Uloga rezultata analize
mikrosatelitskih lokusa u
transplantaciji hematopoetskih
matičnih stanica**

DISERTACIJA

Zagreb, 2009.

Disertacija je izrađena u Zavodu za tipizaciju tkiva Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Zagreb

Voditelj rada: doc. dr. sc. Zorana Grubić

ZAHVALE

Zahvaljujem svojoj mentorici, doc.dr.sc. Zorani Grubić, koja je uvijek bila spremna dati savjet, pružiti pomoć i podijeliti svoje iskustvo, ali me istovremeno i poticala na samostalan rad i iznošenje vlastitih ideja te mi time pomogla postaviti temelje za moj budući rad u znanosti. Želim zahvaliti i dr.sc. Renati Žunec jer je uvijek rado davala svoj doprinos, bilo savjetima bilo konstruktivnom kritikom, u rješavanju problema koji su neizostavni dio svakog, pa tako i ovog istraživanja. Svim djelatnicima Zavoda za tipizaciju želim zahvaliti na razumijevanju i podršci, a posebno Alenu Prpiću, zdrav.lab.teh., Danijeli Sviličić, med.lab.ing. i Kristini Kopic, med.lab.ing., za pomoć koju su mi pružili u izvođenju ovog rada. U ovoj zahvali moram spomenuti i djelatnike Klinike za unutarnje bolesti i Klinike za pedijatriju, posebice prof.dr.sc. Borisa Labara i dr. Ranku Seiwert-Serventi, te im zahvaliti na izvrsnoj suradnji. Naposljetku, želim zahvaliti svojoj obitelji jer su mi, uz njihovu ljubav i bezuvjetnu podršku, sve prepreke na koje sam naišla tijekom izrade ovog rada, bile savladive.

KAZALO

1.	Uvod	1
1.1.	Transplantacija hematopoetskih matičnih stanica	2
1.1.1.	Principi i postupci u HSCT	2
1.1.2.	Imunološki procesi u HSCT	7
1.1.3.	Primjena HSCT	14
1.2.	Kimerizam u HSCT	15
1.2.1.	Važnost praćenja kimerizma nakon HSCT	17
1.2.2.	Metode za određivanje statusa kimerizma nakon HSCT	19
1.2.2.1.	Metoda fenotipizacije eritrocita	21
1.2.2.2.	Citogenetska analiza	21
1.2.2.3.	Metoda FISH	21
1.2.2.4.	Metoda RFLP	22
1.2.2.5.	Analiza lokusa STR/VNTR	22
1.2.2.6.	Analiza biljega kromosoma Y i X i amelogenina	22
1.2.2.7.	Metoda RT-PCR	23
1.3.	Kratka uzastopna ponavljanja slijeda DNK	23
1.3.1.	Mikrosateliti non-HLA	28
1.3.1.1.	Važnost mikrosatelita non-HLA u praćenju kimerizma nakon HSCT	28
1.3.1.2.	Primjena mikrosatelita non-HLA u drugim područjima	31
1.3.2.	Mikrosateliti HLA	31
1.3.2.1.	Važnost mikrosatelita HLA u izboru podudarnog nesrodnog davatelja hematopoetskih matičnih stanica	32
1.3.2.2.	Primjena mikrosatelita HLA u drugim područjima	34
2.	Ciljevi istraživanja	36

3.	Ispitanici, materijal i metode	38
3.1.	Ispitanici	39
3.1.1.	Zdravi ispitanici	39
3.1.2.	Parovi primatelj-davatelj	39
3.2.	Materijal	40
3.3.	Metode	40
3.3.1.	Izolacija DNK	40
3.3.2.	Određivanje alela lokusa non-HLA	40
3.3.2.1.	Osobine mikrosatelita i minisatelita non-HLA	40
3.3.2.2.	Umnažanje mikrosatelita i minisatelita non-HLA	41
3.3.3.	Određivanje alela mikrosatelitskih lokusa HLA	43
3.3.3.1.	Osobine mikrosatelita HLA	43
3.3.3.2.	Umnažanje mikrosatelita HLA	44
3.3.4.	Elektroforeza	47
3.3.5.	Postupak određivanja mikrosatelita HLA kod ispitanika prije HSCT	48
3.3.6.	Postupak određivanja lokusa non-HLA kod ispitanika nakon HSCT	48
3.3.7.	Podjela ispitanika s obzirom na udio stanica primatelja i davatelja u uzorku primatelja nakon HSCT	49
3.3.8.	Izračunavanje udjela stanica primatelja i davatelja u uzorku primatelja nakon HSCT	49
3.3.9.	Statistička obrada podataka	52
4.	Rezultati	54
4.1.	Analiza raznolikosti mikrosatelita i minisatelita non-HLA	55
4.1.1.	Raspodjela alela na mikrosatelitskim i minisatelitskom lokusu non-HLA	55
4.1.2.	Analiza informativnosti mikrosatelitskih i minisatelitskog lokusa non-HLA	59

4.2.	Praćenje kimerizma analizom mikrosatelita i minisatelita non-HLA	61
4.3.	Analiza raznolikosti mikrosatelita HLA	69
4.3.1.	Raspodjela alela na mikrosatelitskim lokusima HLA	69
4.3.2.	Analiza neravnoteže udruživanja između mikrosatelita HLA i lokusa HLA	73
4.4.	Analiza utjecaja podudarnosti za mikrosatelite HLA na ishod HSCT	78
4.5.	Analiza utjecaja mikrosatelita unutar regije TNF na ishod HSCT	84
5.	Rasprava	89
6.	Zaključci	111
7.	Popis literature	114
8.	Popis kratica	130
9.	Sažetak	135
10.	Summary	137
11.	Životopis	139

1. UVOD

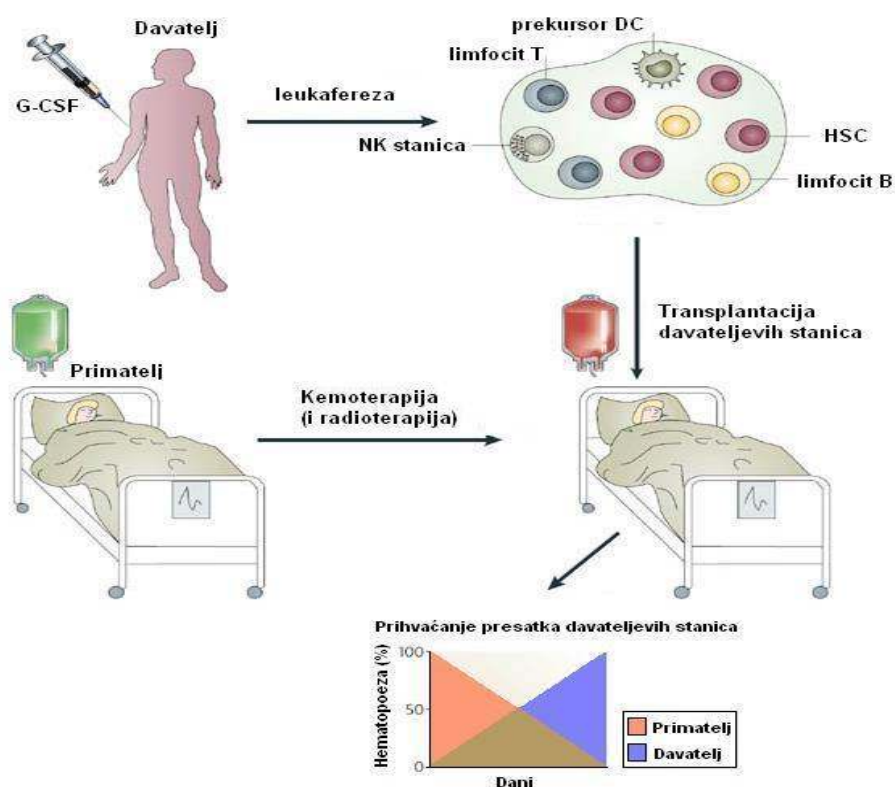
1.1. TRANSPLANTACIJA HEMATOPOETSKIH MATIČNIH STANICA

Transplantacija hematopoetskih matičnih stanica (*engl.* Hematopoietic Stem Cell Transplantation, HSCT), u prošlosti nazivana i transplantacijom koštane srži, svoje začetke vuče još iz tridesetih godina prošlog stoljeća kad su provedeni prvi pokusi s infuzijom koštane srži u bolesnika s aplastičnom anemijom (1). Tijekom 1959. godine Thomas E.D. je uspio provesti prvu uspješnu transplantaciju i to u dva slučaja bolesnika s akutnom limfatičnom leukemijom kojima su davatelji bili njihovi identični blizanci (2). Od tog trenutka nadalje, rezultati HSCT postaju sve bolji. Za to je uvelike zaslužno otkriće glavnog sustava tkivne podudarnosti (*engl.* Human Leukocyte Antigen, HLA) i njegove važnosti u izboru davatelja, ali i poboljšavanje postupaka i metoda koje se koriste pri samoj transplantaciji radi sprječavanja reakcije transplantata protiv primatelja (*engl.* Graft-versus-Host Disease, GvHD), bolja potpora bolesnika lijekovima nakon transplantacije kao i provođenje transplantacije za vrijeme remisije. Iako je sam postupak još uvijek povezan s brojnim rizicima i komplikacijama, danas se HSCT više ne smatra eksperimentalnom metodom, već je, s oko 20 000 godišnje izvedenih transplantacija u svijetu, prihvaćena kao metoda izbora u liječenju čitavog niza različitih bolesti (3).

1.1.1. PRINCIPI I POSTUPCI U HSCT

Osnove liječenja HSCT datiraju još iz pokusa provedenih za vrijeme II Svjetskog rata, kada je na životinjskom modelu dokazano da se zračenjem može potpuno ukinuti funkcija koštane srži. Nastavak istraživanja pokazao je da je tako ozračene životinje moguće spasiti transfuzijom koštane srži druge životinje, što je bio temelj za uvođenje ove metode u liječenju različitih hematoloških bolesti.

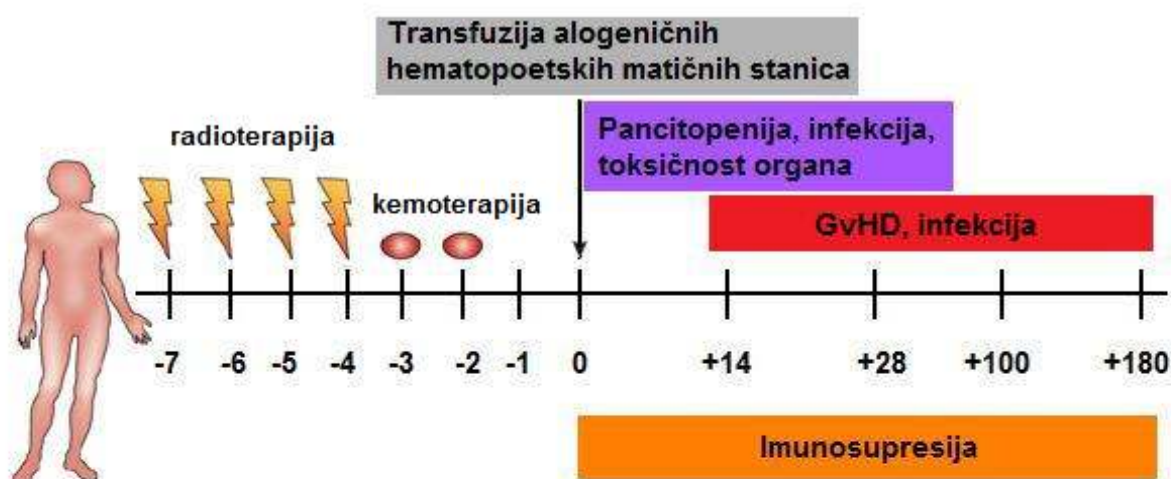
Dva su ključna postupka u samoj transplantaciji (slika 1). Prvi je priprema bolesnika prije transplantacije koja najčešće uključuje kombinaciju kemoterapije i zračenja sa svrhom postizanja nekoliko ciljeva. Prvi cilj je supresija imunološkog sustava bolesnika čime se smanjuje mogućnost odbacivanja transplantata. Drugi cilj je, ukoliko se radi o nekoj malignoj bolesti kao što je npr. leukemija, smanjivanje broja tumorskih stanica. Konačno, ovim postupkom se smanjuje i broj bolesnikovih hematopoetskih stanica. Osim ovih mijeloablativnih postupaka, koristi se i tzv. kondicioniranje smanjenog intenziteta, poznato i kao nemijeloablativno kondicioniranje. Taj postupak se ne oslanja na citotoksični utjecaj kondicioniranja u svrhu uklanjanja tumorskih stanica, već na utjecaj limfocita T davatelja iz transplantata, te tako omogućava transplantaciju i kod onih bolesnika koji ne bi mogli podnijeti standardni, mijeloablativni postupak (Slika 2).



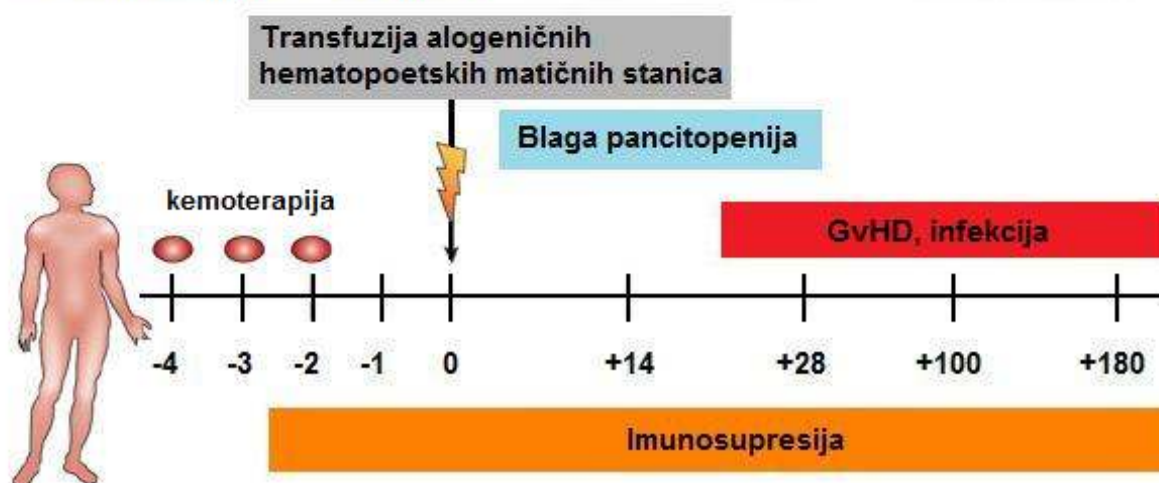
Legenda: G-CSF - čimbenik rasta kolonije granulocita; DC - dendritička stanica; HSC - hematopoetska matična stanica

Slika 1. Postupak HSCT

a) Mijeloablativna alogenična HSCT



b) Nemijeloablativna alogenična HSCT

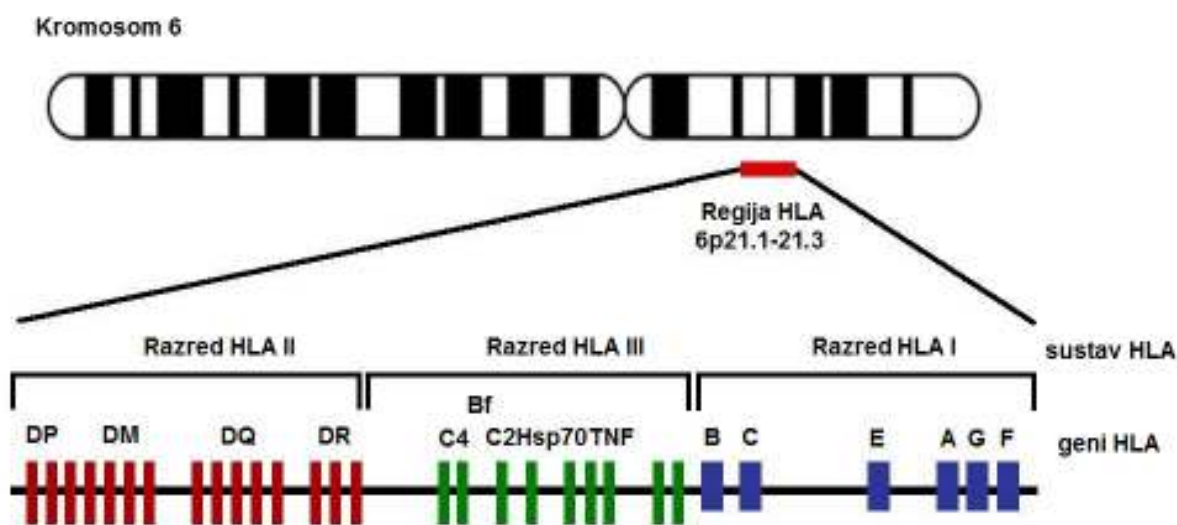


Legenda: HSCT - transplantacija hematopoetskih matičnih stanica; GvHD - reakcija transplantata protiv primatelja

Slika 2. Shema mijeloablativnog i nemijeloablativnog kondicioniranja prije HSCT

Drugi dio postupka odnosi se na samu transplantaciju stanica davatelja. Unutar transplantata nalaze se hematopoetske matične stanice koje će obnoviti hematološki i imunološki sustav primatelja, ali i zrele stanice davateljevog imunološkog sustava, koje su ključne za postizanje učinka transplantata protiv tumora (*engl.* Graft-versus-Leukemia, GvL). Radi se prvenstveno o citotoksičnim limfocitima T (4).

Izbor podudarnog davatelja je jedan od najvažnijih čimbenika za uspješan ishod transplantacije. Otkriće sustava HLA predstavlja jednu od prekretnica u povijesti HSCT. Unutar ovog sustava nalaze se geni HLA koji kodiraju molekule ključne za pokretanje imunološke reakcije (slika 3). Naime, te molekule igraju glavnu ulogu u sazrijevanju limfocita T u timusu. Tijekom sazrijevanja, limfociti T prolaze kroz proces pozitivne i negativne selekcije kojom se osigurava preživljavanje samo onih limfocita T koji su sposobni prepoznati vlastitu molekulu HLA. Molekule HLA također prezentiraju antigen limfocitu T. Aktivacija limfocita T moguća je samo ako on prepozna antigen u sklopu vlastite molekule HLA, te je stoga jasno da će u transplantacijskom okruženju podudarnost primatelja i davatelja za gene, odnosno molekule HLA biti od izuzetne važnosti (5).



Slika 3. Mapa sustava HLA

Postupak pronalaska podudarnog davatelja započinje s određivanjem gena HLA bolesnika i članova njegove uže obitelji (roditelji, braća i sestre). Budući se geni HLA nasljeđuju prema mendelskim zakonima, vjerojatnost pronalaska davatelja među braćom i sestrama iznosi 25%. Ukoliko roditelji nose česte alele gena HLA, postoji mogućnost i da jedan od roditelja bude davatelj. Pretraživanje je opravdano proširiti i na članove šire obitelji ako roditelji potječu iz

uske, zatvorene sredine ili su u daljnjem srodstvu. U slučajevima kada se unutar obitelji ne može pronaći odgovarajući davatelj, započinje se s postupkom pretraživanja registara dobrovoljnih nesrodnih davatelja. Kriteriji podudarnosti za gene HLA ovise o tome da li je davatelj srodna ili nesrodna osoba. Ukoliko je davatelj brat ili sestra bolesnika, primatelj i davatelj se smatraju podudarnima ako su identični za gene HLA-A, -B i -DRB1. Geni HLA se nasljeđuju u bloku zbog male učestalosti crossing-overa unutar sustava HLA, te stoga podudarnost za gene HLA-A, -B i -DRB1 primatelja i davatelja istovremeno znači i podudarnost za čitav haplotip HLA. To nije slučaj ako je davatelj nesrodna osoba te su stoga i kriteriji podudarnosti za takvog davatelja stroži. U najvećem broju transplantacijskih centara, nesrodni davatelj i bolesnik moraju biti identični za gene HLA-A, -B, -Cw, -DRB1 i -DQB1 da bi se osigurao uspješan ishod HSCT (6).

Dugi niz godina je jedini izvor hematopoetskih matičnih stanica za transplantaciju bila koštana srž dobivena aspiracijom iz ilijačnih kostiju davatelja. Posljednjih godina se međutim sve više koriste i matične stanice dobivene iz periferne krvi (*engl.* Peripheral Blood Stem Cells, PBSC). Naime, nakon primjene čimbenika rasta kolonija granulocita (*engl.* Granulocyte Colony Stimulating Factor, G-CSF) moguće je iz periferne krvi aferezom dobiti velik broj matičnih stanica. Prednost ovog pristupa u usporedbi s transplantacijom matičnih stanica iz koštane srži je brže prihvaćanje transplantata, dok je nedostatak češća pojava kroničnog GvHD-a. Iz tog razloga se danas koriste oba pristupa, ovisno o tipu bolesti kao i nekim drugim čimbenicima, npr. dobi bolesnika. Naposljetku, u novije vrijeme se sve više u transplantaciji koriste matične stanice iz umbilikalne krvi, a prednost ovakvog transplantata očituje se u brznoj dostupnosti transplantata budući se radi o smrznutim jedinicama umbilikalne krvi. Važna je činjenica da je umbilikalna krv relativno siromašna zrelim limfocitima T, iz tog razloga je i smanjen rizik od GvHD-a, a rezultat toga je mogućnost provođenja transplantacije i s određenim brojem nepodudarnosti za gene HLA. S druge strane, ovaj tip transplantacije sa sobom nosi povećani rizik od zatajenja transplantata, bilo uslijed odbacivanja ili zbog neprihvatanja transplantata. Isto tako su i prihvaćanje transplantata matičnih stanica iz umbilikalne krvi i oporavak hematopoetskog

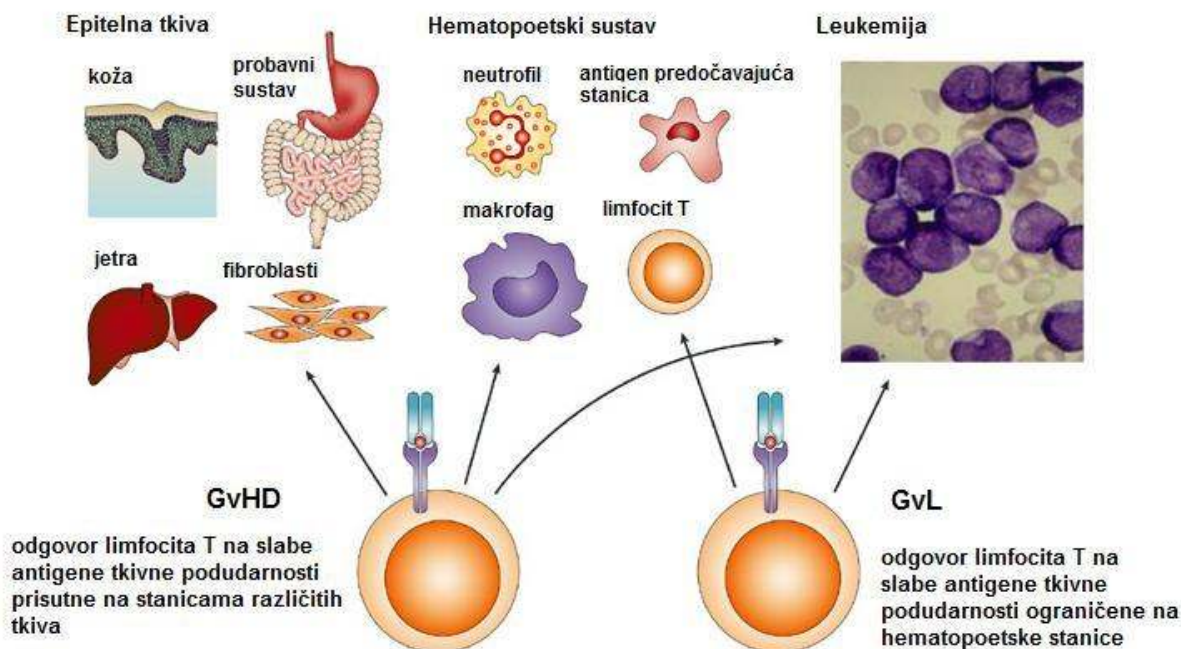
sustava sporiji u usporedbi s ostalim izvorima matičnih stanica što rezultira povećanim rizikom za infekcije (3).

Nastavak liječenja bolesnika nakon transplantacije uključuje čitav niz postupaka nužnih za povoljan ishod. Nakon transplantacije, bolesnici koji su bili podvrgnuti mijeloablativnom protokolu, nalaze se u stanju pancitopenije i osjetljivi su na različite infekcije te stoga moraju boraviti u sterilnom okruženju. Potpora transfuzijama eritrocita i trombocita je nužna, kao i profilaktičko liječenje protiv bakterijskih, virusnih i gljivičnih infekcija. Provođenje imunosupresije bolesnika nakon transplantacije potrebno je i radi sprječavanja razvoja GvHD-a. Konačno, jedan od postupaka koji se primjenjuje nakon transplantacije, a predstavlja možda i najveći napredak u posljednjih nekoliko godina u ovom području, je infuzija limfocita davatelja (*engl.* Donor Lymphocyte Infusion, DLI). DLI se koristi za poboljšanje učinka GvL, odnosno u slučajevima kada se pojavi relaps bolesti (4).

1.1.2. IMUNOLOŠKI PROCESI U HSCT

Postupak HSCT je razvijen kako bi omogućio primjenu inače smrtonosnih doza zračenja i/ili kemoterapije kojima se uklanjaju tumorske stanice. Naime, budući niti zračenje niti citostatici koji se koriste u tim postupcima nisu specifični za tumor, takvo intenzivno kondicioniranje dovodi do uništenja hematopoetskog i imunološkog sustava bolesnika te je nužna HSCT kako bi se osigurao njihov oporavak. Nažalost, niti jedan od dosad istraživanih postupaka kondicioniranja ne osigurava potpuno uklanjanje tumora. Za uklanjanje preostalih tumorskih stanica ključan je učinak GvL zrelih stanica iz transplantata i to prije svega limfocita T. Iste stanice su odgovorne i za razvoj GvHD-a te ta dva procesa zapravo predstavljaju dva naličja iste medalje (slika 4). Jedan od najvećih izazova znanstvenicima iz područja transplantacijske imunologije predstavlja upravo pitanje da li je ta dva procesa moguće

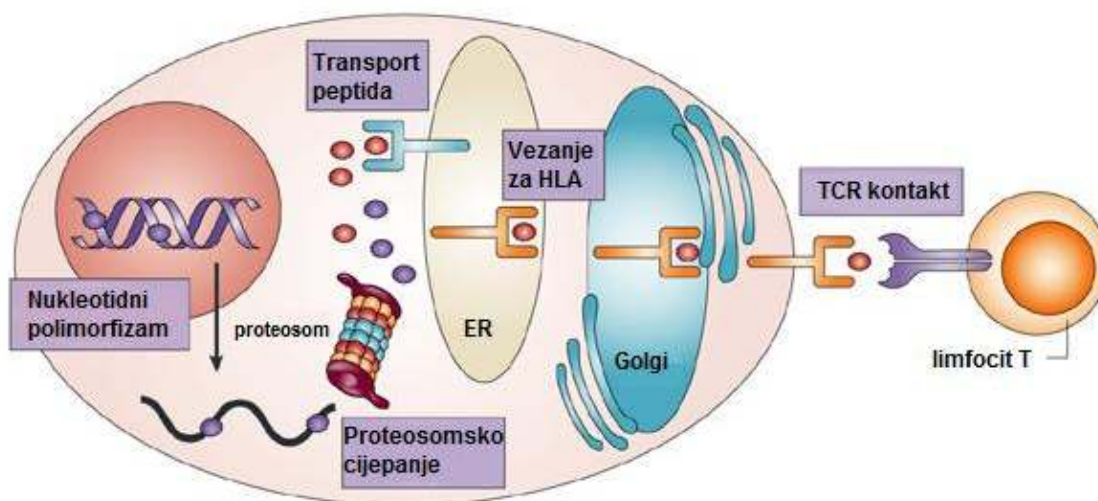
razdvojiti, odnosno da li je moguće razviti postupak kojim bi se spriječio GvHD, a da se pritom ne ukine učinak GvL (7).



Legenda: GvHD - reakcija transplantata protiv primatelja; GvL - učinak transplantata protiv tumora

Slika 4. Uloga limfocita T u nastanku GvHD i učinka GvL nakon HSCT

I u slučaju učinka GvL i u slučaju GvHD-a nezaobilaznu ulogu igraju molekule HLA razreda I i II koje prezentiraju antigene citotoksičnim (CD8+) i pomoćničkim (CD4+) limfocitima T. Nepodudarnost za gene HLA primatelja i davatelja predstavlja najveći rizik za razvoj GvHD-a ili odbacivanje transplantata. Premda je učestalost GvHD-a puno manja ukoliko su primatelj i davatelj podudarni za gene HLA, on se ipak pojavljuje i to kao posljedica odgovora limfocita T na slabe antigene tkivne podudarnosti (*engl.* minor Histocompatibility Antigens, mHAg). Slabi antigen tkivne podudarnosti može biti bilo koji protein u organizmu koji unutar slijeda nukleotida svog gena posjeduje varijabilnost, odnosno ako za taj protein postoje razlike bilo u slijedu aminokiselina bilo u razini ekspresije između jedinki unutar populacije (slika 5).



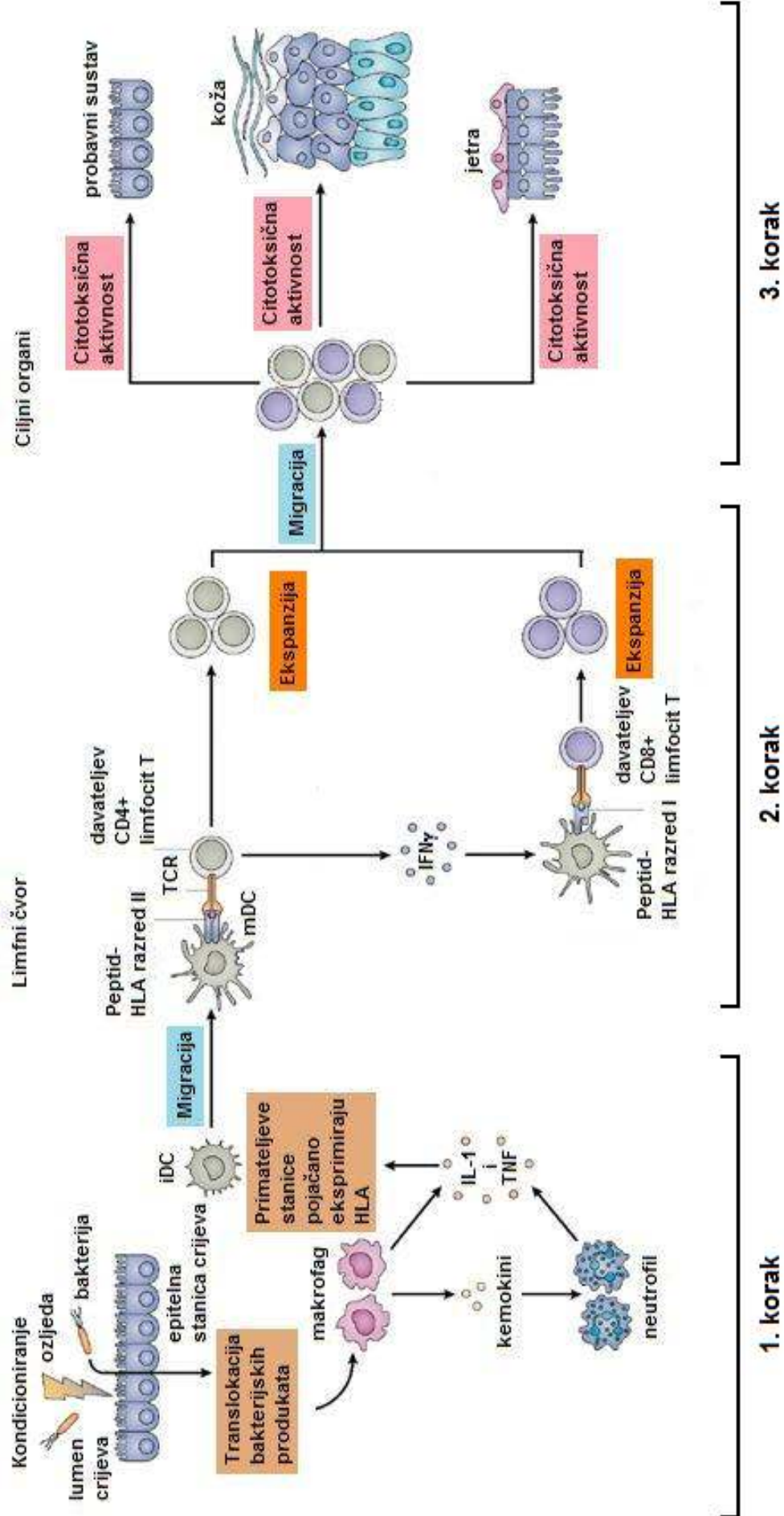
Legenda: TCR - T stanični receptor

Slika 5. Mehanizam nastanka slabih antigena tkivne podudarnosti

Razlika između učinka GvL i GvHD-a leži upravo u vrsti mHAg koji potiče odgovor limfocita T. Ako se radi o više mHAg koji su specifični za tumorsku stanicu, razvija se GvL učinak. Ukoliko se ti antigeni nalaze na različitim zdravim tkivima, dolazi do razvoja GvHD-a (8).

Jedna od najtežih komplikacija nakon HSCT je GvHD. Javlja se u dva oblika: akutni i kronični GvHD. Akutni GvHD karakterizira oštećenje kože, jetre i probavnog sustava, dok kronični oblik ima puno raznovrsnije manifestacije i može nalikovati autoimunim sindromima. Granica do koje se GvHD klasificira kao akutni oblik je 100 dana nakon transplantacije, no radi se prvenstveno o granici koja je postavljena radi olakšavanja epidemioloških studija te je za potvrdu potrebna pato-histološka klasifikacija.

Sam proces nastanka akutnog GvHD-a se može podijeliti u tri koraka (slika 6).



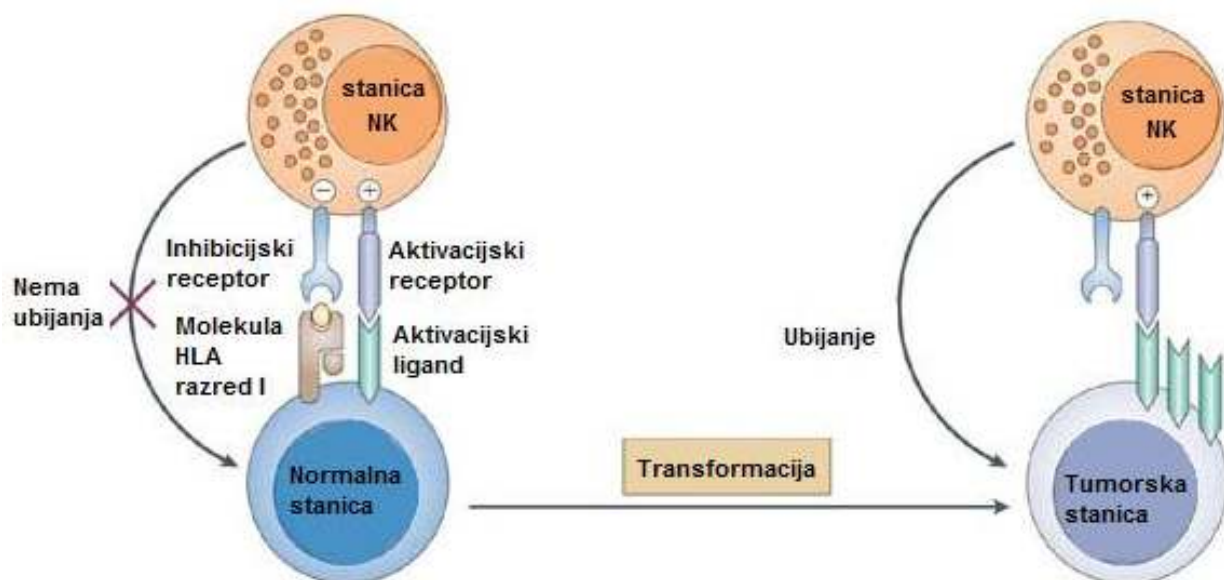
Legenda: iDC - nezrela dendritička stanica; mDC - zrela dendritička stanica; IL-1 - interleukin 1; TNF - čimbenik nekroze tumora; TCR - T stanični receptor

Slika 6. Mehanizam nastanka akutnog GvHD-a

Početna, tzv. inicijacijska faza GvHD-a se odvija prije transplantacije, odnosno za vrijeme kondicioniranja bolesnika. Naime, u tom razdoblju uslijed citotoksičnog djelovanja kemoterapije i zračenja dolazi do oštećenja tkiva bolesnika, posebice crijeвне mukoze. Oštećenje tkiva omogućava prijenos bakterijskih produkata kao što je npr. lipopolisaharid iz lumena crijeva u krvotok uslijed čega dolazi do izlučivanja proupalnih citokina (tzv. „citokinska oluja“) što dovodi do pojačane ekspresije molekula HLA kao i adhezijskih molekula na stanicama bolesnika. Na taj način se povećava sposobnost tih stanica da prezentiraju antigen.

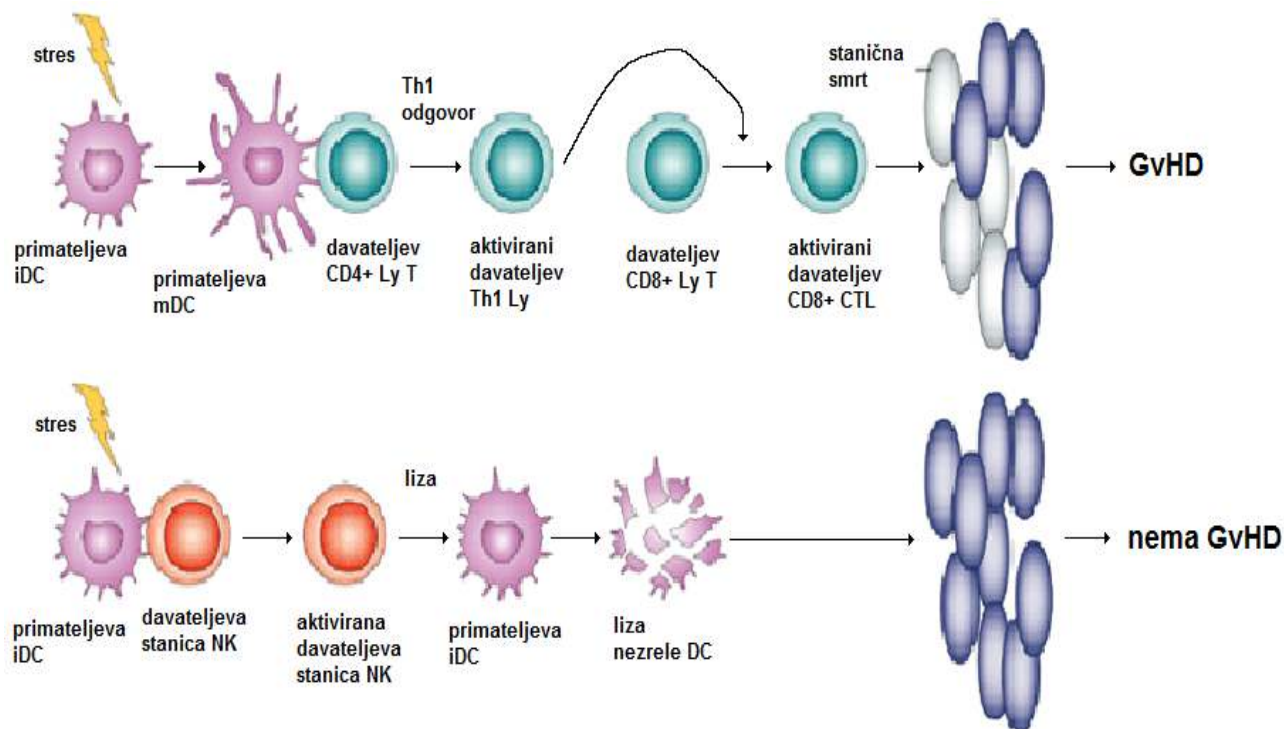
U drugom koraku dolazi do aktivacije limfocita T davatelja unutar limfnih čvorova što rezultira stvaranjem interferona γ (IFN γ) koji dodatno pojačava ekspresiju molekula HLA, adhezijskih molekula i kemokina na antigen prezentirajućim stanicama (*engl.* Antigen Presenting Cells, APC), prvenstveno dendritičkih stanica (DC). Na taj način, IFN γ još više potiče prezentaciju antigena, ali i aktivaciju limfocita CD8⁺ i CD4⁺ specifičnih za primatelja. U završnom, trećem koraku te efektorske stanice putuju u ciljne organe gdje uzrokuju oštećenje tkiva koje može dovesti do multiorganskog zatajenja (9).

Premda su limfociti T od ključne važnosti za odvijanje imunoloških reakcija koje su potaknute kao posljedica transplantacije, posljednjih godina se pozornost znanstvenika sve više usmjerava na tzv. stanice „prirodne ubojice“ (*engl.* Natural Killer, NK) i njihovu ulogu, kako u stvaranju učinka GvL, tako i u nastajanju GvHD-a. Taj interes je prije svega bio potaknut rasvjetljavanjem mehanizma aktivacije stanica NK. Naime, za aktivaciju stanice NK, uz vezanje liganda za aktivacijske receptore, istovremeno ne smije doći do interakcije inhibicijskog receptora i njegovog liganda, te su na taj način stanice NK odgovorne za održavanje imunološke tolerancije i sprječavanje autoimunosti. Otkriće tog mehanizma, kao i otkriće da su ligandi inhibicijskih receptora stanica NK molekule HLA, omogućilo je razvijanje pristupa koji poboljšavaju učinak GvL, a temelje se na citotoksičnim sposobnostima stanica NK (slika 7).



Slika 7. Mehanizam aktivacije stanica NK

Gubitak ekspresije molekula HLA je jedan od uobičajenih mehanizama bijega tumorske stanice. Međutim, takva tumorska stanica, premda više ne može biti prepoznata i uklonjena posredstvom citotoksičnih limfocita T, više nije sposobna pružiti inhibicijski signal koji je potreban da ne postane meta stanice NK. S druge strane, stanice NK neće dovesti do razvoja GvHD-a, upravo suprotno, prema istraživanjima na mišjim modelima, stanice NK zapravo sprječavaju razvoj GvHD-a i to ubijajući dendritičke stanice primatelja (slika 8) (10).



Legenda: iDC - nezrela dendritička stanica; mDC - zrela dendritička stanica; Ly T - limfocit T; CTL - citotoksični limfocit T; GvHD - reakcija transplantata protiv primatelja

Slika 8. Pretpostavljeni mehanizam djelovanja stanica NK u sprječavanju GvHD-a

Postoje brojni pristupi kojima se u današnje vrijeme pokušava spriječiti razvoj GvHD-a uz istovremeno zadržavanje učinka transplantata na tumorske stanice. U nekim centrima se smanjuje štetni učinak kondicioniranja primjenom nemijeloablativnih protokola. Drugi pristup je kombinacija mijeloablativnog kondicioniranja uz depleciju limfocita T iz transplantata te kasnije primjene DLI. Konačno, u svjetlu otkrića prednosti stanica NK u usporedbi s limfocitima T, danas se razvijaju protokoli tzv. haploidentične transplantacije u kojoj se bira davatelj transplantata s ciljanom nepodudarnošću HLA, odnosno onom koja će osigurati postojanje aloreaktivnih stanica NK u transplantatu. Poznavanje tipa inhibicijskih receptora (*engl.* Killer Inhibitory Receptor, KIR) koji se nalaze na stanicama NK davatelja neophodno je u planiranju haploidentične transplantacije. Naime, budući se radi o receptorima koji nisu specifični za pojedinačne molekule HLA razreda I, već za grupe molekula HLA, nepodudarnost za gene HLA ne znači nužno i nepodudarnost za ligande receptora KIR na stanicama NK (11). Premda se u

većini transplantacijskih centara haploidentična transplantacija još uvijek ne razmatra ukoliko je moguće pronaći bilo srodnog bilo nesrodnog davatelja identičnog za gene HLA, rezultati brojnih istraživanja upućuju kako će se ovaj postupak u budućnosti provoditi kao prvi izbor liječenja za određene bolesti. U tom smislu se posebno ističe rad skupine znanstvenika iz Perugie koji su u retrospektivnoj analizi ishoda haploidentičnih transplantacija pokazali da vjerojatnost pojave relapsa bolesti unutar pet godina nakon transplantacije iznosi 75% za bolesnike kod kojih nije postojala nepodudarnost za ligande receptora stanica NK. Nasuprot tome, relaps se nije pojavio niti kod jednog bolesnika čija je nepodudarnost u genima HLA s davateljem bila takva da je izazvala aktivaciju aloreaktivnih stanica NK iz transplantata (12). Potrebno je istaknuti da su ovako dobri rezultati bili uočeni samo za bolesnike s akutnom mijeloičnom leukemijom (*engl.* Acute Myeloid Leukemia, AML), ali ne npr. i s akutnom limfoblastičnom leukemijom (*engl.* Acute Lymphoblastic Leukemia, ALL) te su stoga daljnja istraživanja u ovom smjeru nužna kako bi se prednost haploidentične transplantacije u usporedbi sa standardnim metodama mogla procijeniti sa sigurnošću.

1.1.3. PRIMJENA HSCT

Transplantacija hematopoetskih matičnih stanica je u današnje vrijeme metoda izbora u liječenju brojnih hematoloških poremećaja i malignosti, ali i različitih tumora solidnih organa, autoimunih bolesti i sl. (tablica 1) (13)

Tablica 1. Bolesti koje se liječe transplantacijom hematopoetskih matičnih stanica

<i>Maligne bolesti</i>	<i>Nemaligne bolesti</i>
• Akutna mijeloična leukemija (AML) • Akutna limfocitna leukemija (ALL) • Kronična mijeloična leukemija (CML) i mijeloproliferativni poremećaji • Kronična limfocitna leukemija (CLL) • Non-Hodgkinov limfom (NHL) • Hodgkinova bolest (HL) • Mijelodisplastični sindromi (MDS) • Multipli mijelom i amiloidoza • Solidni tumori: dojka, testis, jajnik i mikrocelularni karcinom pluća • Pedijatrijski solidni tumori: neuroblastom, Ewingov sarkom, meduloblastom, karcinom bubrežnih stanica, melanom	• Aplastična anemija (AA) i srodna zatajenja koštane srži • Hemoglobinopatije: talasemija, anemija srpastih stanica • Kongenitalni poremećaji hematopoeze: Fanconijeva anemija i srodni sindromi • Kongenitalne imunodeficijencije: teška kombinirana imunodeficiencija, Wiskott-Aldrichov sindrom, kronična granulomatozna bolest i srodni sindromi • Urođene greške metabolizma • Autoimuni poremećaji

1.2. KIMERIZAM U HSCT

Pojam kimerizam potječe od grčke riječi „himera“ kojom se nazivalo čudovište iz grčke mitologije koje je imalo glavu lava, tijelo koze i rep zmije (slika 9). U medicini se kimerom naziva organizam u čijem tijelu postoje stanične populacije porijeklom iz genetski različitih jedinki iste ili različitih vrsta. Kimera može nastati prirodnim putem te tako npr. oko 8% dvojajčanih blizanaca predstavljaju prirodne kimere, s druge strane može biti stvorena i umjetno npr. transplantacijom tkiva ili organa. Pojam iradijacijske kimere uveden je 1950-tih godina kako bi označio miša kojem je nakon ozračivanja cijelog tijela, hematopoetski sustav spašen transplantacijom hematopoetskog tkiva drugog miša (14).



Slika 9. Čudovište himera iz grčke mitologije

Postoji nekoliko vrsta kimerizma koji mogu nastati nakon HSCT. U sklopu znanstvenog skupa „Tandem Meetings of the International Bone Marrow Transplant Registry and the American Society of Blood and Marrow Transplantation“ (2001.g.) održana je i sekcija na kojoj su radi usklađivanja nazivlja donesene preporuke o mogućim statusima kimerizma. O punom kimerizmu (PK) govorimo ukoliko je primateljev hematopoetski sustav u potpunosti zamijenjen davateljevim te su nakon transplantacije prisutne samo davateljeve stanice. Nasuprot tomu, ako nakon transplantacije u tijelu bolesnika postoje i primateljeve i davateljeve stanice u bilo kakvom omjeru, tada se radi o tzv. miješanom kimerizmu (MK). Postoji nekoliko različitih podtipova miješanog kimerizma ovisno o njegovoj stabilnosti, odnosno smjeru promjena u omjeru stanica primatelja i davatelja. Prvi podtip je stabilni miješani kimerizam pri kojem se udjeli stanica primatelja i davatelja ne mijenjaju značajno s vremenom. Ovaj tip miješanog kimerizma se javlja često nakon transplantacija koje se provode u svrhu liječenja nemalighnih bolesti kao što je npr. teška kombinirana imunodeficijencija (*engl.* Severe Combined Immunodeficiency Disease, SCID), pri kojima se primjenjuje kondicioniranje smanjenog intenziteta. Padajući miješani kimerizam je stanje u kojem dolazi do smanjivanja udjela stanica

primatelja, a karakterističan je za rano razdoblje nakon transplantacije. Treći podtip je rastući miješani kimerizam pri kojem dolazi do porasta udjela stanica primatelja. Naposljetku, postoji i djelomični kimerizam (DK) kod kojeg su neke stanične linije u potpunosti primateljeve, a druge davateljeve (15).

1.2.1. VAŽNOST PRAĆENJA KIMERIZMA NAKON HSCT

Praćenje kimerizma kojim se utvrđuje porijeklo stanica u perifernoj krvi ili koštanoj srži bolesnika nakon HSCT daje vrlo vrijedne informacije o uspješnosti transplantacije s obzirom na funkcioniranje transplantata, učinkovitost kemoterapije i zračenja itd. Međutim, procjena značenja pojedinog nalaza kao i izbor intervencija koje određeni status kimerizma iziskuje, ovisi o tome da li je transplantacija provedena u svrhu liječenja maligne ili nemaligne bolesti.

Transplantacija hematopoetskih matičnih stanica je jedini način liječenja brojnih bolesnika s naslijeđenim ili stečenim nemaligim bolestima kao što su talasemija, anemija srpastih stanica, različite imunodeficijencije i sl. Budući je cilj transplantacije kod ovakvih slučajeva poboljšanje hematopoetske funkcije, postizanje imunokompetentnosti ili povećanje količine enzima koji nedostaje, nije nužno u potpunosti zamijeniti primateljev hematopoetski sustav s davateljevim, odnosno postići puni kimerizam, već je za znatno poboljšanje stanja dovoljno dovesti bolesnika u status miješanog kimerizma. Iz tog razloga se u protokolu transplantacije za liječenje nemalighnih bolesti primjenjuje kondicioniranje smanjenog intenziteta pa je nalaz miješanog kimerizma nakon transplantacije i očekivan. Premda je na ovaj način smanjena učestalost štetnih nuspojava, posljedica nemijeloablativnog pristupa jest da su odbacivanje transplantata ili njegovo neprihvatanje glavni uzroci neuspjeha liječenja. Praćenjem kimerizma moguće je ukazati na one bolesnike kod kojih postoji opasnost od odbacivanja transplantata. Nalaz rastućeg miješanog kimerizma je povezan s pojavom odbacivanja za

talasemiju, tešku aplastičnu anemiju, anemiju srpastih stanica i brojne druge bolesti. Ukoliko se analizom bolesnikovog uzorka utvrdi rastući miješani kimerizam, pravodobnom intervencijom kao što je primjena DLI ili ukidanje imunosupresije, moguće je spasiti transplantat (16).

Smatra se da je za uspješno liječenje malignih bolesti s HSCT ključno postizanje statusa punog kimerizma. Prisutnost stanica primatelja nakon transplantacije može ukazati ili na preživljavanje tumorskih stanica ili na preživljavanje normalnih, zdravih hematopoetskih stanica primatelja ili oboje. Iz tog razloga utvrđivanje statusa kimerizma ne može biti zamjena za analizu minimalne ostatne bolesti (*engl.* Minimal Residual Disease, MRD), već je za pravilno praćenje prihvatanja transplantata i remisije potrebna kombinacija obje metode. S druge strane, prema nekim istraživanjima, i prisutnost normalne primateljeve hematopoeze ukazuje na povećani rizik za relaps bolesti, Naime, pretpostavlja se da primateljeve hematopoetske stanice olakšavaju proliferaciju malignih stanica koje su preživjele kondicioniranje i to tako da inhibiraju imunokompetentne, efektorske davateljeve stanice, odnosno oslabljuju učinak GvL. Danas je povezanost miješanog kimerizma i relapsa dobro dokumentirana jedino za bolesnike s kroničnom mijeloičnom leukemijom (CML). Rezultati istraživanja ove povezanosti za akutne oblike leukemije još uvijek su proturječni, neka su istraživanja ukazala na prediktivnu vrijednost miješanog kimerizma za pojavu relapsa, dok druga nisu našla takvu povezanost. Utvrđeno je također da postoje razlike i ovisno o činjenici da li su u istraživanje bili uključeni odrasli bolesnici ili djeca. Zaključak svih preglednih radova koji se bave ovom problematikom jest da je za procjenu važnosti praćenja kimerizma u svrhu predviđanja relapsa potrebno provesti daljnja i puno opsežnija istraživanja.

Analiza statusa kimerizma na staničnim subpopulacijama izrazito povećava osjetljivost metode. Iz tog razloga je u slučajevima kada ne postoji biljeg specifičan za bolest koji omogućava praćenje MRD-a pomoću tehnika lančane reakcije polimerazom (*engl.* Polymerase Chain Reaction, PCR), kao što je npr. BCR/ABL fuzijska mRNK za CML, analizu praćenja kimerizma na staničnim subpopulacijama moguće koristiti kao zamjensku metodu.

Uvođenjem nemijeloablativnog pristupa u liječenju malignih bolesti transplantacijom došlo je i do promjena u postupku praćenja kimerizma. Miješani kimerizam je prisutan kod svih bolesnika nakon HSCT, te su primjene DLI nužne kako bi se postigao puni kimerizam i spriječio relaps bolesti. Analizom statusa kimerizma moguće je utvrditi učinkovitost tog postupka. Istraživanja su dodatno pokazala da je prisutnost miješanog kimerizma unutar populacije limfocita T i NK stanica povezana s odbacivanjem transplantata, odnosno da je prisutnost limfocita T primatelja povezana s povećanim rizikom za relaps. Iz tog razloga se kod ovakvih bolesnika preporuča provođenje analize na mijeloidnoj lozi, limfocitima T i stanicama NK (17).

Premda se postupci praćenja kimerizma nakon HSCT razlikuju između pojedinih centara s obzirom na vremenski razmak između pojedinih analiza, uzorak na kojem se analiza provodi i sl., usuglašeno je mišljenje da je analiza statusa kimerizma metoda koju je potrebno rutinski provoditi nakon transplantacije kako bi se u slučaju utvrđivanja rastućeg miješanog kimerizma moglo pravodobno intervenirati te spriječiti odbacivanje transplantata ili relaps bolesti.

1.2.2. METODE ZA ODREĐIVANJE STATUSA KIMERIZMA NAKON HSCT

U protekla dva desetljeća su se u svrhu određivanja porijekla stanica u uzorku bolesnika nakon HSCT upotrebljavale brojne metode. Bez obzira na tehniku koja se primjenjivala i vrstu stanica koje su se analizirale, sve metode su se temeljile na analizi polimorfnih genetskih biljega ili njihovih produkata za koje su se primatelj i davatelj razlikovali. Metode koje se danas koriste za praćenje kimerizma su: fenotipizacija eritrocita, citogenetske analize, fluorescentna *in situ* hibridizacija (*engl.* Fluorescent *In Situ* Hybridization, FISH), polimorfizmi duljine restrikcijskog fragmenta (*engl.* Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), analiza kratkih uzastopnih ponavljanja (*engl.* Short Tandem Repeats, STR) i varijabilnog broja uzastopnih ponavljanja (*engl.* Variable Number of Tandem Repeats, VNTR), analiza biljega specifičnih za kromosom X

i Y, analiza amelogena, kvantitativni PCR u stvarnom vremenu (*engl.* Real-Time quantitative PCR, RT-PCR), amplifikacijski refraktorni mutacijski sustav (*engl.* Amplification Refractory Mutation System, ARMS) i obrada slike - *in situ* digestija restrikcijske endonukleaze (*engl.* Image Processing and Restriction Endonuclease *In Situ* Digestion, IPA-REISD). Osjetljivost pojedine metode, kao i njena informativnost, navedene su u tablici 2. Osim navedenih metoda, određivanje gena HLA u slučajevima kada postoji nepodudarnost za te gene između primatelja i davatelja može se također koristiti u svrhu praćenja kimerizma. Međutim, budući se danas u najvećem broju slučajeva transplantacija još uvijek provodi između primatelja i davatelja koji su identični za gene HLA, ovaj pristup se rijetko kada može primijeniti.

Tablica 2. Usporedba metoda za određivanje statusa kimerizma nakon HSCT

METODA	OSJETLJIVOST (%)	INFORMATIVNOST
Fenotipizacija eritrocita	0,04–3	niska
Citogenetska analiza	5-10	niska
FISH	0,7-5	visoka
RFLP	5-10	visoka
STR/VNTR	0,4-5	jako visoka
Biljezi Y kromosoma	0,1-4	visoka
Biljezi X kromosoma	0,1-4	visoka
Amelogenin	0,1-4	visoka
RT-PCR	0,1-1	visoka

Legenda: FISH - fluorescentna in situ hibridizacija; RFLP - polimorfizmi duljine restrikcijskog fragmenta; STR - kratka uzastopna ponavljanja; VNTR - varijabilni broj uzastopnih ponavljanja; RT-PCR - kvantitativna lančana reakcija polimerazom stvarnom vremenu

1.2.2.1. Metoda fenotipizacije eritrocita

Fenotipizacija eritrocita je metoda koja se koristi za otkrivanje hematopoeze primatelja uglavnom samo za bolesnike s CML-om. Razlog tome leži u činjenici da se kod te bolesti prilikom relapsa povećava samo udio granulocita, monocita i eritrocita primatelja, dok ostale stanične linije ostaju porijeklom od davatelja. Prednosti ove metode su da se može provoditi na uzorcima krvi, brzina, osjetljivost i preciznost. Nedostatak metode je da se analizira samo jedna vrsta stanica te da se ne može izvoditi ako je bolesnik primio transfuzije krvi (18).

1.2.2.2. Citogenetska analiza

Citogenetska analiza se uglavnom koristila u slučajevima kada su se primatelj i davatelj razlikovali po spolu. Međutim, ova metoda se mogla koristiti čak i ako su primatelj i davatelj bili istog spola ukoliko se radilo o bolesti koju karakterizira neki kromosomski rearanžman s gubitkom genetske informacije, bilo da se radi o monosomiji ili deleciji. Tako se npr. citogenetska analiza koristi u praćenju kimerizma kod bolesnika s CML kod kojih se određuje prisutnost stanica pozitivnih za Philadelphia kromosom. Ova metoda ima brojne nedostatke: dugotrajna je i zahtjeva veliku količinu uzorka bolesnika, analizira samo stanice koje se dijele, nisko je osjetljiva i ograničena je brojem stanica (19, 20).

1.2.2.3. Metoda FISH

Za razliku od klasičnog citogenetskog određivanja kromosoma X i Y, metoda FISH omogućava brzu analizu velikog broja stanica. Radi se o pouzdanoj i visoko osjetljivoj metodi s malim postotkom lažno pozitivnih rezultata. Nažalost, ovu metodu je moguće koristiti samo u slučajevima kada se primatelj i davatelj razlikuju u spolu (21).

1.2.2.4. Metoda RFLP

Upotreba metode RFLP temelji se na prisutnosti/odsutnosti mjesta cijepanja restrikcijskih enzima u uzorku DNK primatelja i davatelja. Metoda je visoko informativna budući, za razliku od citogenetskih tehnika, analizira DNK iz najmanje 10^6 stanica i to svih stanica s jezgrom, bez obzira na to da li se dijele ili ne. S druge strane, metoda je dugotrajna, zahtjevna i nisko osjetljiva, a moguće ju je provesti samo ukoliko je dostupna veća količina uzorka za analizu što je u brojnim slučajevima nemoguće (22).

1.2.2.5. Analiza lokusa STR/VNTR

Analiza mikrosatelitskih lokusa (STR) i minisatelitskih lokusa (VNTR) smatra se najboljim izborom za praćenje kimerizma nakon HSCT. Metoda analizira izrazito polimorfne dijelove genoma te je stoga visoko informativna. Brza je, zahtijeva malu količinu uzorka te ju je moguće provesti vrlo brzo nakon transplantacije. Nedostatak metode je nešto niža osjetljivost koja je posljedica činjenice da tijekom PCR reakcije bolje umnažaju molekule DNK onih stanica koje čine većinski udio u uzorku (23).

1.2.2.6. Analiza biljega kromosoma Y i X i amelogenina

Metode koje analiziraju biljege specifične za kromosom Y i X koriste se kada postoji razlika u spolu primatelja i davatelja. Ukoliko je davatelj muškog spola, analiziraju se geni, mikrosateliti ili bialelni biljezi specifični za kromosom Y uz pomoć metode PCR. Ako je davatelj ženskog spola, analizira se gen za androgeni receptor koji se nalazi na kromosomu X (*engl.* Human Androgen Receptor, HUMARA) koji sadrži trinukleotidno ponavljanje CAG. U stanicama muškog porijekla taj mikrosatelit nije metiliran i stoga je podložan digestiji restrikcijskim enzimom *HpaII*. Time je omogućeno određivanje netaknute DNK iz stanica ženskog porijekla. Analiza amelogenina može se koristiti kao drugi izbor u oba slučaja. Ove

metode su visoko osjetljive, no svoju primjenu imaju samo kod onih parova gdje su primatelj i davatelj različitog spola (24).

1.2.2.7. Metoda RT-PCR

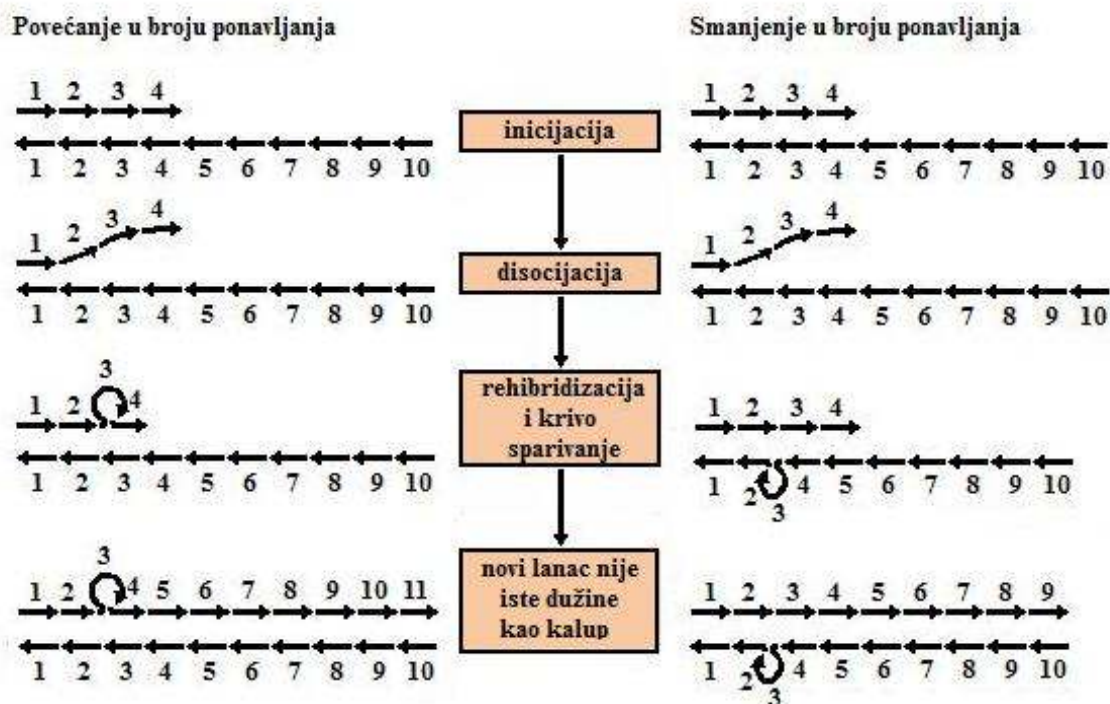
Jedna od najnovijih i najosjetljivijih metoda za određivanje statusa kimerizma je metoda RT-PCR. Temelji se na uporabi fluorescentno obilježene probe koja je ugrađena između početnica 5' i 3' zbog čega se tijekom PCR ciklusa cijepa i na taj način emitira fluorescenciju. Budući se količina PCR produkta, a samim time i količina pocijepane probe udvostručuje sa svakim PCR ciklusom, postoji linearan odnos između logaritma početnog broja kopija molekule DNK i prvog ciklusa tijekom kojeg dolazi do značajnog porasta fluorescencije. Ovim postupkom može se postići brzo, precizno i osjetljivo određivanje udjela stanica primatelja. Nažalost, metoda je za sad učinkovita jedino kada se analiziraju bialelni genski biljezi (*engl.* Single Nucleotide Polymorphism, SNP) što znači da je analizu moguće primjeniti kod oko 90% parova (25).

1.3. KRATKA UZASTOPNA PONAVLJANJA SLIJEDA DNK

Kratka uzastopna ponavljanja slijeda DNK, poznata i kao mikrosatelitski lokusi, su dijelovi genoma unutar kojih je slijed nukleotida dužine 1-6pb uzastopno ponovljen određen broj puta. Prisutni su u eukromatinskim regijama kromosoma svih eukariota osim kvasca. Odlikuje ih visok stupanj mutacija (5×10^{-4} - 10^{-5} po mjestu po mejozi) i kodominantno mendelsko nasljeđivanje. Nalaze se u izvangenskim, ali i u genskim regijama i to ne samo u intronima, već i u kodirajućim regijama gena. U ljudskom genomu se javljaju u prosjeku svakih 6kb. Mikrosatelitska DNK je slabo zastupljena jedino u telomerama i centromerama (26).

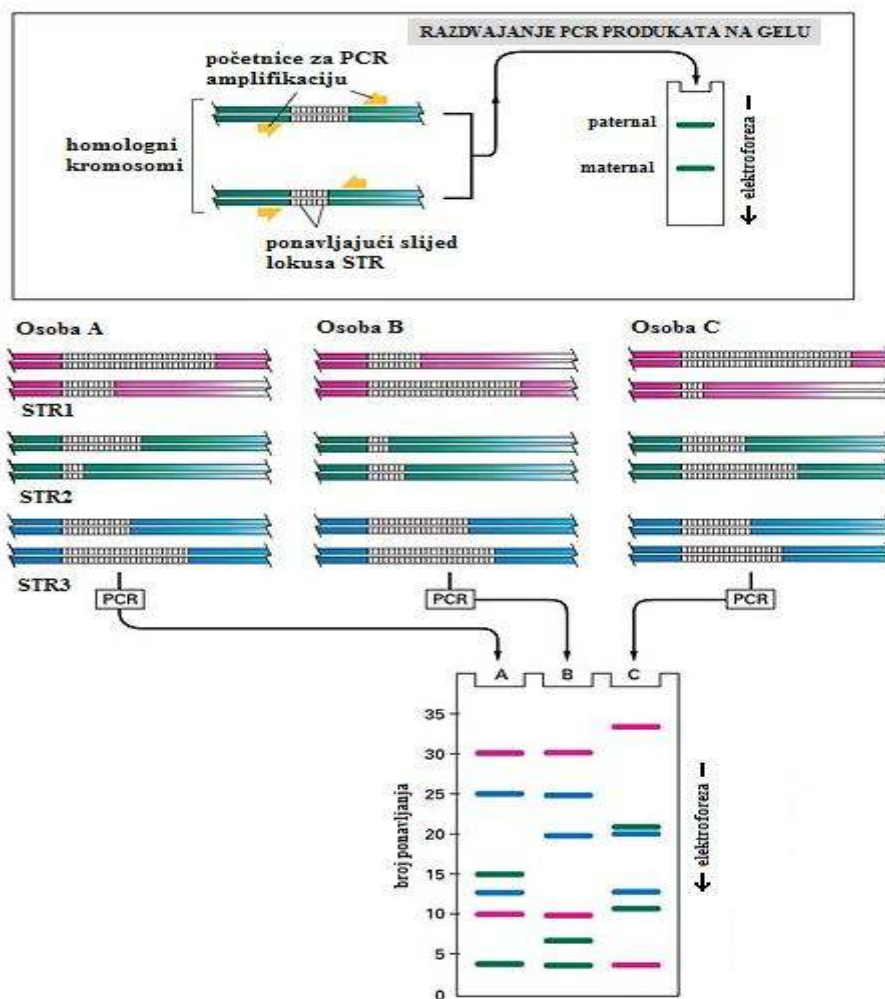
Mikrosateliti se međusobno razlikuju u dužini ponavljano­g slijeda, broju ponavljanja te složenosti ponavljajućeg uzorka. Jednostavna ponavljanja sadrže jedinice identične dužine i slijeda. Primjer jednog takvog ponavljanja je mikrosatelitski lokus HUMTH01 (*engl.* Human Tyrosine Hydroxylase gene) koji se sastoji od ponavljanja slijeda TCAT. Složena ponavljanja se sastoje od dva ili više susjednih, jednostavnih ponavljanja. Mikrosatelitski lokus HUMVWA31 (*engl.* Human von Willebrand Factor gene) sa strukturom $(ATCT)_2(GTCT)_m(ATCT)_n$ je primjer složenog ponavljanja. Kompleksna ponavljanja mogu sadržavati nekoliko blokova s ponavljajućim jedinicama promjenjive dužine te više ili manje promjenjivim intervenirajućim slijedovima. Primjer takvog ponavljanja je mikrosatelitski lokus D21S11 sa slijedećom strukturom: $(TCTA)_{4-6}(TCTG)_{5-6}(TCTA)_3TA(TCTA)_3TCA(TCTA)_2TCCATA(TCTA)_n$. (27).

Aleli pojedinih mikrosatelita međusobno se razlikuju po broju ponavljanja slijeda specifičnog za taj lokus. Smatra se da bi se nastanak te raznovrsnosti mogao objasniti mehanizmom ispada pri udvostručavanju molekule DNK (*engl.* replication slippage). Radi se o procesu koji se zbiva tijekom udvostručavanja DNK kada uslijed ispada dijela slijeda dolazi do pogrešnog sparivanja te je kao posljedica toga jedan ponavljajući blok izbačen ili umetnut u novonastali lanac DNK (slika 10). Naime, s obzirom da se mikrosatelitski lokusi sastoje od jednakih ponavljanja, prilikom spajanja lanca DNK koji predstavlja kalup i novonastalog lanca može doći do pogreške uslijed koje je jedan ponavljajući blok izbačen u obliku omče iz molekule. Takav blok će se isjeći tijekom popravka molekule DNK te će zbog toga novi lanac biti različite duljine u odnosu na stari. Učestalost ispada ovisi o veličini ponavljajuće jedinice (najveća je za dinukleotidna ponavljanja) i o njenom slijedu (najmanja je za ponavljanja bogata kombinacijom G-C) (28).



Slika 10. Princip stvaranja raznovrsnosti mikrosatelitskih lokusa mehanizmom ispada pri udvostručavanju molekule DNK

Zbog činjenice da se aleli mikrosatelitskih lokusa razlikuju po duljini, metode za njihovo određivanje su vrlo jednostavne i uključuju umnažanje uz pomoć reakcije PCR te elektroforezu za razdvajanje produkata PCR (slika 11).



Legenda: STR - kratka uzastopna ponavljanja

Slika 11. Shema određivanja alela mikrosatelitskog lokusa

Naime, uporabom početnica koje su fluorescentno obilježene i specifične za jedinstvene sljedove DNK u smjeru 5' i 3' od samog mikrosatelitskog lokusa, moguće je reakcijom PCR dobiti velik broj fluorescentno obilježenih kopija alela pojedinog mikrosatelitskog lokusa koje nosi određena osoba. S obzirom da se aleli zbog razlike u broju ponavljanja osnovnog slijeda, međusobno razlikuju po duljini, različitom brzinom će putovati kroz gel tijekom elektroforeze te se na taj način razdvojiti. Razdvojene alele je tad moguće vrlo jednostavno odrediti uz pomoć lasera koji će pobuditi fluorescenciju boje te fotodetektora koji tu fluorescenciju očitava. Usporedbom vremena od početka elektroforeze do očitavanja fluorescencije za alel

mikrosatelitskog lokusa koji se analizira i fragment DNK poznate duljine koji se koristi kao standard, moguće je izračunati duljinu alela te ga na taj način i definirati.

O ulozi mikrosatelita u eukariotskom genomu postoje dva, suprotstavljena mišljenja. Prva teorija govori da ponavljajući sljedovi DNK imaju funkcionalnu ulogu, bilo neposredno u genskoj regulaciji ili kao tzv. „vruća mjesta“ (*engl.* hot spots) rekombinacije. Prema toj teoriji, mikrosatelitska DNK je zadržana unutar genoma zato što svojim mutagenim potencijalom pojačava dugoročni evolucijski potencijal vrste (29). Protivnici ove teorije tvrde da su sva svojstva i funkcije koje se pripisuju ponavljajućim sljedovima DNK samo odgovor na njihovu prisutnost u genomu, tj. da su posljedica, a ne uzrok njenog nastanka i održavanja. Oni podupiru hipotezu tzv. „sebične“ DNK (*engl.* selfish DNK) koja kaže da se ponavljajući sljedovi održavaju samo zbog svoje sposobnosti da se repliciraju i šire u genomu (30).

Nazivlje mikrosatelitskih lokusa je dugi niz godina predstavljalo izvor problema i nesporazuma. Naime, sve do 1997. g. nisu postojala usuglašena pravila o dodjeljivanju imena ovim lokusima te su ona bila proizvoljna. U najvećem broju slučajeva su se u imenu nalazile kratice gena u čijoj blizini je mikrosatelitski lokus otkriven, npr. mikrosatelitski lokus HUMF13A01 koji se nalazi unutar gena za podjedinicu A koagulacijskog čimbenika XIII (*engl.* Human coagulation Factor XIII A subunit gene), dok je kratica „HUM“ označavala da je mikrosatelitski lokus prisutan u genomu čovjeka. Međunarodno društvo za forenzičnu genetiku (*engl.* International Society for Forensic Genetics, ISFG) je 1997. g. donijelo preporuke o nazivlju mikrosatelita prema kojima se pojedini lokus imenuje prema kromosomu na kojem se nalazi. Tako je npr. iz imena mikrosatelitskog lokusa D21S11 vidljivo da se nalazi na kromosomu 21 budući je brojka „21“ navedena iza velikog slova „D“, odnosno ispred velikog slova „S“. Preporuka je da se imena ne trebaju mijenjati u ovaj oblik jedino ako se radi o već dobro poznatim lokusima STR kao što je npr. HUMTH01. Imena alela pojedinog mikrosatelita trebaju se pisati iza imena mikrosatelitskog lokusa i znaka „*“ te odražavati broj ponavljanja osnovnog slijeda u tom alelu, tako npr. alel HUMTH01*9 ima devet ponavljanja. Ukoliko neki

alel ima nepotpuni oblik ponavljanja, tada je to potrebno naznačiti na slijedeći način: napisati broj potpunih ponavljanja te iza decimalne točke dopisati broj parova baza nepotpunog ponavljanja. Primjer je alel HUMTH01*9.3 koji se sastoji od devet potpunih tetranukleotidnih ponavljanja te jednog ponavljanja u kojem nedostaje jedna baza (31).

Usklađivanje nazivlja mikrosatelitskih lokusa smještenih unutar regije sustava HLA predstavlja dodatan izazov. Naime, uslijed intenzivnih istraživanja sustava HLA, u ovoj regiji je otkriven izrazito velik broj mikrosatelitskih lokusa koji i dalje raste. Kao posljedica toga, čitav niz lokusa ima više od jednog imena kao i više od jednog para specifičnih početnica koje se koriste za njihovo umnažanje reakcijom PCR. Uspoređivanje rezultata pojedinih istraživanja je iz tog razloga izuzetno otežano te su stoga i poduzete inicijative za standardiziranjem nazivlja i usklađivanjem s preporukama ISFG (32).

1.3.1 MIKROSATELITI NON-HLA

Za potrebe ove disertacije, mikrosatelitski lokusi su podijeljeni u dvije skupine: mikrosatelite non-HLA i mikrosatelite HLA. Jedini kriterij za ovu podjelu bio je položaj pojedinog mikrosatelita te se tako u skupini mikrosatelita non-HLA nalaze svi lokusi koji nisu smješteni unutar regije HLA na kromosomu 6, dok se mikrosateliti HLA nalaze unutar regije HLA.

1.3.1.1. Važnost mikrosatelita non-HLA u praćenju kimerizma nakon HSCT

Zbog svoje vrlo visoke raznovrsnosti, mikrosatelitski lokusi su idealni genetski biljezi za identifikaciju osoba u bilo koju svrhu. Stoga su našli svoju primjenu i u praćenju kimerizma

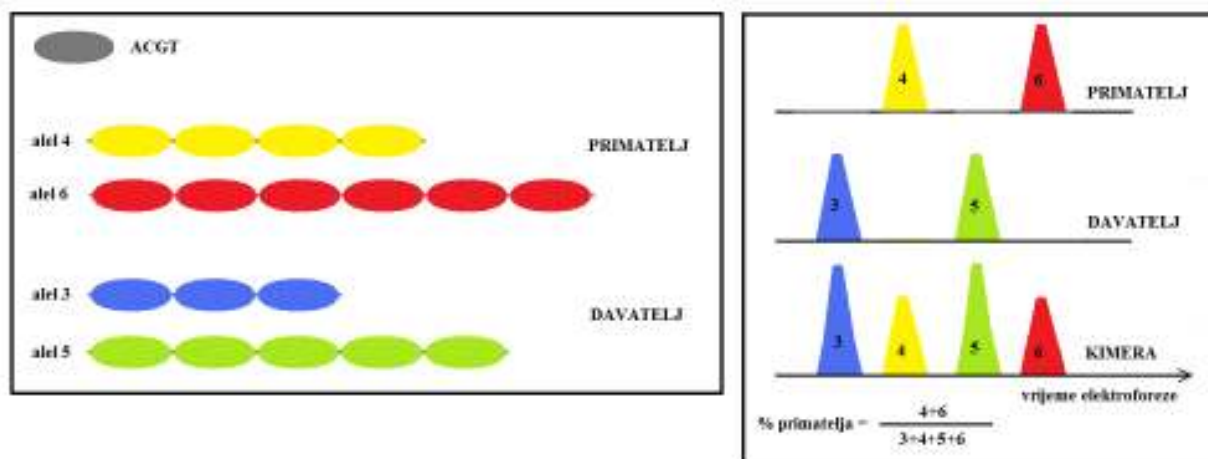
nakon HSCT kojem je cilj odrediti porijeklo stanica u uzorku bolesnika nakon transplantacije. Naime, budući je vjerojatnost da će dvije osobe biti jednake za alele nekoliko različitih mikrosatelita izuzetno mala, moguće je razlikovati DNK koja potječe iz stanica primatelja i davatelja, čak i kad se radi o braći. Jedini izuzetak su jednojajčani blizanci koji su identični za čitavu DNK pa tako i za mikrosatelite. Lokus STR mora posjedovati dovoljan broj alela kao i postotak heterozigotnosti od najmanje 70% kako bi zadovoljio kriterije potrebne da ga se uključi u postupak praćenja kimerizma. Te dvije vrijednosti se uzimaju u obzir pri procjeni informativnosti pojedinog mikrosatelitskog lokusa, odnosno kod izračunavanja tzv. vrijednosti PIC (*engl.* Polymorphism Information Content). Stoga je provođenje populacijskih istraživanja neophodno kako bi se odabrala skupina mikrosatelita koja će biti testirana prilikom prve analize uzorka bolesnika nakon HSCT. Ta skupina mora biti odabrana tako da se u najvećem broju slučajeva već nakon prve analize iz nje može izdvojiti dovoljan broj informativnih lokusa za daljnje praćenje. Informativnim lokusom se smatra onaj mikrosatelit za kojeg i primatelj i davatelj u potpunosti razlikuju za barem jedan alel (33).

S obzirom da se populacije međusobno razlikuju u raspodjeli alela na pojedinom mikrosatelitu, literaturni podaci nisu dovoljni za njegovo uključivanje u postupak praćenja kimerizma, već je potrebno provesti njegovu analizu u populaciji iz koje potječe i bolesnik. S druge strane, populacijska istraživanja mogu dati vrlo korisne informacije o stabilnosti pojedinog mikrosatelitskog lokusa. Naime, lokusi STR s visokim stupnjem mutacija nisu dobar izbor za praćenje kimerizma zbog veće mogućnosti pogreške prilikom određivanja alela. Odabir lokusa s većim brojem nukleotida unutar osnovne jedinice ponavljanja također će olakšati određivanje alela te umanjiti mogućnost pogreške, te je iz tog razloga u skupinu mikrosatelita koja će se analizirati potrebno uključiti što je više moguće lokusa s tetranukleotidnim ponavljanjima, a izbjegavati lokuse s dinukleotidnim ponavljanjima ili s nepravilnim ponavljanjima.

Postupak analize mikrosatelitskih lokusa za praćenje kimerizma može se podijeliti u dva dijela. Tijekom prvog dijela, koji se odvija prije transplantacije, analizira se uzorak primatelja i

davatelja za skupinu mikrosatelita koji su uključeni u postupak praćenja kimerizma pojedinog centra. Utvrđuje se koji su mikrosateliti informativni za par primatelja i davatelja.

Nakon transplantacije, analizira se uzorak primatelja i utvrđuje porijeklo stanica u uzorku i njihov omjer. Količina DNK primatelja kao i davatelja koja je izolirana iz uzorka bolesnika nakon HSCT proporcionalna je broju stanica primatelja, odnosno davatelja u uzorku. Nadalje, količina DNK prije umnažanja proporcionalna je količini DNK nakon umnažanja budući se u svakom ciklusu reakcije PCR broj molekula DNK udvostručuje. Također, u svaku se novonastalu molekulu DNK ugrađuje fluorescentno obilježena početnica tijekom PCR-a. Iz toga proizlazi da je intenzitet fluorescencije koja se očitava prilikom elektroforeze PCR produkata proporcionalan broju stanica iz kojih je DNK izolirana. Intenzitet fluorescencije je prikazan visinom odnosno površinom, pojedinog signala koji odgovara alelu primatelja odnosno davatelja i izražen je s brojčanom vrijednošću. Na taj način je iz omjera visine pikova koji predstavljaju alele primatelja i davatelja za pojedini mikrosatelitski lokus moguće izračunati omjer stanica primatelja i davatelja (slika 12).



Slika 12. Shematski prikaz analize alela mikrosatelitskih lokusa u praćenju kimerizma HSCT

1.3.1.2. Primjena mikrosatelita non-HLA u drugim područjima

Mikrosateliti su zbog svoje rasprostranjenosti dužinom cijelog genoma, visokog stupnja raznovrsnosti i relativno jednostavnih metoda njihovog određivanja našli svoju primjenu kao genetski biljezi i u brojnim drugim područjima osim transplantacijske medicine kao što su: gensko mapiranje, evolucijska istraživanja i analize migracije populacija, sudska medicina, itd (33, 34, 35).

Posljednjih godina se uvelike istražuje uloga mikrosatelitskih lokusa u nastanku pojedinih bolesti. Tijekom tih istraživanja razjašnjena su dva mehanizma putem kojih mikrosateliti mogu ili izravno uzrokovati bolest ili sudjelovati u njenom razvoju. Prvi mehanizam je tzv. širenje mikrosatelita, a primjeri bolesti koje na taj način nastaju su sindrom fragilnog kromosoma X, miotonička distrofija, Huntington-ova bolest i dr. U svim ovim slučajevima povećanje broja ponavljajućih jedinica izravno dovodi do pojave bolesti, bilo da uzrokuje metilaciju promotorske regije gena kao u slučaju sindroma fragilnog kromosoma X, ili da transkripcijom većeg broja kopija mikrosatelitskog lokusa dolazi do križnog vezanja i taloženja proteina kao u slučaju nekih neurodegenerativnih bolesti (37). Drugi mehanizam je nestabilnost mikrosatelita, odnosno povećanje ili smanjenje broja ponavljajućih blokova mikrosatelitskog lokusa u tumorskom tkivu u usporedbi s normalnim tkivom. Ova pojava je uočena tijekom istraživanja nasljednog oblika karcinoma debelog crijeva, a još uvijek nije razjašnjeno da li su ponavljajući sljedovi povezani s procesom transformacije (37).

1.3.2. MIKROSATELITI HLA

Unutar regije sustava HLA na kromosomu 6 (6p21.1-21.3) do danas je otkriveno oko 350 mikrosatelitskih lokusa. Sustav HLA je jedan od najistraživanijih genskih sustava u čovjeka, a

posljednjih godina upravo je analiza mikrosatelita HLA najviše upotrebljavan pristup, bilo da se radi o populacijskim istraživanjima, ispitivanjima uloge sustava HLA u transplantacijskoj medicini ili razjašnjavanju njegove povezanosti s brojnim bolestima (39). Mikrosateliti koji su smješteni unutar regije HLA su najvećim dijelom dinukleotidna ponavljanja i to u više od 60% slučajeva ponavljanja slijeda CA. Ovu skupinu mikrosatelita odlikuje visok stupanj raznovrsnosti s prosječno 9,5 alela na pojedinom mikrosatelitskom lokusu, srednjom vrijednošću PIC od 0,68 i srednjom vrijednošću razine heterozigotnosti od 0,71. Prosječna udaljenost između dva mikrosatelita unutar regije HLA iznosi oko 10kB. Jedna od osobitosti sustava HLA je visok stupanj neravnoteže udruživanja. Pojam „neravnoteža udruživanja“ (*engl.* linkage disequilibrium, LD) označava pojavu da je učestalost pojavljivanja dva alela lokusa HLA veća nego što bi se to očekivalo na osnovu njihovih pojedinačnih učestalosti. Ova pojava je također razlog zbog kojeg mikrosateliti HLA, s obzirom na smještaj unutar sustava HLA, pokazuju određene specifičnosti u odnosu na mikrosatelite non-HLA. To je prvenstveno činjenica da su aleli nekih mikrosatelitskih lokusa dio visoko očuvanih haplotipova HLA (npr. HLA-A1-B8-DR3-MOGc146-TNFa2b3c1). Na međusobnu povezanost mikrosatelita HLA utječe udaljenost te su stoga najjače povezani mikrosateliti unutar regija HLA razreda I, razreda II ili razreda III.

1.3.2.1 Važnost mikrosatelita HLA u izboru podudarnog nesrodnog davatelja hematopoetskih matičnih stanica

Podudarnost primatelja i davatelja za gene HLA najvažniji je čimbenik za uspješan ishod HSCT te je stoga od ključne važnosti u izboru davatelja. Budući geni HLA podliježu mendelskim zakonima nasljeđivanja, približno trećina bolesnika kojima je potrebna transplantacija može unutar obitelji naći genotipski HLA identičnog davatelja, među braćom i sestrama, odnosno fenotipski HLA identičnog davatelja među roditeljima ili članovima šire

obitelji. Za preostale bolesnike potrebno je pronaći fenotipski HLA identičnog nesrodnog davatelja među dobrovoljnim davateljima upisanim u registre dobrovoljnih davatelja hematopoetskih matičnih stanica.

Premda je broj transplantacija s nesrodnog davatelja u stalnom porastu, ovaj tip transplantacije je još uvijek povezan s povećanim rizikom za razvoj GvHD-a i neuspješnim ishodom transplantacije u usporedbi s HSCT u kojima je davatelj srodnik. Štoviše, rizik za razvoj GvHD-a i postotak smrtnosti nakon nesrodne transplantacije ostaju visoki čak i kad su primatelj i davatelj identični za gene HLA (40). Jedno od mogućih objašnjenja ove pojave leži u činjenici da podudarnost srodnih primatelja i davatelja za gene HLA u najvećem broju slučajeva znači i podudarnost za čitavu regiju HLA te na taj način uključuje sve gene, i HLA i non-HLA, koji bi mogli imati utjecaj na ishod transplantacije. To, međutim, nije slučaj s nesrodnim davateljima.

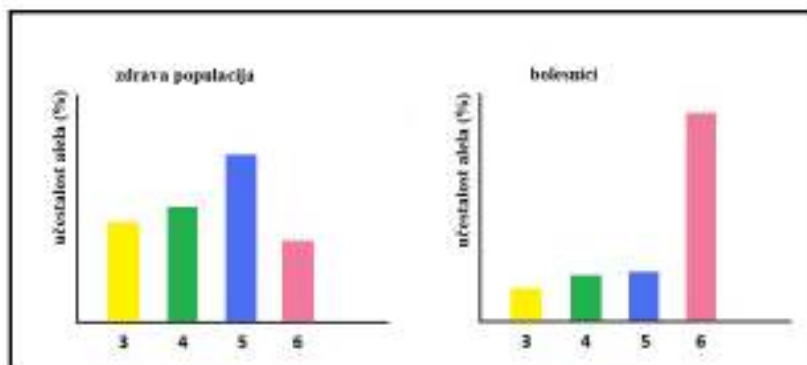
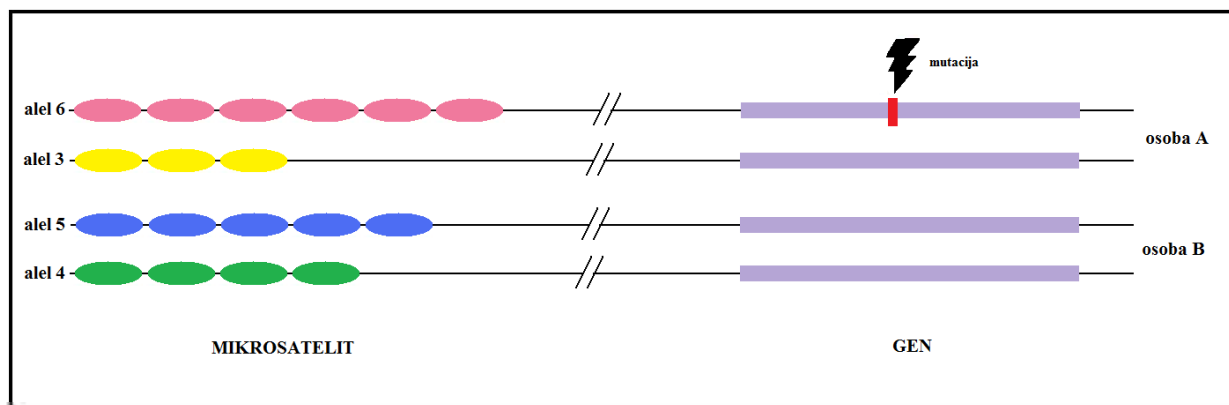
U pokušaju pronalaska što podudarnijeg nesrodnog davatelja moguće je primjeniti analizu mikrosatelita HLA. Naime, analizom mikrosatelita koji su razmješteni duž čitave regije sustava HLA, moglo bi se preciznije identificirati one davatelje koji s primateljem dijele ne samo gene HLA, već i čitav haplotip HLA (41).

Istraživanja mikrosatelita regije gena za čimbenik nekroze tumora (*engl.* Tumor Necrosis Factor, TNF) ukazala su na još jednu od mogućih prednosti analize mikrosatelita HLA primatelja prije HSCT. Naime, rezultati tih istraživanja su pokazali da su neki od alela na mikrosatelitima unutar regije TNF povezani s pojačanom odnosno smanjenom produkcijom citokina TNF α . S obzirom da ovaj citokin igra jednu od ključnih uloga u inicijacijskoj fazi razvoja GvHD-a, informacija o većoj ili manjoj sposobnosti stanica imunološkog sustava bolesnika da ga proizvode je izrazito vrijedna za predviđanje ishoda HSCT s obzirom na pojavu GvHD-a. Analiza ovih mikrosatelita bi stoga mogla pomoći pri ukazivanju na one bolesnike koji će nakon transplantacije imati veći rizik od razvoja GvHD-a (42).

1.3.2.2. Primjena mikrosatelita HLA u drugim područjima

Analiza mikrosatelita HLA u sklopu populacijskih i evolucijskih istraživanja može dati korisne informacije o filogeniji. Na primjer, istraživanje mikrosatelitskih lokusa koristi se za rasvjetljavanje evolucije raznovrsnosti HLA. Uz populacijsku genetiku, mikrosateliti smješteni unutar regije HLA našli su svoju najveću primjenu u istraživanjima povezanosti gena sustava HLA s različitim bolestima. Ovakvom analizom moguće je dobiti čitav niz korisnih podataka: od preciznijeg mapiranja lokusa koji pridonosi podložnosti za bolest (hemokromatoza), određivanja ili isključivanja čimbenika unutar regije HLA za dodatnu genetsku podložnost ili zaštitu od bolesti (glutenska enteropatija, Bechet-ova bolest, mutipla skleroza), dodatno razjašnjavanje uloge regije HLA u genetskoj podložnosti ili patofiziologiji bolesti (šećerna bolest tip I, reumatoidni artritis, sistemski lupus eritematosus) itd. (39).

Osnovni princip analize mikrosatelita svrhu mapiranja gena za podložnost za određenu bolest je prikazan na Slici 13. Za svaki mikrosatelit postoji raspodjela učestalosti alela među pripadnicima zdrave populacije. Ukoliko unutar gena, koji je fizički smješten u blizini mikrosatelita, dođe do mutacije koja će uzrokovati razvoj bolesti, tada će se takav mutirani oblik gena, zbog male vjerojatnosti crossing-overa, nasljeđivati zajedno s alelom na mikrosatelitu koji ima osoba kod koje je prvi put došlo do mutacije (primjer na slici 13: osoba A, alel 6). S vremenom će unutar populacije bolesnika doći do promjene u raspodjeli učestalosti alela mikrosatelitskog lokusa te će u njoj prevladavati alel koji je bio prisutan na mikrosatelitu u trenutku prvog pojavljivanja mutacije (primjer na slici 13: alel 6). Što je mikrosatelit bliži genu odgovornom za razvoj bolesti, to će ta predominacija biti izraženija. Analizom takvog mikrosatelitskog lokusa u zdravoj populaciji i među bolesnicima moguće je utvrditi razlike te na taj način suziti područje genoma unutar kojeg će se zatim izravnim metodama poput sekvencioniranja tražiti gen s mutacijom odgovornom za nastanak bolesti.



Slika 13. Shema primjene mikrosatelitskih lokusa u genskom mapiranju

Postoje brojni primjeri različitih bolesti u čijem je razvoju upravo na taj način istraživana uloga gena sustava HLA. Jedno od najnovijih i najopsežnijih je istraživanje kojim je ispitivana povezanost mikrosatelita HLA i razvoja šećerne bolesti tip I. Osim već poznate povezanosti sa regijom HLA razreda II, rezultati istraživanja su ukazali i na važnost proširene regije razreda I u kojoj je pronađena snažna povezanost ove bolesti s mikrosatelitskim lokusom D6S2223 (43). Upravo je ovo istraživanje bilo povod brojnim znanstvenicima da se usredotoče na ovaj, dotad malo razmatran, dio regije sustava HLA i njegovu ulogu u nastanku šećerne bolesti tip I.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Istražiti raznolikost 9 mikrosatelitskih lokusa non-HLA (TH01, VWFA31, FES/FPS, F13A01, SE33, D1S1656, D12S391, D18S535 i D22S683) i jednog minisatelitskog lokusa non-HLA (D1S80) na reprezentativnom uzorku hrvatske populacije (N=150).
2. Izračunati informativnost ispitivanih lokusa non-HLA za praćenje kimerizma nakon HSCT.
3. Ispitati praćenje kimerizma u svrhu procjene funkcioniranja transplantata ili predviđanja ponovne pojave bolesti opetovanom analizom lokusa non-HLA među ispitanicima nakon transplantacije te utvrditi da li postoje razlike u mogućnosti predviđanja ponovne pojave bolesti s obzirom na dijagnozu ispitanika.
4. Istražiti raznovrsnost 13 mikrosatelitskih lokusa HLA smještenih unutar sustava HLA (D6S291, D6S1014, D6S273, TNFd, TNFa, TNFb, D6S2793, STR_MICA, MIB, D6S2927, D6S2939, D6S265 i D6S510) na reprezentativnom uzorku hrvatske populacije (N=150).
5. Analizirati haplotipske veze između mikrosatelitskih lokusa HLA kao i između alela mikrosatelitskih lokusa HLA i gena HLA u hrvatskoj populaciji.
6. Utvrditi vrijednosti LD-a za pojedine haplotipske veze koje će se koristiti za buduća istraživanja povezanosti regije HLA s bolestima.
7. Odrediti strukturu produženih haplotipova HLA u hrvatskoj populaciji te je usporediti s podacima za druge populacije.
8. Ispitati utjecaj podudarnosti za mikrosatelite HLA na pojavu GvHD-a, ponovnu pojavu bolesti, odbacivanje transplantata te sveukupnog preživljenja ispitanika koji su primili hematopoetske matične stanice od nesrodnog davatelja.
9. Ispitati povezanost alela mikrosatelitskih lokusa unutar regije TNF (TNFa, TNFb i TNFd) kod ispitanika sa sveukupnim preživljavanjem.

3. ISPITANICI, MATERIJAL I METODE

3.1. ISPITANICI

Plan istraživanja je odobren od strane Etičkih povjerenstava Kliničkog bolničkog centra Zagreb te Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

3.1.1. ZDRAVI ISPITANICI

Za provođenje populacijskog dijela istraživanja raznolikosti alela devet mikrosatelita non-HLA i jednog minisatelita non-HLA te 13 mikrosatelita HLA u hrvatskoj populaciji, analizirani su uzorci 150 zdravih, nesrodnih stanovnika grada Zagreba. Ispitanici su porijeklom bili iz svih krajeva Hrvatske.

3.1.2. PAROVI PRIMATELJ-DAVATELJ

Za praćenje kimerizma, ispitivanja podudarnosti za alele mikrosatelita HLA na ishod transplantacije te istraživanja povezanosti alela mikrosatelita unutar regije TNF ispitanika s rizikom za pojavu i težinu akutnog GvHD-a, provedeno je ispitivanje na uzorku od 120 parova ispitanika koji su bili liječeni s HSCT i njihovih davatelja. U 100 parova primatelj i davatelj bile su srodne osobe, dok je u preostalih 20 slučajeva davatelj bio dobrovoljni nesrodni davatelj iz Svjetskog registra (Bone Marrow Donors Worldwide, BMDW). U istraživanje su uključeni ispitanici koji su se liječili u Klinici za hematologiju i Klinici za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb u periodu 2000.-2007.g. Svi ispitanici su bili podvrgnuti mijeloablativnom kondicioniranju prije HSCT. U slučajevima mijeloidnog zloćudnog tumora ispitanici su za pripremu liječenja alogenom transplantacijom primili program kombinaciju busulfana i ciklofosfamida (44), dok se za limfoidne zloćudne tumore priprema sastojala od ozračenja cijelog tijela u kombinaciji sa ciklofosfamidom (45).

3.2. MATERIJAL

Svakom primatelju i davatelju je u sklopu traženja bilo srodnog davatelja unutar obitelji, bilo nesrodnog davatelja u međunarodnom Registru uzet uzorak periferne krvi radi određivanja gena HLA. Iz tog uzorka krvi je izdvojeno 2ml krvi u svrhu određivanja alela mikrosatelitskih lokusa.

3.3. METODE

3.3.1. IZOLACIJA DNK

Iz 2ml uzorka periferne krvi ispitanika izolirana je DNK pomoću komercijalnog kita za izolaciju DNK (Nucleospin, Macherey Nagel, Duren, Njemačka). Metoda se temelji na uporabi kolumni sa silikatnom membranom koja specifično veže molekule DNK.

3.3.2. ODREĐIVANJE ALELA LOKUSA NON-HLA

3.3.2.1. Osobine mikrosatelita i minisatelita non-HLA

Skupina lokusa non-HLA obuhvaćala je 9 lokusa STR (TH01, VWFA31, FES/FPS, F13A01, SE33, D1S1656, D12S391, D18S535 i D22S683) i jedan lokus VNTR (D1S80). Smještaj i struktura ispitivanih lokusa, kao i broj i duljina njihovih alela prikazani su u tablici 3 (46-55).

Tablica 3. Smještaj i osobine 10 analiziranih lokusa non-HLA

<i>Lokus</i>	<i>Kromosom</i>	<i>Broj alela</i>	<i>Duljina alela (pb)</i>	<i>Ponavljajući slijed</i>
TH01	11	8	154-178	(AATG) _n
VWFA31	12	13	122-166	(ATCT) ₂ (GTCT) _m (ATCT) _n
FES/FPS	15	10	202-238	(ATTT) _n
F13A01	6	16	179-235	(AAAG) _n
SE33	5	23	233-319	(AAAG) _n
D1S80	1	28	369-801	(GAGGACCACCGCAAG) _n
D1S1656	1	13	129-168	(TAGA) ₄ (TGA) ₀₋₁ (TAGA) ₆₋₁₆ (TAGG) ₀₋₁ (TG) ₅
D12S391	12	15	209-253	(GATA) _n
D18S535	18	8	130-158	(GATA) _n
D22S683	22	18	168-204	(TATC) _n

Legenda: pb - parova baza

3.3.2.2. Umnažanje mikrosatelita i minisatelita non-HLA

Umnažanje lokusa STR i VNTR non-HLA provedeno je uz pomoć metode PCR. Početnice su na 5' kraju bile obilježene fluorescentnom bojom Cy5. Ukupni volumen reakcije PCR iznosio je 15 µl (9µl H₂O; 0,25µl početnica 5' i 3' koncentracije 10pmol/µl; 1,25µl pufera 10X koji sadrži 25mM MgCl₂ (Applied Biosystems); 0,25µl deoksiribonukleozid-trifosfata (dNTP) koncentracije 10mM; 0,15µl polimeraze Taq koncentracije 5U/µl; 2µl DNK). Slijed nukleotida početnica 5' i 3' specifičnih za svaki lokus non-HLA prikazan je u tablici 4, dok su uvjeti reakcije PCR prikazani u tablici 5 (46-55).

Tablica 4. Slijed nukleotida početnica 5' i 3' za umnažanje lokusa STR i VNTR non-HLA

<i>Lokus</i>	<i>Početnice</i>
TH01	5' GTG ATT CCC ATT GGC CTG TTC CCT 3' GTG GGC TGA AAA GCT CCC GAT TAT
VWFA31	5' CCC TAG TGG ATG ATA AGA ATA ATC AGT ATG 3' GGA CAG ATG ATA AAT ACA TAG GAT GGA TGG
FES/FPS	5' GGG ATT TCC CTA TGG ATT GG 3' GCG AAA GAA TGA GAC TAC AT
F13A01	5' ATG CCA TGC AGA TTA GAA A 3' GAG GTT GCA CTC CAG CCT TT
SE33	5' AAT CTG GGC GAC AAG AGT GA 3' ACA TCT CCC CTA CCG CTA TA
D1S80	5' GAA ACT GGC CTC CAA ACA CTG CCC GCC G 3' GTC TTG TTG GAG ATG CAC GTG CCC CTT GC
D1S1656	5' GTG TTG CTC AAG GGT CAA CT 3' GAG AAA TAG AAT CAC TAG GGA ACC
D12S391	5' AAC AGG ATC AAT GGA TGC AT 3' TGG CTT TTA GAC CTG GAC TG
D18S535	5' TCA TGT GAC AAA AGC CAC AC 3' GAC AGA AAT ATA GAT GAG AAT GCA
D22S683	5' AAC AAA ACA AAA CAA AAC AAA CA 3' GGT GGA AAT GCC TCA TGT AG

Tablica 5. Uvjeti reakcije PCR za lokuse STR i VNTR non-HLA

<i>Lokus</i>	<i>Uvjeti reakcije PCR</i>	<i>Lokus</i>	<i>Uvjeti reakcije PCR</i>
TH01 VWFA31 FES/FPS F13A01	94°C - 45" } 54°C - 1' } 26 ciklusa 72°C - 1' }	D1S80	95°C - 15" } 66°C - 15" } 30 ciklusa 72°C - 40" }
SE33 D22S683	95°C - 45" } 61°C - 1' } 27 ciklusa 72°C - 1' 30" }	D1S1656 D12S391 D18S535	95°C - 1' } 58°C - 1' } 30 ciklusa 72°C - 1' }

3.3.3. ODREĐIVANJE ALELA MIKROSATELITSKIH LOKUSA HLA

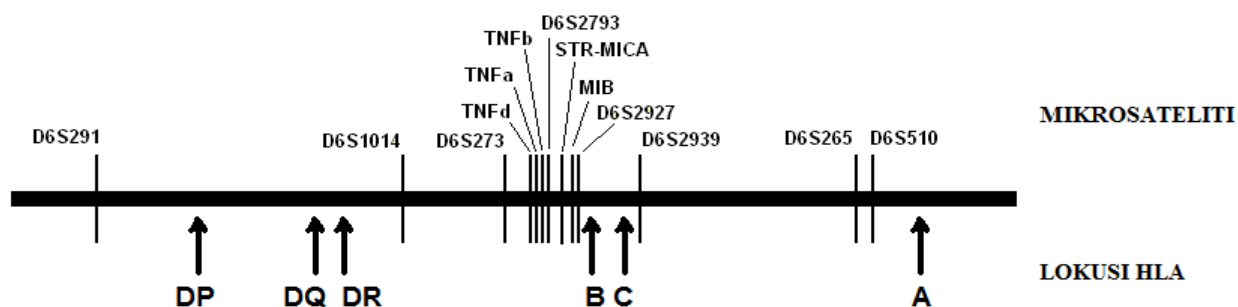
3.3.3.1. Osobine mikrosatelita HLA

Skupina mikrosatelita HLA obuhvaćala je 13 mikrosatelitskih lokusa (D6S291, D6S1014, D6S273, TNFd, TNFa, TNFb, D6S2793, STR_MICA, MIB, D6S2927, D6S2939, D6S265 i D6S510). Struktura mikrosatelita HLA, te njihov broj i duljina alela su prikazani u tablici 6, dok im je smještaj unutar regije HLA na kromosomu 6 prikazan na Slici 14 (32).

Tablica 6. Osobine 13 ispitivanih mikrosatelita HLA

<i>Lokus</i>	<i>Broj alela</i>	<i>Duljina alela (pb)</i>	<i>Ponavljajući slijed</i>
D6S291	7	200-212	(CA) _n
D6S1014	8	125-146	(AGC) _n
D6S273	7	126-138	(GT) _n
TNFd	7	124-136	(GA) _n
TNFa	14	97-123	(GT) _n
TNFb	7	124-130	(G/A) _n
D6S2793	15	206-224	(CA/TG) _n
STR_MICA	7	179-194	(GCT) _n
MIB	19	320-356	(GT) _n
D6S2927	6	213-233	(CAAA) _n
D6S2939	13	124-172	(TTTC) _n
D6S265	7	122-134	(CA) _n
D6S510	15	176-204	(AC) _n

Legenda: pb - parova baza



Slika 14. Smještaj 13 ispitivanih mikrosatelita HLA na kromosomu 6

3.3.3.2. Umnažanje mikrosatelita HLA

Mikrosatelitski lokusi HLA analizirani su uz pomoć PCR-a i specifičnih, fluorescentno obilježenih početnica 5' i 3'. Ukupni volumen reakcije PCR iznosio je 10 μ l (6 μ l H₂O; 0,2 μ l početnica 5' i 3' koncentracije 10 pmol/ μ l; 1 μ l pufera 10X; 1 μ l glicerola; 0,1 μ l deoksiribonukleozid-trifosfata (dNTP) koncentracije 10 mM; 0,1 μ l polimeraze Taq koncentracije 5 U/ μ l; 2 μ l DNA te MgCl₂ koncentracije 25 mM čiji volumen je ovisio o mikrosatelitu). Slijed nukleotida početnica i koncentracije MgCl₂ za reakciju PCR za umnažanje mikrosatelita HLA prikazani su u tablici 7, a uvjeti reakcije PCR u tablici 8 (32).

Tablica 7. Slijed nukleotida početnica 5' i 3' za umnažanje mikrosatelita HLA

<i>Lokus</i>	<i>Početnice</i>	<i>Koncentracija MgCl₂ (mM)</i>
D6S291	5' GGG GAT GAC GAA TTA TTC ACT AAC T 3' GGC ATT CAG GCA TGC CTG GC	2
D6S1014	5' GGG TCT GAC CAC TGA GAC AC 3' CAG TGA GAG CTC TGA GGG TC	2
D6S273	5' GCA ACT TTT CTG TCA ATC CA 3' ACC AAA CTT CAA ATT TTC GG	3
TNFd	5' AGA TCC TTC CCT GTG AGT TCT GCT 3' CAT AGT GGG ACT CTG TCT CCA AAG	2
TNFa	5' GCC TCT AGA TTT CAT CCA GCC ACA 3' CCT CTC TCC CCT GCA ACA CAC A	1,5
TNFb*	5' GCA CTC CAG CCT AGG CCA CAG A (1) 3' GCC TCT AGA TTT CAT CCA GCC ACA (2) 3' GTG TGT GTT GCA GGG GAG AGA G	2
D6S2793	5' CTA CCT CCT TGC CAA ACT TG 3' ATG GGC AAG ACT TCA ATG GC	2,5
STR_MICA	5' CCT TTT TTT CAG GGA AAG TGC 3' CCT TAC CAT CTC CAG AAA CTG C	2
MIB	5' CTA CCA TGA CCC CCT TCC CC 3' CCA CAG TCT CTA TCA GTC CA	2
D6S2927	5' GAC AGT CCT CAT TAG CGC TGA GG 3' CGA GAG AAC AAC TGG CAG GAC TG	2,5
D6S2939	5' GTA GCT GTG GAA ACA GTG TC 3' GCT TGA CTT GAA ACT CAG AG	2,3
D6S265	5' ACG TTC GTA CCC ATT AAC CT 3' TGA TCT AAT CGA GGT AAA CAG CAG AAA G	3
D6S510	5' AAT GGG CTA CTA CTT CAC ACC 3' CAA CAC ACT GAT TTC CAT AGC	2

* Reakcija PCR za umnažanje lokusa TNFb provodi se u dva dijela, tzv. „ugniježđeni“ PCR (engl. nested PCR); 5' početnica je zajednička za obje reakcije, dok se za 3' početnica razlikuje za prvu i drugu reakciju PCR; koncentracija MgCl₂ jednaka je za prvu i drugu reakciju PCR.

Tablica 8. Uvjeti reakcije PCR za umnažanje mikrosatelita HLA

<i>Lokus</i>	<i>Uvjeti reakcije PCR</i>
D6S291 D6S1014 STR_MICA	94°C - 15" 55°C - 30" 72°C - 1' 35 ciklusa
D6S273 D6S265	94°C - 15" 59°C - 30" 72°C - 1' 35 ciklusa
TNFd	94°C - 15" 60°C - 30" 72°C - 1' 35 ciklusa
TNFa*	95°C - 5' 94°C - 20" 65°C - 30" 72°C - 20" 10 ciklusa (-1°C/ciklus) 94°C - 20" 55°C - 20" 72°C - 20" 30 ciklusa
TNFb**	1. reakcija PCR 94°C - 3' 94°C - 30" 60°C - 1" 72°C - 1' 30 ciklusa 2. reakcija PCR 94°C - 3' 94°C - 30" 60°C - 1' 72°C - 1' 5 ciklusa

<i>Lokus</i>	<i>Uvjeti reakcije PCR</i>
D6S2793	94°C - 5' 94°C - 30" 62°C - 30" 72°C - 30" 72°C - 10' 35 ciklusa
MIB	94°C - 15" 57°C - 30" 72°C - 1' 35 ciklusa
D6S2927	94°C - 5' 94°C - 30" 67°C - 30" 72°C - 30" 72°C - 10' 30 ciklusa
D6S2939	94°C - 9' 94°C - 1' 54°C - 1' 72°C - 1'30" 72°C - 10' 34 ciklusa
D6S510	95°C - 3' 92°C - 1' 55°C - 1' 72°C - 1' 72°C - 5' 30 ciklusa

* U reakciji PCR za lokus TNFa temperatura sparivanja početnica se prvih 10 ciklusa smanjuje za po 1°C po ciklusu (engl. touch-down PCR)

** Reakcija PCR za lokus TNFb provodi se u dva dijela, tzv. „ugniježđeni“ PCR (engl. nested PCR)

3.3.4. ELEKTROFOREZA

Umnoženi produkti PCR analizirani su elektroforezom na 6%-tnom poliakrilamidnom gelu debljine 0,5mm u automatskom sekvenceru (ALFexpress, Amersham Pharmacia, Uppsala, Švedska). Produkti reakcije PCR su prije elektroforeze pomiješani s puferom s bojom te standardima odnosno fragmentima DNK poznate duljine. Uz te unutarnje standarde, na svakom gelu je bio uključen i vanjski standard. Prilikom analize mikrosatelita HLA vanjski standard bili su aleli testiranog mikrosatelita umnoženi iz DNK izolirane iz B staničnih linija korištenih tijekom 10th IHW (*engl.* International Histocompatibility Workshop) (tablica 9). U slučaju analize mikrosatelita non-HLA koristile su se tzv. alelne ljestve (*engl.* allelic ladder) koje su dobivene miješanjem umnoženih uzoraka DNK osoba kojima su prethodno određeni aleli za

Tablica 9. Popis B staničnih linija korištenih kao standard u analizi mikrosatelita HLA

<i>Lokus</i>	<i>Stanična linija</i>	<i>Aleli</i>	<i>Lokus</i>	<i>Stanična linija</i>	<i>Aleli</i>
D6S291	TAB089 BTB	172pb 172pb, 182pb	D6S2793	VAVY BTB	CA26 CA14
D6S1014	BTB VAVY	137pb 143pb	STR_MICA	KAS116 VAVY BTB	A6 A5.1 A4
D6S273	TAB089 BTB	134pb 134pb	MIB	TAB089 BTB	326pb 338pb
TNFD	VAVY BTB HO301	TNFD2 TNFD4 TNFD5	D6S2927	KAS116 BTB	217pb 213pb
TNFA	BTB VAVY KAS011	TNFA1 TNFA2 TNFA10	D6S2939	KAS116 BTB	160pb 160pb
TNFB	AMALA BTB VAVY RML	TNFB1 TNFB5 TNFB3 TNFB4	D6S265	TAB089 BTB	126pb, 130pb 130pb

Legenda: pb - parova baza

pojedini mikrosatelitski lokus non-HLA i to tako da su zastupljeni svi aleli testiranog mikrosatelita. Komercijalni standard duljine 200pb (Sizer200, Amersham Pharmacia, Uppsala, Švedska) je također korišten prilikom analize mikrosatelita non-HLA kao i mikrosatelita HLA.

Prije elektroforeze, priređeni uzorci denaturirani su 3 min na 95°C, a zatim stavljeni na led do trenutka nanošenja na gel. Uvjeti elektroforeze bili su: 350min; 1200V, 40mA; 50W; 50°C. Očitavanje alela provedeno je uz pomoć lasera koji pobuđuje fluorescenciju boje vezane za fragmente DNK te fotodetektora koji očitavaju fluorescenciju u trenutku kad fragment DNK prolazi kroz lasersku zraku.

Određivanje duljine fragmenata DNK provedeno je uz pomoć računalnog programa AlleleLocator (Amersham Pharmacia, Uppsala, Švedska) koji na temelju vremena elektroforeze standarda poznate duljine, izračunava duljinu alela analiziranog mikrosatelita.

3.3.5. POSTUPAK ODREĐIVANJA MIKROSATELITA HLA KOD ISPITANIKA PRIJE HSCT

Određivanje mikrosatelita HLA provedeno je prije transplantacije kod ispitanika i njihovih davatelja u slučaju transplantacije s nesrodnog davatelja (N=20), te kod ispitanika kojima je davatelj bio genotipski HLA identični brat ili sestra (N=100). Za prvu skupinu ispitanika određivano je svih 13 mikrosatelita HLA koji su uključeni u istraživanje, dok su za drugu skupinu ispitanika određivani samo mikrosateliti iz regije TNF.

3.3.6. POSTUPAK ODREĐIVANJA LOKUSA NON-HLA KOD ISPITANIKA NAKON HSCT

Analiza uzorka periferne krvi ispitanika prije transplantacije i davatelja prvo je provedena na lokusima TH01, VWFA31, FES/FPS, F13A01, SE33 i D1S80. Ukoliko analizom tih lokusa nisu bila pronađena najmanje dva informativna lokusa, bili su analizirani i dodatni lokusi

(D1S1656, D12S391, D18S535 i D22S683). Informativnim lokusom smatrao se onaj lokus na kojem je primatelj imao barem jedan alel koji nije bio prisutan kod davatelja.

3.3.7. PODJELA ISPITANIKA S OBZIROM NA UDIO STANICA PRIMATELJA I DAVATELJA U UZORKU PRIMATELJA NAKON HSCT

S obzirom na udio stanica primatelja i davatelja u uzorku primatelja nakon HSCT, ispitanici su bili podijeljeni u tri skupine: ispitanici kod kojih su prilikom svake analize uočeni samo aleli davatelja (puni kimerizam, PK), ispitanici kod kojih su u određenom periodu nakon HSCT uočeni i aleli primatelja i aleli davatelja u određenom omjeru (miješani kimerizam, MK), te konačno ispitanici kod kojih su uočeni samo aleli primatelja (P). Unutar skupine ispitanika koji su pokazali miješani kimerizam razlikovali smo četiri podskupine: ispitanike s padajućim miješanim kimerizmom (pMK) kod kojih se udio alela primatelja s vremenom smanjivao, ispitanike s rastućim miješanim kimerizmom (rMK) kod kojih je udio alela primatelja nakon HCT rastao, ispitanike koji su pokazivali i padajući i rastući miješani kimerizam (pMK/rMK) te ispitanike sa stabilnim miješanim kimerizmom (sMK) kod kojih se udio alela primatelja nije značajno mijenjao.

3.3.8. IZRAČUNAVANJE UDJELA STANICA PRIMATELJA I DAVATELJA U UZORKU PRIMATELJA NAKON HSCT

Udio stanica primatelja, odnosno davatelja u uzorku bolesnika nakon HSCT proporcionalan je koncentraciji DNK nakon umnažanja reakcijom PCR, tj. intenzitetu fluorescencije koja se očitava prilikom prolaska molekule DNK kroz lasersku zraku tijekom elektroforeze. Budući se intenzitet fluorescencije izražava visinom signala koji označava pojedini fragment DNK, odnosno alel mikrosatelita, moguće je izračunati udio DNK, tj. stanica

primatelja i davatelja u uzorku iz omjera visine signala specifičnih alela. Ovisno o tome da li se primatelj i davatelj za pojedini mikrosatelit lokus razlikuju u oba ili samo jednom alelu, te da li je jedan od njih ili oboje homozigot za analizirani mikrosatelit, primjenjuju se različite formule za izračunavanje tog omjera (56).

Primjer 1. Primatelj i davatelj se razlikuju za oba alela

Primatelj



Davatelj



Kimera



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

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

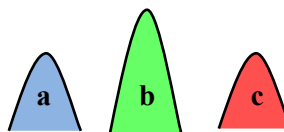
Primatelj



Davatelj



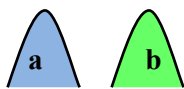
Kimera



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

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

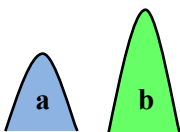
Primatelj



Davatelj



Kimera



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

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

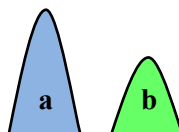
Primatelj



Davatelj



Kimera



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

Primjer 5. Primatelj je homozigot za alel koji nema davatelj

Primatelj



Davatelj



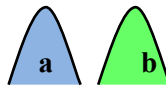
Kimera



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

Primjer 6. Davatelj je homozigot za alel koji nema primatelj

Primatelj



Davatelj



Kimera



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

3.3.9. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Podaci su analizirani deskriptivnom statistikom. Učestalosti su određene za svaki lokus direktnim brojanjem. Osoba je smatrana homozigotom za analizirani lokus ukoliko je na njemu određen samo jedan alel. Učestalost pojedinog alela, odnosno njegov udio među svim alelima na ispitivanom lokusu, izračunata je prema formuli:

$$f_a = \frac{2(AA) + (Aa)}{2n}$$

f_a - učestalost alela a

AA - broj homozigotnih genotipova

Aa - broj heterozigotnih genotipova

n - broj osoba u ispitivanom uzorku

Hardy-Weinberg ravnoteža će biti testirana uporabom χ^2 testa. Također su, kao mjere informativnosti pojedinog lokusa, izračunati postotak očekivane i uočene heterozigotnosti i razina polimorfizma (*engl.* Polymorphism Information Content – PIC) prema radu Hearne i suradnika (26) Udio heterozigota predstavlja mjeru genetičke varijabilnosti. Uspoređen je uočeni udio heterozigota s očekivanim. Očekivana heterozigotnost izračunata je prema formuli:

$$H = 1 - \sum \frac{(f_a)^2 n}{n - 1}$$

H - očekivana heterozigotnost

f_a - učestalost alela

n - broj alela

PIC vrijednost izračunata je prema formuli:

$$PIC = 1 - \sum (f_a)^2 - \sum 2(f_a)^2(f_{a+1})^2$$

PIC - vrijednost razine polimorfizma

f_a - učestalost alela

Vrijednost neravnoteže udruživanja izračunata je prema formuli preuzetoj iz rada Imanishi-a i suradnika (57):

$$LD = F_{ab} - f_a f_b$$

F_{ab} = frekvencija haplotipa ab lokusa A i B

f_a - učestalost alela a lokusa A

f_b = frekvencija alela b lokusa B

Povezanost pojedinih kliničkih i genetskih čimbenika procijenjena je uz pomoć 2x2 tablica pri čemu je razina statističke značajnosti bila 0,05. U slučaju kada je broj pojedinog čimbenika bio manji od 5, koristio se Fisher-ov test.

Procjena preživljavanja bolesnika nakon transplantacije provedena je uporabom Kaplan-Meierove analize.

4. REZULTATI

4.1. ANALIZA RAZNOLIKOSTI MIKROSATELITA I MINISATELITA NON-HLA

4.1.1. RASPODJELA ALELA NA MIKROSATELITSKIM I MINISATELITSKOM LOKUSU NON-HLA

Analiza učestalosti alela na mikrosatelitskim i minisatelitskom lokusu non-HLA provedena je na uzorku hrvatske populacije (N=150). Rezultati raspodjele učestalosti alela za lokuse TH01, VWFA31, FES/FPS i F13A01 prikazani su u tablici 10. Najveći broj alela (n=14) uočen je na lokusu F13A01, a najmanji na mikrosatelitima TH01 i FES/FPS (n=7). Nedostatak pojedinih alela koji su opisani u literaturi, a nisu uočeni u hrvatskoj populaciji je vidljiv za sva četiri lokusa. U svim slučajevima se radilo o alelima s izrazitom velikim ili izrazito malim brojem ponavljanja te malim učestalostima. Jedini izuzetak je alel 10 na lokusu F13A01, no za ovaj lokus je svojstvena mala učestalost (<2%) za sve alele s više od sedam ponavljanja osnovnog tetranukleotidnog slijeda.

Usporedba raspodjela učestalosti alela na lokusima prikazanim u tablici 11 ukazala je da kod svih lokusa osim lokusa TH01 postoje dva (VWFA31-16, VWFA31-17, i F13A01-6, F13A01-7), odnosno tri alela (FES/FPS-11, FES/FPS-12, FES/FPS-13), čija zajednička učestalost iznosi više od 45%. U sva tri slučaja radi se o alelima koji se međusobno razlikuju za jednu osnovnu jedinicu ponavljanja. Učestalosti alela s većim ili manjim brojem ponavljanja na ovim lokusima ravnomjerno opadaju. Nasuprot tome, kod mikrosatelita TH01 uočena su tri alela, također s izrazito većom učestalošću u odnosu na ostale alele tog lokusa (77,7%), no u ovom slučaju radi se o jednom alelu s malim brojem ponavljanja (TH01-6) te dva alela s većim brojem ponavljanja (TH01-9 i TH01-9.3).

Tablica 10. Raspodjela alela na mikrosatelitima TH01, VWFA31, FES/FPS i F13A01 u hrvatskoj populaciji (N=150)

TH01		VWFA31		FES/FPS		F13A01	
<i>Alel</i>	<i>Učestalost (%)</i>	<i>Alel</i>	<i>Učestalost (%)</i>	<i>Alel</i>	<i>Učestalost (%)</i>	<i>Alel</i>	<i>Učestalost (%)</i>
5	1,3	10	—	6	—	3	0,7
6	30,7	11	—	7	—	3.2	8,7
7	11,3	12	0,3	8	—	4	5,7
8	8,0	13	3,0	9	1,7	5	14,3
9	20,7	14	12,0	10	7,7	6	27,7
9.3	26,3	15	13,3	11	28,0	7	34,7
10	1,7	15.2	0,7	12	36,0	8	1,0
11	—	16	21,3	13	21,3	9	1,3
		17	25,7	14	4,7	10	—
		18	13,0	15	0,7	11	0,7
		19	8,7			12	1,3
		20	2,0			13	0,7
		21	—			14	1,7
						15	0,3
						16	1,3
						17	—

Analiza učestalosti alela na lokusima SE33, D22S683 i D1S80 prikazana je u tablici 11. Najveći broj alela pronađen je na lokusu SE33 (n=21) na kojem je, za razliku od preostala dva lokusa, učestalost svih alela jednoliko raspoređena. Među 18 alela uočenih na lokusu D22S683 i 15 alela na lokusu D1S80, po dva alela pokazuju predominantnost, no u slučaju D22S683 radi se o alelima koji se razlikuju za samo jedno i to nepotpuno ponavljanje, odnosno 2pb (D22S683-14 i D22S683-14.2). S druge strane, razlika u dužini između dva najučestalija alela minisatelitskog

Tablica 11. Raspodjela alela na mikrosatelitima SE33 i D22S683 i minisatelitu D1S80 u hrvatskoj populaciji (N=150)

SE33		D22S683		D1S80			
<i>Alel</i>	<i>Učestalost (%)</i>	<i>Alel</i>	<i>Učestalost (%)</i>	<i>Alel</i>	<i>Učestalost (%)</i>	<i>Alel</i>	<i>Učestalost (%)</i>
12	—	12	8,3	14	—	37	—
12.2	—	13	7,3	15	—	38	—
13.2	4,7	13.2	9,3	16	2,0	39	—
14	2,0	14	15,3	17	18,0	40	—
15	6,0	14.2	15,3	18	3,3	41	—
16	7,3	15	8,7	19	8,0		
17	8,3	15.2	6,3	20	11,7		
18	5,3	16	9,3	21	29,7		
19	4,3	16.2	2,3	22	7,7		
20	5,0	17	3,7	23	2,7		
21	2,7	17.2	2,7	24	7,3		
22.2	4,3	18	1,0	25	4,0		
23.2	3,7	18.2	1,3	26	2,0		
24.2	6,7	19	1,7	27	0,7		
25.2	4,0	19.2	3,3	28	1,3		
26.2	10,3	20	0,6	29	1,0		
27.2	8,3	20.2	2,0	30	0,7		
28.2	6,3	21	1,3	31	—		
29.2	5,3			32	—		
30.2	2,0			33	—		
31.2	2,0			34	—		
32.2	0,7			35	—		
33.2	0,7			36	—		

lokusa D1S80 (D1S80-17 i D1S80-21) puno je veća i iznosi četiri ponavljanja slijeda od 16pb. Za lokuse SE33 i D1S80 uočen je nedostatak alela koji su opisani u literaturi, no dok se kod lokusa SE33 radi samo o dva alela s izrazito malim brojem ponavljanja (SE33-12 i SE33-12.2), kod lokusa D1S80 nije uočen niti jedan alel dulji od 625pb (D1S80-30).

Raspodjela alela na lokusima D1S1656, D12S391 i D18S535 prikazana je u tablici 12. Na lokusu D12S391 otkriven je najveći broj alela (n=15) čije su učestalosti jednolike

Tablica 12. Raspodjela alela na mikrosatelitima D1S1656, D12S391 i D18S535 u hrvatskoj populaciji (N=150)

D1S1656		D12S391		D18S535	
<i>Alel</i>	<i>Učestalost (%)</i>	<i>Alel</i>	<i>Učestalost (%)</i>	<i>Alel</i>	<i>Učestalost (%)</i>
10	6,0	15	2,3	9	7,3
11	14,7	16	3,0	10	2,3
12	6,3	17	8,0	11	5,3
13	10,0	17.3	3,0	12	21,7
14	13,3	18	13,3	13	34,3
15	14,7	18.3	7,7	14	17,7
15.3	6,0	19	9,0	15	11,0
16	7,3	19.3	4,3	16	0,3
16.3	9,0	20	11,7		
17	5,7	21	12,7		
17.3	5,3	22	9,7		
18.3	1,0	23	9,0		
19.3	0,7	24	4,3		
		25	1,7		
		26	0,3		

raspoređene, s tek neznatno većom učestalošću tri alela (D12S391-18, D12S391-20 i D12S391-21). Navedena tri alela pokazala su zastupljenost veću od 10%. Slična situacija otkrivena je i na lokusu D1S1656 kod kojeg su četiri alela (D1S1656-11, D1S1656-13, D1S1656-14 i D1S1656-15) uočena sa zastupljenošću od 10% i više. Međutim, kod oba spomenuta lokusa nije uočena pravilna raspodjela zastupljenosti alela pri kojoj se tzv. «granični» aleli, odnosno aleli s najmanjim i najvećim brojem ponavljanja pojavljuju u najrjeđe. Nasuprot lokusima D1S1656 i D12S391, raspodjela alela na lokusu D18S535 bila je znatno manje raznolika sa samo 8 uočenih različitih alela od kojih alel D18S535-13 pokazao izrazito veliku zastupljenost (34,3%) u odnosu na druge alele te se zajedno s alelom D18S535-12 pojavio u više od 50% ispitanika.

4.1.2. ANALIZA INFORMATIVNOSTI MIKROSATELITSKIH I MINISATELITSKOG LOKUSA NON-HLA

Analiza mogućnosti primjene pojedinog lokusa u svrhu razlučivanja porijekla stanica u uzorku primatelja nakon HSCT, odnosno razlikovanja primatelja i davatelja, provedena je na osnovi nekoliko statističkih vrijednosti. To su razina polimorfizma (PIC) te očekivana i uočena heterozigotnost, rezultati ove analize prikazani su u tablici 13.

Iz rezultata je vidljivo kako za niti jedan od ispitivanih lokusa nije primijećena značajna razlika između vrijednosti za očekivanu i uočenu heterozigotnost. Za lokus SE33 je očekivana vrijednost heterozigotnosti bila najviša (0,9362) budući je njegovom analizom unutar hrvatske populacije uočen čak 21 alel i to sa samo jednim alelom koji je pokazao učestalost od 10%. Također, broj osoba koje su bile heterozigoti za ovaj lokus u hrvatskoj populaciji bio je najviši u usporedbi s ostalim lokusima. Sukladno tomu, vrijednost PIC za lokus SE33 od 0,9385 također predstavlja najvišu vrijednost u skupini ispitivanih lokusa. Prema ispitivanim statističkim vrijednostima, lokus SE33 slijede lokusi D12S391 i D22S683 koji s 15, odnosno 18 uočenih

alela i raspodjelom alela sličnoj onoj na lokusu SE33, predstavljaju drugi i treći najinformativniji lokus s vrijednostima PIC koje su iznosile 0,9070 (D12S391) i 0,9046 (D22S683).

Tablica 13. Statistički podaci za lokuse TH01, VWFA31, FES/FPS, F13A01, SE33, D1S80, D1S1656, D12S391, D18S535 i D22S683 u hrvatskoj populaciji (N=150)

<i>Lokus</i>	<i>H_{očekivana}</i>	<i>H_{uočena}</i>	<i>PIC</i>
TH01	0,7419	0,7533	0,7651
VWFA31	0,8166	0,8200	0,8216
FES/FPS	0,7090	0,6133	0,7049
F13A01	0,7566	0,8000	0,7492
SE33	0,9362	0,9400	0,9385
D1S80	0,8379	0,7733	0,8399
D1S1656	0,8898	0,8600	0,8964
D12S391	0,9018	0,8667	0,9070
D18S535	0,7521	0,7267	0,7636
D22S683	0,9013	0,8867	0,9046

Legenda: H - heterozigotnost; PIC(engl. Polymorphism Information Content) - razina polimorfizma

4.2. PRAĆENJE KIMERIZMA ANALIZOM MIKROSATELITA I MINISATELITA NON-HLA

U svrhu praćenja kimerizma kod ispitanika nakon HSCT radi procjene funkcioniranja transplantata ili predviđanja ponovne pojave bolesti provedena je opetovana analiza lokusa non-HLA među 120 ispitanika koji su primili presadak krvotvornih matičnih stanica. Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine s obzirom na srodstvo s davateljem: 100 ispitanika kojima je davatelj bila sestra ili brat (skupina I), te 20 ispitanika koji su presadak primili od roditelja ili od nesrodnog davatelja iz Svjetskog registra dobrovoljnih davatelja koštane srži (skupina II). Podaci o dobi i dijagnozi ispitanika te podudarnosti po spolu ispitanika i davatelja prikazani su u tablici 14.

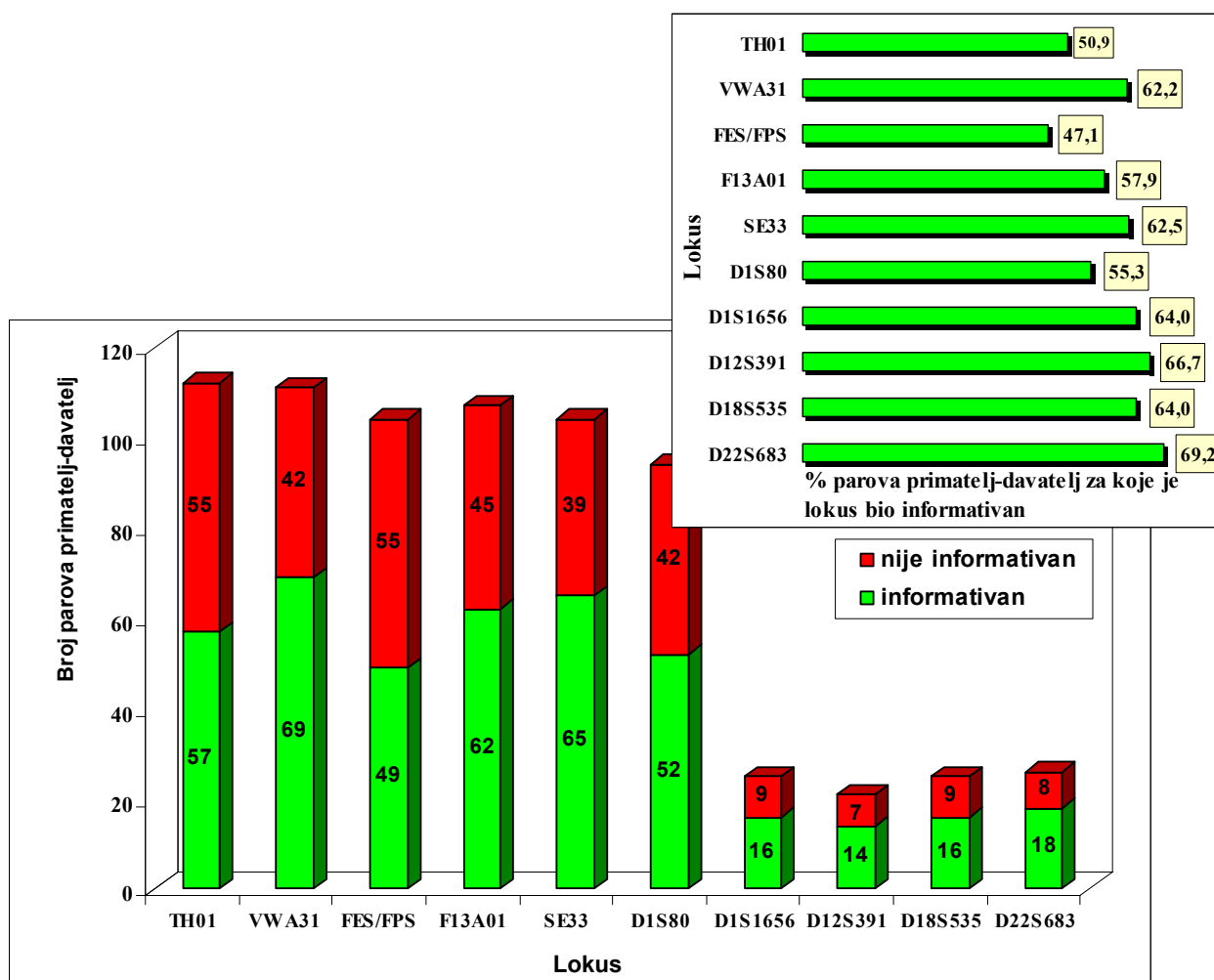
Tablica 14. Raspodjela ispitanika (N=120) prema dobi, dijagnozi i podudarnosti po spolu između ispitanika i davatelja krvotvornih matičnih stanica

	Zdravi ispitanici N=150	Ispitanici liječeni s HSCT	
		I (N=100)	II (N=20)
Dob ispitanika (godine)			
<i>Medijan (raspon)</i>	34,7 (22-58)	26,1 (1-53)	16,9 (3-36)
Spol (Ž/M)	87/63	46/54	9/11
Dijagnoza			
<i>AML</i>		28	1
<i>ALL</i>		25	9
<i>CML</i>		8	4
<i>CLL</i>		2	-
<i>NHL</i>		7	2
<i>AA</i>		13	2
<i>MDS</i>		5	1
<i>ostalo</i>		12	1
Odnos spola ispitanik/davatelj			
<i>M/M</i>		26	7
<i>M/Ž</i>		28	4
<i>Ž/M</i>		22	2
<i>Ž/Ž</i>		24	7

Legenda: HSCT – transplantacija hematopoetskih matičnih stanica; I - ispitanici kojima je davatelj bio brat ili sestra; II - ispitanici kojima je davatelj bio roditelj ili nesrodni davatelj; M - muškarac; Ž - žena; AML - akutna mijeloična leukemija; ALL - akutna limfocitna leukemija; CML - kronična mijeloična leukemija; CLL - kronična limfatička leukemija; NHL - non-Hodgkinov limfom; AA - aplastična anemija; MDS - mijelodisplastični sindrom

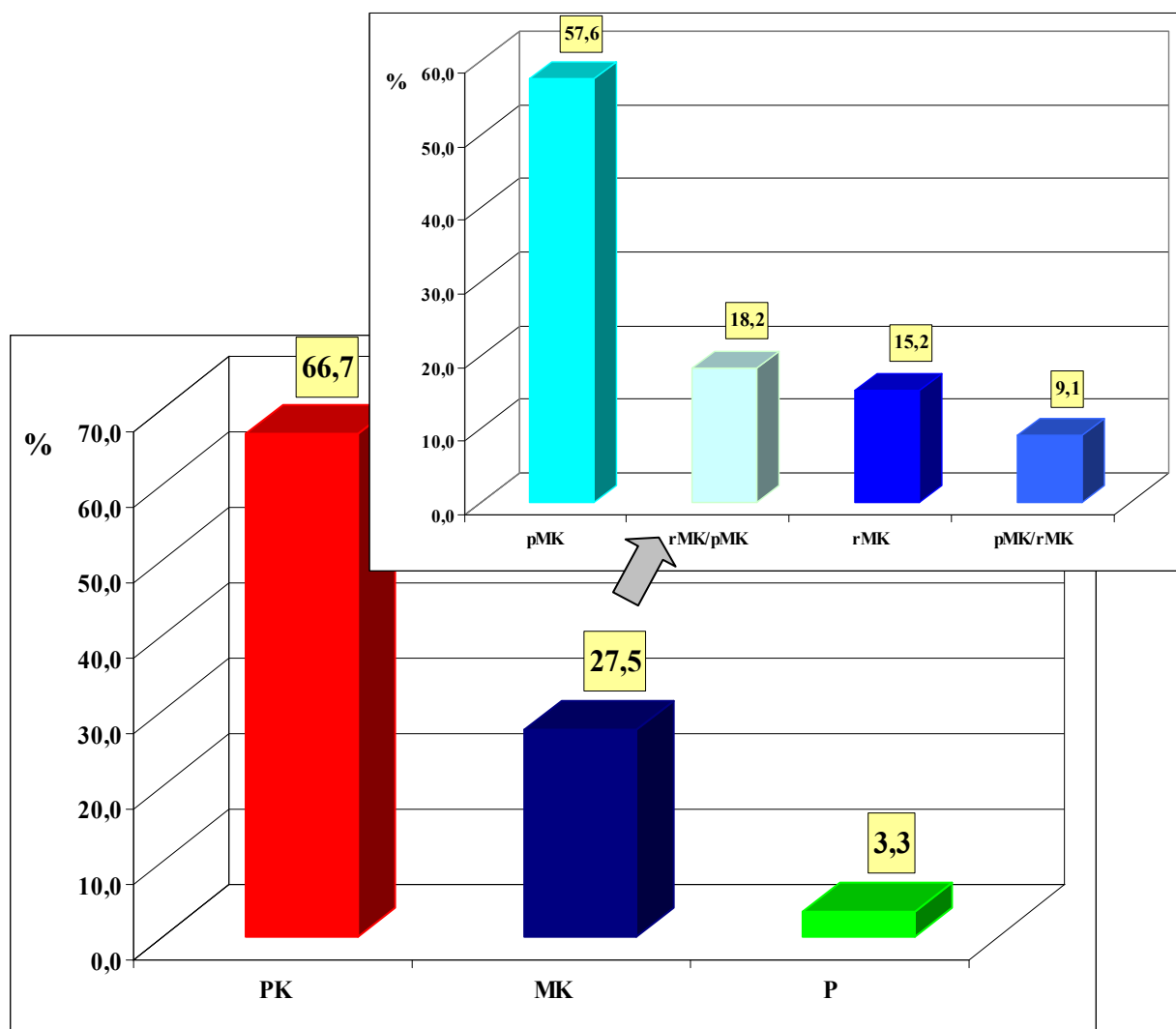
Iz tablice 14 vidljivo je kako su i u skupini ispitanika kojima je davatelj bio genotipski identični brat ili sestra i u skupini ispitanika kojima je davatelj bio fenotipski identični roditelj ili nesrodna osoba iz Svjetskog registra dobrovoljnih davatelja koštane srži, ispitanici bili mlađe životne dobi. To je posebno uočljivo u drugoj navedenoj skupini gdje je čak 90% ispitanika bilo mlađe od 30 godina, a niti jedan ispitanik nije bio stariji od 50 godina. Ispitanici su bili ravnomjerno raspodijeljeni prema spolu u obje skupine. Međutim, omjer ispitanika koji su se podudarali sa svojim davateljem po spolu razlikovao se u dvije skupine ispitanika. Dok su među ispitanicima s davateljem genotipski identičnim bratom ili sestrom bili podjednako zastupljeni ispitanici koji su bili istog spola kao i davatelj te ispitanici kod kojih je bila prisutna razlika u spolu primatelja i davatelja, u skupini ispitanika s fenotipski identičnim davateljem razlika u spolu je postojala samo u 30% slučajeva. Naposljetku, značajna razlika između dvije skupine uočena je i s obzirom na bolest zbog koje je osoba i liječena transplantacijom. Naime, akutna mijeloična leukemija najčešća je dijagnoza kod ispitanika s genotipski identičnim davateljem, slijede ju akutna limfocitna leukemija i aplastična anemija. Nasuprot tomu, akutna mijeloična leukemija je bila prisutna kod samo 5% ispitanika s fenotipski identičnim davateljem. Gotovo polovica ovih ispitanika je bolovala od akutne limfatičke leukemije dok je treća najzastupljenija bolest bila kronična mijeloična leukemija.

Podaci o broju parova za koje je pojedini lokus bio informativan prikazani su na slici 15. Vidimo da je lokus D22S683 bio informativan u najvećem broju slučajeva kada je bio testiran, dok je najmanji broj parova primatelj-davatelj pokazao razliku u alelima na lokusu FES/FPS. Ovi rezultati, kao i rezultati preostalih osam lokusa, u skladu su s podacima dobivenim analizom ovih lokusa na uzorku zdrave populacije. Jedina iznimka je lokus D18S535 koji je usprkos relativno niskoj vrijednosti PIC kao i udjelu heterozigota u zdravoj populaciji, unutar skupine parova primatelj-davatelj bio na trećem mjestu prema stupnju informativnosti.



Slika 15. Informativnost lokusa uključenih u postupak praćenja kimerizma

U analizi usporedbe kliničkog statusa ispitanika i rezultata kimerizma, ispitanici su bili podijeljeni u skupinu ispitanika kod kojih je prilikom svake analize uočeni puni kimerizam (PK), skupinu ispitanika kod kojih je pronađen miješani kimerizam (MK), bilo da se radilo o padajućem (pMK), rastućem (rMK) ili stabilnom miješanom kimerizmu (sMK), te konačno skupinu ispitanika kod kojih su uočeni samo aleli primatelja (P). kod kojih se udio alela primatelja nije značajno mijenjao. Raspodjela ispitanika prema navedenim grupama prikazana je na slici 16.



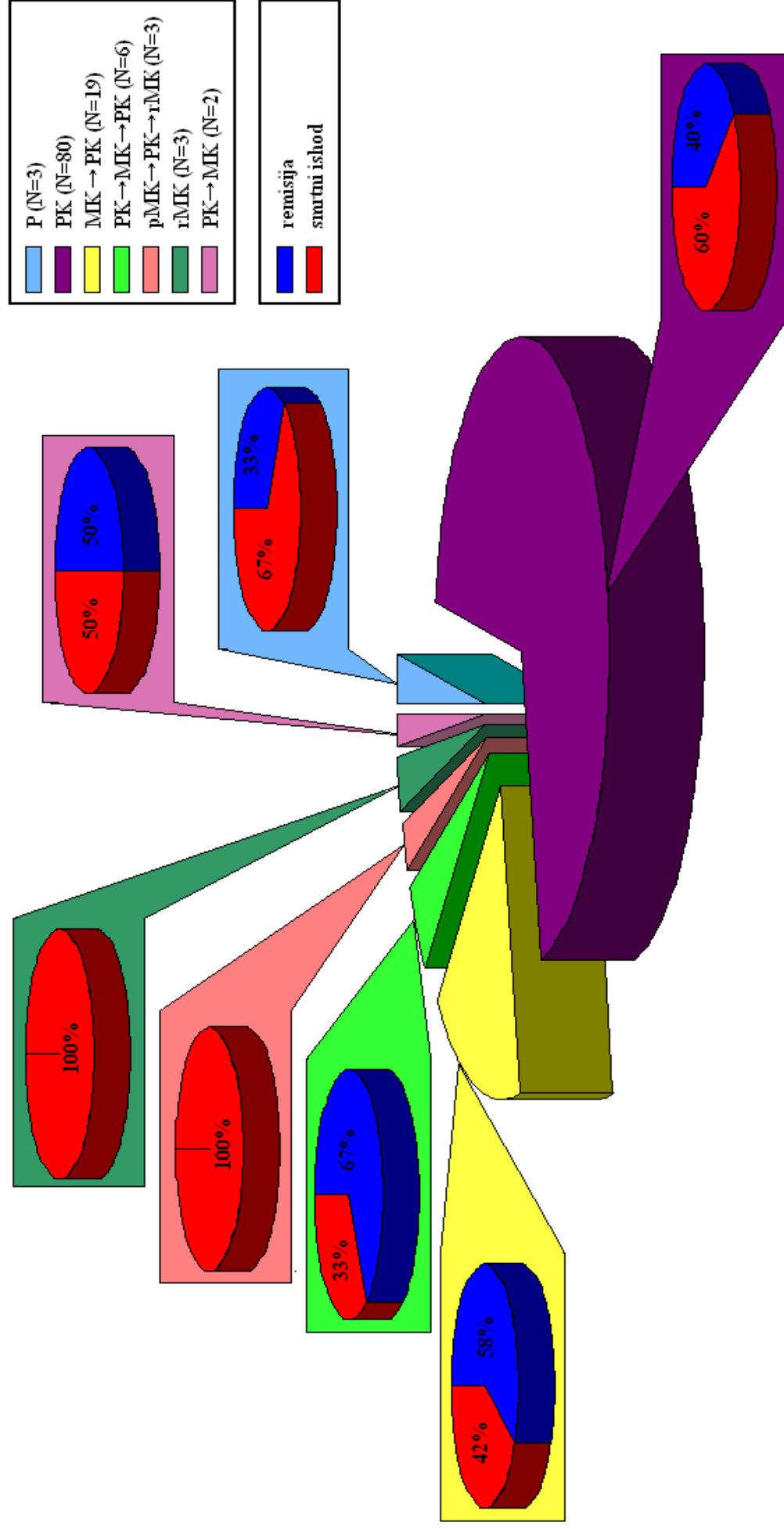
Legenda: PK - potpuni kimerizam; MK - miješani kimerizam; P - ispitanici kod kojih su uočeni samo aleli primatelja; pMK - padajući miješani kimerizam; rMK - rastući miješani kimerizam

Slika 16. Raspodjela ispitanika (N=120) prema udjelu alela primatelja i davatelja u uzorku ispitanika nakon HSCT

Najveći broj ispitanika (66,7%) je prilikom svake analize pokazivao potpuni kimerizam, odnosno prisustvo samo alela davatelja u uzorku nakon HSCT. U skupini ispitanika kod kojih je uočen miješani kimerizam nakon transplantacije (27,5%), za 3/4 ispitanika udio stanica primatelja u uzorku se s vremenom smanjivao. Uglavnom je bila riječ o ispitanicima kod kojih je miješani kimerizam bio prisutan u razdoblju netom nakon transplantacije te su svi s vremenom dosegli puni kimerizam (N=18). Za sedam ispitanika je, nakon početnog punog kimerizma

nakon transplantacije, prilikom narednih analiza uzorka utvrđeno prisustvo alela primatelja. Kao i kod prethodne skupine ispitanika, i u ovim slučajevima taj se udio alela primatelja s vremenom smanjivao sve dok ih više nije bilo moguće odrediti, odnosno do statusa punog kimerizma. Slijedeće dvije podskupine ispitanika kod kojih je uočen miješani kimerizam pokazivale su povećanje udjela alela primatelja u uzorku ispitanika nakon transplantacije. Kod pet ispitanika je, nakon razdoblja tijekom kojeg su pokazivali status PK-a, došlo do ponovne pojave alela primatelja, za četiri ispitanika je taj udio s vremenom rastao, dok se kod jedne ispitanice tijekom vremena nije značajno mijenjao. Preostala tri ispitanika nisu niti u jednom trenutku dosegla stanje PK-a, već su aleli primatelja bili prisutni tijekom čitavog razdoblja praćenja ispitanika i u većem udjelu prilikom svake naredne analize. Naposljetku, kod tri ispitanika je došlo do neprihvatanja presatka, odnosno niti u jednom trenutku nije bilo moguće utvrditi prisustvo alela davatelja u uzorku periferne krvi ispitanika nakon transplantacije.

Na slici 17 prikazan je klinički status ispitanika s obzirom na kimerizam. U skupinama ispitanika s najvećim udjelom smrtnog ishoda nalazili su se ispitanici kod kojih su, bilo odmah nakon transplantacije, bilo nakon početnog perioda pri kojem je uspostavljen puni kimerizam, uočene stanice primatelja i to s udjelom koji je rastao s vremenom (rMK). Nakon njih, po nepovoljnom ishodu transplantacije, slijede ispitanici kod kojih niti u jednom trenutku nisu uočene stanice davatelja, odnosno kod kojih nije došlo do prihvatanja presatka. Od tri takve osobe, dvije, s dijagnozom kronične i akutne limfatičke leukemije su preminule, dok je jedna osoba koja je bolovala od aplastične anemije u remisiji. U skupini ispitanika kod kojih su od samog početka praćenja statusa kimerizma uočeni samo aleli davatelja, 40% ispitanika je u remisiji.



Legenda: P - ispitanici kod kojih su uočeni samo aleli primatelja; PK - potpuni kimerizam; MK - miješani kimerizam; pMK - padajući miješani kimerizam; rMK - rastući miješani kimerizam

Slika 17. Raspodjela kliničkog statusa ispitanika ovisno o statusu kimerizma

Uzroci smrti kod preostalih 60% ispitanika kretali su se od posljedica teških oblika reakcije presatka protiv primatelja do infekcije. Kod dva ispitanika su nakon početnog stanja PK-a uočene stanice primatelja, no u jednom slučaju se radilo o rastućem miješanom kimerizmu i ispitaniku koji je preminuo, dok je u drugom slučaju riječ bila o stabilnom miješanom kimerizmu pronađenom u bolesnice s CML-om te dobrim kliničkim statusom. Naposljetku, dvije skupine ispitanika s povoljnijim ishodom transplantacije tvorili su ispitanici koji su postigli status punog kimerizma nakon početnog perioda tijekom kojeg su uočene stanice primatelje i to s udjelima koji su se s vremenom smanjivali, odnosno ispitanici kod kojih su se stanice primatelja pojavile prolazno i s malim udjelom tijekom praćenja kimerizma.

Rastući miješani kimerizam pokazao se kao najgori prognostički faktor za ishod transplantacije budući je smrtni ishod bio uočen kod svih 7 ispitanika kod kojih je bio prisutan. Raspodjela tih ispitanika prema dijagnozama, dobi, podudarnosti po spolu s davateljem kao i ukupno preživljavanje prikazano je u tablici 15.

Tablica 15. Osobine ispitanika s nalazom rastućeg miješanog kimerizma (N=7)

<i>Ispitanik</i>	<i>Dijagnoza</i>	<i>Dob (ispitanik/davatelj)</i>	<i>Spol (ispitanik/davatelj)</i>	<i>Preživljavanje (mj)</i>
0865451	ALL	43/36	M/M*	2
0648261	ALL	6/4	Ž/M*	12
2424101	OMS	50/44	M/Ž*	2
0588431	MDS	11/17	M/Ž*	11
0821283	AML	6/5	M/Ž*	7
9969966	ALL	36/44	M/M**	6
0534922	CML	20/51	Ž/Ž**	24

*Legenda: AML - akutna mijeloična leukemija; ALL - akutna limfocitna leukemija; CML - kronična mijeloična leukemija; OMS - osteomijeloskleroza; MDS - mijelodisplastični sindrom; M - muškarac; Ž - žena; * - davatelj brat ili sestra; ** - davatelj nesrodna osoba iz Svjetskog registra dobrovoljnih davatelja koštane srži*

Iz tablice je vidljivo kako su među ispitanicima bile čak tri osobe s dijagnozom ALL, ali i da su bile zastupljene sve česte bolesti uočene u skupini ispitanika s izuzetkom AA i non-Hodgkinovog limfoma. Također, u ovoj skupini su se nalazili i parovi primatelj-davatelj koji su se podudarali po spolu te dobi, kao i osobe kojima je davatelj bio različitog spola, odnosno kod kojih je postojala znatna razlika s obzirom na dob.

4.3. ANALIZA RAZNOLIKOSTI MIKROSATELITA HLA

4.3.1. RASPODJELA ALELA NA MIKROSATELITSKIM LOKUSIMA HLA

Uzorci 150 zdravih, nesrodnih ispitanika analizirani su za 13 mikrosatelita smještenih unutar regije HLA (D6S291, D6S1014, D6S273, STR_MICA, D6S2793, MIB, D6S2927, D6S2939, D6S265 i D6S510, TNFa, TNFb i TNFd) kako bi se dobio bolji uvid u genetsku sliku hrvatske populacije. Rezultati ove analize prikazani su u tablicama 16, 17, 18 i 19..

Analiza raznolikosti alela na lokusima D6S291, D6S1014, D6S273 (tablica 17) pokazala je da se u sva tri slučaja radi o mikrosatelitima s razmjerno velikim brojem alela, od kojih je jedan alel uvijek predominantan. Tako je na lokusu D6S291 u najvećem broju slučajeva (37,3%) bio uočen alel D6S291-202pb, na lokusu D6S1014 je alel D6S1014-134pb bio prisutan s najvećom zastupljenošću (40,3%) i konačno, na lokusu D6S273 je alel D6S273-132pb bio

Tablica 16. Raspodjela alela na mikrosatelitima D6S291, D6S1014, D6S273 i STR_MICA u uzorku hrvatske populacije (N=150)

D6S291		D6S1014		D6S273		STR_MICA	
<i>Alel</i>	<i>Učestalost (%)</i>	<i>Alel</i>	<i>Učestalost (%)</i>	<i>Alel</i>	<i>Učestalost (%)</i>	<i>Alel</i>	<i>Učestalost (%)</i>
200pb	21,0	125pb	14,3	126pb	3,3	4	18,0
202pb	37,3	128pb	-	128pb	3,0	5	11,7
204pb	15,0	131pb	1,0	130pb	17,0	5.1	25,3
206pb	6,7	134pb	40,3	132pb	40,3	6	25,7
208pb	4,0	137pb	22,3	134pb	26,7	9	19,3
210pb	12,3	140pb	16,7	136pb	4,3		
212pb	3,7	143pb	4,3	138pb	5,3		
		146pb	1,0				

prisutan u 40,3% slučajeva. S druge strane, lokus STR-MICA je, premda s manjim brojem uočenih alela, pokazao puno ujednačeniju raspodjelu 5 alela s neznatno većom učestalošću alela STR_MICA-5.1 (25,3%) i STR_MICA-6 (25,7%).

Analizom mikrosatelita MIB otkriven je najveći broj alela (n=19) među svim mikrosatelitima HLA testiranim u ovom istraživanju. Ovaj je lokus također pokazao i jednu od najujednačenijih raspodjela alela, sa samo jednim alelom (MIB-346pb) koji je imao učestalost veću od 10% te s jednim alelom (MIB-320pb) s učestalošću manjom od 1%. S druge strane, na lokusu D6S2793 uočena su dva alela s frekvencijom većom od 10% (CA15 i CA17) te jedan s učestalošću većom od 20% (CA14) (tablica 17).

Tablica 18. Raspodjela alela na mikrosatelitima D6S2793 i MIB u uzorku hrvatske populacije (N=150)

D6S2793				MIB			
<i>Alel</i>	<i>Učestalost (%)</i>	<i>Alel</i>	<i>Učestalost (%)</i>	<i>Alel</i>	<i>Učestalost (%)</i>	<i>Alel</i>	<i>Učestalost (%)</i>
CA14	22,0	CA24	4,7	320pb	0,7	340pb	8,3
CA15	15,3	CA25	9,0	322pb	1,0	342pb	7,3
CA16	—	CA26	7,3	324pb	5,3	344pb	6,7
CA17	12,3	CA27	0,3	326pb	8,7	346pb	10,7
CA18	5,0	CA28	0,3	328pb	3,0	348pb	8,7
CA19	1,3			330pb	5,3	350pb	3,3
CA20	4,3			332pb	6,7	352pb	1,7
CA21	7,7			334pb	8,3	354pb	1,7
CA22	5,0			336pb	7,0	356pb	1,7
CA23	5,3			338pb	4,0		

Sličnost u raspodjeli alela na lokusima D6S2927 i D6S265 očituje se u tome da je između šest alela lokusa D6S2927, odnosno sedam alela lokusa D6S265, po jedan alel pokazao učestalost veću od 35% (aleli D6S2927-217pb i D6S265-126pb). Međutim, raspodjela preostalih alela na ovim lokusima je različita. Naime, dok je raspodjela alela na lokusu D6S2927 razmjerno pravilno opadala kako se broj ponavljanja osnovnog slijeda povećavao, odnosno smanjivao s obzirom na broj ponavljanja najčešćeg alela, raspodjela alela na lokusu D6S265 nije pokazala takav pravilan obrazac (tablica 18).

Tablica 18. Raspodjela alela na mikrosatelitima D6S2927, D6S2939, D6S265 i D6S510 u uzorku hrvatske populacije (N=150)

D6S2927		D6S2939		D6S265		D6S510	
<i>Alel</i>	<i>Učestalost (%)</i>	<i>Alel</i>	<i>Učestalost (%)</i>	<i>Alel</i>	<i>Učestalost (%)</i>	<i>Alel</i>	<i>Učestalost (%)</i>
213pb	7,3	124pb	0,3	122pb	7,7	176pb	1,3
217pb	35,3	128pb	7,3	124pb	2,7	178pb	28,9
221pb	21,3	132pb	37,0	126pb	35,3	180pb	—
225pb	22,3	136pb	0,3	128pb	9,0	182pb	0,9
229pb	12,3	140pb	0,7	130pb	27,7	184pb	—
233pb	1,3	144pb	0,3	132pb	16,0	186pb	13,4
		148pb	0,7	134pb	1,7	188pb	7,8
		152pb	—			190pb	3,9
		156pb	22,7			192pb	24,1
		160pb	17,3			194pb	3,9
		164pb	6,3			196pb	15,9
		168pb	4,3			198pb	—
		172pb	2,7			200pb	—
						202pb	—
						204pb	—

Analiza 13 alela pronađenih na lokusu D6S2939 pokazala je predominantnost tri alela: jednog alela, D6S2939-132pb, koji ima mali broj ponavljanja te dva alela s većim brojem ponavljanja (D6S2939-156pb i D6S2939-160pb). I na kraju, analiza alela na lokusu D6S510 pokazala je zastupljenost alela D6S510-178pb i D6S510-192pb veću od 20% dok su preostali aleli pokazali frekvencije manje od 15% s izuzetkom alela D6S510-196pb koji je bio zastupljen s 15,9% (tablica 18).

Raspodjela alela na 3 mikrosatelita smještena unutar regije TNF prikazana je u tablici 19. Lokus TNFa pokazao je najveću raznolikost s 12 uočenih alela čije su se učestalosti kretale od 0,7% do 23,7%. Na lokusu TNFa do danas je poznato 14 alela, od kojih samo aleli TNFa8 i TNFa12 nisu uočeni među našim ispitanicima. Nasuprot tome, lokusi TNFb i TNFd pokazali su znatno manju raznolikost sa sedam uočenih alela. Također, na ova dva lokusa otkrivena je izrazita predominantnost jednog alela, na lokusu TNFb dominantan je bio alel TNFb4 (46,7%), a na lokusu TNFd alel TNFd4 (57,0%).

Tablica 19. Raspodjela alela na mikrosatelitima TNFa, TNFb i TNFd u uzorku hrvatske populacije (N=150)

TNFa				TNFb		TNFd	
<i>Alel</i>	<i>Učestalost (%)</i>	<i>Alel</i>	<i>Učestalost (%)</i>	<i>Alel</i>	<i>Učestalost (%)</i>	<i>Alel</i>	<i>Učestalost (%)</i>
a1	0,7	a8	—	b1	14,0	d1	2,3
a2	16,7	a9	4,0	b2	3,0	d2	5,7
a3	1,7	a10	23,7	b3	13,0	d3	2,3
a4	5,3	a11	11,3	b4	46,7	d4	57,0
a5	8,3	a12	—	b5	21,0	d5	21,3
a6	13,0	a13	6,3	b6	1,0	d6	9,3
a7	8,7	a14	0,3	b7	1,3	d7	2,0

4.3.2. ANALIZA NERAVNOTEŽE UDRUŽIVANJA IZMEĐU MIKROSATELITA HLA I LOKUSA HLA

Naredni cilj ovog istraživanja bio je utvrditi vrijednost neravnoteže udruživanja između mikrosatelita HLA i gena HLA. Takvo istraživanje potrebno je provesti kako bi se analiza mikrosatelita HLA mogla iskoristiti za odabir najpodudarnijeg davatelja u slučajevima kada bolesnik nema genotipski HLA identičnog davatelja u obitelji, već mu davatelj može biti samo nesrodna osoba iz Svjetskog registra dobrovoljnih davatelja koštane srži (BMDW). Naime, poznavanje vrijednosti neravnoteže udruživanja između alela pojedinog mikrosatelita i alela lokusa HLA omogućilo bi bolje određivanje haplotipova HLA i samim time otkrivanje onih davatelja koji su s bolesnikom identični ne samo za gene HLA razreda I i II, već i za čitav haplotip HLA. Također, ova analiza je neophodna budući je jedan od ciljeva ovog istraživanja bio utvrditi i da li neki od ispitivanih mikrosatelita pokazuje povezanost s ishodom transplantacije. Naime, na taj način bi se, ukoliko određeni mikrosatelit pokaže utjecaj na preživljavanje bolesnika nakon HSCT, moglo isključiti da je ta povezanost posljedica neravnoteže udruživanja s genom HLA. S obzirom da se većina mikrosatelita testiranih u ovom istraživanju nalazi u blizini lokusa HLA-B, a preostali su previše udaljeni od drugih lokusa HLA razreda I ili II, vrijednost LD-a te statistička značajnost izračunate su samo za haplotipske veze lokusa HLA-B i mikrosatelita smještenih u blizini ovog lokusa HLA (tablice 20 i 21). U tablicama su prikazani rezultati za sve haplotipske veze kod kojih je vrijednost LD-a bila veća od 0,3 neovisno o tome da li je vrijednost P bila statistički značajna za pojedinu haplotipsku vezu ili ne.

Iz rezultata vidimo da između lokusa HLA-B i mikrosatelita D6S2927 postoji vrlo snažna neravnoteža udruživanja. Haplotipska veza koja je pokazala najveću vrijednost LD-a je HLA-B*51/D6S2927-2 (LD=2,2; P=0,0002), dok su čak tri haplotipske veze između HLA-B i mikrosatelita STR_MICA pokazale LD>2,0 i P<0,01. Najčešće veze bile su HLA-

B*07/STR_MICA-A5.1 i HLA-B*51/STR_MICA-A6 (6.11%); navedene veze također su pokazale i najvišu vrijednost LD-a

Tablica 20. Analiza haplotipskih veza između lokusa HLA-B i mikrosatelita D6S2927, STR_MICA i D5S2793 u hrvatskoj populaciji (N=150)

HLA-B*	D6S2927	STR_MICA	D6S2793
07	4 ^{a***}	5.1 ^{b****}	CA17 ^{a****}
08	3 ^{a****}	5.1 ^{c**}	CA24 ^{d****}
13	4 ^{d***}	5.1 ^{d**}	CA18 ^{d****}
14	4 ^d	6 ^c	CA14 ^{c****}
15	2 ^{c*}	5 ^{a****}	—
18	3 ^{a****}	4 ^{a****}	CA25 ^{d**} , CA26 ^d
27	1 ^{c****}	4 ^{a****}	CA14 ^{c****}
35	5 ^{a****}	5c, 9c ^{**}	CA21 ^{d*}
37	1 ^{d*}	—	—
38	4 ^{c****}	9 ^{a****}	CA25 ^{d*} , CA26 ^{d****}
39	4 ^{d*}	9 ^{c**}	CA15 ^{d**}
41	2 ^{d*}	—	—
44	2 ^{a**}	5.1 ^{c*} , 6 ^{c**}	CA15 ^d , CA18 ^{d**}
49	—	6 ^d	CA22 ^d
50	—	6 ^d	CA14 ^{d**}
51	2 ^{b****}	6 ^{a****}	CA15 ^{d*} , CA20 ^d
57	—	9 ^{d**}	—
58	—	9 ^{d*}	—
61	1 ^{d****}	5 ^{d**}	—

Legenda: LD – neravnoteža udruživanja;

a - LD=0,3–0,5; b - LD=0,5–1,0; c - LD=1,0–2,0; d - LD >2,0

* - P < 0.05; ** - P < 0.01; *** - P < 0.001; **** - P < 0.0001

(LD=2,2, odnosno LD=1,8). Niti jedna od haplotipskih veza HLA-B/D6S2793 nije dosegla vrijednost LD-a veću od 2,0 no istovremeno je pet veza pokazalo izrazito visoko statistički značajne vrijednosti LD-a ($P < 0,0001$).

Analizom povezanosti lokusa HLA-B i mikrosatelita TNFb uočeno je kako je statistički

Tablica 21. Analiza haplotipskih veza između lokusa HLA-B i mikrosatelita TNFa, TNFb i TNFd u hrvatskoj populaciji (N=150)

HLA-B*	TNFa	TNFb	TNFd
07	a11 ^{a****}	—	—
08	a2 ^{a****}	b3 ^{b***}	d2 ^{b****}
13	a7 ^{b****}	—	—
14	a2 ^{b**}	b1 ^{b*}	—
15	a2 ^{b*}	b1 ^{b*}	—
18	a10 ^{a****}	—	d4 ^{a*}
27	a6 ^{a****}	—	—
35	a5 ^{b*}	—	d7 ^{c**}
37	a9 ^{c****}	—	d3 ^{c****}
38	a10 ^{a****}	—	—
39	a13 ^{b****}	—	d6 ^{c*}
41	a7 ^{c**}	—	—
44	a4 ^{b****}	b4 ^{b*}	—
50	a5 ^{b***}	b7 ^{c***}	—
51	a3 ^{c**}	—	d5 ^{a*}
57	a2 ^{c*}	—	—
61	a10 ^{c*}	b3 ^{c*}	—

Legenda: LD – neravnoteža udruživanja;

a - LD=0,3–0,5; b - LD=0,5–1,0; c - LD=1,0–2,0; d - LD > 2,0;

** - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,001$; **** - $P < 0,0001$*

najznačajnija povezanost prisutna između HLA-B*50 i alela TNFb7 ($P < 0,001$). U slučaju mikrosatelita TNFa, haplotipska veza HLA-B*18/TNFa10 bila je najzastupljenija (5,3%) te je pokazala i statistički značajno visoku vrijednost LD-a ($LD=1,7$; $P < 0,0001$). U konačnici, među haplotipskim vezama HLA-B/TNFd navedenim u tablici 20, najvišu vrijednost P pokazale su kombinacije HLA-B*08 i TNFd2 te HLA-B*37 i TNFd3 ($P < 0,0001$).

Uz analizu haplotipskih veza lokusa HLA-B i mikrosatelita HLA, provedena je i analiza neravnoteže udruživanja između mikrosatelita smještenih unutar regije TNF. Rezultati su

Tablica 22. Analiza haplotipskih veza dva lokusa između mikrosatelita TNF (TNFa, TNFb, TNFd) u hrvatskoj populaciji (N=150)

TNFa/ TNFb	LD	P	TNFb/ TNFd	LD	P	TNFa/ TNFd	LD	P
a1/b4	0.2	NZ	b1/d5	2.7	0.0008	a2/d2	3.2	<0.0001
a2/b1	3.7	<0.0001	b2/d5	0.6	NZ	a2/d5	1.3	NZ
a2/b3	2.7	0.0099	b3/d2	2.7	<0.0001	a3/d5	0.5	NZ
a3/b1	0.6	NZ	b4/d1	1.0	0.0459	a4/d1	0.3	NZ
a3/b5	0.2	NZ	b4/d3	0.3	NZ	a5/d4	0.2	NZ
a4/b6	0.4	0.0107	b4/d4	2.5	NZ	a6/d4	0.4	NZ
a5/b5	0.6	NZ	b4/d6	0.8	NZ	a9/d3	0.9	NZ
a5/b6	0.3	NZ	b5/d6	0.3	NZ	a10/d4	2.3	NZ
a5/b7	0.5	NZ	b6/d6	0.2	NZ	a13/d6	1.8	<0.0001
a7/b1	0.8	NZ	b7/d4	0.3	NZ			
a9/b4	0.5	NZ						
a10/b4	2.3	NZ						
a11/b4	2.3	NZ						
a13/b4	1.1	NZ						

Legenda: LD – neravnoteža udruživanja; NZ – vrijednost P nije statistički značajna

prikazani u tablici 22. Najčešća haplotipska veza TNFa/TNFb bila je TNFa10/TNFb4 (12,0%; LD=2,3), dok je najjača povezanost pronađena za kombinaciju TNFa2/TNFb1 (LD=3,7; $P<0,00001$). Između 10 haplotipskih veza TNFb/TNFd najčešća je bila TNFb4/TNFd4 (23,2%; LD=2,5; $P>0,05$), a najviša vrijednost LD-a primjećena je za kombinaciju TNFb1/TNFd5 (LD=2,7; $P=0,0008$). Naposljetku, najjača povezanost između mikrosatelita TNFa i TNFd uočena je za vezu TNFa2/TNFd2 (LD=3,2; $P<0,0001$).

Osim analize haplotipskih veza dva lokusa, napravljena je i analiza povezanosti sva tri mikrosatelita TNF (tablica 23). Najvišu vrijednost LD-a pokazala je haplotipska veza TNFa10/TNFb4/TNFd4 (LD=3,36; $P=0,001$) koja je također bila i najčešća (8,52%). S druge strane, najznačajnija vrijednost P uočena je za vezu TNFa2/TNFb3/TNFd2 ($P<0,0001$).

Tablica 23. Analiza haplotipskih veza tri lokusa između mikrosatelita TNF (TNFa, TNFb, TNFd) u hrvatskoj populaciji (N=150)

TNFa/TNFb/TNFd	LD	P	TNFa/TNFb/TNFd	LD	P
a2/b1/d4	1,0	NZ	a6/b5/d5	0,6	NZ
a2/b3/d2	2,8	<0,0001	a7/b1/d5	1,0	0,0115
a2/b5/d2	0,3	NZ	a7/b4/d1	0,3	NZ
a3/b1/d4	0,2	NZ	a7/b5/d4	0,3	NZ
a3/b1/d5	0,2	NZ	a10/b4/d4	3,4	0,0010
a4/b4/d1	0,3	NZ	a11/b4/d4	2,3	0,0022
a5/b5/d4	0,4	NZ	a11/b4/d6	0,4	NZ
a5/b5/d6	0,3	NZ	a13/b3/d5	0,3	NZ
a5/b7/d4	0,5	NZ	a13/b4/d6	1,3	0,0005
a6/b4/d1	0,5	NZ	a13/b5/d6	0,4	NZ
a6/b5/d4	1,2	0,0257			

Legenda: LD – neravnoteža udruživanja; NZ – vrijednost P nije statistički značajna

4.4. ANALIZA UTJECAJA PODUDARNOSTI ZA MIKROSATELITE HLA NA ISHOD HSCT

Podaci o dobi, spolu, dijagnozi i kliničkom statusu ispitanika koji su primili presađak od nesrodnog davatelja (N=15) ili jednog od roditelja (N=5) prikazani su u tablici 24.

Tablica 24. Podaci o spolu, dobi, dijagnozi i kliničkom statusu ispitanika koji su primili presađak od nesrodnog davatelja ili roditelja (N=20)

Ispitanik	Spol (P/D)	Dob (P/D)	Dijagnoza	aGvHD (I-II)	aGvHD (III-IV)	Preživljavanje (mjeseci)	Status
1	M/M	36/44	ALL	+	-	6	† (ponovna pojava bolesti)
2	Ž/M	18/44	MF	-	+	2	†
3	Ž/Ž	20/53	CML	-	-	24	† (ponovna pojava bolesti)
4	M/M	17/29	NHL	-	+	35	† (ponovna pojava bolesti)
5	M/M	22/24	ALL	-	+	3	†
6	Ž/Ž	26/28	CML	-	+	3	†
7	M/M	11/42	ALL	-	+	3	†
8	M/M	8/35	CML	-	-	113	remisija
9	Ž/Ž	19/26	NHL	-	-	1	†
10	M/M	22/37	MDS	-	+	2	†
11	M/Ž	33/42	ALL	-	+	3	†
12	M/Ž	6/25	ALL	-	+	1	†
13	M/M	31/40	ALL	-	-	1	† (infekcija)
14	M/M	5/47	ALL	+	-	30	remisija
15	Ž/M	3/49	CML	-	+	33	remisija
16*	Ž/Ž	21/43	ALL	-	-	5	† (infekcija)
17*	M/Ž	2/29	AML	-	+	1	†
18*	Ž/Ž	17/40	AA	-	-	21	†
19*	Ž/Ž	7/32	AA	-	+	64	remisija
20*	Ž/Ž	13/46	ALL	-	-	5	† (ponovna pojava bolesti)

Legenda: P – primatelj; D – davatelj; aGvHD – akutni GvHD; M - muškarac; Ž - žena; AML - akutna mijeloična leukemija; ALL - akutna limfocitna leukemija; CML - kronična mijeloična leukemija; NHL - non-Hodgkinov limfom; AA - aplastična anemija; MDS - mijelodisplastični sindrom; MF – mijelofibroza; † - smrtni ishod; * - ispitanici koji su primili presađak od roditelja

Kako bi se ispitao utjecaj podudarnosti za mikrosatelite HLA na pojavu akutnog GvHD-a, ponovna pojava bolesti, odbacivanje transplantata te sveukupno preživljenje ispitanika nakon HSCT, provedena je analiza 13 mikrosatelita HLA u skupini od 20 ispitanika kao i među njihovim davateljima. Rezultati ove analize prikazani su u tablici 25.

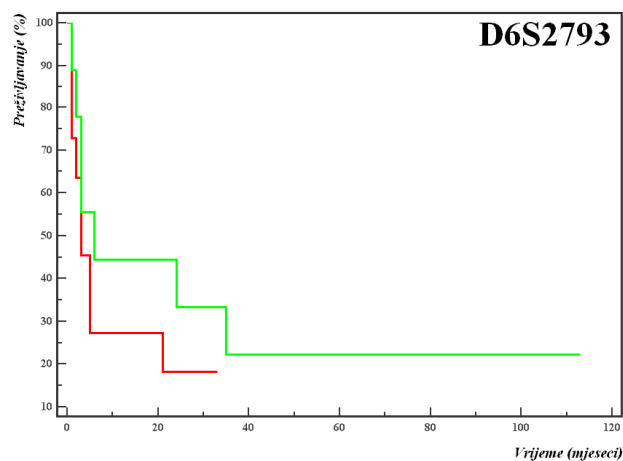
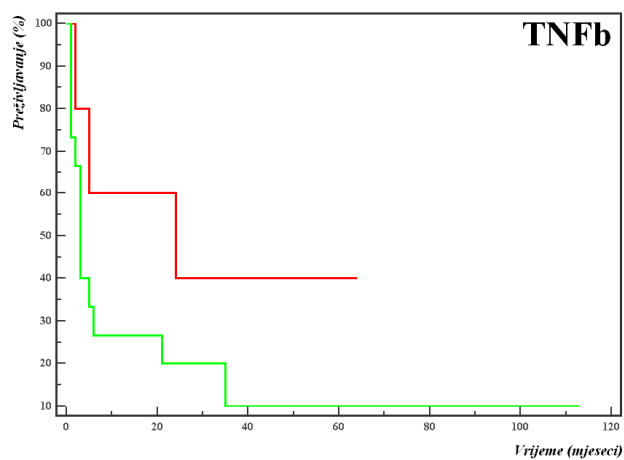
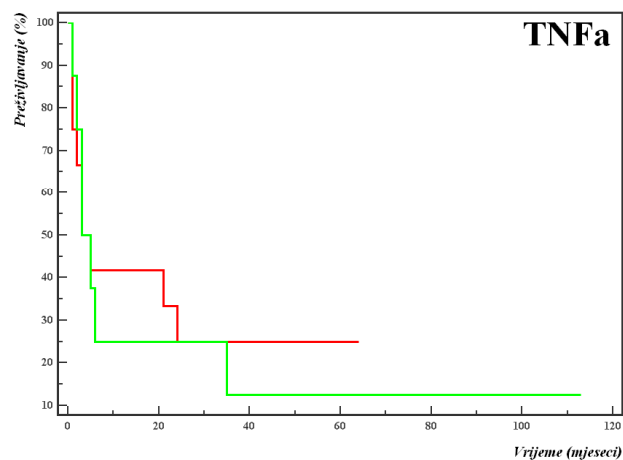
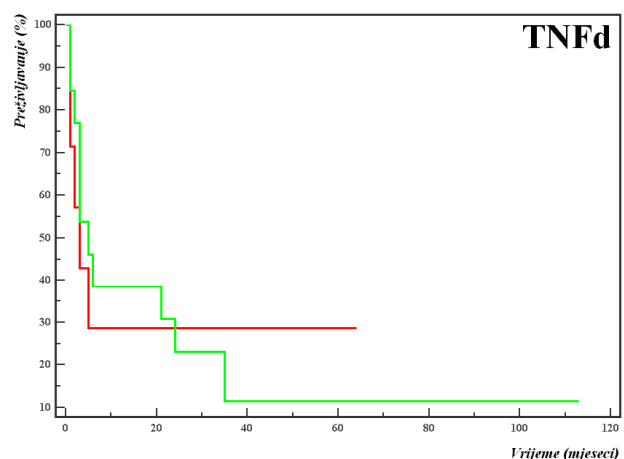
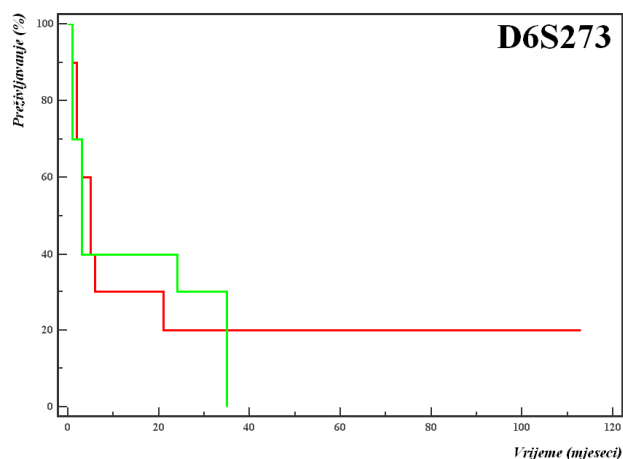
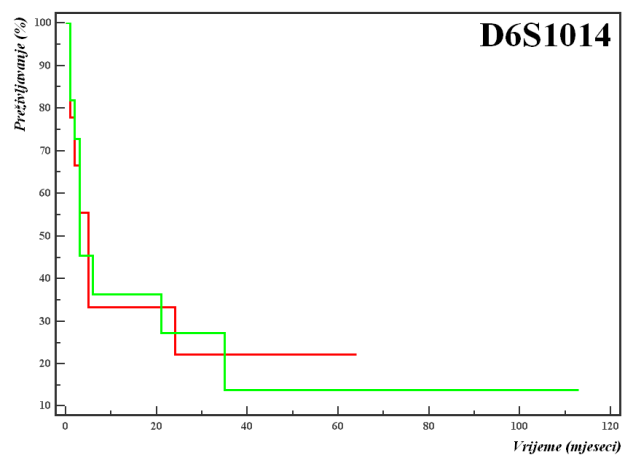
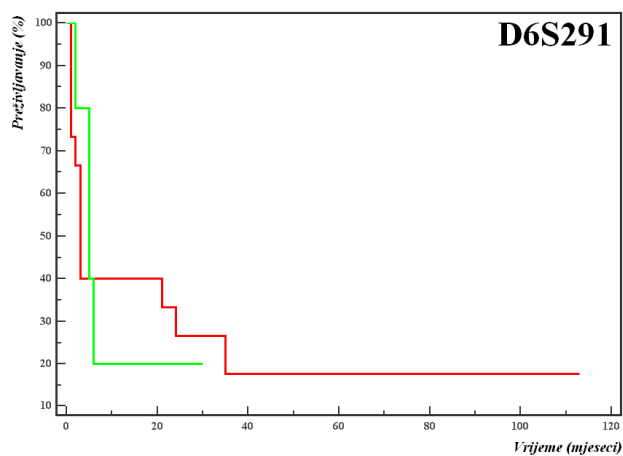
Tablica 25. Analiza podudarnosti primatelja i davatelja za 13 mikrosatelita HLA (D6S291, D6S1014, D6S273, TNFd, TNFa, TNFb, D6S2793, STR_MICA, MIB, D6S2927, D6S2939, D6S265 i D6S510) u skupini od 20 ispitanika

Lokus	Bolesnici																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
D6S291																				
D6S1014																				
D6S273																				
TNFd																				
TNFa																				
TNFb																				
D6S2793																				
STR_MICA																				
MIB																				
D6S2927																				
D6S2939																				
D6S265																				
D6S510																				

Legenda: Ispitanici 1-15 → davatelj nesrodna osoba; ispitanici 16-20 → davatelj roditelj

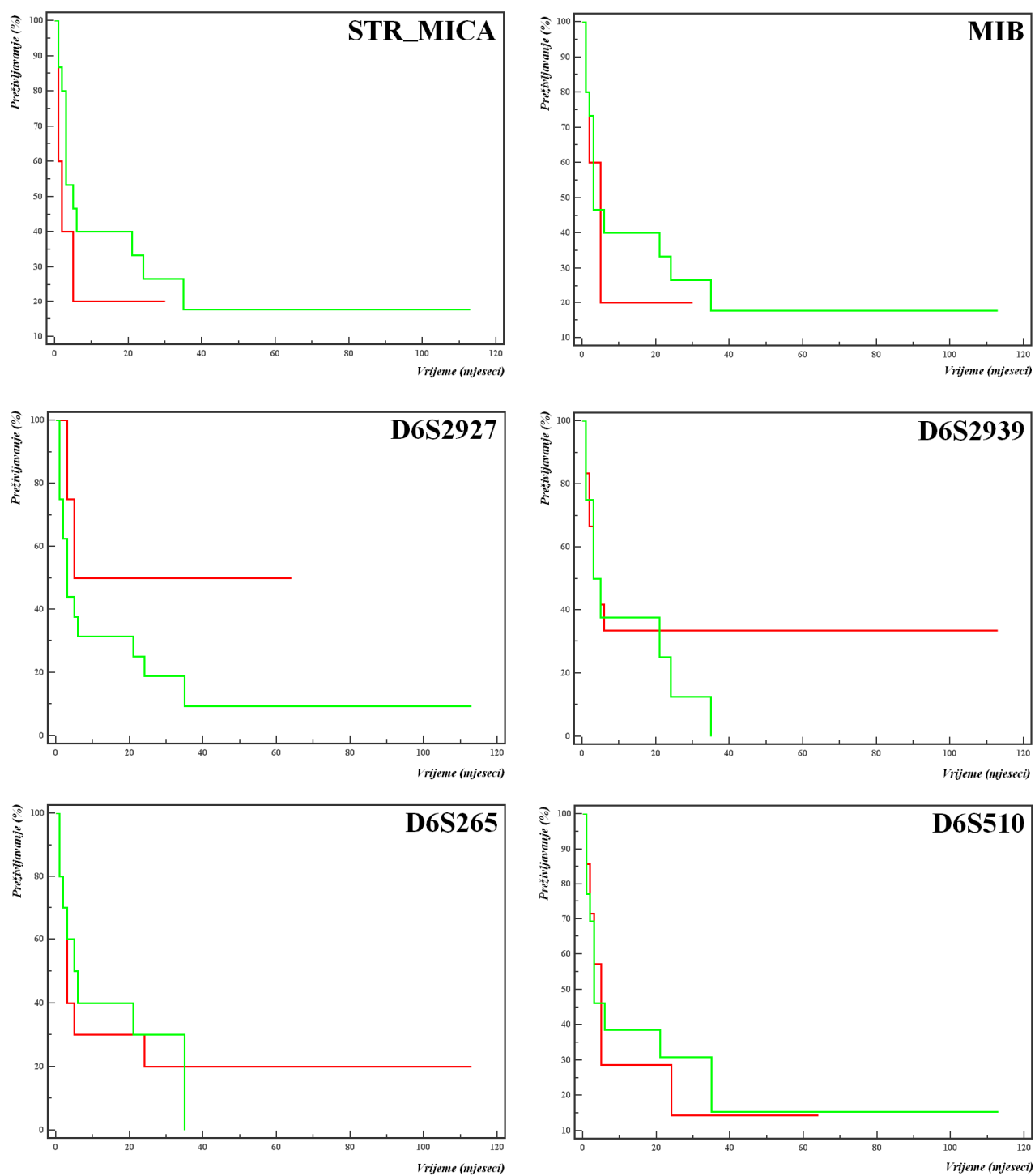
- primatelj i davatelj su identični za analizirani lokus
- primatelj i davatelj nisu identični za analizirani lokus

Utjecaj podudarnosti para primatelj-davatelj za pojedini mikrosatelit HLA prikazan je na slikama 18 i 19. Niti za jedan od 13 ispitivanih mikrosatelita nije pronađena statistički značajna razlika u preživljavanju ispitanika između skupine primatelja koji su za analizirani mikrosatelit bili identični sa svojim davateljem i primatelja kod kojih je uočena razlika u alelima mikrosatelita u odnosu na davatelja.



Legenda:
— ispitanik podudaran s davateljem za mikrosatelit HLA
— ispitanik nepodudaran s davateljem za mikrosatelit HLA

Slika 18. Preživljavanje ispitanika nakon HSCT (N=20) s obzirom na podudarnost primatelja i davatelja za mikrosatelite HLA (D6S291, D6S1014, D6S273, TNFd, TNFa, TNFb, D6S2793)

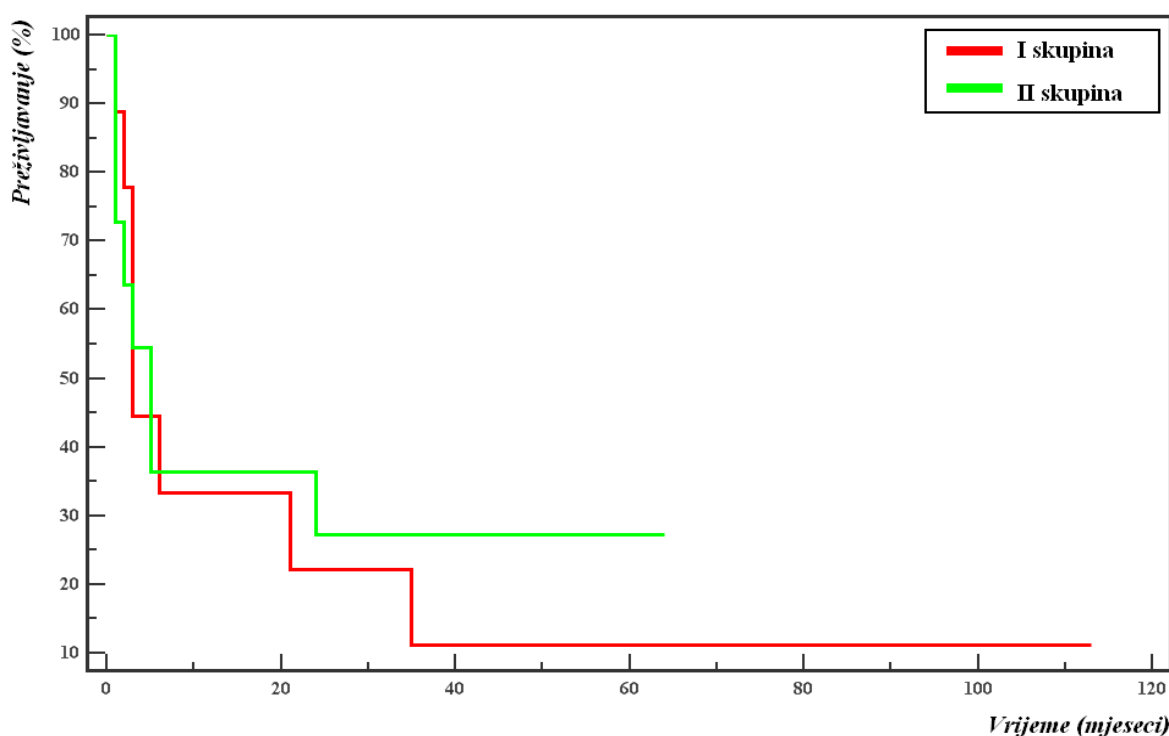


Legenda:

- ispitanik podudaran s davateljem za mikrosatelit HLA
- ispitanik nepodudaran s davateljem za mikrosatelit HLA

Slika 19. Preživljavanje ispitanika nakon HSCT (N=20) s obzirom na podudarnost primatelja i davatelja za mikrosatelite HLA (STR_MICA, MIB, D6S2927, D6S2939, D6S265 i D6S510)

Nadalje, ispitanici su bili podijeljeni u dvije skupine s obzirom na broj mikrosatelita kod kojih je uočena nepodudarnost para primatelj-davatelj: skupina I kod koje je nepodudarnost uočena u najviše pet mikrosatelita HLA, te skupina II u koju su bili uključeni ispitanici koji su se od svojih davatelja razlikovali za šest ili više mikrosatelita HLA. Rezultati ove analize prikazani su na slici 20. Razlika u preživljavanju između ove dvije skupine ispitanika nije bila statistički značajna.

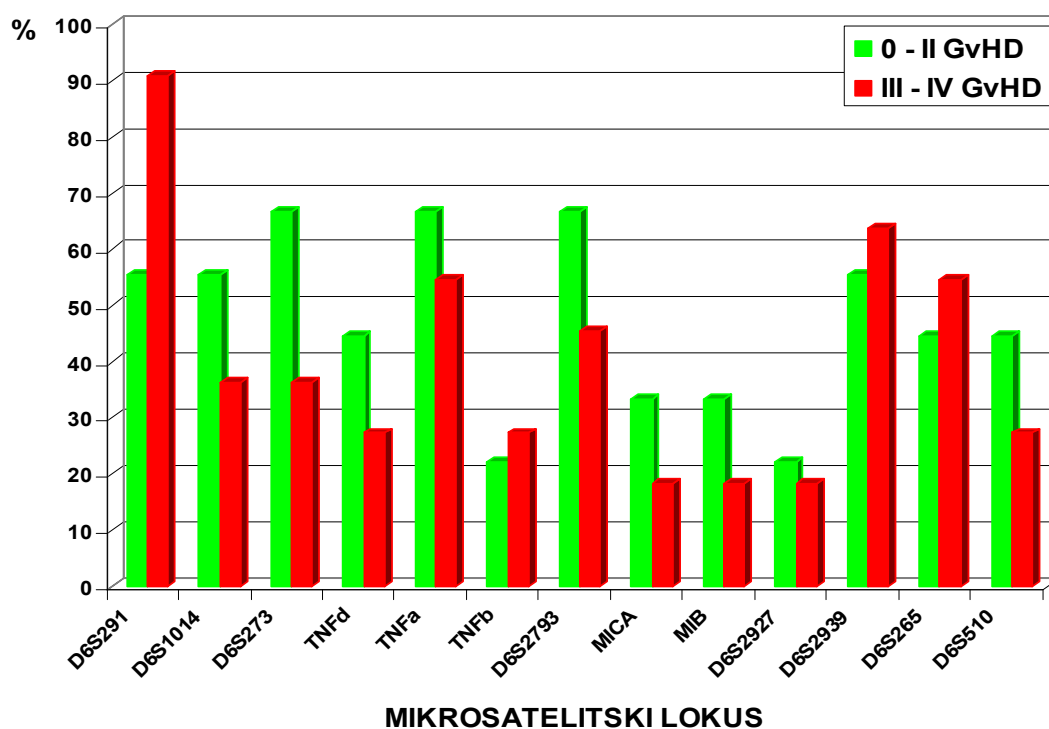


Legenda: I skupina – ispitanici koji se od svog davatelja razlikuju za najviše 5 mikrosatelita; II skupina – ispitanici koji se od davatelja razlikuju za 6-13 mikrosatelita

Slika 20. Preživljavanje ispitanika nakon HSCT (N=20) s obzirom na broj mikrosatelita HLA za koje se razlikuju par primatelj-davatelj

Povezanost podudarnosti za ispitivane mikrosatelite HLA također je analizirana s obzirom na pojavu i težinu akutnog GvHD-a. U skupini od 20 ispitanika, kod devet osoba nisu primijećeni znakovi akutnog GvHD-a ili je on bio blažeg oblika (I i II stupanj), dok je 11 ispitanika razvilo teški oblik akutnog GvHD-a (III i IV stupanj). Usporedba te dvije skupine

ispitanika nije otkrila statistički značajne razlike u pojavi i težini akutnog GvHD-a obzirom na podudarnost između primatelja i davatelja za niti jedan od ispitivanih mikrosatelita HLA (slika 21). Lokusi D6S291 i D6S273 bili su jedini mikrosateliti kod kojih je primijećena izrazitija razlika između dvije skupine ispitanika. Nepodudarnost para primatelj-davatelj za lokus D6S291 bila je prisutna kod čak 90,9% ispitanika s teškim oblikom GvHD-a naspram 55,6% bolesnika koji su razvili blaži oblik GvHD-a. S druge strane, nepodudarnost za lokus D6S273 je češće bila prisutna kod ispitanika kod kojih nije došlo do razvoja GvHD-a ili je on bio blažeg oblika (66,7%) u usporedbi s ispitanicima koji su razvili GvHD III ili IV stupnja (36,7%). Također, nije uočena statistički značajna razlika u pojavi i težini akutnog GvHD-a kod ispitanika koji su imali manji broj nepodudarnosti (0-5) za mikrosatelite HLA u usporedbi s ispitanicima koji su se od svojih davatelja razlikovali za 6-13 mikrosatelita HLA.

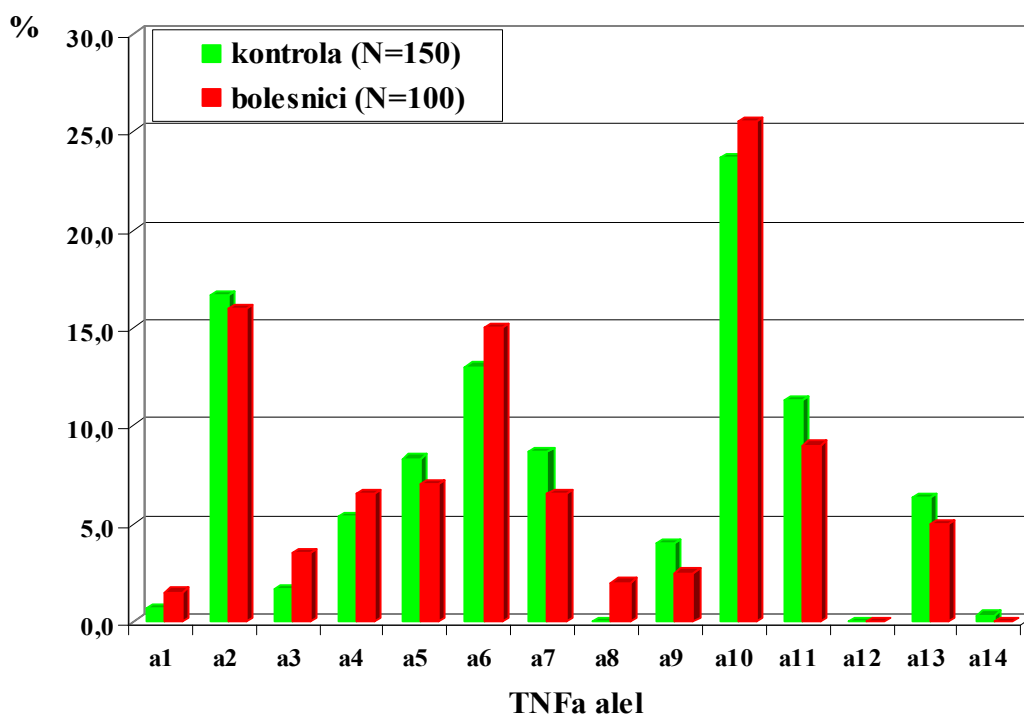


Legenda: 0-I – skupina ispitanika koja ili nije pokazivala znakove akutnog GvHD-a ili je on bio blažeg oblika (I i II stupanj); III-IV – skupina ispitanika koja je razvila teški oblik akutnog GvHD-a (III i IV stupanj)

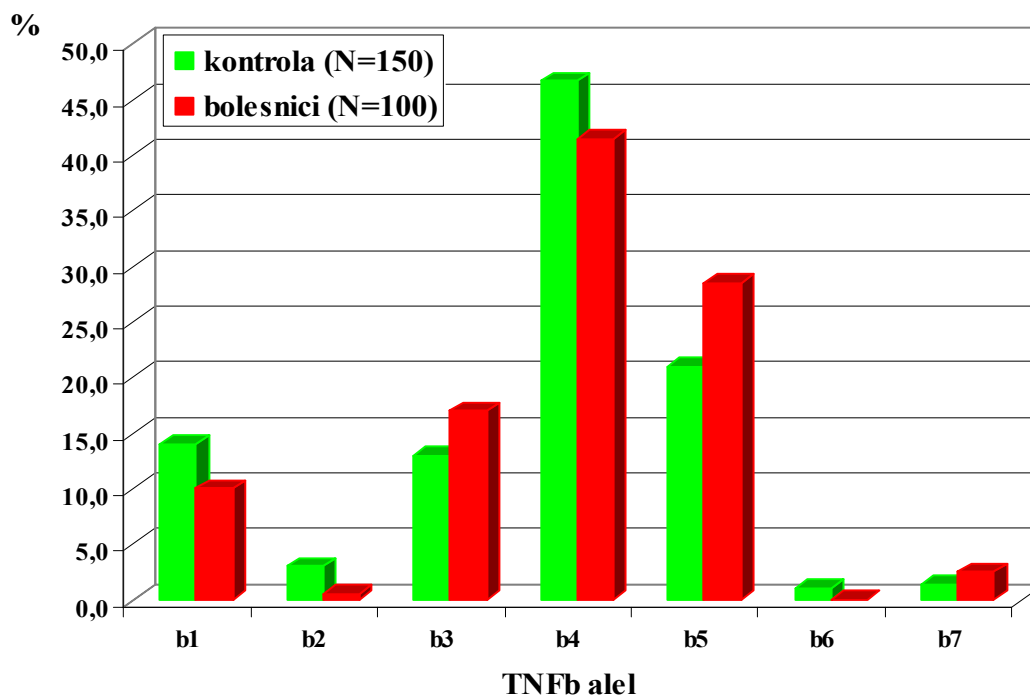
Slika 21. Pojava i težina akutnog GvHD-a kod ispitanika koji su se razlikovali od svog davatelja za alele mikrosatelita HLA

4.5. ANALIZA UTJECAJA MIKROSATELITA UNUTAR REGIJE TNF NA ISHOD HSCT

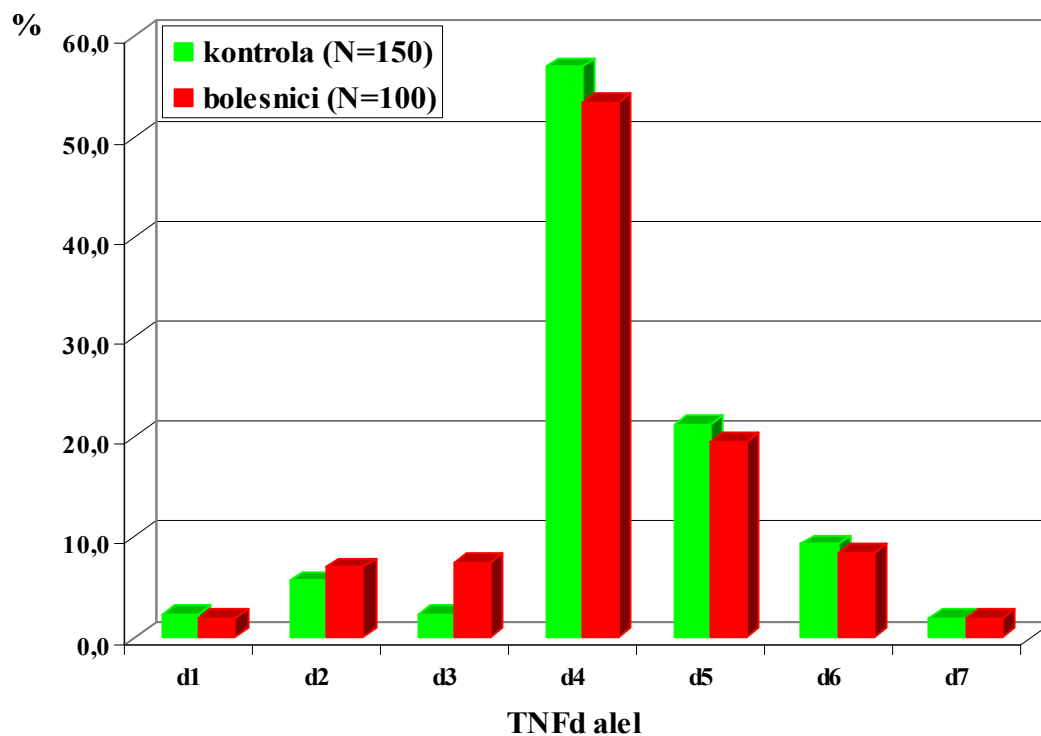
U svrhu ispitivanja povezanosti mikrosatelita smještenih unutar regije TNF na ishod HSCT, prvo je provedena analiza tri lokusa (TNFa, TNFb i TNFd) u skupini od 100 ispitanika koji su primili presadak od genotipski HLA identičnog brata ili sestre. Usporedba raspodjele učestalosti alela na lokusima TNFa, TNFb i TNFd između zdrave kontrole i skupine ispitanika prikazana je na slikama 22, 23 i 24. Jedina razlika uočena između dvije populacije je veća zastupljenost alela TNFa8 i TNFd3 među ispitanicima, no ta razlika gubi statističku značajnost nakon korekcije vrijednosti P.



Slika 22. Raspodjela alela na mikrosatelitu TNFa u kontrolnoj skupini (N=150) i među ispitanicima s genotipski HLA identičnim davateljem (N=100)



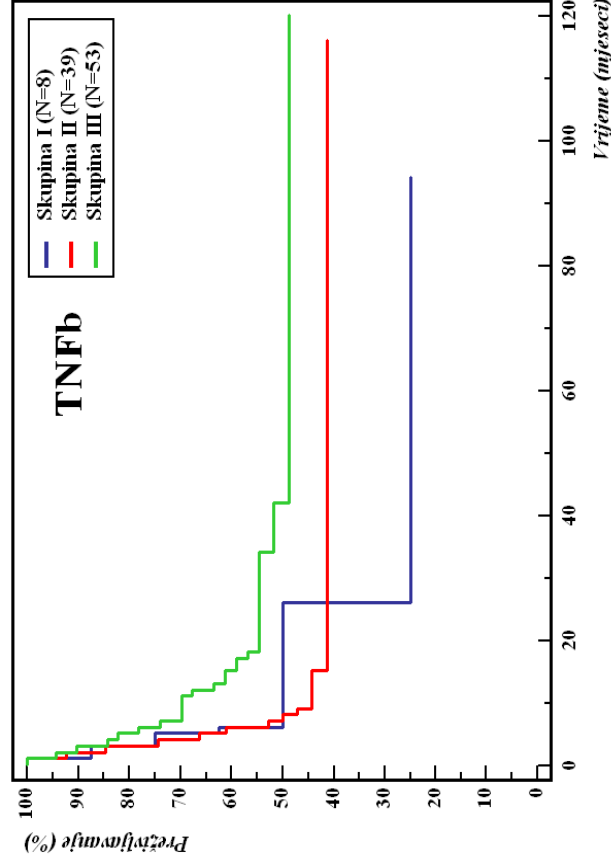
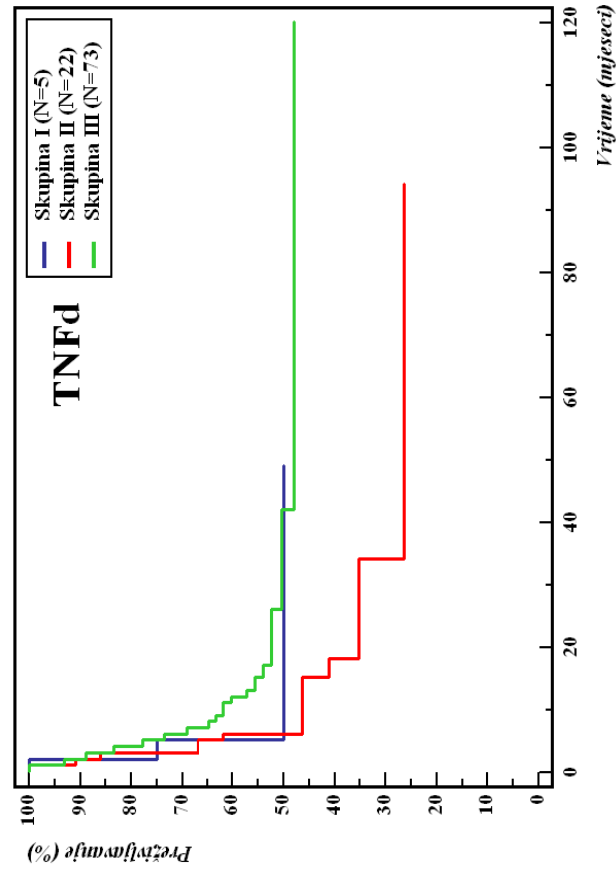
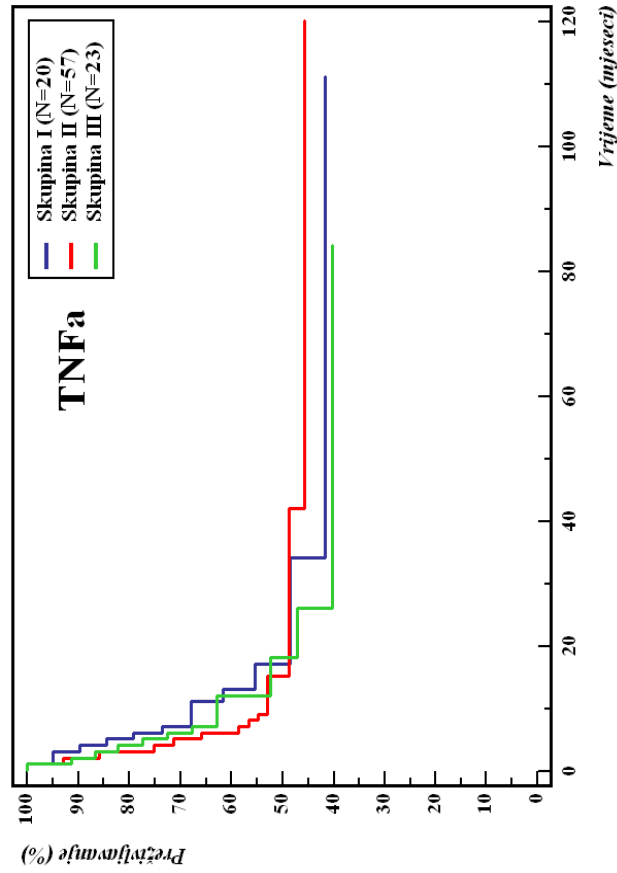
Slika 23. Raspodjela alela na mikrosatelitu TNFb u kontrolnoj skupini (N=150) i među ispitanicima s genotipski HLA identičnim davateljem (N=100)



Slika 24. Raspodjela alela na mikrosatelitu TNFd u kontrolnoj skupini (N=150) i među ispitanicima s genotipski HLA identičnim davateljem (N=100)

Skupina ispitanika zatim je bila podijeljena na tri grupe s obzirom na dužinu alela prisutnog na TNFa, TNFb i TNFd lokusu. Osobe koje su na lokusu TNFa imale alele TNFa1-TNFa6 pridružene su skupini I, ukoliko su imale alele TNFa7-TNFa13 uključene su u skupinu III, a skupinu II sačinjavale su osobe koje su imale i alel s malim brojem ponavljanja i alel s velikim brojem ponavljanja. Podjela je na isti način učinjena i za lokuse TNFb i TNFd. Aleli s malim brojem ponavljanja na lokusu TNFb su bili TNFb1-TNFb3, dok su u skupinu alela s velikim brojem ponavljanja bili uključeni aleli TNFb4-TNFb7. Konačno, između sedam alela otkrivenih na lokusu TNFd, prva tri alela (TNFd1-TNFd3) pridružena su skupini s malim brojem ponavljanja, dok su preostala četiri alela (TNFd4-TNFd7) bila svrstana među alele s velikim brojem ponavljanja. Tri skupine ispitanika bile su uspoređene s obzirom na preživljavanje (slika 25). Statistički značajna razlika u preživljavanju nije bila pronađena niti za jedan lokus. Za lokus TNFa vjerojatnosti preživljavanja bile su gotovo identične za sve tri skupine ispitanika. Analiza lokusa TNFb i TNFd otkrila je nešto veće razlike između ispitivanih skupina. Bolji ishod transplantacije uočen je među osobama koje su imale oba ili barem jedan alel s velikim brojem ponavljanja na lokusu TNFb. Rezultati analize lokusa TNFd upućivali su da najlošije izgleda imaju ispitanici iz skupine s po jednim alelom s malim i jednim alelom s velikim brojem ponavljanja.

Naposljetku, provedena je i usporedba preživljavanja ispitanika i s obzirom na prisutnost pojedinačnih alela na lokusima mikrosatelita TNF. Iz rezultata ove analize izdvojena su tri alela koja su pokazala utjecaj na ishod transplantacije: TNFa8, TNFa10 i TNFd6 (slika 26). Ispitanici kod kojih je bio prisutan alel TNFa8 (4%) imali su izrazito lošiju vjerojatnost preživljavanja u usporedbi s ispitanicima kod kojih ovaj alel nije pronađen ($P < 0,0001$). Nasuprot tomu, značajno povoljniji ishod HSCT ($P = 0,0220$) uočen je kod ispitanika pozitivnih za alel TNFa10 (45%) u odnosu na bolesnike negativne za taj alel. Premda razlika u preživljavanju ispitanika pozitivnih za alel TNFd6 u usporedbi s ostalim ispitanicima nije dosegla statistički značajnu vrijednost P , treba spomeniti da je prisutnost TNFd6 bila povezana s nepovoljnijim ishodom HSCT.



Legenda:

Skupina I - ispitanici koji imaju oba alela s malim brojem ponavljanja;

Skupina II - ispitanici koji imaju jedan alel s malim brojem ponavljanja
i jedan alel s velikim brojem ponavljanja;

Skupina III - ispitanici koji imaju oba alela s velikim brojem ponavljanja;

Aleli s malim brojem ponavljanja: TNFa1-TNFa6

TNFb1-TNFb3

TNFd1-TNFd3

Aleli s velikim brojem ponavljanja: TNFa7-TNFa13

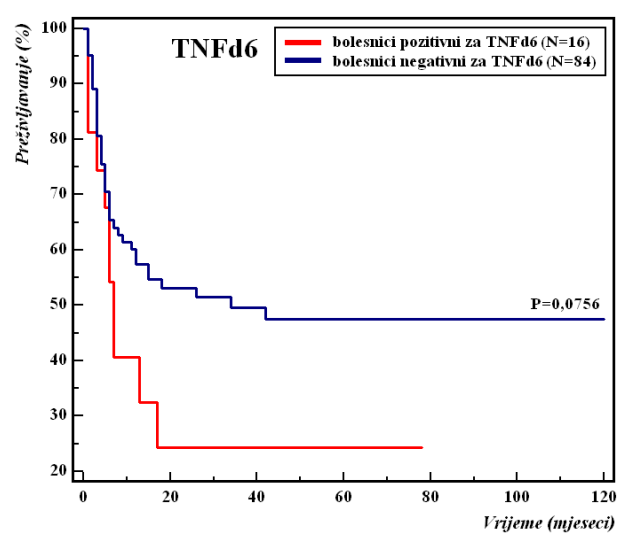
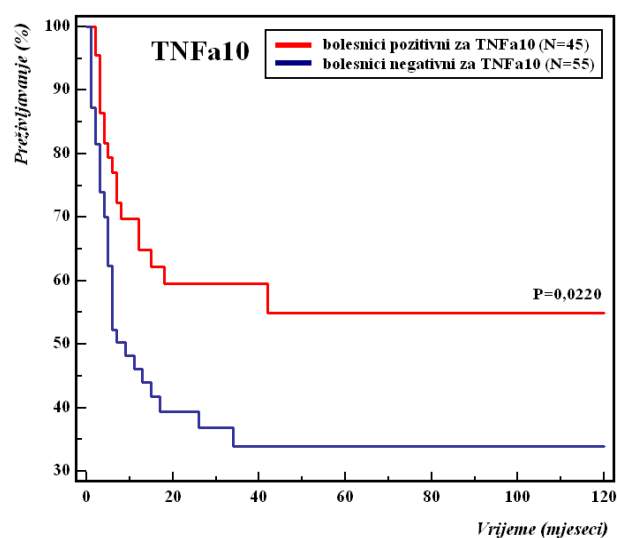
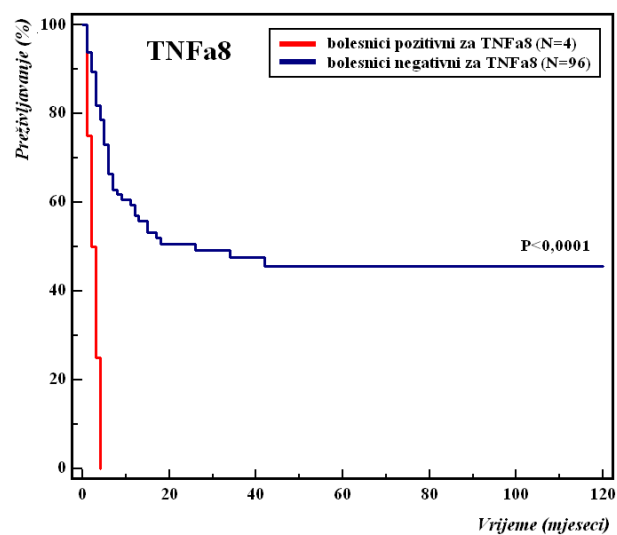
TNFb4-TNFb7

TNFd4-TNFd7

Slika 25. Preživljavanje ispitanika s genotipski HLA

identičnim davateljem (N=100) s obzirom na veličinu alela na

mikrosatelitima TNFa, TNFb i TNFd



Slika 26. Preživljavanje ispitanika s genotipski HLA identičnim davateljem (N=100) s obzirom na prisutnost alela TNFa8, TNFa10 i TNFd6

5. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je ispitati na koji način se analiza mikrosatelita može primjeniti u poboljšanju ishoda HSCT. Kako bi takva analiza uopće bila moguća, kao preduvjet bilo je neophodno provesti istraživanje među zdravim ispitanicima unutar populacije kojoj pripadaju i ispitanici s HSCT. Takvim pristupom dobiva se uvid u osobine pojedinog lokusa, prvenstveno njegovu raznovrsnost, te se procjenjuje opravdanost njegove primjene u svim daljnjim postupcima. Iz navedenog razloga ovo istraživanje obuhvaćalo je dva područja: populacijska ispitivanja mikrosatelita u hrvatskoj populaciji te važnost analize mikrosatelita u odabiru davatelja prije transplantacije kao i praćenje ispitanika nakon HSCT.

Lokusi uključeni u ovo istraživanje bili su podijeljeni u dvije skupine s obzirom na to da li je mogućnost njihove primjene bila ispitivana u okvirima praćenja ispitanika nakon HSCT ili u analizama utjecaja podudarnosti primatelja i davatelja hematopoetskih matičnih stanica za mikrosatelite na ishod transplantacije. Prvu skupinu, lokuse non-HLA, sačinjavali su: TH01, VWFA31, FES/FPS, F13A01, SE33, D1S80, D12S391, D18S535 i D22S683 dok su drugu skupinu mikrosatelita HLA sačinjavali: D6S291, D6S1014, D6S273, STR_MICA, D6S2793, MIB, D6S2927, D6S2939, D6S265 i D6S510, TNFa, TNFb i TNFd. Raznovrsnost lokusa, odnosno raspodjela alela, ispitivana je za obje skupine lokusa, no dok je za prvu skupinu analiza prvenstveno bila provedena kako bi se procijenila informativnost pojedinog lokusa, kod istraživanja mikrosatelita HLA naglasak je stavljen na utvrđivanje odnosa između mikrosatelita HLA i gena HLA, neravnotežu udruživanja i njihovu ulogu u boljem preživljavanju ispitanika nakon HSCT.

Populacijsko istraživanje raznovrsnosti 9 mikrosatelita i jednog minisatelita koji su smješteni izvan regije HLA provedeno je na uzorku od 150 zdravih, nesrodnih ispitanika. Ovakvo istraživanje neophodno je prije njihove moguće primjene u praćenju ispitanika nakon transplantacije ili u bilo kojem drugom slučaju kada se određivanjem alela mikrosatelita pokušava razlučiti podrijetlo stanica dviju ili više različitih osoba. Osnovna osobina koja se uzima u obzir jest njegova informativnost. Kao mjerilo informativnosti određenog lokusa koristi

se vrijednost PIC na koju utječu broj alela te postotak heterozigotnosti. Što je broj alela veći i što su njihove učestalosti ujednačenije čime se osigurava i veći udio heterozigota za ispitivani lokus u populaciji, to će i njegova vrijednost PIC, odnosno razina njegove informativnosti biti viša (26).

Analiza 10 lokusa non-HLA uključenih u ovo istraživanje pokazala je da se broj alela pronađenih na pojedinom lokusu kreće u rasponu od 7 alela koliko ih je uočeno za mikrosatelite TH01 i FES/FPS do 21 alela koji su pronađeni na lokusu SE33, a srednja vrijednost broja alela iznosila je 12,8 za 10 ispitivanih lokusa. Usporedba dijela naših rezultata s drugim populacijama bila je moguća zahvaljujući postojanju baze podataka «DNA PCR Datenbank» (58). Naime, navedena baza podataka objavljene rezultate populacijskih istraživanja za lokuse TH01, VWFA31, FES/FPS, F13A01, SE33 i D1S80 u više od 200 europskih i svjetskih populacija. Usporedbom raspodjele alela na analiziranim lokusima s rezultatima dobivenima za druge populacije ustanovljeno je da se hrvatska populacija ne razlikuje značajno od dosad istraživanih europskih populacija. Razlike se u najvećem broju slučajeva odnose na odsutnost alela s izrazito malim, odnosno velikim brojem ponavljanja koji su u drugim populacijama pronađeni s vrlo malom učestalošću. Tako npr. na lokusu TH01 kod nas nije bio uočen jedino alel TH01-11 od dosad u literaturi opisanih alela. Među ispitivanim populacijama, ovaj alel je samo u Španjolskoj i Italiji uočen s frekvencijom od 2,5% (59, 60). U svim drugim europskim populacijama pojavljivao se u manje od 1,0% ispitanika. Isti rezultati uočeni su i za druge populacije u svijetu s izuzetkom Indije gdje je alel TH01-11 pronađen u 5,5% stanovnika (61). Aleli VWFA31-11 i VWFA31-21 koji nisu uočeni među hrvatskim ispitanicima analizom lokusa VWFA31, i u svim drugim europskim populacijama pronađeni su s učestalošću manjom od 1,0%. Alel VWFA31-11 se sa sličnom frekvencijom pojavljivao i u ostalim svjetskim populacijama, dok je alel VWFA31-21 s nešto višom učestalošću od 1,0% primjećen u populacijama središnje Afrike (62). Analiza lokusa FES/FPS u našoj populaciji nije otkrila osobe koje su posjedovale alele FES/FPS-7 i FES/FPS-8. Dok je alel FES/FPS-7 bio ili odsutan ili prisutan s učestalošću manjom od 0,5%

u drugim europskim populacijama (Mađarska, Poljska, Portugal, Španjolska), alel FES/FPS-8 pojavljivao se u približno 1,0% osoba, osim u Poljskoj gdje je pronađen kod približno 2,0% stanovništva (63-66). Oba alela značajnije su prisutna među stanovnicima Afrike, alel FES/FPS-7 s najvećom zastupljenošću (3,9%) u populaciji otoka Sao Tome i Principe, dok su se učestalosti alela FES/FPS-8 kretale u rasponu od 10,3% koliko je uočeno među Afroamerikancima do 17,4% u populaciji Kameruna (67, 68). Jedini aleli na lokusu F13A01 koji su opisani u literaturi, a nisu u ovom istraživanju uočeni u hrvatskoj populaciji, su aleli F13A01-10 i F13A01-17. Ovi aleli primjećeni su u više od 1,0% stanovnika jedino u Maroku i Indoneziji, ali ne i u Evropi (69, 70). Aleli s najmanjim brojem ponavljanja na lokusu SE33 (aleli SE33-12 i SE33-12.2) nisu pronađeni u Hrvatskoj, no i u ostalim zemljama njihova zastupljenost bila je manja od 1,0%. Izuzetak su populacije Mađarske, Poljske i Turske gdje se učestalost alela SE33-12 kretala približno 1,5%, dok je za alel SE33-12.2 izuzetak Španjolska s učestalošću ovog alela od 1,4% (71-74). Analiza lokusa D1S80 u hrvatskoj populaciji nije otkrila alele s manjim brojem ponavljanja od alela D1S80-16 i većim brojem ponavljanja od alela D1S80-30. Aleli manji od alela D1S80-15, ukoliko su i bili uočeni, u niti jednoj od dosad istraženih populacija nisu bili zastupljeni u više od 0,5% osim u Kolumbiji (1,2%), dok je alel D1S80-15, premda jednako slabo zastupljen u Evropi, pokazao nešto veću učestalost ($\approx 2,8\%$) među stanovništvom Bliskog Istoka, Indije i Kine (75-77). Od alela s velikim brojem ponavljanja, koji nisu otkriveni u hrvatskoj populaciji, jedino je alel D1S80-31 bio prisutan u rasponu od 1,0% do 10,0% u velikoj većini europskih, ali i svjetskih populacija. Ovo je i jedina izrazita razlika između hrvatske populacije i drugih, dosad istraživanih populacija. Međutim, budući se radi o jedinom minisatelitskom lokusu uključenom u ovo istraživanje s ponavljajućom jedinicom od 16pb, ova razlika je najvjerojatnije posljedica neusuglašenosti nazivlja kao jednog od osnovnih problema u usporedbi rezultata dobivenih analizom lokusa s ponavljajućim sljedovima DNK u različitim populacijama. Konačno, analizom lokusa D1S1656, D12S391, D18S535 i D22S683 nije otkriven niti jedan alel koji dosad nije bio uočen u drugim populacijama i obrnuto, postojanje

svih dosad poznatih alela na ovim mikrosatelitima potvrđeno je i među hrvatskim ispitanicima (55, 78-82).

Analiza raspodjele alela na ispitivanim lokusima ukazala je na ujednačenu zastupljenost alela za sve lokuse osim lokusa FES/FPS i D18S535. Jedino su kod ova dva lokusa uočeni aleli koji su se u našoj populaciji pojavljivali sa zastupljenošću većom od 30%. Kao što je već rečeno, usporedba rezultata naše populacije i drugih europskih populacija s obzirom na raspodjelu alela nije pokazala značajnije razlike. Štoviše, ne samo da razlika nije bila uočena za najučestalije alele koji su bili zajednički hrvatskim ispitanicima i ispitanicima iz drugih europskih populacija, već je i raspodjela ostalih alela bila bez većih odstupanja.

Udio heterozigota je drugi ključni čimbenik za utvrđivanje informativnosti određenog lokusa. Usporedba uočene i očekivane heterozigotnosti promatranih lokusa pokazala je da se vrijednosti oba čimbenika ne razlikuju značajno te da su u slučaju svih lokusa s izuzetkom FES/FPS veće od 70%. Stoga je lokus FES/FPS kao posljedicu niske heterozigotnosti, malog broja alela te izrazite predominantnosti tri alela (aleli FES/FPS-11, FES/FPS-12 i FES/FPS-13), u konačnici pokazao i najnižu vrijednost PIC-a od 0,70. Za sve ostale lokuse vrijednost PIC bila je veća od 0,75. Najinformativnijim lokusom pokazao se mikrosatelit SE33 što je i shvatljivo obzirom na najveći broj uočenih alela na ovom mikrosatelitu te postotkom heterozigotnosti od čak 94%.

Opće prihvaćeno mišljenje je da je lokus dovoljno informativan za uključivanje u postupak praćenja kimerizma nakon HSCT ukoliko mu je postotak heterozigotnosti veći od 70% te vrijednost $PIC \geq 0,70$ (83). Rezultati ovog rada jasno pokazuju da su svi ispitivani lokusi non-HLA, uključujući i FES/FPS, zadovoljili postavljene kriterije informativnosti te da je njihova primjena u praćenju kimerizma nakon HSCT opravdana.

Nasuprot svim drugim područjima u kojima se analiza mikrosatelita upotrebljava za određivanje porijekla stanica različitih osoba (sudska medicina, antropološka istraživanja itd.) odnosno njihovo razlikovanje, analiza mikrosatelita u svrhu praćenja kimerizma nakon HSCT

postavlja još jedan dodatni zahtjev. Naime, kod odabira informativnih lokusa, potrebno je obratiti pozornost na pojavu koja je svojstvena za umnažanje mikrosatelita reakcijom PCR, tzv. «stutter» signale. Tijekom produljivanja novog lanca DNK može doći do odvajanja DNK polimeraze od lanca DNK. Prilikom spajanja nove molekule polimeraze koja će nastaviti produljivanje DNK može se stvoriti omča u lancu kalupu te na taj način, uz fragmente stvarne dužine alela koji se umnaža, u manjoj mjeri nastaju i fragmenti koji su kraći za jedno ponavljanje osnovnog slijeda. Ti ponavljajući sljedovi se prilikom analize alela vide kao signali slabijeg intenziteta fluorescencije te, ukoliko je alel specifičan za primatelja za jedno ponavljanje kraći od alela specifičnog za davatelja, mogu dovesti do lažno pozitivnog, odnosno negativnog nalaza (84).

Osim toga, za procjenu kimerizma ispitanika nakon transplantacije potrebno je provesti analizu na najmanje dva lokusa koji posjeduju alele specifične za primatelja, odnosno davatelja. Razlog zbog kojeg analizu nije dovoljno provesti na samo jednom mikrosatelitu leži u potvrđenoj činjenici da je stopa mutacije na lokusu s ponavljajućim sljedovima DNK viša nego za kodirajuće dijelove genoma. Najčešće mutacije ovih lokusa su adicije ili delecije jedne ponavljajuće jedinice. Stoga je, kao posljedica ove osobine mikrosatelita, moguće da se analizom samo jednog lokusa pogrešno odredi porijeklo stanica u uzorku ispitanika nakon transplantacije. U prilog tvrdnji kako analiza samo jednog mikrosatelita nije dovoljno pouzdana, ide i slučaj bolesnice kod koje je, u svrhu liječenja CML, provedena HSCT (85). Šest mjeseci nakon HSCT, analiza uzorka krvi bolesnice ukazala je na relaps bolesti, no također je utvrđeno i da je kod jednog od lokusa STR korištenih u svrhu određivanja kimerizma došlo do gubitka jednog od alela specifičnih za bolesnicu. Naknadno se utvrdilo da je u tumorskim stanicama došlo do gubitka dijela kromosoma 18 unutar kojeg se nalazio i ispitivani lokus. Ovaj slučaj naglašava mogućnost pogrešnog tumačenja rezultata ukoliko se praćenje kimerizma oslanja na analizu samo jednog lokusa STR. Iz tog razloga je također bolje koristiti lokuse na različitim kromosomima, a ne samo na jednom. Naime, u leukemijskim stanicama su česte promjene

strukture kromosoma (delecije, prerazmještaji itd.) te bi stoga pouzdavanje u rezultate analize mikrosatelita na samo jednom kromosomu također moglo dovesti do krivih zaključaka.

Kada su osobine izabranih mikrosatelita bile određene populacijskim istraživanjem, postavljene su osnove za daljnju analizu te se moglo pristupiti ispitivanju praćenja kimerizma u svrhu procjene funkcioniranja transplantata ili predviđanja ponovne pojave bolesti. Iz tog razloga provedena je opetovana analiza lokusa non-HLA među 120 ispitanika nakon HSCT.

U analizi mikrosatelita među parovima primatelj-davatelj cilj je bio utvrditi da li su doista dovoljno informativni kako bi u najmanje 95% slučajeva omogućili razlikovanje primatelja i davatelja za barem dva lokusa što je pretpostavljeno na osnovu populacijskog istraživanja. Naime, rezultati istraživanja koje su proveli Ariffin i suradnici upućuju na to da je, upravo zbog dodatnih zahtjeva koje praćenje kimerizma postavlja na kriterije informativnosti pojedinog lokusa, uz populacijsko istraživanje potrebna i analiza uzoraka primatelja i davatelja prije odabira lokusa (86). Rezultati našeg istraživanja parova primatelj-davatelj jasno su pokazali usklađenost s rezultatima populacijskog istraživanja, osim za lokus D18S535, no i u njegovom slučaju informativnost lokusa bila je veća, a ne manja od očekivane. Iz tog razloga možemo reći da je analiza mikrosatelita na uzorku zdrave populacije dovoljna kako bi se proveo kvalitetan i precizan odabir lokusa prikladnih za praćenje kimerizma. Autori prije spomenutog istraživanja analizirali su lokuse koji se nalaze u dva komercijalna kita za identifikaciju osoba, između ostalog i lokuse TH01, VWFA31, FES/FPS i F13A01 (86). Premda je njihova tvrdnja kako nije opravdano u prvoj analizi testirati velik broj lokusa (9-12) koliko ih se obično nalazi u komercijalnim kitovima, potvrđena i ovim istraživanjem, potreba za dodatnim analizama nakon populacijskog istraživanja nije utemeljena kao ni mišljenje autora da je jedan lokus dovoljan za pouzdano utvrđivanje statusa kimerizma. Nedostatak ovog istraživanja vjerojatno leži u činjenici da je provedeno na uzorku od samo 33 parova primatelj-davatelj. Također postoji i neslaganje rezultata navedenog istraživanja s obzirom na utvrđenu informativnost pojedinog lokusa. Naime, premda je i u istraživanju Ariffin-a i suradnika lokus FES/FPS pokazao najmanju informativnost,

ona je bila znatno manja među našim ispitanicima (39,0% naspram 47,1%). Sličan rezultat primijećen je i za lokus F13A01 (52,0% naspram 57,9%), dok su lokusi TH01 i VWFA31 pokazali veću informativnost u istraživanju autora iz Malezije (73,0% za oba lokusa naspram 50,9% za TH01 i 62,2% za VWA31 među našim parovima primatelj-davatelj) (86). Ove razlike mogu biti posljedica nekoliko čimbenika, kao što je mali broj ispitanika u prethodno navedenom istraživanju, zatim sastav ispitivanih populacija (hrvatski ispitanici naspram ispitanika kineskog, malajskog i indijskog porijekla) te konačno činjenica da su u istraživanju Ariffin-a i suradnika prilikom opisa lokusa izostavljeni neki od alela s nepotpunim brojem ponavljanja (npr. alel TH01-9.3 i alel F13A01-3.2) koji su pokazali značajnu učestalost u svim dosad istraživanim populacijama diljem svijeta.

Kako bi se provelo ispitivanje povezanosti kimerizma s kliničkim stanjem ispitanika nakon HSCT, ispitanici su grupirani obzirom na udjele stanica primatelja i davatelja koji su bili utvrđeni analizom lokusa non-HLA tijekom praćenja. Uz tri osnovne skupine: ispitanike koji su pokazali PK, ispitanike kod kojih je u određenom periodu uočen MK te ispitanike kod kojih su pronađeni samo aleli primatelja, definirane su i podskupine ispitanika s MK ovisno o tome da li je udio primatelja rastao ili padao s vremenom. Ovaj način podjele uobičajen je za istraživanja primjene analize kimerizma u predviđanju ishoda HSCT, a poseban naglasak se u svim novijim istraživanjima stavlja upravo na točno određivanje vrste MK. Naime, smatra se da bi upravo grupiranje svih ispitanika s MK-om u jednu skupinu moglo objasniti činjenicu da su dosadašnja ispitivanja predviđajuće vrijednosti analize kimerizma kod bolesnika s akutnim leukemijama pružala proturječne rezultate. Primjer istraživanja u kojem razlikovanje ova dva tipa MK-a nije provedeno su i radovi (87, 88) u kojem autori nisu našli povećanje rizika za ponovnu pojavu bolesti među bolesnicima s akutnim leukemijama kod kojih je uočen MK u usporedbi s bolesnicima koji su pokazivali PK. Ovakav rezultat je u suprotnosti s većinom dosad objavljenih istraživanja ove tematike (23, 89-100). Prema novijim istraživanjima koja su jasnije odredila skupinu bolesnika s MK, ishod HSCT za bolesnike s tzv. padajućim MK-om ne razlikuje se

bitno od onog za bolesnike s PK-om, dok je vjerojatnost relapsa i smrtnog ishoda značajno viša za bolesnike s rastućim MK. Imajući u vidu te rezultate, moguće je da je u radovima koji nisu povezali rastući MK s relapsom bolesti, ova povezanost jednostavno bila prikrivena neprikladnom raspodjelom bolesnika. I rezultati našeg istraživanja podržavaju predviđajuću vrijednost rastućeg MK-a za ponovnu pojavu bolesti jer je upravo u skupini ispitanika kod kojih je uočen rastući MK, najnepovoljniji, smrtni ishod transplantacije bio prisutan kod svih ispitanika. Također, od sedam ispitanika ove skupine, njih čak četiri bolovala su od nekog oblika akutne leukemije, dok je samo jedna osoba imala dijagnozu CML. Ovo je potrebno naglasiti zbog prije spomenutih nesuglasica o važnosti praćenja kimerizma kod bolesnika s akutnim leukemijama te činjenice da bi upravo u slučaju akutnih leukemija kod kojih nisu određeni specifični tumorski markeri kao što je slučaj s fuzijskim genom *BCR-ABL* kod CML-a, mogućnost oslanjanja na analizu statusa kimerizma u predviđanju ponovne pojave bolesti bila od izrazite važnosti za donošenje pravovremenih odluka tijekom liječenja (25).

Premda su prednosti koje bi analiza mikrosatelita u praćenju kimerizma mogla pružiti u poboljšanju liječenja značajne, neophodno je istaknuti i ograničenja ove metode. To su prije svega osjetljivost analize koja iznosi do 1% ukoliko se ne provodi na staničnim subpopulacijama (101). Bitno je spomenuti kako je osjetljivost ove metode ovisna i o vrsti aparata koji se koristi za provođenje analize, naime aparatima novije generacije (sekvenceri koji se temelje na kapilarnoj elektroforezi) moguće je detektirati puno niže udjele alela primatelja ($\approx 1\%$). Drugim riječima, nalaz punog kimerizma treba tumačiti u okvirima metode, odnosno uzeti u obzir činjenicu kako ovim tipom analize nije moguće utvrditi prisutnost manje od 1% alela primatelja. Iz tog se razloga ova analiza ne može primjeniti za utvrđivanje minimalne ostatne bolesti, što bi također moglo objasniti i određene nedosljednosti u povezanosti statusa kimerizma s pojavom ponovne pojave bolesti. Naime, kako u našem, tako i u brojnim drugim istraživanjima, ponovna pojava bolesti je primjećena i kod osoba koje su pokazivale prisutnost samo alela davatelja (23, 92, 93). Pojedini autori su ovakve slučajeve objašnjavali prevelikim vremenskim razmakom

između analiza što je u skladu i s izrazito brzom dinamikom razvoja ponovne pojave bolesti kod akutnih leukemija (23). Drugi autori su, međutim, opovrgnuli tu tvrdnju budući su u svojim radovima opisali bolesnike kod kojih je ponovna pojava bolesti bolesti uočena samo dva mjeseca nakon posljednjeg nalaza punog kimerizma (94). Najvjerojatnije objašnjenje stoga leži u činjenici da definicija punog kimerizma primjenom analize mikrosatelita zapravo označava prisutnost $\geq 99\%$, a ne 100% stanica davatelja.

Nasuprot još uvijek neusuglašenim mišljenjima oko važnosti analize kimerizma kod akutnih leukemija, većina istraživača slaže se u tvrdnji da pojava krvotvornih stanica primatelja prethodi ponovnoj pojavi bolesti u slučajevima kada bolesnici boluju od CML-a (91, 102-105). Premda je danas određivanje fuzijskog gena *BCR-ABL* metoda izbora za određivanje minimalne ostatne bolesti, analiza kimerizma ima velik značaj pri donošenju odluka o postupcima za koje je neophodno odrediti prisutnost primateljeve hematopoeze (npr. promjena imunosupresije, infuzije limfocita davatelja) te praćenje njihovog učinka (16). Naposljetku, podijeljena mišljenja postoje vezana uz dob bolesnika kod kojih će nalaz miješanog kimerizma ukazivati na mogućnost pojave relapsa bolesti. Naime, istraživanje koje je proveo Guimond i suradnici ukazalo je na pojavu miješanog kimerizma kod djece s ponovnom pojavom bolesti, no ne i među odraslim bolesnicima kod kojih je uočena ponovna pojava bolesti (106). Autori su kao objašnjenje ovakvih rezultata ponudili činjenicu da obnova T stanične linije kod djece ovisi o timusu, dok je kod odraslih osoba ona prvenstveno ovisna o diobi perifernih stanica T. Naime, periferne stanice T su aloreaktivnije, te je pretpostavka da će se preostale normalne stanice T primatelja učinkovitije ukloniti kod odraslih bolesnika te ih stoga i neće biti moguće odrediti prilikom ponovne pojave bolesti. Rezultati našeg istraživanja ne idu u prilog ovoj tvrdnji budući su se u skupini ispitanika kod kojih je rastući MK prethodio ponovnoj pojavi bolesti bolesti nalazili i odrasli ispitanici i djeca.

Slijedeći cilj ovog rada bio je utvrditi da li je analizu 13 mikrosatelita HLA (D6S291, D6S1014, D6S273, TNFd, TNFa, TNFb, D6S2793, STR_MICA, MIB, D6S2927, D6S2939,

D6S265 i D6S510) moguće primjeniti u boljem odabiru nesrodnih HLA identičnih davatelja. Pretpostavljeno je kako bi se u tu svrhu mogao primjeniti isti pristup koji se koristi u mapiranju gena koji su odgovorni za razvoj određene bolesti. Na taj način bi se analizom mikrosatelita koji su smješteni unutar regije HLA moglo suziti područje regije HLA unutar kojeg se nalaze geni koji, osim gena HLA, također imaju utjecaj na ishod transplantacije. Drugim riječima, uz pomoć analize mikrosatelita moglo bi se utvrditi za koje je još sljedove regije HLA osim onih koji kodiraju gene HLA bitna podudarnost između primatelja i davatelja hematopoetskih matičnih stanica. Međutim, prije ispitivanja utjecaja podudarnosti primatelja i davatelja za mikrosatelite HLA na ishod HSCT, bilo je potrebno provesti njihovu analizu na uzorku zdrave populacije, odnosno definirati veze pojedinog mikrosatelita s genima HLA i odrediti snagu neravnoteže udruživanja među njima. Utvrđivanje jačine neravnoteže udruživanja između pojedinog mikrosatelita HLA i gena HLA omogućava pravilnu interpretaciju rezultata, odnosno određuje kolika je vjerojatnost da je povezanost podudarnosti primatelja i davatelja za mikrosatelit s ishodom HSCT posljedica neravnoteže udruživanja tog lokusa s genima HLA. Ta vjerojatnost će biti to veća što je i vrijednost neravnoteže udruživanja između mikrosatelita HLA i gena HLA veća. Nasuprot tomu, ukoliko se utvrdi da između mikrosatelita HLA i gena HLA ne postoji neravnoteža udruživanja ili je ona slaba, može se pretpostaviti da ili sam mikrosatelit HLA ili lokus u njegovoj neposrednoj blizini ima utjecaj na ishod HSCT.

Usporedba rezultata raspodjele alela na mikrosatelitima HLA u našoj populaciji pokazala je, slično kao i kod analize lokusa non-HLA, da se hrvatska populacija značajno ne razlikuje od drugih, dosad istraživanih, europskih populacija (107-119).

Istraživanje raznovrsnosti alela na lokusu STR_MICA pokazalo je da je u Hrvatskoj, kao i većini dosad analiziranih populacija bijele rase, najčešći aleli STR_MICA-A5.1 (25,3%) i STR_MICA-A6 (25,7%) (107-110). Među našim ispitanicima uočili smo sve dosad opisane alele osim dva nedavno otkrivena i vrlo rijetka alela: STR_MICA-A7 i STR_MICA-A10.

Analizom mikrosatelita D6S2793 među našim ispitanicima otkriveni su svi dosad opisani aleli na ovom lokusu s izuzetkom alela D6S2793-CA16 koji su primijećeni u talijanskoj i njemačkoj populaciji (109, 110). Najučestaliji aleli primijećeni na ovom mikrosatelitu (D6S2793-CA14, -CA15 i -CA17) su također najzastupljeniji u spomenutim populacijama (109, 110).

Podaci o učestalosti najzastupljenijeg alela na lokusu D6S2927 (D6S2927-217pb; 35,3%) i najrjeđeg alela (D6S2927-6; 1,3%) kao i o raspodjeli ostalih alela pokazuju sličnost s rezultatima istraživanja ovog lokusa u Njemačkoj (110).

Lokus TNFa pripada skupini lokusa za koje postoje podaci za izrazito velik broj populacija, a treba podsjetiti da je to i prvi mikrosatelit uopće korišten u populacijskim istraživanjima. Usporedba naših rezultata s rezultatima dobivenim za njemačku, talijansku, francusku i englesku populaciju otkrila je sličnosti, ali i ukazala na neke od osobitosti hrvatske populacije (111-116). Najčešći alel na ovom mikrosatelitu među hrvatskim ispitanicima bio je alel TNFa10 (23,7%) kao i u talijanskoj populaciji, ali suprotno rezultatima dobivenim za većinu drugih europskih populacija kod kojih je najčešći alel TNFa2. Kod nas je alel TNFa2 na drugom mjestu po zastupljenosti kao i među Talijanima. S obzirom na prisutnost, odnosno odsutnost pojedinog alela, u našoj populaciji nisu pronađeni aleli TNFa8 i TNFa12 koji su uočeni u prije spomenutim europskim populacijama. Nasuprot tomu, alel TNFa14, koji je bio prisutan među hrvatskim ispitanicima (0,3%), nije pronađen u dosad istraženim europskim populacijama, već samo s malom zastupljenošću (0,4%) u Koreji (117).

Raspodjela alela na mikrosatelitu TNFb ukazala je na izrazitu predominantnost jednog alela (TNFb4) što je u skladu s rezultatima dobivenim za Francuze, Grke, Nijemce i Talijane (111-113). Za razliku od njega, alel TNFb5, koji se među našim ispitanicima pojavio kod 21,0% ispitanika, pokazuje velika odstupanja u učestalosti kod ostalih istraživanih populacija. Tako je rezultat dobiven za stanovnike Hrvatske vrlo sličan rezultatima dobivenim za Grke, Nijemce i Talijane, no znatno odudara od rezultata za francusku populaciju u kojoj se među ispitanicima pojavio s niskom zastupljenošću (6,7%). Konačno, alel TNFb6 je u hrvatskoj populaciji bio

zastupljen u samo 1,0% slučajeva, što odgovara niskoj učestalosti ovog alela opaženoj među Škotima (114), no u suprotnosti je s frekvencijom od čak 11,0% koja je za ovaj alel uočena u francuskoj populaciji (112).

Mikrosatelit TNFd je najslabije istražen lokus među mikrosatelitima TNF te smo stoga podatke o učestalostima njegovih alela mogli usporediti samo s malim brojem dosad analiziranih populacija. Ispitivanje je otkrilo da je učestalost alela TNFd4 koji je među hrvatskim ispitanicima uočen s preko 50,0% bila slična podacima iz Velike Britanije (56,6%) i Sjeverne Irske (50,5%), dok je u populaciji Indije ovaj alel, premda i dalje najčešći, bio znatno manje prisutan (29,0%) (118). Usporedba rezultata na ovom lokusu opet je dovela do problema u različitom označavanju alela tj. njihove dužine. Naime, među Japancima najčešći alel je TNFd3 koji svojom dužinom odgovara našem alelu TNFd4 tj 130pb (119). Stoga je neophodno kod ovakvih usporedbi biti vrlo oprezan kako ne bi došlo do donošenja pogrešnih zaključaka.

Podatke o raznovrsnosti mikrosatelita D6S273, MIB, D6S265, D6S291, D6S1014, D6S2939 i D6S510 koji su dobiveni za hrvatske ispitanike nije bilo moguće usporediti s rezultatima za druge populacije. Radi se o mikrosatelitima koji su bili uključeni uglavnom u istraživanja povezanosti različitih bolesti s regijom HLA koja su provedena tijekom 90-tih godina te za njih nisu bila niti provedena opsežna populacijska istraživanja. Budući su se prvi koraci ka usuglašavanju nazivlja mikrosatelitskih lokusa poduzeli tek početkom ovog stoljeća, teško je usporediti rezultate ranijih studija s podacima iz ovog rada (32).

Iz svih navedenih rezultata vidljivo je kako su se u slučaju mikrosatelita HLA, za razliku od mikrosatelita non-HLA, uočene razlike uglavnom odnosile na razlike u zastupljenosti pojedinih alela u našoj populaciji u odnosu na druge populacije, a ne na prisustvo, odnosno odsustvo pojedinog alela što je u skladu s opažanjem Crouau-Roy i suradnika (112).

Analiza haplotipskih veza alela mikrosatelita i specifičnosti HLA-B provedena je s ciljem utvrđivanja vrijednosti LD-a između alela mikrosatelita i specifičnosti HLA-B čime bi se isključila mogućnost da je povezanost ishoda HSCT s podudarnošću primatelja i davatelja za

određeni mikrosatelit posljedica visoke vrijednosti LD-a. Usporedba naših rezultata i rezultata dobivenih za druge europske populacije pokazala je da postoje haplotipske veze koje su zajedničke hrvatskoj i drugim europskim populacijama, ali i haplotipske veze koje su osobitost hrvatske populacije. Rezultati analize haplotipskih veza lokusa HLA-B i D6S2927 pronađenih u našoj populaciji u skladu su s istraživanjem provedenim među njemačkim ispitanicima, te su potvrdili i zaključke tog istraživanja u smislu da su specifičnosti lokusa HLA-B koje pripadaju istoj serološkoj grupi (npr. B*38 i B*39, B*49 i B*50 ili B*55 i B*56) povezane s istim alelom lokusa D6S2927 (110).

Snažna povezanost lokusa STR_MICA i HLA-B koja je opisana i u prethodnim populacijskim istraživanjima, potvrđena je i našim rezultatima (120). Slično kao i u talijanskoj populaciji, i među našim ispitanicima je za HLA-B*35 uočena neravnoteža udruživanja s dva alela mikrosatelita STR_MICA (STR_MICA-A5 i STR_MICA-A9), no dok vrijednost LD-a s alelom STR_MICA-A5 nije bila statistički značajna kao među talijanskim ispitanicima ($D=0,53$; $P=0,06$), haplotipska veza HLA-B*35/ STR_MICA-A9 je pokazala višu i statistički značajnu vrijednost LD-a ($D=0,95$; $P=0,0015$) (109).

Nešto slabija neravnoteža udruživanja utvrđena je između lokusa D6S2793 i HLA-B u usporedbi sa STR_MICA. Moguće objašnjenje leži u činjenici da je na lokusu STR-MICA pronađen manji broj alela kao i u bližem položaju ovog lokusa u odnosu na lokus HLA-B. Rezultati dobiveni za lokus D6S2793 ukazali su i na postojanje veza za sada uočenih samo u Hrvatskoj. Naime, među hrvatskim ispitanicima HLA-B*18 je pokazao povezanost s alelima D6S2793-CA25 i D6S2793-CA26 što je različito od objavljenih podataka za njemačku i talijansku populaciju (109, 110). U navedenim populacijama HLA-B*18 nije pokazao statistički značajnu povezanost niti s jednim od alela mikrosatelita D6S2793.

Analiza haplotipskih veza između mikrosatelita smještenih unutar regije TNF i lokusa HLA-B otkrila je manji broj statistički značajnih veza između lokusa TNFb i TNFd i specifičnosti HLA-B u usporedbi s alelima mikrosatelita TNFa. Razlog tome je puno niži

polimorfizam ova dva mikrosatelita naspram lokusa TNFa čime je i smanjena mogućnost otkrivanja haplotipskih veza sa statistički značajnom vrijednosti LD-a. Usporedba haplotipskih veza opisanih u drugim zemljama (Francuska, Grčka, Italija i Njemačka) s našom populacijom nije otkrila nove veze s iznimkom veze HLA-B*51 i TNFa3 koja dosad nije opisana (109-112). Nasuprot tome, snažna povezanost HLA-B*08/TNFD2 koja je otkrivena u Hrvatskoj nije u skladu s dosad pronađenim vezama alela ovog mikrosatelita i specifičnosti HLA-B*08. Naime, u drugim populacijama specifičnost HLA-B*08 je najčešće bila u vezi s alelima TNFD1 ili TNFD3. Također, haplotipska veza HLA-B*39/TNFD6, koja se nalazi među statistički značajnim vezama HLA-B/TNFD među hrvatskim ispitanicima dosad nije opisana drugdje te je moguće da je odlika naše populacije. Takav zaključak, međutim, nije moguće donijeti sve do onog trenutka kad se upotpune podaci o ovim haplotipskim vezama i za druge populacije u našoj regiji, odnosno Evropi.

S obzirom da dosad nije provedeno niti jedno istraživanje produženih haplotipova HLA koje bi uključilo sve mikrosatelite analizirane u ovom radu, usporedba hrvatske i drugih populacija provedena je na rezultatima analize dijelova produženih haplotipova i to: HLA-B/D6S2927/STR_MICA/D6S2793 i HLA-B/TNFB/TNFA/TNFD. Usporedba rezultata analize haplotipskih veza HLA-B/D6S2927/STR_MICA/D6S2793 u talijanskoj i hrvatskoj populaciji nije otkrila značajnije razlike (109). Nekoliko haplotipskih veza je pokazalo snažnu neravnotežu udruživanja kroz čitav produženi haplotip od HLA-B do D6S2793, npr. haplotipovi HLA-B*07, -B*08, -B*18, dok je za druge neravnoteža udruživanja bila prisutna samo za određeni dio produženog haplotipa, npr. haplotipovi HLA-B*44, -B*51.

Najčešća veza između gena HLA-B i mikrosatelita TNF koja je bila prisutna među hrvatskim ispitanicima bila je HLA-B*18/TNFB4/TNFA10/TNFD4. Prema istraživanju Udalove, ova veza je dio tzv. očuvanog haplotipa (*engl.* ancestral haplotype, AH) AH 18.1 (121). Premda su rezultati ovog dijela istraživanja u najvećoj mjeri u skladu s dosad objavljenim podacima, ipak su uočene i neke osobitosti u vezama alela mikrosatelita TNF i specifičnosti HLA-B unutar naše

populacije. Na primjer, jedan od najčešćih i najistraživanijih haplotipa HLA, haplotip 8.1 (HLA-A1, -Cw7, -B8, -DRB1*0301, -DQB1*0201) za koji je dokazana povezanost s brojnim autoimunim bolestima, u Hrvatskoj pronađen je s različitim alelom na mikrosatelitu TNFd. Još jedan takav slučaj je i haplotip AH 7.1 (HLA-A*03, -B*07; -DRB1*15, -DQB1*0602) koji se također razlikuje za alel TNFd. U oba slučaja se očekivani i uočeni alel na lokusu TNFd razlikuju za jedno ponavljanje što upućuje na mogućnost povećanog stupnja mutacije mikrosatelita kao uzroka razlike.

Naposljetku, kao posljednji dio populacijskog istraživanja raznovrsnosti mikrosatelita HLA, provedena je analiza haplotipskih veza između alela tri mikrosatelita TNF (TNFa, TNFb i TNFd). Usporedba rezultata analize haplotipskih veza dva, odnosno tri lokusa s podacima za druge populacije (Baski, Danci, Francuzi, Grci) ukazala je na razlike u učestalosti i značajnosti pojedinih veza između populacija, no nije otkrila niti jednu novu, dosad neopisanu haplotipsku vezu (112, 113). Prva razlika odnosi se na najčešću haplotipsku vezu alela mikrosatelita TNFa i TNFb među hrvatskim ispitanicima: TNFa10/TNFb4. Nasuprot tome, među prije spomenutim najzastupljenija je bila veza TNFa11/TNFb4 koja je u hrvatskoj populaciji bila druga po učestalosti. S druge strane, haplotipska veza koja je pokazala najvišu vrijednost LD-a među našim ispitanicima, TNFa2/TNFb1, također je opisana u istraživanju Gallaghery i suradnika, no s manjom vrijednosti P (114). Podaci za preostale haplotipske veze ova dva mikrosatelita bili su u skladu s rezultatima dobivenim za druge populacije. S obzirom na općenito mali broj podataka o raznovrsnosti lokusa TNFd u drugim populacijama, nije bilo moguće provesti usporedbu naših rezultata o haplotipskim vezama TNFb/TNFd s rezultatima drugih populacija.

Nakon što su populacijskim istraživanjem bile utvrđene raznovrsnost i vrijednosti LD-a mikrosatelitskih lokusa HLA, mogli smo pristupiti trećoj cjelini ove doktorske disertacije, a to je ispitivanje povezanosti podudarnosti para primatelj-davatelj za 13 mikrosatelita HLA na ishod same HSCT. Ideju o mogućoj primjeni mikrosatelita HLA za odabir nesrodnog davatelja prva je iznijela grupa istraživača iz SAD-a (41). Uloga ovakve analize za cilj ima prvenstveno točnije

odrediti haplotip HLA koji posjeduje davatelj, odnosno primatelj hematopoetskih matičnih stanica, osobito u programu fenotipski HLA identičnog davatelja. Ideja je bila prihvaćena od strane brojnih autora budući se temeljila na prisutnosti dokazano snažne neravnoteže udruživanja koja obuhvaća čitavu regiju HLA pa tako i mikrosatelitske lokuse smještene unutar nje te je pružala mogućnost relativno jednostavne analize mikrosatelitskih lokusa u određivanju haplotipa HLA. Pojedini autori čak su ispitali mogućnost analize mikrosatelita HLA u predviđanju haplotipa HLA, testirajući njihovu analizu kao zamjenu za klasično određivanje gena HLA (122). Uz već spomenute prednosti ovakve analize, neophodno je spomenuti i bitno nižu cijenu određivanja mikrosatelita u odnosu na određivanje gena HLA iz čega proizlazi da bi se troškovi koji su povezani uz određivanje gena HLA u svrhu odabira davatelja mogli značajno smanjiti ukoliko bi se to određivanje provodilo neizravno pomoću analize mikrosatelita HLA. Međutim, prvi rezultati ovog istraživanja pokazali su da ovakva primjena nije moguća budući npr. predviđajuća vrijednost opada kod širokih specifičnosti lokusa HLA (npr. HLA-A9). Autori su stoga predložili da se primjena analize mikrosatelita usmjeri u dva pravca: probir davatelja nakon početnog određivanja gena HLA razreda I i II, odnosno ukazati na davatelje koji imaju najčešće haplotipove na temelju informacije o mikrosatelitima HLA te ih izuzeti iz daljnje dodatne analize gena HLA na višoj razini razlučivanja; konačni odabir između davatelja koji dijele iste alele na genima HLA razreda I i II. Mogućnost predviđanja rezultata analize gena HLA uz pomoć mikrosatelita HLA i danas se ispituje. Najnoviji primjer je istraživanje kojim je grupa autora iz Indije pokazala da se analizom mikrosatelita D6S2811 može predvidjeti koji će alel HLA-B*27 posjedovati osoba pozitivna za taj gen lokusa HLA-B (123). Također je potrebno spomenuti i istraživanje nizozemskih autora koji su pokazali da je analizom mikrosatelita D6S2878 moguće predvidjeti koje će alele na lokusu HLA-DRB1 posjedovati osoba i to čak na razini visokog razlučivanja (124).

Druga moguća primjena analize mikrosatelita HLA potaknuta je brojnim istraživanjima povezanosti gena HLA s bolestima kao što su psorijaza (125), Bechetova bolest (126),

reumatoidni artritis (127) i sl. u kojima su mikrosateliti HLA bili korišteni kao genetski biljezi. Ta ispitivanja kao i činjenica da razlike u slabim antigenima tkivne podudarnosti utječu na pojavu i težinu reakcije presatka protiv primatelja, navela su na ideju o mogućoj primjeni mikrosatelita HLA kao biljega povezanosti pri određivanju gena koji kodiraju te slabe antigene tkivne podudarnosti. Do danas je provedeno nekoliko istraživanja koja su primjenila navedeni pristup i pokazala da podudarnost za lokuse non-HLA utječe na pojavu teškog oblika GvHD-a (42, 128-130).

Istraživanje autora iz Poljske ukazalo je na povezanost raznolikosti unutar gena koji kodiraju citokine TNF- α i TNF- β s pojavom komplikacija nakon TKMS (42), dok je rad autora iz Nizozemske pokazao da je podudarnost para primatelj-davatelj za alele mikrosatelita TNFa povezana s nižom učestalošću citotoksičnih limfocita T (129). Budući je većina istraživanja ovog područja bila usredotočena na polimorfizme koji se nalaze unutar regije TNF ili su smješteni u blizini gena koji kodiraju druge citokine (npr. IL-10), rezultate našeg istraživanja koji su se odnosili na ispitivanje povezanosti podudarnosti za mikrosatelite HLA koji ne pripadaju polimorfizmima regije TNF i ishoda HSCT mogli smo usporediti jedino s rezultatima istraživanja grupe autora iz Japana (128). Navedeno istraživanje je uz mikrosatelite TNFa i TNFd obuhvatilo i lokuse STR_MICA, MIB, D6S273, D6S265 i D6S510. Autori ovog rada su također primjenili podjelu mikrosatelitskih lokusa prema udjelu parova primatelj-davatelj koji su bili podudarni za pojedini lokus. Ovakav pristup analizi naših ispitanika i njihovih davatelja doveo je do slijedeće podjele mikrosatelita: lokusi s niskim postotkom podudarnosti ($\leq 50\%$): D6S291, D6S273, TNFa, D6S2793, D6S2939 i D6S265; lokusi s visokim postotkom podudarnosti ($> 50\%$): TNFd, TNFb, STR_MICA, MIB, D6S2927 i D6S510. Premda su postoci podudarnosti za mikrosatelite koji su analizirani u istraživanju koje je proveo Li sa suradnicima bili značajno viši od onih uočenih za naše parove primatelj-davatelj, raspodjela na lokuse s niskim, odnosno visokim postotkom podudarnosti podudara se za oba istraživanja. Dobiveni rezultati nisu iznenađujući obzirom da su se u skupini mikrosatelita HLA s visokim postotkom

podudarnosti nalazili oni lokusi koji su u populacijskom istraživanju pokazali visoku vrijednost LD-a s genima HLA te da se ispitanici uključeni u ovaj dio istraživanja bili fenotipski HLA identični sa svojim davateljima. Jedina dva lokusa koji nisu u skladu s ovom teorijom bili su lokusi TNFa i D6S2793 koji su pokazali podudarnost za par primatelj-davatelj u manje od 50% slučajeva usprkos prije utvrđenoj visokoj vrijednosti LD-a s lokusom HLA-B (128).

Analiza mikrosatelitskih lokusa među parovima primatelj-davatelj bila je provedena i kako bi se točnije opisale osobine haplotipova HLA pronađenih u ovoj skupini ispitanika, odnosno utvrdilo postojanje neuobičajenih haplotipova. Takva informacija je od posebne važnosti ukoliko je neuobičajeni haplotip prisutan kod bolesnika budući se izgledi za pronalazak podudarnog davatelja u tom slučaju znatno smanjuju. Nažalost, rezultati ovog ispitivanja nisu omogućili otkrivanje pravilnosti pomoću koje bi bilo moguće utvrditi da li primatelj ili davatelj nose neuobičajeni haplotip HLA. Naime, premda su se i među zdravim ispitanicima i među parovima primatelj-davatelj pojavljivale iste kombinacije mikrosatelita i lokusa HLA-B, na nekim mikrosatelitskim lokusima je kombinacija pronađena kod primatelja bila uobičajena, dok je za druge lokuse upravo alel davatelja bio onaj za koji je pronađena povezanost s određenim alelom HLA-B u zdravoj populaciji. Ovakva situacija je bila uočena kod svih analiziranih parova primatelj-davatelj. Od interesa je spomenuti kako je među parovima primatelj-davatelj uključenima u ovo istraživanje, najmanji broj nepodudarnosti bio pronađen upravo za one osobe koje su nosioci očuvanog haplotipa AH 8.1 koji pripada skupini najočuvanijih haplotipa HLA diljem svijeta te je također i najčešći haplotip u hrvatskoj populaciji (131).

Ispitivanje utjecaja podudarnosti za mikrosatelite HLA parova primatelj-davatelj na pojavu i stupanj GvHD-a te preživljavanje nije otkrila statistički značajne razlike za niti jedan od analiziranih mikrosatelita HLA, kako u našem istraživanju, tako i među japanskim parovima primatelj-davatelj (128). Jedina odstupanja koja su uočena u našem istraživanju odnosila su se na povezanost nepodudarnosti za lokus D6S291 s teškim oblicima GvHD-a te lokusa D6S273 s blažim oblicima GvHD-a. Nasuprot tome, japanska studija je otkrila da je među bolesnicima s

teškim oblicima GvHD-a, ukoliko je par primatelj-davatelj bio podudaran na mikrosatelit TNFd preživljavanje bilo lošije. Iz rezultata našeg istraživanja koja su u potpunosti u skladu s prethodno navedenim radom, može se zaključiti da traženje podudarnosti za mikrosatelite HLA, posebice one koji se nalaze na većoj udaljenosti od gena HLA, a u svrhu smanjenja pojave i težine GvHD-a kao i poboljšanja preživljavanja, nije opravdano. Mogući razlog izostanka povezanosti između podudarnosti za ispitivane mikrosatelite HLA i povoljnijeg ishoda HSCT je mali broj ispitanika, no daljnja istraživanja bi se možda trebala više usredotočiti na traženje gena koji kodiraju slabe antigene tkivne nepodudarnosti izvan regije HLA.

Kao posljednji dio ovog rada provedeno je ispitivanje utjecaja mikrosatelita smještenih unutar regije TNF na ishod HSCT. Poticaj, kako za ovo ispitivanje, tako i za istraživanja koja su proveli drugi autori (42, 132-134) leži u rezultatima istraživanja grupe autora na čelu s Pociotom koji su ukazali na povezanost polimorfizama smještenih u regiji TNF sa smanjenom, odnosno povećanom proizvodnjom citokina TNF- α (135). Radi se o proupalnom citokinu koji se proizvodi u periodu prije transplantacije kao posljedica ozljede tkiva tijekom kondicioniranja bolesnika te nakon transplantacije uslijed aktivacije limfocita T. Citokin TNF- α na taj način sudjeluje u razvoju akutnog GvHD-a. Pretpostavka od koje su krenula sva naredna istraživanja bila je da određivanje alela na mikrosatelitima TNF može imati prognostičku vrijednost za ishod HSCT, te pomoći u odluci o vrsti liječenja za sprječavanje GvHD-a, kao i mogućoj primjeni protucitokinske terapije.

Prvo istraživanje o utjecaju raznovrsnosti unutar regije TNF na ishod TKMS proveo je Middleton sa suradnicima te ukazao na povezanost genotipa primatelja TNFd3/TNFd3 s učestalijom pojavom GvHD-a stupnja III ili IV. Radi se o genotipu koji je u prijašnjim ispitivanjima pokazao povezanost s pojačanom proizvodnjom TNF- α . Ovaj rezultat je potvrđen i kasnijim istraživanjem na većem broju ispitanika (136). U istraživanju iz 2006. godine Bettens i suradnici opisali su značajne razlike u preživljavanju bolesnika koji su nosioci genotipova TNFd1/d2/d3 u usporedbi s bolesnicima koji su bili pozitivni za genotip TNFd3/d3, alel TNFd4 i

alel TNFd5 (134). Konačno, istraživanje grupe autora iz Poljske potvrdilo je povezanost genotipa TNFd3/d3 s težim oblicima GvHD-a (42). Iz svih navedenih rezultata vidljivo je da ne postoji zajedničko, jedinstveno mišljenje o utjecaju polimorfizama regije TNF na ishod HSCT s obzirom na pojavu i stupanj GvHD-a premda je alel TNFd3 istaknut kao rizični faktor u većini dosadašnjih istraživanja.

Podjele ispitanika koje su korištene u prethodno opisanim studijama, primjenjene su i u ovom radu. Dobiveni rezultati nisu ukazali da postoji povezanost veličine alela koji su prisutni na sva tri testirana mikrosatelita TNF, premda su nešto izrazitije razlike uočene u preživljavanju ispitanika s obzirom na veličinu alela na lokusima TNFb i TNFd. No, dok za lokus TNFb dosad ne postoje podaci o povezanosti s ishodom HSCT, rezultati dobiveni ovim istraživanjem nisu ukazali bolje preživljavanje ispitanika koji su pozitivni za genotipove TNFd1/d2/d3 kao u slučaju istraživanja Bettens i suradnika, već da je najlošiji ishod transplantacije bio prisutan kod ispitanika s po jednim alelom s malim i jednim alelom s velikim brojem ponavljanja (134). Također ni analiza povezanosti pojedinačnih alela mikrosatelita TNF nije izdvojila alele TNFd3, TNFd4 i TNFd5 kao alele koji nose povećani rizik kao što je pokazano u prethodno opisanim radovima. Naime, u skupini naših ispitanika, najlošije preživljavanje je primjećeno kod osoba koje su bile pozitivne za TNFa8 i TNFd6 u usporedbi s ispitanicima koji nisu bili nosioci navedenih alela. S druge strane, značajno bolje preživljavanje uočeno je za ispitanike s alelom TNFa10 u odnosu na ispitanike koji ga nisu posjedovali. Ovo je prvi put da je povezanost s ishodom HSCT uočena za alele mikrosatelita TNFa i dok je u slučaju alela TNFa8 ovaj rezultat potrebno potvrditi na većem broju ispitanika budući su samo četiri osobe bile pozitivne za ovaj alel, otkriće povezanosti alela TNFa10 s boljim preživljavanjem nije upitan s obzirom da je veliki broj ispitanika bio pozitivan za taj alel (45%).

Sažimajući ukratko sve rezultate ovog istraživanja, može se zaključiti kako je analiza mikrosatelitskih lokusa opravdala uključivanje u postupke koji su dio programa HSCT. Za odgovarajuće praćenje bolesnika te donošenje odluka o liječenju nakon transplantacije

neophodna je informacija o uspjehu HSCT odnosno funkciji transplantata, a ovim istraživanjem dokazano je kako je upravo analiza mikrosatelita idealan pristup za dobivanje te informacije. Uz već dokazane prednosti poput kratkog vremena izvođenja testa te male količine uzorka potrebnog za analizu, metoda je pokazala visoku osjetljivost i pouzdanost te, što je najvažnije, usuglašenost s kliničkim stanjem bolesnika, odnosno prognostičku vrijednost. Nasuprot tomu, ovo istraživanje nije pružilo neosporne dokaze o vrijednosti analize mikrosatelita HLA u odabiru najprikladnijeg davatelja među nesrodnim, fenotipski HLA identičnim osobama. Međutim, premda u slučaju analize mikrosatelita HLA nije utvrđena jasna mogućnost primjene kao kod prethodno spomenute analize lokusa non-HLA, podaci dobiveni ovim istraživanjem ipak ukazuju na potrebu za uključivanjem većeg broja ispitanika u daljnjim istraživanjima ovog tipa kako bi se mogli donijeti konačni zaključci. Potrebno je naglasiti kako je ovaj rad međutim ukazao na mogući izravni utjecaj pojedinih mikrosatelita HLA na ishod TKMS. Istraživanje te uloge mikrosatelita HLA bilo je u našem radu ograničeno na lokuse smještene u regiji TNF, no dobiveni rezultati nedvojbeno upućuju na nužnost proširenja ovakve analize i na preostale dijelove regije HLA koji kodiraju gene značajne za imunološki odgovor kao što su npr. geni HSP, TAP ili MIC. Dublji uvid u ovo područje omogućio bi preciznije određivanje bolesnika s većim rizikom za razvoj komplikacija nakon transplantacije te na taj način pravodobnim intervencijama poboljšao njihove izgleda za preživljavanje.

6. ZAKLJUČCI

1. Istraživanje raspodjele alela 9 mikrosatelita non-HLA (TH01, VWFA31, FES/FPS, F13A01, SE33, D1S1656, D12S391, D18S535 i D22S683) i jednog minisatelita non-HLA (D1S80) na uzorku hrvatske populacije pokazalo je da nema statistički značajnih razlika u usporedbi s drugim evropskim populacijama.
2. Svih 10 analiziranih lokusa zadovoljilo je potrebne kriterije informativnosti (vrijednost $PIC \geq 0,70$ i udio heterozigota u populaciji $\geq 70\%$) za uključivanje u praćenje kimerizma kod ispitanika nakon HSCT.
3. Lokus FES/FPS je bio jedini lokus kod kojeg su kriteriji informativnosti bili na donjoj graničnoj vrijednosti.
4. Opetovanom analizom lokusa non-HLA među ispitanicima nakon HSCT utvrđena je prognostička vrijednost analize ovih lokusa, odnosno utvrđivanja stanja kimerizma kod ispitanika koje je u svim slučajevima odgovaralo kliničkom stanju ispitanika.
5. Analiza lokusa non-HLA pokazala jednim od najvažnijih postupaka u predviđanju ponovne pojave bolesti u slučajevima kada je kod ispitanika bio utvrđen rastući miješani kimerizam.
6. Nije utvrđeno postojanje razlike u mogućnosti predviđanja ponovne pojave bolesti s obzirom na dijagnozu ispitanika budući je povezanost rastućeg miješanog kimerizma s ponovnom pojavom bolesti bila uočena kod ispitanika s različitim dijagnozama.
7. Istraživanje raznovrsnosti 13 mikrosatelita HLA (D6S291, D6S1014, D6S273, STR_MICA, D6S2793, MIB, D6S2927, D6S2939, D6S265 i D6S510, TNFa, TNFb i TNFd.) na uzorku hrvatske populacije nije otkrilo statistički značajne razlike između hrvatske i drugih evropskih populacija.
8. U hrvatskoj populaciji nije otkriven niti jedan alel na analiziranim mikrosatelitima HLA koji dosad nije bio opisan u literaturi.
9. Alel TNFa14, koji je bio uočen među hrvatskim ispitanicima, dosad nije opisan niti u jednoj evropskoj populaciji.

10. Analiza haplotipskih veza između alela mikrosatelita HLA i gena HLA u hrvatskoj populaciji potvrdila je sličnost s drugim evropskim populacijama.
11. Haplotipske veze D6S2793/HLA-B pokazale su najveće vrijednosti LD-a, a haplotipske veze D6S2927/HLA-B imale su najveću statističku značajnost.
12. Novootkrivene haplotipske veze pronađene u ovom istraživanju su: D6S2793-CA25/HLA-B*18, D6S2793-CA26/HLA-B*18, TNFa3/HLA-B*51, TNFd2/HLA-B*08 i TNFd6/HLA-B*39.
13. Istraživanje produženih haplotipova pokazalo je da se haplotip AH 18.1 u Hrvatskoj ne razlikuje se od istog u drugim evropskim populacijama, dok je za haplotipove AH8.1 i AH 7.1 uočena razlika u strukturi s obzirom na alel lokusa TNFd.
14. Analizom povezanosti mikrosatelita TNF otkriveno je 8 haplotipskih veza dva lokusa sa statistički značajnom visokom vrijednošću LD-a.
15. Ispitivanja povezanosti sva tri lokusa TNF otkrila su najjaču povezanost za kombinaciju TNFa10/TNFb4/TNFd4 (LD=3,36; P=0,001) koja je također bila i najčešća kombinacija među našim ispitanicima.
16. Istraživanje utjecaja podudarnosti primatelja i nesrodnog davatelja hematopoetskih matičnih stanica za mikrosatelite HLA na pojavu GvHD-a i sveukupno preživljavanje ispitanika, utvrdilo je da podudarnost za niti jedan od analiziranih mikrosatelita nije statistički značajno povezana s ishodom HSCT.
17. Povezanosti alela mikrosatelita TNFa sa sveukupnim preživljavanjem ispitanika nakon HSCT ukazalo je na značajno lošiji ishod HSCT za ispitanike koji su bili pozitivni za alel TNFa8 i nasuprot tome, značajno bolje preživljavanje ispitanike koji su imali alel TNFa10.

7. POPIS LITERATURE

1. Osgood EE, Riddle MC, Mathews TJ. *Ann Intern Med* 1939;13:357-67.
2. Thomas ED, Lochte HL Jr, Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest* 1959;38:1709-16.
3. Aschan J. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: current status and future outlook. *Br Med Bull* 2006;77(78):23-36.
4. Ringdén O, le Blanc K. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: state of the art and new perspectives. *APMIS* 2005;113:813-30.
5. Mickelson EM, Petersdorf E, Anasetti C, Martin P, Woolfrey A, Hansen JA. HLA Matching in Hematopoietic Cell Transplantation. *Hum Immunol* 2000;61:92-100.
6. Petersdorf EW. Immunogenomics of unrelated hematopoietic cell transplantation. *Curr Opin Immunol* 2006;18:559-64.
7. Schlomchik WD. Graft-versus-host disease. *Nat Rev* 2007;7:340-52.
8. Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer* 2004;4:371-80.
9. Roncarolo M, Battaglia M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nat Rev Immunol* 2007;7:585-98.
10. Parham P, McQueen KL. Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. *Nat Rev* 2003;73:108-22.
11. Velardi A, Ruggeri L, Moretta A, Moretta L. NK cells: a lesson from mismatched hematopoietic transplantation. *Trends Immunol* 2002;23:438-44.
12. Ruggeri L, Mancusi A, Burchielli E i sur. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295:2097-100.
13. Peters WP, Dansey R, Baynes RD, Champlin R. Bone marrow transplantation. U: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast RC Jr, Gansler TS, Holland JF, Frei E ur. *Cancer Medicine* 6, Hamilton, Ontario: B.C. Decker, Inc; 2003, str.

14. McCann SR, Crampe M, Molloy K, Lawler M. Hemopoietic chimerism following stem cell transplantation. *Transfus Apher Sci* 2005;32:55-61.
15. Antin JH, Childs R, Filipovich AH i sur. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem Meetings of the International Bone Marrow Transplant Registry and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001;7(9):473-85.
16. Collins RH, Goldstein S, Giralt S i sur. Donor leukocyte infusions in acute lymphocytic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26:511-6.
17. Bader P, Niethammer D, Willasch A, Kreyenberg H, Klingebiel T. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant* 2005;35:107-19.
18. Schaap N, Schattenberg A, Bar B i sur. Red blood cell phenotyping is a sensitive technique for monitoring chronic myeloid leukaemia patients after T-cell-depleted bone marrow transplantation and after donor leucocyte infusion. *Br J Haematol* 2000;108:116-25.
19. Offit K, Burns JP, Cunningham I i surl. Cytogenetic analysis of chimerism and leukemia relapse in chronic myelogenous leukemia patients after T cell-depleted bone marrow transplantation. *Blood* 1990; 75:1346-55.
20. Sparkes R. Cytogenetic analysis in human bone marrow transplantation. *Cancer Genet Cytogenet* 1981;4:345-52.
21. Kögler G, Wolf HH, Heyll A, Arkesteijn G, Wernet P. Detection of mixed chimerism and leukemic relapse after allogeneic bone marrow transplantation in subpopulations of leucocytes by fluorescent in situ hybridization in combination with the simultaneous immunophenotypic analysis of interphase cells. *Bone Marrow Transplant* 1995;15:41-8.

22. Yam PY, Petz LD, Knowlton RG et al. Use of DNA restriction fragment length polymorphisms to document marrow engraftment and mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation. *Transplantation* 1987;43:399-407.
23. Bader P, Hoelle W, Klingebiel T i sur. Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation: the impact of quantitative PCR analysis for prediction of relapse and graft rejection in children. *Bone Marrow Transplant* 1997;19:697-702.
24. Khan F, Agarwal A, Agrawal S. Significance of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation: new variations on an old theme. *Bone Marrow Transplantation* (2004) 34, 1–12.
25. Alizadeh M, Bernard M, Danic B i sur. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood* 2002;99:4618-25.
26. Hearne C, Ghosh S, Todd J. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends Genet* 1992;8:288-94.
27. Urquhart A, Kimpton CP, Downes TJ, Gill P. Variation in Short Tandem Repeat sequences – a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *International J Leg Med* 1994;107:13-20.
28. Fan H, Chu JY. A brief review of short tandem repeat mutation. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2007;5(1):7-14.
29. Koreth J, O Leary J, McGee J. Microsatellites and PCR genomics. *J Pathol* 1996;178:239-48.
30. Charlesworth B, Sniedgowski P, Stephan W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 1994;371:215-20.
31. Olaisen B, Bär W, Brinkmann B i sur. DNA recommendations 1997 of the International Society for Forensic Genetics. *Vox Sang* 1998;74(1):61-3.

32. Gourraud PA, Cambon-Thomsen A, Dauber EM i sur. Nomenclature for HLA microsatellites. *Tissue Antigens* 2007;69 Suppl 1:210-3.
33. Rothberg PG, Gamis AS, Baker D. Use of DNA polymorphisms to monitor engraftment after allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Lab Med* 1997;17:109-18.
34. Foissac A, Crouau-Roy B, Faure S i sur l. Microsatellites in the HLA region: an overview. *Tissue Antigens* 1997;49:197-214.
35. Bruford MW, Wayne RK. Microsatellites and their application to population genetic studies. *Curr Opin Genet Dev* 1993;3(6):939-43.
36. Butler JM. Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *J Forensic Sci.* 2006;51(2):253-65.
37. Paulson HL, Fischbeck KH. Trinucleotide repeats in neurogenetic disorders. *Annu Rev Neurosci* 1996;19:79-107.
38. Young J, Leggett B, Gustafson C i sur. G. Genomic instability occurs in colorectal carcinomas but not in adenomas. *Hum Mutat* 1993;2(5):351-4.
39. Foissac A, Salhi M, Cambon-Thomsen A. Microsatellites in the HLA region: 1999 update. *Tissue Antigens* 2000;55(6):477-509.
40. Petersdorf EW, Gooley TA, Anasetti C i sur. Optimizing outcome after unrelated marrow transplantation by comprehensive matching of HLA class I and II alleles in the donor and recipient. *Blood* 1998;92:3515-20.
41. Carrington M, Wade J. Selection of transplant donors based on MHC microsatellite data. *Hum Immunol* 1996;51(2):106-9.
42. Bogunia-Kubik K. Polymorphisms within the genes encoding TNF- α and TNF- β associate with the incidence of post-transplant complications in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants. *Arch Immunol Ther Exp* 2004;52:240-9.
43. Thorsby E, Lie BA. HLA associated genetic predisposition to autoimmune diseases: Genes involved and possible mechanisms. *Transpl Immunol.* 2005;14(3-4):175-82.

44. Labar B, Bogdanić V, Nemet D, Mrsić M, Pavletić Ž, Zupančić S. Allogeneic BMT for AML in Zagreb. *Bone Marrow Transplant* 1989;4(suppl 3): 86-7.
45. Labar B, Bogdanić V, Nemet D, Vrtar M, Mrsić M. Total body irradiation with or without lung shielding for allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1989;4(suppl 3):108.
46. Polymeropoulos MH, Xiao H, Rath DS, Merrill CR. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human tyrosine hydroxylase gene (TH). *Nucleic Acids Res* 1991;19:3753.
47. Peake IR, Bowen D, Bignell P i sur. Family Studies and Prenatal Diagnosis in Severe von Willebrand Disease by Polymerase Chain Reaction Amplification of a Variable Number Tandem Repeat Region of the von Willebrand Factor Gene. *Blood* 1990;76:555-1.
48. Polymeropoulos MH, Rath DS, Xiao H, Merrill CR. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human c-fes/fps proto-oncogene (FES). *Nucleic Acids Res* 1991;19:4018.
49. Polymeropoulos MH, Rath DS, Xiao H, Merrill CR. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human coagulation factor XIII A subunit gene (F13A01). *Nucleic Acids Res* 1991;19:4306.
50. Möller A, Brinkmann B. Locus ACTBP2 (SE33). Sequencing data reveal considerable polymorphism. *Int J Legal Med* 1994;106(5):262-7.
51. Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 1991;48(1):137-44.
52. Lareu MV, Barral S, Salas A, Pestoni C, Carracedo A. Sequence variation of a hypervariable short tandem repeat at the D1S1656 locus. *Int J Legal Med* 1998;111(5):244-7.
53. Lareu MV, Pestoni C, Schürenkamp M, Rand S, Brinkmann B, Carracedo A. A highly variable STR at the D12S391 locus. *Int J Legal Med* 1996;109(3):134-8.

54. Lareu MV, Barral S, Salas A, Carracedo A. Sequence variation of a variable short tandem repeat at the D18S535 locus. *Int J Legal Med* 1998;111(6):337-9.
55. Barral S, Lareu MV, Salas A, Carracedo A. Sequence variation of two hypervariable short tandem repeats at the D22S683 and D6S477 loci. *Int J Legal Med* 2000;113(3):146-9.
56. Nollet F, Billiet J, Selleslag D, Criel A. Standardisation of multiplex fluorescent short tandem repeat analysis for chimerism testing. *Bone Marrow Transplant.* 2001;28(5):511-8.
57. Imanishi T, Akaza T, Kimura A, Tokunaga K, Gojobori T. Estimation of allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci. U: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T, ur. *HLA 1991. Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference Vol 1.* Oxford: Oxford University Press; 1992, p 76-9.
58. Baza podataka «DNA PCR Datenbank» Instituta za forenzičku medicinu i Instituta za humanu genetiku i antropologiju Sveučilišne bolnice u Düsseldorfu, Sveučilišta Heinrich-Heine (<http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/MedFak/Serology/database.html>)
59. Rose G, De Luca M, Falcone E, Spadafora P, Carrieri G, De Benedictis G. Allele frequency distributions at seven DNA hypervariable loci in a population sample from Calabria (Southern Italy). *Gene Geogr* 1996;10:135-45.
60. Lorente M, Lorente JA, Wilson MR, Budowle B, Villanueva E. Spanish population data on seven loci: D1S80, D17S5, HUMTH01, HUMVWA, ACTBP2, D21S11 and HLA-DQA1. *Forensic Sci Int* 1997;86:163-71.
61. Ranjan D, Kashyap VK. Genetic variation observed at three tetrameric short tandem repeat loci HumTH01, TPOX, and CSF1PO - in five ethnic population groups of Northeastern India. *Am J Hum Biol* 2001;3:23-9.
62. Gamero JJ, Romero JL, Arufe MI i sur. Analysis of allele distribution for nine short tandem repeat loci in autochthonous Canary Islands and immigrant Central West African populations. *Progr Forensic Genet* 2000;8:224-6.

63. Szabo A, Schürenkamp M, Hühne J. Hungarian population data for six STR loci. *Int J Legal Med* 1998;111:49-51.
64. Miscicka-Sliwka Czarny J, Grzybowski T, Wozniak M. Population genetics of 14 STRs: vWA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, F13A01, FESFPS, F13B, LPL, D3S1358 and FGA in the Pomerania-Kujawy region of Poland. *Progr Forensic Genet* 1998;7:261-3.
65. Souto L, Amorim A, Vide MC. Population and segregation data on the multiplex system (TH01, VWA, FES, F13A1) from Central Portugal. *Progr Forensic Genet* 1998;7:363-5.
66. Bell B, Nievas P, Abecia E, Martínez-Jarreta B, Hinojal R, Martinez-Cordero A. Population genetics of the STR loci HUMCSF1PO, HUMF13A01, HUMFES/FPS and D12S391 in Asturias (northern Spain). *Forensic Sci Int* 2000;13:21-3.
67. Gusmão L, Prata MJ, Miranda C, de Jesus Trovoada M, Amorim A. STR data from S. Tomé e Príncipe (Gulf of Guinea, West Africa). *Forensic Sci Int* 2001;116:53-4.
68. Destro-Bisol G, Boschi I, Caglià A i sur. Microsatellite Variation in Central Africa: An analysis of intrapopulation and interpopulation genetic diversity. *Am J Phys Anthropol* 2000;112:319-37.
69. Parra E, Saha N, Soemantri AG i sur. Genetic variation at 9 autosomal microsatellite loci in Asian and Pacific populations. *Hum Biol* 1999;71:757-79.
70. Bosch E, Clarimón J, Pérez-Lezaun A, Calafell F. STR data for 21 loci in northwestern Africa. *Forensic Sci Int* 2001;116:41-51.
71. Csete K, Schürenkamp M, Varga T. The STR systems HumVWA and HumACTBP2 in a Hungarian population. *Int. J. Legal Med* 1996;108:316-7.
72. Pawlowski R, Maciejewska A, Paszkoska R, Welz A. Frequencies for five short tandem repeat (STR) systems in a population from North Poland. *Int J Legal Med* 1997;110:10-3.

73. Bäßler G, Förster R, Eberspächer B, Karl C, Kugler M, Pflug W. Frequency data for the STR loci HumFibra (FGA) and HumACTBP2 (SE33) in a population of Germans and Turks from South-West Germany. *Int J Legal Med* 1999;112:136-8.
74. Pestoni C, López-Gómez J, Aller M, Lareu MV, Rodriguez-Calvo MS, Carracedo A. Complex STRs (ACTBP2, D2S11 and Fibra/FGA) in two Spanish populations: New intermediate alleles and population genetics in ACTBP2. *Progr Forensic Genet* 2001;7:324-5.
75. Katsuyam Y, Inoko H, Imanishi T, Mizuki N, Gojobori T, Ota M. Genetic relationships among Japanese, Northern Han, Hui, Uygur, Kazakh, Greek, Saudi Arabian, and Italian populations based on allelic frequencies at four VNTR (D1S80, D4S43, COL2A1, D17S5) and one STR (ACTBP2) loci. *Hum Hered* 1998;48:126-37.
76. Deka R, DeCruo S, Jin L i sur. Population genetic characteristics of the D1S80 locus in seven human populations. *Hum Genet* 1994;94:252-8.
77. Mastana SS, Papiha SS. D1S80 distribution in world populations with new data from the UK and the Indian sub-continent. *Ann Hum Biol* 2001;28:308-18.
78. Grubwieser P, Zimmermann B, Niederstätter H, Pavlic M, Steinlechner M, Parson W. Evaluation of an extended set of 15 candidate STR loci for paternity and kinship analysis in an Austrian population sample. *Int J Legal Med* 2007;121(2):85-9.
79. Martínez-Jarreta B, Vásquez P, Abecia E, Garde M, de Blás I, Budowle B. Autosomic STR loci (HUMTPOX, HUMTH01, HUMVWA, D18S535, D1S1656 and D12S391) in San Salvador (El Salvador, Central America). *J Forensic Sci* 2004;49(3):633-4.
80. De Leo D, Turrina S, Marigo M, Tiso N, Danieli GA. Italian population data for D1S1656, D3S1358, D8S1132, D10S2325, VWA, FES/FPS, and F13A01. *Forensic Sci Int* 2001;123(1):71-3.

81. Martínez-Jarreta B, Nieves Marco P, Abecia Martínez E, Lareu Huidobro MV, Budowle B. Population genetics of the D1S1656, D12S391, and D18S535 loci in Asturias (North Spain). *J Forensic Sci* 2000;45(2):442-4.
82. Farfán MJ, Sanz P, Lareu MV, Carracedo A. Population data on the D1S1656 and D12S391 STR loci in Andalusia (south Spain) and the maghreb (north Africa). *Forensic Sci Int* 1999;104(1):33-6.
83. Rothberg PG, Gamis AS, Baker D. Use of DNA polymorphisms to monitor engraftment after allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Lab Med* 1997;17:109-18.
84. Schraml E, Lion T. Interference of dye-associated fluorescence signals with quantitative analysis of chimerism by capillary electrophoresis. *Leukemia* 2003;17:221-3.
85. Chen DP, Tsai SH, Tseng CP, Wu TL, Chang PY, Sun CF. Bone marrow transplant relapse with loss of an allele. *Clinica Chim Acta* 2008;387:161-4.
86. Ariffin H, Daud S S, Mohamed Z, Ibrahim K, Lee T F, Chong LA. Evaluation of two short tandem repeat multiplex systems for posthaematopoietic stem cell transplantation chimerism analysis. *Singapore Med J* 2007;48(4):333–7.
87. Schattenberg A, de Witte T, Salden M i sur. Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation with lymphocyte-depleted bone marrow is not associated with a higher incidence of relapse. *Blood* 1989;73:1367-72.
88. Choi SJ, Lee KH, Lee JH i sur. Prognostic value of hematopoietic chimerism in patients with acute leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: a prospective study. *Bone Marrow Transplant* 2000;26(3):327-32.
89. Bader P, Beck J, Frey A i sur. Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant* 1998;21(5):487-95.

90. Bader P, Dückers G, Kreyenberg H i sur. Monitoring of donor cell chimerism for the detection of relapse and early immunotherapeutic intervention in acute lymphoblastic leukemias. *Ann Hematol* 2002;81Suppl 2:25-7.
91. Serrano J, Roman J, Sanchez J i sur. Molecular analysis of lineage-specific chimerism and minimal residual disease by RT-PCR of p210(BCR-ABL) and p190(BCR-ABL) after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: increasing mixed myeloid chimerism and p190(BCR-ABL) detection precede cytogenetic relapse. *Blood* 2000;95(8):2659-65.
92. Mattsson J, Uzunel M, Tammik L, Aschan J, Ringden O. Leukemia lineage-specific chimerism analysis is a sensitive predictor of relapse in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 2001;15:1976-85.
93. Ramirez M, Diaz M, Garcia-Sanchez F i sur. Chimerism after allogeneic hematopoietic cell transplantation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1996;18:1161-5.
94. Barrios M, Jiménez-Velasco A, Román-Gómez J i sur. Chimerism status is a useful predictor of relapse after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. *Haematologica* 2003;88(7):801-10.
95. Wäsch R, Bertz H, Kunzmann R, Finke J. Incidence of mixed chimaerism and clinical outcome in 101 patients after myeloablative conditioning regimens and allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2000;109(4):743-50.
96. Najfeld V, Burnett W, Vlachos A, Scigliano E, Isola L, Fruchtman S. Interphase FISH analysis of sex-mismatched BMT utilizing dual color XY probes. *Bone Marrow Transplant* 1997;19(8):829-34.

97. Miura Y, Tanaka J, Toubai T i sur. Analysis of donor-type chimerism in lineage-specific cell populations after allogeneic myeloablative and non-myeloablative stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2006;37(9):837-43.
98. Formankova R, Honzatkova L, Moravcova J i sur. Prediction and reversion of post-transplant relapse in patients with chronic myeloid leukemia using mixed chimerism and residual disease detection and adoptive immunotherapy. *Leuk Res* 2000;24:339-47.
99. Fernandez-Aviles F, Urbano-Ispizua A, Aymerich M i sur. Serial quantification of lymphoid and myeloid mixed chimerism using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers predicts graft rejection and relapse, respectively, after allogeneic transplantation of CD34+ selected cells from peripheral blood. *Leukemia* 2003;17:613-20.
100. Gorczynska E, Turkiewicz D, Toporski J i sur. Prompt initiation of immunotherapy in children with an increasing number of autologous cells after allogeneic HCT can induce complete donor-type chimerism: a report of 14 children. *Bone Marrow Transplant* 2004;33:211-7.
101. Kristt D, Stein J, Yaniv I, Klein T. Assessing quantitative chimerism longitudinally: technical considerations, clinical applications and routine feasibility. *Bone Marrow Transplant* 2007;39(5):255-68.
102. Román J, Serrano J, Jiménez A i sur. Myeloid mixed chimerism is associated with relapse in bcr-abl positive patients after unmanipulated allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Haematologica* 2000;85(2):173-80.
103. Roux E, Helg C, Chapuis B i sur. Evolution of mixed chimerism after allogeneic bone marrow transplantation as determined on granulocytes and mononuclear cells by the polymerase chain reaction. *Blood* 1992;79:2775-83.
104. Mackinnon S, Barnett L, Heller G i sur. Minimal residual disease is more common in patients who have mixed T-cell chimerism after bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1994;83:3409-16.

105. Gardiner N, Lawler M, O’Riordan J i sur. Persistent donor chimaerism is consistent with disease-free survival following BMT for chronic myeloid leukaemia. *Bone Marrow Transplant* 1997;20:235–241.
106. Guimond M, Busque L, Baron C i sur. Relapse after bone marrow transplantation: evidence for distinct immunological mechanisms between adult and paediatric populations. *Br J Haematol* 2000;109:130-7.
107. Singal DP, Li J, Zhang G. Microsatellite polymorphism of the STR_MICA gene and susceptibility to rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2001;19:451-2.
108. Ghaderi M, Nikitina Zake L, Wallin K i sur. Tumor necrosis factor A and MHC class I chain related gene A (MIC-A) polymorphisms in Swedish patients with cervical cancer. *Hum Immunol* 2001; 62:153-8.
109. Bolognesi E, D’Alfonso SD, Rolano V, Fasano ME, Pratico L, Momigliano-Richiardi P. STR_MICA and MICB microsatellite alleles in HLA extended haplotypes. *Eur J Immunogenet* 2001; 28:523-30.
110. Glas J, Werner AI, Brunnler G i sur. Linkage disequilibrium between HLA-B, C1_4_1, STR_MICA and MICB. *Tissue Antigens* 2001;58:411-8.
111. Frigerio S, Cuisani E, Pozzi A, Silvani A, Salmaggi A, Boiardi A. Tumor necrosis factor microsatellite polymorphisms in Italian glioblastoma patients. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;109:172-4.
112. Crouau-Roy B, Briant L, Bouissou C i sur. Tumor necrosis factor microsatellites in four European populations. *Hum Immunol* 1993;38:213-6.
113. Muller E, Frank KH, Fussel M, Hering S, Kuhlisch E. TNFa and b microsatellites in Germany. *Int J Legal Med* 1998;111:336.
114. Gallagher G, Eskdale J, Oh H, Richards SD, Campbell DA, Field M. Polymorphism in the TNF gene cluster and MHC serotypes in the West of Scotland. *Immunogenetics* 1997;45:188-94.

115. Hajeer AH, Worthington J, Davies EJ, Hillarby MC, Poulton K, Ollier WER. TNF microsatellite a2, b3 and d2 alleles are associated with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 1997;49:222-7.
116. van der Slik AR, Shing DC, Eerligh P, Giphart MJ. Subtyping for TNFa microsatellite sequence variation. *Immunogenet* 2000;52:29-34.
117. Kim HK, Han H, Choi HB, Pyo CW, Kim CC, Kim TG. Distribution of seven polymorphic markers and haplotypes within the human TNF gene cluster in Koreans. *Hum Immunol* 2000;61:1274-80.
118. Agrawal C, Raghav SK, Gupta B i sur. Tumour necrosis factor-a microsatellite polymorphism association with rheumatoid arthritis in Indian patients. *Arch Med Res* 2005;36:555-9.
119. Asano H, Kobayashi T, Uchida K i sur. Significance of tumour necrosis factor microsatellite polymorphism in renal transplantation. *Tissue Antigens* 1997;50:484-8.
120. Tamiya G, Ota M, Katsuyama Y i sur. Twenty-six new polymorphic microsatellite markers around the HLA-B, -C and -E loci in the human MHC class I region. *Tissue Antigens* 1998;51:337-46.
121. Udalova IA, Nedospasov SA, Webb GC, Chaplin DD, Turetskaya RL. Highly informative typing of the human TNF locus using six adjacent polymorphic markers. *Genomics* 1993;16:180-6.
122. Foissac A, Fort M, Clayton J i sur. Microsatellites in the HLA region: HLA prediction and strategies for bone marrow donor registries. *Transplant Proc* 2001;33(1-2):491-2.
123. Thomas R, Philip R, Banerjee M. Association of an extended haplotype of HLA class I alleles and their flanking microsatellites with spondyloarthropathies in South Indian patients. *Hum Immunol* 2006;67(4-5):318-23.

124. Doxiadis GGM, de Groot N, Class FHJ, Doxiadis IIN, van Rood JJ. A highly divergent microsatellite facilitating fast and accurate DRB haplotyping in humans and rhesus macaque. *PNAS* 2007;104(21):8907-12.
125. Oka A, Tamiya G, Tomizawa M i sur. Association analysis using refined microsatellite markers localizes a susceptibility locus for psoriasis vulgaris within a 111 kb segment telomeric to the HLA-C gene. *Hum Mol Genet* 1999;8(12):2165-70.
126. Mizuki N, Ota M, Yabuki K i sur. Localization of the pathogenic gene of Behçet's disease by microsatellite analysis of three different populations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(12):3702-8.
127. Ota M, Katsuyama Y, Kimura A i sur H. A second susceptibility gene for developing rheumatoid arthritis in the human MHC is localized within a 70-kb interval telomeric of the TNF genes in the HLA class III region. *Genomics* 2001;71(3):263-70.
128. Li S, Kawata H, Katsuyama Y i sur. Association of polymorphic MHC microsatellites with GvHD, survival, and leukemia relapse in unrelated hematopoietic stem cell transplant donor/recipient pairs matched at five HLA loci. *Tissue Antigens* 2004;63:362-8.
129. Hanifi Moghaddam P, Zwinderman A, Kazemi M i sur. D6STNFA microsatellite locus correlates with CTLp frequency in unrelated bone marrow donor-recipient pairs. *Hum Immunol* 1998;59(5):295-301.
130. Tay GK, Witt CS, Christiansen FT i sur. Matching for MHC haplotypes results in improved survival following unrelated bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1995;15(3):381-5.
131. Grubić Z, Žunec R, Čečuk-jeličić E, Kerhin-Brkljačić V, Kaštelan A. Polymorphism of HLA-A, -B, -DRB1, -DQA1 and -DQB1 haplotypes in a Croatian population. *Eur J Immunogenet* 2000;27:47-51.

132. Middleton PG, Taylor PR, Jackson G, Proctor SJ, Dickinson AM. Cytokine gene polymorphisms associating with severe acute graft-versus-host disease in HLA-identical sibling transplants. *Blood* 1998;92:3943-8.
133. Dickinson AM, Cavet J, Cullup H, Wang XN, Sviland L, Middleton PG. GvHD risk assessment in hematopoietic stem cell transplantation: role of cytokine gene polymorphism and an *in vitro* human skin explant model. *Hum Immunol* 2001;62:1266-76.
134. Bettens F, Passweg J, Gratwohl A i sur. Association of TNF α and IL-10 polymorphism with mortality in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation* 2006;81(9):1261-7.
135. Pociot F, Briant L, Jongeneel CV i sur. Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF- α and TNF- β by human molecular cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol* 1993;23:223-31
136. Cavet J, Middleton PG, Segall M, Noreen H, Davies SM, Dickinson AM. Recipient tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms associate with early mortality and acute graft-versus-host disease severity in HLA-matched sibling bone marrow transplantation. *Blood* 1999;94:3941-6.

8. POPIS KRATICA

AA	aplastična anemija (engl. Aplastic Anemia)
ALL	akutna limfocitna leukemija (engl. Acute Lymphoblastic Leukemia)
AML	akutna mijeloična leukemija (engl. Acute Myeloid Leukemia)
APC	antigen prezentirajuća stanica (engl. Antigen Presenting Cell)
ARMS	amplifikacijski refraktorni mutacijski sustav (engl. Amplification Refractory Mutation System)
BMDW	Svjetski registar dobrovoljnih davateljakoštane srži (ENGL. Bone Marrow Donors Worldwide)
CLL	kronična limfocitna leukemija (engl. Chronic Lymphocytic Leukemia)
CML	kronična mijeloična leukemija (engl. Chronic Myelogenous Leukemia)
CTL	citotoksični limfocit T
DC	dendritička stanica
DK	djelomični kimerizam
DLI	infuzija limfocita davatelja (engl. Donor Lymphocyte Infusion)
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
dNTP	deoksiribonukleozid-trifosfat
FISH	fluorescentna in situ hibridizacija (engl. Fluorescent In Situ Hybridization)
G-CSF	čimbenik rasta kolonije granulocita (engl. Granulocyte Colony Stimulating Factor)
GvHD	reakcija transplantata protiv primatelja (engl. Graft-versus-Host Disease)
GvL	učinak transplantata protiv tumora (engl. Graft-versus-Leukemia)
H	očekivana heterozigotnost
HL	Hodgkinova bolest (engl. Hodgkin lymphoma)
HLA	glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. Human Leukocyte Antigen)
HSC	hematopoetska matična stanica

HSCT	transplantacija hematopoetskih matičnih stanica (engl. Hematopoietic Stem Cell Transplantation)
HUMARA	gen za androgeni receptor koji se nalazi na kromosomu X (engl. Human Androgen Receptor)
HUMF13A01	mikrosatelit unutar gena za podjedinicu A koagulacijskog čimbenika XIII (engl. Human coagulation Factor XIII A subunit gene)
HUMFES/FPS	mikrosatelit unutar protoonkogeni FES/FPS (engl. Human c-FES/FPS proto-oncogene)
HUMTH01	mikrosatelit unutar gena za tirozin hidroksilazu (engl. Human Tyrosine Hydroxylase gene)
HUMVWA31	mikrosatelit unutar gena za von Willebrand-ov čimbenik (engl. Human von Willebrand Factor gene)
iDC	nezrela dendritička stanica
IFN γ	interferon γ
IHW	Međunarodna radionica o tkivnoj podudarnosti (engl. International Histocompatibility Workshop)
IL-1	interleukin 1
IL-10	interleukin 10
IPA-REISD	obrada slike - in situ digestija restrikcijske endonukleaze (engl. Image Processing and Restriction Endonuclease In Situ Digestion)
ISFG	Međunarodno društvo za forenzičnu genetiku (engl. International Society for Forensic Genetics)
KIR	inhibicijski receptor stanica NK (engl. Killer Inhibitory Receptor)
LD	neravnoteža udruživanja (engl. Linkage Disequilibrium)
Ly T	limfocit T
M	muškarac

mDC	zrela dendritička stanica
MDS	mijelodisplastični sindrom (engl. Myelodysplastic Syndrome)
MF	mijelofibroza
mHAg	slabi antigeni tkivne podudarnosti (engl. minor Histocompatibility Antigens)
MK	miješani kimerizam
MRD	minimalna ostatna bolest (engl. Minimal Residual Disease)
NHL	non-Hodgkinov limfom (engl. Non-Hodgkin lymphoma)
NK	stanice „prirodne ubojice“ (engl. Natural Killer)
OMS	osteomijeloskleroza
pb	parovi baza
PBSC	matične stanice dobivene iz periferne krvi (engl. Peripheral Blood Stem Cells)
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. Polymerase Chain Reaction)
PIC	razina polimorfizma (engl. Polymorphism Information Content)
PK	puni kimerizam
pMK	padajući miješani kimerizam
RFLP	polimorfizmi duljine restrikcijskog fragmenta (engl. Restriction Fragment Length Polymorphism)
rMK	rastući miješani kimerizam
RT-PCR	kvantitativni PCR u stvarnom vremenu (engl. Real-Time quantitative PCR)
SCID	teška kombinirana imunodeficijencija (engl. Severe Combined Immunodeficiency Disease)
sMK	stabilni miješani kimerizam
SNP	bialelni genski biljezi (engl. Single Nucleotide Polymorphism)
STR	kratka uzastopna ponavljanja (engl. Short Tandem Repeats)
TCR	T stanični receptor
TNF α	čimbenik nekroze tumora alfa (engl. Tumor Necrosis Factor alpha)

VNTR	varijabilni broj uzastopnih ponavljanja (engl. Variable Number of Tandem Repeats)
Ž	žena

9. SAŽETAK

Analiza mikrosatelita provedena je u svrhu ispitivanja njihove uloge u transplantaciji hematopoetskih matičnih stanica. Prvi dio istraživanja ispitivao je mogućnost primjene 10 lokusa non-HLA u razlikovanju stanica primatelja i davatelja za praćenje kimerizma nakon transplantacije. Drugi dio istraživanja obuhvatio je ispitivanje raznolikosti 13 mikrosatelita HLA, važnost njihove podudarnosti u paru primatelj/nesrodni davatelj za ishod transplantacije te njihovu ulogu u preživljavanju bolesnika koji su primili transplantat od srodnog davatelja. Istraživanje je obuhvatilo 150 zdravih, nesrodnih ispitanika i 120 ispitanika liječenih transplantacijom te njihove davatelje. Rezultati populacijskih istraživanja mikrosatelita non-HLA i mikrosatelita HLA nisu ukazali na statistički značajne razlike između hrvatske i evropskih populacija. Istraživanje je pokazalo da je analiza mikrosatelita non-HLA metoda izbora za određivanje kimerizma te da svi analizirani lokusi zadovoljavaju kriterije informativnosti za uključivanje u postupak praćenja kimerizma. Rezultati također upućuju da je analiza kimerizma važna za predviđanje ishoda transplantacije. Nije pronađena povezanost podudarnosti para primatelj/nesrodni davatelj s boljim ishodom transplantacije za niti jedan od analiziranih mikrosatelita HLA. Unutar parova primatelj/srodni davatelj uočen je utjecaj mikrosatelita TNFa na preživljavanje ispitanika nakon transplantacije. Zaključno, analiza mikrosatelita ima značajnu ulogu u poboljšanju ishoda transplantacije omogućujući pravodobne intervencije u liječenju te ukazujući na bolesnike s povećanim rizikom za razvoj komplikacija nakon transplantacije.

10. SUMMARY

Analysis of microsatellites was performed to evaluate their role in the hematopoietic stem cell transplantation program. The applicability in the distinguishing of recipient and donor cells during the chimerism following after transplantation was investigated for 10 non-HLA loci. Conversely, the importance of recipient/donor matching for 13 HLA microsatellites in the unrelated transplantation outcome and their role in survival of patients with related donor was investigated. The study included 150 healthy, unrelated subjects and 120 patients who underwent transplantation and their donors. Results of population studies of all microsatellites have not revealed any statistically significant difference between Croatian and other European populations. The investigation showed that non-HLA microsatellite analysis is a method of choice for chimerism determination; all analyzed non-HLA microsatellites satisfied informativeness criteria for this procedure. Furthermore, results indicated that chimerism status is important in transplantation outcome prediction. No correlation was found between a better transplantation outcome and recipient/donor matching for any of the tested HLA microsatellites, but an influence of the TNFa microsatellite on patient survival after transplantation was observed. In conclusion, the microsatellite analysis has an important role in transplantation outcome improvement by enabling timely treatment interventions and indicating patients with a higher risk for developing post-transplantation complications.

Naslov disertacije: THE ROLE OF THE MICROSATELLITE ANALYSIS RESULTS IN THE HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

Katarina Štingl

Godina obrane disertacije: 2009.g.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Katarina Štingl, dipl. ing. biologije

Datum i mjesto rođenja: 21. srpnja 1977. god, Sisak, Hrvatska

Naobrazba: 1991.-1995. Prirodoslovno-matematička gimnazija Velika Gorica
1995.-2000. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Biološki odsjek, smjer molekularna biologija
2004.- Doktorski studij: „Biomedicina i zdravstvo“ Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Radno mjesto: Znanstveni novak-asistent na Katedri za urologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu (Zavod za tipizaciju tkiva, KBC Zagreb) od 2001.g.

Članstva: Hrvatsko imunološko društvo
Hrvatsko društvo za humanu genetiku
European Federation for Immunogenetics

Prisustvovanja znanstvenim skupovima:
2001.-2008. 9 domaćih znanstvenih skupova (5 usmenih priopćenja, 4 postera)
10 međunarodnih znanstvenih skupova (10 postera)

Popis znanstvenih radova:
10 znanstvenih radova u časopisima indeksiranim u CC i SCI
5 znanstvenih radova u knjigama s međunarodnom recenzijom
3 znanstvena rada u časopisima indeksiranim u sekundarnim publikacijama
23 kongresna priopćenja u časopisima indeksiranim u CC i SCI