

# Ograničavajući faktori u alogeničnoj transplantaciji krvotvornih matičnih stanica

---

**Matić, Mia**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2023**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:745091>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-25**

*Repository / Repozitorij:*



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija  
SVEUČILIŠTE U SPLITU

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



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Mia Matic**

**OGRANIČAVAJUĆI FAKTORI U ALOGENIČNOJ  
TRANSPLANTACIJI KRVOTVORNIH MATIČNIH STANICA**

**Završni rad**

Split, 2023.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Mia Matić**

**OGRANIČAVAJUĆI FAKTORI U ALOGENIČNOJ  
TRANSPLANTACIJI KRVOTVORNIH MATIČNIH STANICA**

**LIMITING FACTORS IN HEMATOPOIETIC STEM CELL  
TRANSPLANTATION**

**Završni rad/Bachelor thesis**

Mentor:

**Doc.dr.sc. Esma Čečuk-Jeličić**

Split, 2023.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI  
RAD

Sveučilište u Splitu  
Sveučilišni odjel zdravstvenih studija  
Preddiplomski studij Medicinsko-laboratorijska dijagnostika

**Znanstveno područje:** Biomedicina i zdravstvo  
**Znanstveno polje:** Kliničke medicinske znanosti

**Mentor:** Doc.dr.sc. Esmā Čečuk-Jeličić

### Ograničavajući faktori u alogeničnoj transplantaciji krvotvornih matičnih stanica

Mia Matić, 0346011389:

#### Sažetak

**Cilj:** Cilj rada je bio ispitati i analizirati rezultate tipizacije HLA pacijentice i njene obitelji. Pacijentici koja je bolovala od teškog oblika akutne mijeloične leukemije (AML) utvrdili smo je li postoji HLA identičan srodnik kako bi mogla krenuti u postupak transplantacije.

**Materijal i metode:** Metode korištene u ovom završnom radu su: serološka metoda tj. test mikrolimfocitotoksičnosti i metode molekularne biologije PCR - SSP i PCR– SSO metode.

**Rezultati:** Razvojem metoda u medicini i biologiji, povećava se osjetljivost i točnost rezultata. Samim time pacijentu je moguće pružiti više opcija liječenja. TKMS postale su rutinske operacije i čest izbor u liječenju mnogih bolesti.

**Zaključak:** Najvažnija stavka prije provedbe transplantacije krvotvornih matičnih stanica je pronalazak odgovarajućeg donora, kako bi liječenje oboljelih od malignih i nemalighnih bolesti završilo što uspješnije.

**Ključne riječi:** Transplantacija krvotvornih matičnih stanica, HLA, PCR-SSP, PCR-SSO, srodni davatelj, nesrodni davatelj.

**Rad sadrži:** 41 stranica, 20 slika i 23 referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav povjerenstva za obranu:

1. Doc.dr.sc. Daniela Šupe-Domić
2. Doc.dr.sc. Esmā Čečuk-Jeličić
3. Mag. Mirela Zec

**Datum obrane:** 14. rujna 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

**University of Split**  
**University Department of Health Studies**  
**Bachelor Study of Medical laboratory diagnostics**

**Scientific area:** Biomedicine and health  
**Scientific field:** Clinical medical sciences

**Supervisor:** Doc.dr.sc. Esma Čečuk-Jeličić

### Limiting factors in hematopoietic stem cell transplantation

Mia Matić, 0346011389:

#### Summary

**Objectives:** The objective of the paper was to analyze the results of the HLA typing of the patient and her family. For a patient who suffered from a severe form of acute myeloid leukemia (AML), treated at the Department of Hematology of the Split Clinical Hospital Center, we determined whether there was an HLA-identical relative so that she could start the transplantation procedure.

**Material and methods:** The methods used in this final work are: serological method and molecular biology method PCR-SSO.

**Results:** By developing all the methods used in this system of treatment and typing, by determining the genes and antigens of the system, the success rate of hematopoietic stem cell transplantation has increased. With the discovery of the HLA system, hematopoietic stem cell transplantation is a choice in the treatment of many hematological diseases.

**Conclusion:** The most important step before carrying out the transplantation of hematopoietic stem cells is finding a suitable donor, so that the treatment of patients with malignant and non-malignant diseases ends as successfully as possible.

**Key words:** Transplantation of hematopoietic stem cells, HLA, PCR-SSP, PCR-SSO, related and unrelated donors.

**Thesis contains:** 41 pages, 20 figures and 23 references

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

1. Doc.dr.sc. Daniela Šupe-Domić
2. Doc.dr.sc. Esma Čečuk-Jeličić
3. Mag. Mirela Zec

**Defense date:** 14<sup>th</sup> September 2023.

## **POPIS KRATICA**

**AML-** akutna mijeloična leukemija

**CDC-** citotoksičnost ovisna o komplementu

**DDKMS** – Registar Dobrovoljnih Darivatelja Krvotvorni Matičnih Stanica

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

**GvHD** – *Graft versus Host Disease*

**GvL-** *Graft versus Leukemia*

**HLA-** *Human Leukocyte Antigen*

**HMS** – hematopoetske matične stanice

**KMS-** krvotvorne matične stanice

**MHC-** *Major Histocompatibility Complex*

**MLCT-** test mikrolimfocitotoksičnosti

**MMS** – mezenhimske matične stanice

**PCR-** *Polymerase chain reaction*

**PCR-SSO-** *Polymerase chain reaction- Sequence Specific Oligonukleotides*

**PCR-SSP-** *Polymerase chain reaction- Sequence Specific Primer*

**TKMS-** transplantacija krvotvornih matičnih stanica

# SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1.	Krvotvorne matične stanice .....	3
1.2.	Koštana srž.....	5
1.3.	Krvotvorne matične stanice iz periferne krvi.....	5
1.3.1.	Krvotvorne matične stanice iz koštane srži .....	6
1.3.2.	Krvotvorne matične stanice iz pupkovine.....	7
1.4.	Glavni sustav tkivne snošljivosti .....	7
1.4.1.	Sustav HLA.....	8
1.5.	Građa i funkcija HLA molekula .....	9
1.5.1.	HLA razred I .....	9
1.5.2.	HLA razred II.....	11
1.6.	Obilježja sustava HLA.....	12
1.7.	Transplantacija krvotvornih matičnih stanica .....	14
1.7.1.	Osobitosti transplantacije krvotvornih matičnih stanica.....	14
1.7.1.1.	Ograničavajući faktori u transplantaciji.....	15
1.8.	Davatelji krvotvornih matičnih stanica.....	15
1.8.1.	Hrvatski registar dobrovoljnih darivatelja krvotvornih matičnih stanica .....	16
2.	CILJ RADA .....	18
3.	MATERIJALI I METODE.....	19
3.1.	ISPITANICI.....	19
3.2.	METODE.....	19
3.2.1.	Serološka metoda.....	19

3.2.2. Izolacija DNA .....	22
3.2.3. Molekularne metode .....	23
3.2.4. Molekularna metoda: PCR-SSO .....	24
4. REZULTATI.....	28
5. RASPRAVA.....	30
ZAKLJUČAK.....	31
LITERATURA .....	32
ŽIVOTOPIS.....	34



# 1. UVOD

Sredinom prošlog stoljeća transplantacija krvotvornih matičnih stanica (TKMS) bila je zadnji pokušaj liječenja bolesnika u posljednjoj fazi zloćudnih bolesti. Danas TKMS više nije eksperimentalni oblik liječenja, nego se koristi kao rutinski zahvat u liječenju hematoloških, imunoloških i onkoloških pacijenata. Kod alogenične transplantacije se bolesne i manje vrijedne krvotvorne matične stanice (KMS) zamjenjuju zdravim stanicama donora. Kod autologne TKMS pacijent sam sebi osigurava KMS te se tako skraćuje period aplazije i osigura brži oporavak. No, nisu svi pacijenti prikladni za postupak transplantacije, a o tome ovisi stadij bolesti, opće stanje pacijenta kao i pronalazak darivatelja. Ovom medicinskom metodom moguće je liječiti maligne i nemaligne bolesti. U 75% slučajeva radi se o malignim bolestima kao što su limfoblastična leukemija, non-Hodgkinovi limfomi i akutne mijeloične leukemije. Rjeđe se ovim zahvatima liječe maligne bolesti, kao što su: aplastična anemija, talasemija i sindromi imunodeficiencije. (2,4,20)

Još pedesetih godina prošlog stoljeća izvodili su se prvi eksperimenti transplantacije na životinjskim vrstama. Američki pedijatar, dr. E. Donall Thomas je izveo prvu uspješnu transplantaciju kod blizanaca koji su bolovali od limfoblastične leukemije. Pacijenti su bili ozračeni letalnim dozama. (20)

S obzirom na porijeklo KMS razlikuju se:

1. Alogenična transplantacija (davatelj i primatelj su najčešće osobe u krvnom srodstvu)
2. Singenična transplantacija (davatelj i primatelj su jednojajčani blizanci)
3. Autologna transplantacija (primatelj je sam sebi davatelj)
4. Ksenogena transplantacija (davatelj i primatelj su jedinke različitih životinjskih vrsta, ovaj oblik se koristi samo u istraživačke svrhe)

Kod liječenja bolesnika imunosupresivnim lijekovima i citostaticima uništavaju se zloćudne stanice kao i imunološki sustav primatelja. Presađivanjem KMS se zatim nadomjesti hematopoetski i imunološki sustav pacijenta. Tri su izvora KMS-a: koštana srž, krvi iz pupkovine i stanice periferne krvi. Kod liječenja s autolognom TKMS se pacijentu, procesom citofereze, separiraju stanice periferne krvi. Izdvojena krv se zamrzava na određeno vrijeme, dok bolesnik ne završi liječenje kemoterapijom, nakon čega mu se odmrznute KMS vraćaju kako bi ponovo uspostavile funkciju krvotvornog sustava. Kod alogenične transplantacije glavno pitanje je podudarnost darivatelja i primatelja. Prvo se odrede HLA geni i antigeni krvnih srodnika bolesnika (brat ili sestra). Nerijetko može doći do smrtonosnih komplikacija kakva je GvHD (engl. Graft versus host disease) u kojoj dolazi do odbacivanja presatka zbog imunološkog sustava. (1,3,5)

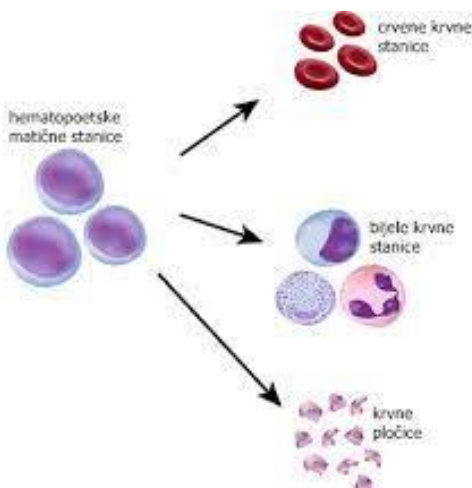
Matične stanice imaju sposobnost diferencijacije u odraslom ljudskom organizmu. Svakog dana tijelo gubi veliku količinu stanica, a taj se broj nadomješta regeneracijom ili diobom stanica iste funkcije. Izvorno su regenerativne i obnavljaju oštećena tkiva u organizmu što ih čini jedinstvenima u medicini. Osim regenerativne funkcije još su mlade, moćne i jedinstvene. Same ne vrše nikakvu određenu zadaću, no imaju sposobnost pretvaranja (diferencijacije) u djelatne stanice. (8)

## 1.1. Krvotvorne matične stanice

Osnovna karakteristika KMS je njihova sposobnost samoobnove, diferencijacije i proliferacije. Morfološki podsjećaju na limfocite. (Slika 1.). Nakon oplodnje razvijaju se totipotentne stanice, a njihovi potomci se nazivaju embrijske stanice. Embrijske matične grade tkiva odraslog čovjeka. Njihova karakteristika je mogućnost razvijanja u 200 različitih tipova stanica. Nakon pluripotentnih, slijede multipotentne matične stanice. Nalaze se kod odraslih osoba većinom u stanju mirovanja, a ukoliko dođe do ozljede tkiva one se pokrenu i nadopune populaciju stanica. KMS je prototip multipotentne matične stanice koja je ishodišna stanica za nastanak svih stanica krve loze. Moguća je diferencijacija u prekursore mijeloidne loze, a iz njih nastaju eritrociti, granulociti i trombociti. Također, moguća je diferencijacija u prekursore limfoidne loze iz koje nastaju T- i B- limfociti te NK stanice. (4,21)

U koštanoj srži jako malo prostora zauzimaju matične stanice, svega 0,003%, a do nedavno se mislilo da je to jedini izvor KMS. Nakon otkrivanja čimbenika rasta omogućilo se mobiliziranje KMS, a ta spoznaja omogućila je lakši način uzorkovanja KMS. Zahvaljujući jednostavnosti, uzorkovanje iz periferne krvi postaje najčešće korišten način. Termin „transplantacija koštane srži“ zamjenjuje se terminom „transplantacija krvotvornih matičnih stanica“. Nedugo nakon toga, shvatilo se da krv iz pupkovine sadrži dovoljan broj vrijednih stanica za uspješnu transplantaciju kod djece. Ubrzo su se počele osnivati banke krvi po cijelom svijetu. (17)

Krvotvorne matične stanice proizvode stanice hematopoetske loze tijekom cijelog života, a nalaze se u specijaliziranom mikrookolišu zvanom “niša” u koštanoj srži. Ono što ih čini izuzetno važnim je to što nisu predodređene za jednu funkciju već služe kao izvor za nastanak svih vrsta krvnih stanica kod čovjeka. (2,3)



**Slika 1.** Krvotvorne matične stanice

(Preuzeto i prilagođeno iz <http://www.innovationsstemcellcenter.com/>)

Procesom diferencijacije pluripotentna matična stanica se diferencira u limfatičke multipotentne i mijeloidne multipotentne stanice. Iz limfatičke loze nastati će limfoblasti, a potom limfociti, dok će iz mijeloidne loze nastati megakariociti, granulociti, monociti i eritrociti. Proliferacijom i sazrijevanjem nastaju krvne stanice koje se morfološki razlikuju i obavljaju određenu funkciju. Proliferacijska sposobnost je jako izražena, a to govori i podatak da iz jedne stanice nastane milijun zrelih stanica tijekom 20 dioba. (7)

KMS se dijele na:

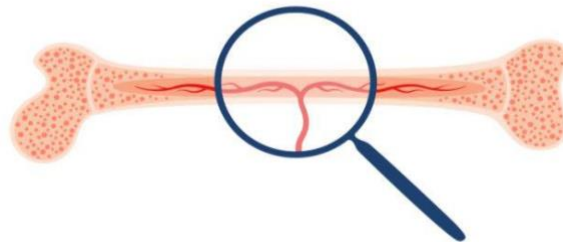
1. Mezenhimske matične stanice (MMS)
2. Hematopoetske matične stanice (HMS)

*Mezenhimske matične stanice (MMS)* vrše proizvodnju stanica koje sudjeluju u međustaničnim interakcijama i stvaraju čimbenike rasta te proteine matriksa koji sudjeluju u regulaciji hematopoeze i čine stromu krvnih stanica. (8)

*Hematopoetske matične stanice (HMS)* su izvorne stanice za nastanak krvnih stanica. Diferencijacija se vrši u eritrocite, koje imaju funkciju prijenosa kisika, leukocite, koje imaju jednu od najvažnijih funkcija u imunološkom sustavu organizma i trombocite koji imaju funkciju u zgrušavanju krvi. (8)

## 1.2. Koštana srž

Hematopoeza je neprekidan i složen proces nastajanja krvnih elemenata koji se odvija tijekom cijelog života. Počinje već u trećem tjednu embrionalnog razvoja. S obzirom da u drugom mjesecu razvoja započinje okoštavanje kostiju, koštana srž postupno preuzima ulogu proizvodnje krvnih stanica. Koštanu srž čine dvije vrste: crvena i žuta koštana srž. U crvenoj koštanoj srži nastaju eritrociti, leukociti i trombociti, a to su područja plosnatih kostiju kao što su: kosti prsnog koša, rebra, ključna kosti, kosti zdjelice i lubanje. Žuta koštana srž dobila je naziv po brojnim stanicama masnog tkiva, a u njoj nastaju isključivo bijele krvne stanice. To su područja cjevastih kostiju. (Slika 2.) (10)



**Slika 2.** Koštana srž. Presjek.  
(Dostupno:<https://hr.izzi.digital/DOS/112275/119813.html>)

## 1.3. Krvotvorne matične stanice iz periferne krvi

Sve češći je način prikupljanja KMS-a iz periferne krvi uz pomoć staničnog separatora procesom afereze. Taj proces omogućuje razdvajanje krvnih komponenti, tako što se crvena krvna zrnca i plazma vraćaju ponovno u krvotok pacijenta, a sakupljaju se leukociti i trombociti koji su neophodni za liječenje pacijenta. Budući da u periferiji imamo manji broj krvotvornih matičnih stanica, potrebno je uzimati čimbenike rasta G-CSF (engl. *Granulocyte Colony Stimulating Factor*), koji stimuliraju prelazak KMS iz područja koštane srži, gdje je najveća koncentracija, u perifernu krv. U tom slučaju najčešće koristimo filgrastim ili mijelosupresivnu kemoterapiju. Kod autologne transplantacije krvotvornih matičnih stanica, neophodan je rad na protočnoj citometriji. (Slika 3) (5,6)



**Slika 3.** Rad na protočnom citometru.

(Dostupno: <https://kbc-rijeka.hr>)

Protočna citometrija je metoda kojom se mjeri broj CD34+ iz frakcije limfocita i monocita, a govori o količini prikupljenih stanica u uzorku. Taj uređaj, koji u isto vrijeme mjeri više parametara određujući veličinu i granuliranosti čestica, olakšava identifikaciju stanice. Pripravak KMS prikupljen iz periferne krvi smatra se dostatnim za transplantaciju ako ima više od  $3,5 \times 10^6$  / kgTT CD34+ stanica. Mnogi čimbenici utječu na broju CD34+ u perifernoj krvi, a to su: prethodno zračenje, broj ciklusa kemoterapije te mijelotoksični lijekovi. Kod loših mobilizatora moguće je ponoviti mobilizaciju, provoditi leukaferazu velikog volumena ili koristiti nove mobilizirajuće agense. Neke od nuspojava su: bol u kostima, glavobolja, mialgije, umor, vazovagalna reakcija, povišena tjelesna temperatura, no nuspojave se ne pojavljuju često. (5)

### **1.3.1. Krvotvorne matične stanice iz koštane srži**

Sakupljanje KMS iz koštane srži obavlja se u operacijskoj dvorani pod djelovanjem anestezije. Liječnici iglom većeg promjera višekratno aspiriraju koštanu srž iz zdjelične kosti. Prikupljeni uzorak koštane srži se očisti od krvi i uklanjaju se zaostali koštani fragmenti. Postupak traje sat vremena, poprilično je bolan i nosi određene nuspojave i rizike od kojih se pacijenti najčešće žale na bol oko mjesta punkcije koja traje i do tjedan dana. Rjeđe komplikacije koje mogu nastati uključuju infekcije, krvarenja, oštećenje živaca te posljedice anestezije. Neki davatelji razviju anemiju te samim time oporavak može trajati do 4 tjedna, ovisno o imunološkom stanju pacijenta. Ovom metodom uzorkovanja dobije se manji broj stanica nego prikupljanjem iz periferne krvi. (4,10)

### **1.3.2. Krvotvorne matične stanice iz pupkovine**

Umbilikalna krv podrazumijeva ostatke krvi u malim krvnim žilama posteljice i pupčane vrpce nakon poroda. Potrebno je prikupiti umbilikalnu krv odmah nakon rođenja djeteta. Broj sakupljenih stanica je uvijek mali, no to ne mijenja činjenicu da su stanice umbilikalne krvi visoko vrijedne stanice. Ovaj način prikupljanja je najbrži jer traje od 5 do 15 minuta, a osim toga je potpuno bezbolan i bezopasan za majku i dijete. Svaki mililitar koji se prikupi je značajan kako bi se na kraju dobio volumen od 75 do 100 mL. Stanice se pohranjuju u roku 48h u posebne spremnike s tekućim dušikom na -196 C. Prikupljanje iz pupkovini alternativni je izvor KMS-a koja je u početku bila ograničena samo na djecu zbog malog volumena preostale krvi u pupkovini. (2, 3)

U Hrvatskoj postoji privatna banka umbilikalne krvi „Ana Rukavina“, koja djeluju u sklopu KBC Rebro. Važno je istaknuti da stručnjaci iz Hrvatske uspješno prate najnovija dostignuća iz polja medicine pa tako i područja transplantacije tkiva i organa. 2023. godine se obilježila 40. godišnjica od prve transplatacije krvotvornih matičnih stanica sa genotipski identičnog srodnika. Prvu transplantaciju KMS su izveli prof dr.sc. Boris Labar, prim dr. Vinko Bogdanić sa svojim timom na KBC Rebro Zagreb ina taj način hrvatsku transplantacijsku medicine postavii u sam europski vrh. Zagrebu. Hrvatska je bila prva država na ovim prostorima koja je uspješno izvršila prvu transplantaciju krvotvornih matičnih stanica davne 1983. godine. Prije izvođenja same transplantacije je prethodilo određivanje antigena sustava HLA pacijenta I svih članova obitelji. (2,6)

### **1.4. Glavni sustav tkivne snošljivosti**

Glavni sustav tkivne snošljivosti ili histokompatibilnosti skup je lokusa koji kodiraju bjelančevine. Glavna uloga je omogućiti predočavanje stranog antigena stanicama vlastitog imunološkog sustava. Geni ovog sustava se nikada tijekom života ne mijenjaju. (6)

### 1.4.1. Sustav HLA

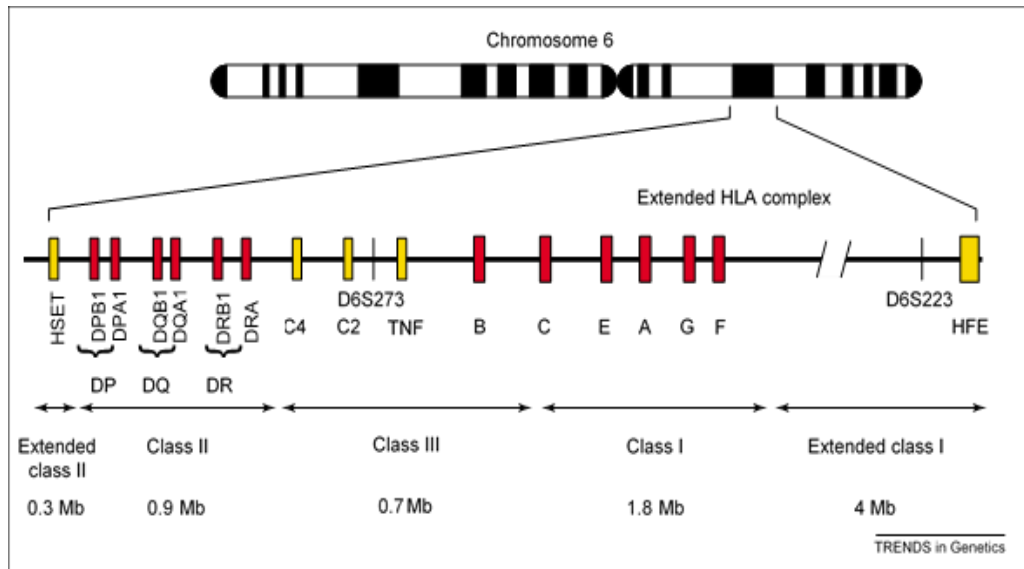
Postupkom mapiranja se dokazalo da se geni ovog sustava nalaze na šestom kromosomu, točnije na kraćem kraku, a to se označava kao 6p21. Daljnjim istraživanjem saznalo se da zauzimaju oko 1% čitavog ljudskog genoma, a to otprilike čini četiri milijuna parova baza. Sustav HLA je najpolimorfiji sustav, te zbog lakšeg shvaćanja podijeljen u tri razreda: HLA I razred, HLA II razred, HLA III razred. Svaki od njih razlikuje se po broju i smještaju gena na kromosomu. (Slika 4) (1,6,23)

HLA je najviše istraživani sustav kod čovjeka zbog najvećeg broja otkrivenih lokusa i alela zadnjih desetljeća. Znanstvenici J. Dausset, J. van Rood i R. Payne su 1958. uočili do tada nepoznata protutijela u krvnim uzorcima višerotkinja i politransfundiranih pacijenata. Ubrzo nakon otkrivanja HLA antigena, pronađeni su i drugi antigeni. Tijekom istraživanja i mapiranja ljudskog genoma (1990.-2003.) HLA regija je prva sekvencirana. Uloga molekula HLA je prvenstveno regulacija imunološkog sustava, odnosno predočavanje vlastitih i stranih peptidnih antigena limfocitima. (22)

Prvi otkriveni lokusu dobili su imena HLA-A i HLA-B, a antigeni određenog lokusa su se označavali brojevima kao na primjer HLA-A1. Pomoću novih testova dokazalo se postojanje novih antigena HLA koji su onda nazvani HLA-D. Zbog velike podudarnosti u stupnji proliferacije limfocita T otkrili su se novi antigeni koji se zovu HLA-DR (D-related). (3)

Geni HLA razreda I smješteni su na telomeričnom kraju kratkog kraka, obuhvaćaju klasične gene odnosno HLA-A, -B i -C i stvaraju produkte, odnosno antigene. Ti produkti, koji su izraženi na površini tjelesnih stanica, su odgovorni za sintezu transplantacijskih antigena. U neklasične gene ubrajamo: HLA-E, -F i -G, a oni su slabijeg polimorfizma. Ovoj genskoj regiji pripadaju i: MICA, MICB, MICC, MICD, MICE. Na centromeričnom kraju nalazi se regija HLA II, a ona sadržava gene koji kodiraju HLA-D molekule. Regija je podijeljena na 6 podregija: HLA-DM, -DN, -DO (one su dio procesa formiranja antigen-predočnih molekula), -DR, -DP, DQ (one kodiraju molekule koje se ispoljavaju na membrani). U središnjem dijelu kromosoma nalazi se regija HLA III sačinjena od 75 gena. Geni koji se tu nalaze su na primjer: enzim 21-hidroksilaza, TNF- $\alpha$  i TNF- $\beta$ . (6)





**Slika 4.** Smještaj lokusa HLA na kraćem kraku kromosoma 6

(Izvor: [https://www.cell.com/trends/genetics/abstract/S0168-9525\(00\)02180-6](https://www.cell.com/trends/genetics/abstract/S0168-9525(00)02180-6) code=cell-site)

## 1.5. Građa i funkcija HLA molekula

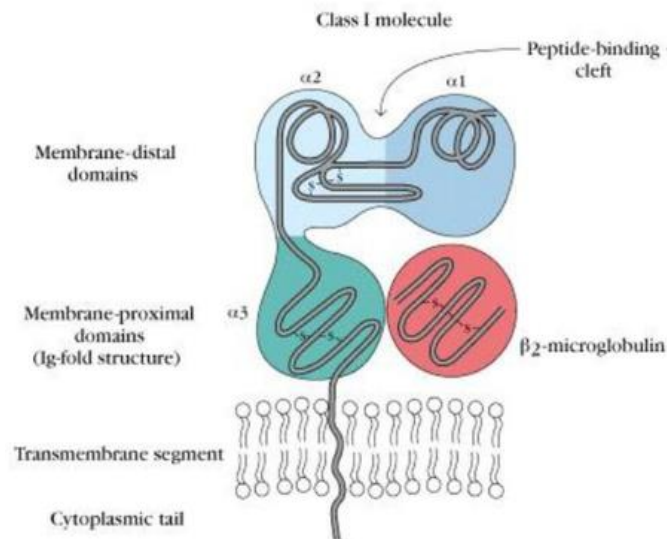
Po svojoj kemijskoj strukturi HLA molekule su glikoproteini, a pronađeni su na svim stanicama koje imaju jezgru te na trombocitima. Neke su stanice siromašnije ovim antigenima, zovemo ih imunološki privilegirana tkiva, kao što su stanice središnjeg živčanog sustava. (6)

### 1.5.1. HLA razred I

HLA razreda I čini 18 gena, a nalaze se na području koje zauzima otprilike 2 megabaze. Zauzima područje tri lokusa: klasični geni ovog razreda: HLA-A, HLA-B, HLA-C, neklasični: HLA-E HLA-F, HLA-G te pseudogene.

Strukturno se molekule sastoje od dva polipeptidna lanca, teškog i lakog povezanih kovalentnom vezom. Laki lanac se proteže i kroz unutarnji i vanjski dio te se dijeli u tri dijela: citoplazmatski, transmembranski i ekstracelularni. Izvanstanični tj. ekstracelularni dio ima tri domene  $\alpha 1, \alpha 2$  i  $\alpha 3$ . Domene  $\alpha$  i  $\beta$  tvore pukotinu za vezanje malih peptida veličine do 10 aminokiselina, većinom virusni i tumorski antigeni. Ovaj dio molekule može

vezati mnogo različitih antigena i samim time povećava polimorfnost cijelog sustava. Teški lanac je 2 mikroglobulin čija je funkcija isključivo učvršćivanje molekule za podlogu. (Slika 5.) (22)



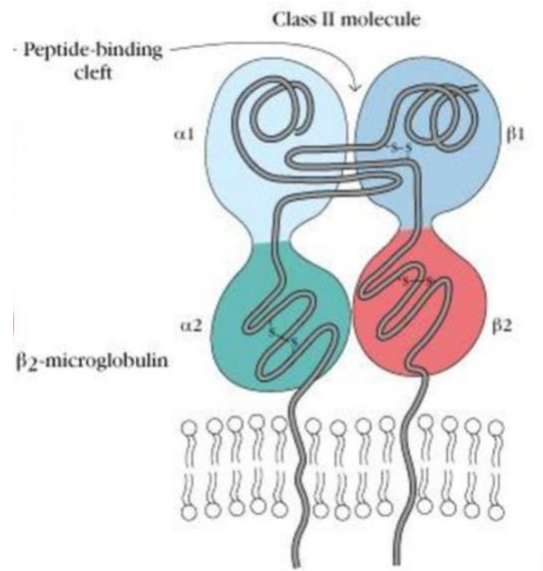
**Slika 5.** Prikaz strukture HLA razreda I  
(Izvor: Kindt, Kuby Immunology) (17)

Pomoću prijenosnih molekula TAP1 i TAP2, peptidi dopijevaju u endoplazmatsku mrežicu gdje se vežu za molekulu HLA te se egzocitozom zajedno ekspimiraju na površini stanice. Citotoksični T limfociti (CD8+) svojim receptorima prepoznaju kompleks antigen-HLA I molekula. (16)

### 1.5.2. HLA razred II

Ovaj razred antigena organiziran je u više subregija: HLA-DM, HLA-DO, HLA-DN, HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR. Molekule su građene od  $\alpha$  i  $\beta$  lanca koji su povezani nekovalentnim vezama. Sačinjena je od četiri regije od kojih svaka ima svoju ulogu (Slika 6.).

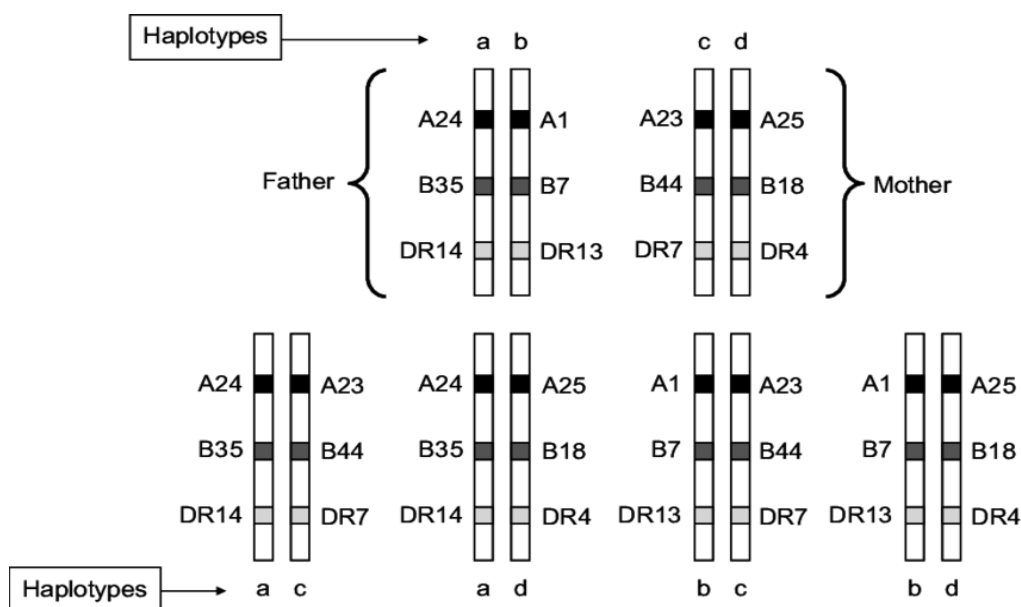
Domena  $\alpha$  i  $\beta$  grade vezno mjesto za antigen i pokazuju visoki stupanj varijabilnosti, za razliku od HLA razreda I mogu vezati i antigene veličine 30 aminokiselina.  $\alpha$  i  $\beta$  domena je nepromjenjiva i slična imunoglobulinu, dok je transmembranski hidrofobni dio kompleksa. Četvrta regija je intracelularna i veže molekulu za citoskelet. (6)



**Slika 6.** Prikaz strukture HLA razreda II  
(Izvor: Kindt, Kuby Immunology) (17)

## 1.6. Obilježja sustava HLA

Zahvaljujući otkrivanju uloga sustava HLA u ljudskom organizmu, svakodnevno se bilježi značajni napredak na polju transplantacijske medicine, antropologije i forenzike. Haplotipom se naziva kombinacija alela na određenom lokusu na kromosomu. Nakon oplodnje spajaju se roditeljske gamete, a dijete dobije jedan haplotip od oca i jedan haplotid od majke. Ti haplotipovi se na staničnoj membrani izražavaju kodominantno te čine genotip. Mogućnost da će dvoje djece biti genotipski identični iznosi 25%, također 25% iznosi šansa da neće dijeliti niti jedan haplotid, a mogućnost da budu haploidentični iznosi 50%. (Slika 7.) (22)

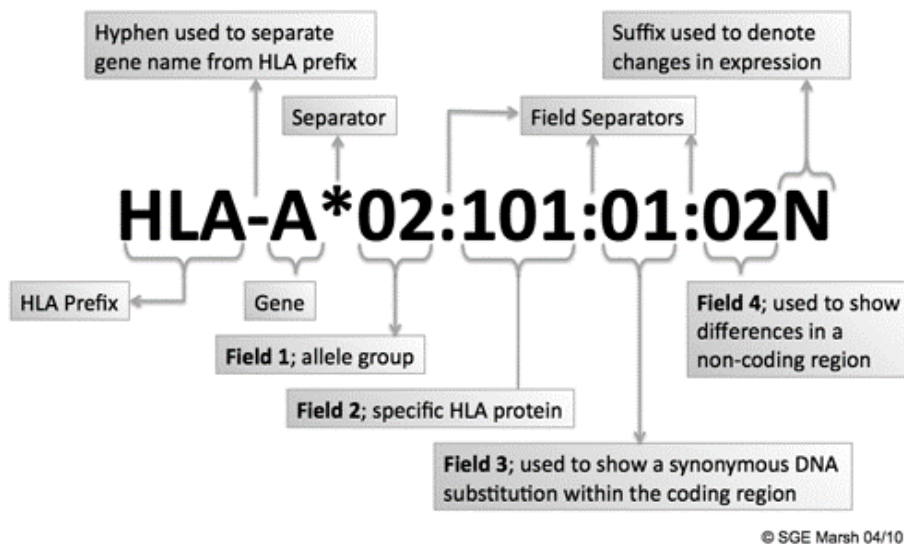


**Slika 7.** Nasljeđivanje haplotipova HLA

(izvor: researchgate.net)

Kod nasljeđivanja haplotipova može doći do nepravilnosti zbog izmjene dijelova kromatida. Razlog tome je rekombinacija u profazi mejotske diobe. No, rekombinacija među HLA genima nema veliki doprinos u varijabilnosti sustava. Osim toga, neki haplotipovi se češće pronađu u nekim populacijama, što se naziva neravnotežom udruživanja. Primjer toga je HLA-A1 koji je češći kod bijele rase nego kod ostalih. Sljedeća značajka ovog sustava je polimorfizam. Danas znamo da je ovaj sustav najpolimorfniji, a to je rezultat svih mutacija i rekombinacija tijekom povijesti. Četvrto svojstvo je poligenija, što znači da postoji više različitih

genas sa sličnim funkcijama. Zahvaljujući svim navedenim obilježjima danas se ove metode koriste za dokazivanje očitstva kao i pri identifikacije osoba. (6,23)



**Slika 8.** Nomenklatura HLA sustava

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

Geni koji vrše kodiranje HLA molekule su visoko polimorfni i potrebno je izvršiti sustavnu nomenklaturu. Sustavno geni vrše kodiranje proteina imunološkog sustava i to je još jedan veliki razlog nomenklature istih. Osnovan je Odbor za nomenklaturu koji je imao odgovornost imenovanja novih HLA gena, sekvenci alela i kontrola njihove kvalitete. Znamenke prije dvotočke opisuju tip alela i on često odgovara serološkom antigenu. Naredne znamenke, označuju podtipove, a brojevi se dodjeljuju redosljedom kojim su DNA sekvence otkrivene. Sufiksi koji se nalaze uz broj alela označavaju status ekspresije. Postoje aleli koji se ne izražavaju, a to su N-null aleli, dok se aleli za koje se pokazalo da se alternativno izražavaju mogu imati sufiks L, S, C, A ili Q. Sufiks L- Low znači da ima na površini stanice u usporedbi s normalnim razinama; S- specificira protein koji se izražava kao topljiva izlučena molekula, C- dodijeljen je alelima koji proizvode proteine koji su prisutni u citoplazmi a ne na površini stanice; Q- upitana je ekspresija. (Slika 8) (7,11,18).

## 1.7. Transplantacija krvotvornih matičnih stanica

### 1.7.1. Osobitosti transplantacije krvotvornih matičnih stanica

Nakon liječenja kemoterapijom ili radioterapijom, koje štetno djeluju na krvotvorni sustav, potrebno je nadoknaditi broj izgubljenih stanica. Presađivanje se temelji na uzimanju zdravih stanica te naknadna reinfuzija pacijentu. Transplantacijom krvotvornih matičnih stanica zamjenjuje se krvotvorno tkivo primatelja, tkivom darivatelja.

Razlikuju se dvije vrste transplantacije KMS:

1. *Autologna transplantacija* kod koje su primatelj i davatelj krvi ista osoba. Ova vrsta transplantacije koristi zdrave matične stanice pacijenta koje se čuvaju dok se pacijent liječi. Prednost ovog postupka je da nepostojanje inkompatibilnosti između stanica primatelja i darivatelja. Samo u slučajevima kada pacijent ima odgovarajući broj zrelih stanica koštane srži je moguće izvoditi ovaj oblik transplantacije. Pacijentu se prije liječenja, koje oštećuje koštanu srž, izvade i zamrznu matične stanice sve dok se ne završi s liječenjem. Infuzijom se vraćaju u krvotok i tako se izbjegava utjecaj kemoterapije na krvotvorni sustav.
2. *Alogenična transplantacija* je vrsta transplantacije kod koje je darivatelj tkivno podudaran krvni srodnik, brat ili sestra. Davatelj je HLA identičan srodni davatelj hematopoetskih matičnih stanica. Ovim oblikom liječenja se pokušava postići učinak GvL (eng. Graft versus Leukemia) koji se još naziva učinak presatka protiv tumora. U toj reakciji imunokompetentne stanice davatelja prepoznaju antigene na tumoru i imaju mogućnost direktno na njih djelovati. Prije transplantacije primatelj mora proći fazu kondicioniranja koja ovisi o vrsti bolesti, dobi bolesnika, i izvoru davateljevih matičnih stanica. Postupak se sastoji od kombinacije kemoterapija i zračenja i imunosne terapije, na način da T– limfociti davatelja koji su potpuno imunokompetentni napadaju preostale T– limfocite primatelja ili tumor direktno. Ovaj oblik liječenja dovodi i do remisije bolesti. Negativne posljedice alogene transplantacije su mogućnost odbijanja presatka protiv primatelja (engl. Graft versus Host Disease, GvHD), što izaziva progresiju zloćudnog tumora, teške infekcije, pancitopenija i imunosupresija. Oporavak se temelji na mjerenju broja granulocita u perifernoj krvi koji se vidi već nakon 8 do 12 dana nakon transplantacije, dok je za potpun oporavak potrebno četiri tjedna (20,21, 22)

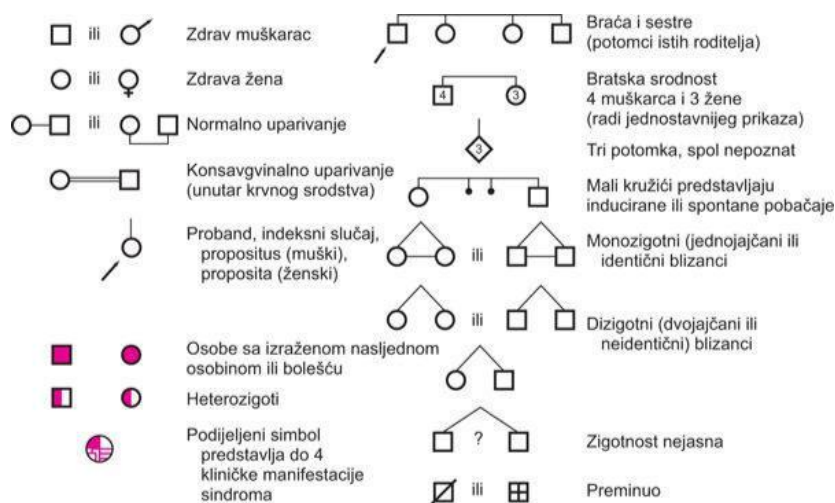
### **1.7.1.1. Ograničavajući faktori u transplantaciji**

Najvažnije pitanje prije samog odvijanja transplantacije je pitanje darivatelja krvotvornih matičnih stanica. Od svih pacijenata koji se nalaze na listi čekanja za transplantaciju, njih 25-30% ima unutar obitelji HLA kompatibilnog donora. Prema zadnjim podacima, polovina pacijenata primila je transplantat od HLA kompatibilnog nesrodnog donora. U nedostatku HLA podudarnog srodnika (brat ili sestra) može se tražiti jedan od izvora:

1. Presadak fenotipski HLA kompatibilnog nesrodnog donora
2. HLA kompatibilna umbilikalna krv (22)

### **1.8. Davatelji krvotvornih matičnih stanica**

Kod alogenične transplantacije potrebno je pronaći identičnog srodnika unutar članova obitelji. Samo u izuzetnim slučajevima, darivatelj KMS može bit jedan od roditelja. Roditelji mogu (rijetko) biti darivatelji ako su u srodstvu ili dijele iste zajedničke antigene /allele. Za utvrđivanje da li unutar obitelji postoji identični srodnikpotrebno je napraviti tipizaciju HLA alelea jednom od metoda molekularne biologije (PCR-SSP; PCR-SSO). Nakon tipizacije HLA, genotipizacijom obitelji utvrđujemo da li pacijent ima darivatelja unutar obitelji. U slučaju pronalaženja identičnog srodnika unutar oibitelji, pacijent se može liječiti alogeničnom transplantacijom što se potvrđuje na transplantacijskom timu, Kliničkog zavoda za transplantaciju KMS, Klinike za unutrašnje bolesti, KBC Rebro, Zagreb. U slučajevima kada ne nalazimo darivatelja unutar obitelji za našeg pacijenta (po strogim Mendelovim zakonitostima, vjerojatnost je 25-30%) darivatelja pokušavamo pronaći tipizacijom HLA proširene obitelji ili pretraživanjem Nacionalnog registra (Hrvatski registar DDKMS) i svjetskom registru dobrovoljnih darivatelja KMS (BMDW). Prilikom procesa genetičkog savjetovanja najprije je potrebno izraditi obiteljsko stablo, a ono sadrži simbole koji predstavljaju članove obitelji i važne zdravstvene podatke o njima. (Slika 9) (15,20)



**Slika 9.** Obiteljsko rodoslovno stablo.

(Izvor: Bogut I, Čerba D, Udžbenik Biologija 4)

Zahvaljujući dobroj edukaciji, mediskoj popularizaciji darivateljstva i same svijesti o dobrovoljnom darivateljstvu, broj darivatelja raste iz dana u dan kako u Hrvatskom registru, tako i u svjetskom registru koji danas u svojoj bazi podataka ima preko 33 milijuna HLA tipiziranih darivatelja u 78 registara iz 53 zemlje.

Najprihvatljivija opcija pacijenata koje nisu našle podudarnog darivatelja je haploidentična TKMS, što bi značilo da se primjenjuje materijal nepodudarnog darivatelja. U obzir dolaze davatelji s nepodudaranjem u 3 od 6 antigena. Ovaj oblik transplantacije češće je korišten u siromašnim zemljama gdje su zdravstvene mogućnosti ograničene te kod pacijenata Afroameričkog i Latinoameričkog podrijetla. Velika prednost je mali trošak i brza dostupnost a veliki problem je češća stopa pojave GVHD i veća stopa smrtnosti. (20,22)

### 1.8.1. Hrvatski registar dobrovoljnih darivatelja krvotvornih matičnih stanica

Hrvatski registar dobrovoljnih darivatelja krvotvornih matičnih stanica je utemeljen 1996. godine u KBC Zagreb. Dugi niz godina Hrvatski registar je imao 156 DDKMS, čiji su darivatelji dijelom bili djelatnici Zavoda za tipizaciju tkiva, a dijelom članovi obitelji bolesnika. Zahvaljujući pismu novinarke Ane Rukavine koja je bolovala od teškog oblika AML broj darivatelja se povećao.

Osnivanjem Zaklade Ana Rukavina 2007.god. te svim akcijama Zaklade Ana Rukavina broj dobrovoljnih darivatelja KMS raste iz dana u dan tako da danas Hrvatski registar ima 63024



DDKMS. Iz Hrvatskog registra DDKMS do danas je pronađeno i dano 168 transplantata te pružena nada u život velikom broju pacijenata s teškim hematološkim oboljenjima. Zadaća ovog registra je vođenje baze podataka svih upisanih i tipiziranih dobrovoljnih darivatelja KMS, pronalaženje podudarnog nesrodnog darivatelja u vlastitom registru te komunikacija s inozemnim institucijama i registrima. (Slika 10.) (6)



**Slika 10.** Hrvatski registar dobrovoljnih darivatelja krvotvornih matičnih stanica

(Dostupno: <https://www.kbc-zagreb.hr/hrvatski-registar-dobrovoljnih-darivatelja-krvotvornih-maticnih-stanica.aspx>)

U Republici Hrvatskoj svaka punoljetna osoba do 40. godine može postati darivatelj. Postupak je jako jednostavan, nakon informiranja od stručne medicinske osobe, tipizacijom alela sustava HLA se potencijalnom darivatelju određuju antigeni tkivne podudarnosti. Cijeli postupak i sve informacije su anonimne te samo u slučaju pronalaska bolesnika istih antigena, registar kontaktira darivatelja. (11)

## **2. CILJ RADA**

Cilj rada je bio ispitati i analizirati rezultate tipizacije HLA pacijentice i njene obitelji. Pacijentica je bolovala od teškog oblika akutne mijeloične leukemije (AML), a liječila se u KBC-u Split. Kako bi što prije mogla krenuti s liječenjem, odnosno transplantacijom, bilo je potrebno serološkim i molekularnim metodama utvrditi postoji li HLA identičan srodnik.

## **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. ISPITANICI**

U ovom radu bavili smo se istraživanjem i određivanjem alela sustava HLA pacijenta i njegove obitelji. Pacijent je bolovao od teške hematološke bolesti te je bilo potrebno ustanoviti postoji li potencijalan darivatelj u obitelji. Ukoliko rezultati ove studije dokažu da postoji darivatelj, pacijentu je omogućeno liječenje alogeničnom TKMS.

### **3.2. METODE**

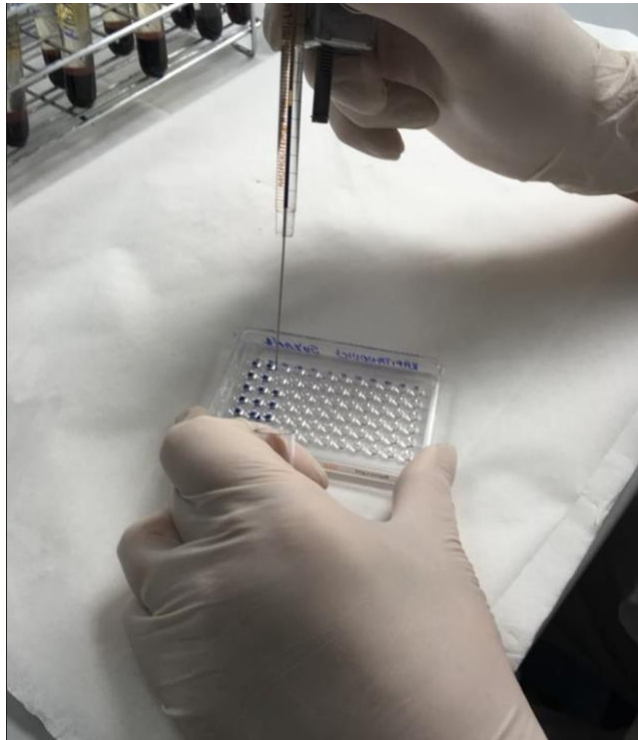
Antigeni sustava HLA određuju se serološkim metodama (test mikrolimfocitotoksičnosti-MLCT). Za određivanje alela koriste se najnovije metode molekularne biologije kao što su lančane reakcije polimerazom i početnicama sa sekvencama specifičnim za alele sustava HLA (*engl. Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Primers, PCR-SSP*), lančane reakcije polimerazom i oligonukleotidima sa sekvencama specifičnim za genske skupine HLA (*engl. Polymerase Chain Reaction – Sequence-Specific Oligonucleotides, PCR-SSO*) i metode sekvenciranja sljedeće generacije (*engl. Next generation sequencing, NGS*).

Antigeni i aleli lokusa sustava HLA-pacijentu i svim članovima obitelji određeni su serološkom metodom (test mikrolimfocitotoksičnosti) te molekularnom metodom PCR –SSO (*engl. Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotides- Luminex* metoda).

#### **3.2.1. Serološka metoda**

Standardna metoda kojom se određuju antigeni razreda I sustava HLA je serološka metoda-test mikrolimfocitotoksičnosti (MCLT, *engl. microlymphocitotoxicity test*). U reakciji sudjeluju poznata poliklonska (dobivena iz seruma višerotkinja) kao i monoklonska protutijela (dobivena imunizacijom miševa) i antigena na limfocitima ispitanika. U slučaju da su protutijelo i antigen podudarni dolazi do nastajanja kompleksa

antigen–antitijelo koji označava pozitivitet testa. Nastali kompleks se vizualizira, a to nam omogućuje komplement kunića. Komplement kunića se veže u gore navedenom kompleksu i vezivanjem uzrokuje oštećenje stanične membrane limfocita. Dodavanjem boje koja može biti tripansko modriilo ili eozinofil dolazi do prodiranja boje u liziranu stanicu, a pozitivni rezultat je moguće vizualizirati pod mikroskopom. Kod pozitivne reakcije stanice se boje u plavo odnosno crveno. Tamo gdje nije došlo do stvaranja kompleksa antigen- antitijelo govorimo o negativnoj reakciji (Slika 11.). Očitavanje reakcija pod svjetlosnim mikroskopom upisuje se u tipizacijski listić kako bismo poslije mogli analizirati i odrediti dobivene gene. (Slika 12.)



**Slika 11.** Potavljanja uzorka u Terasakijevu pločicu  
Hamilton špicom  
(Izradio autor rada u Laboratoriju za tipizaciju tkiva)

Name:  
Name:  
Vorname:  
First name:  
Geb.-Datum:  
Date of Birth:  
Ergebnis / Result:  
HLA-A: \_\_\_\_\_ HLA-B: \_\_\_\_\_  
HLA-Cw: \_\_\_\_\_ HLA-DR: \_\_\_\_\_  
Unterschrift / Signature:



Kaninchenkomplement Charge:  
Rabbit Complement Lot No.: **HKL0322**  
Datum / Date:

Pos.	Ant-HLA	ntgleich possible	Charge Lot No.	Exzision excision	Pos.	Ant-HLA	ntgleich possible	Charge Lot No.	Exzision excision
JA	pos. Control				JB	B 52		9001	
JE	neg. Control				JB	B 53+57+58		0813	
JA	A 1		0207		JC	B 16[52+53+75+76+77]+57+68		0461	
JA	A 1+20*		0372		JD	B 30		0743	
JE	A 2		0305		JE	B 30*		0433	
JE	A 2+49		0405		JF	B 18[30+35]		0354	
JE	A 3*		0348		JE	B 53*		0520	
JE	A 3		0304		JE	B 17[37+50]		0712	
JA	A 23*		0876		JE	B 18+5[51+52]+35+53*		0081	
JC	A 24+2403		0707		JE	B 18	051	0494	
JE	A 25[23+24]+80	exc. A2403	90001		JE	B 40+52+53		0390	
JE	A 29*		0353		JE	B 21[49+50]+41	044, 045	0503	
JA	A 26		0017		JE	B 55		0715	
JE	A 26+68+11*		0813		JE	B 56		0867	
JC	A 30[25+26+34+50]		0701		JC	B 22[54+55+56]+42*		0597	
JA	A 31*		0304		JE	B 27		0790	
JE	A 31		0709		JE	B 27		0863	
JE	A 28[38+66]	A2	0407		JE	B 38+39+40+41+48+46+43+42+13		0798	
JE	A 28[38+66]	A2	0808		JE	B 30+53+51	052	0683	
JE	A 28		0714		JE	B 35+51+5[51+52]		0399	
JE	A 30+31+32+33+34+35+36+37+38+39+40+41+42+43+44	A74	0704		JE	B 53+49	051	0790	
JE	A 31+32+33+29+18		0307		JC	B 37+25+53+5[51+52]+18+19	043	0728	
JE	A 32	A25	0405		JE	B 60+7+42+40		0801	
JE	A 32		0823		JE	B 40[60+61]+47+13		0480	
JE	A 74+29+30+31+32+33+19+23		0404		JE	B 40[60+61]+48+42		0403	
JE	B 51		0304		JE	B 41+A1		0730	
JC	B 5[51+62]		0603		JIC	B 70+15+21[59+50]+56	070	0788	
JE	B 7		0304		JID	Cw 1		0541	
JE	B 7+27+73+81		0307		JIE	Cw 2*		0504	
JE	B 8*		0606		JE	Cw 3		0401	
JE	B 8+48+52+A1		0801		JIE	Cw 4		0587	
JE	B 44		0726		JIE	Cw 5	0415	0773	
JE	B 45+78		0757		JIE	Cw 6+4		0751	
JC	B 12[44+45]		0333		JIC	Cw 7+17		0461	
JE	B 12		0333		JIE	Bw 4*		0746	
JE	B 14[64+65]		0788		JE	Bw 5		0458	

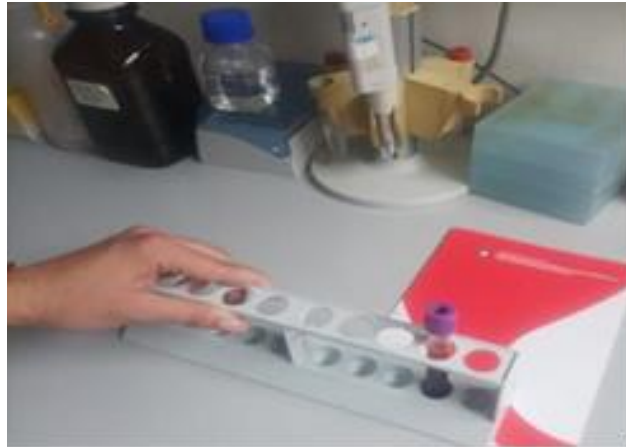
0305 03.11

Inno-train Diagnostik GmbH · Westendstraße 61 · 40476 Künsegg · Tel. 00 49 (0) 21 76 29 30 · Fax 00 49 (0) 21 76 29 30  
E-mail: info@inno-train.de · www.inno-train.de

Slika 12. Primjer tipizacijskog listića (inno train GmbH Diagnostik)

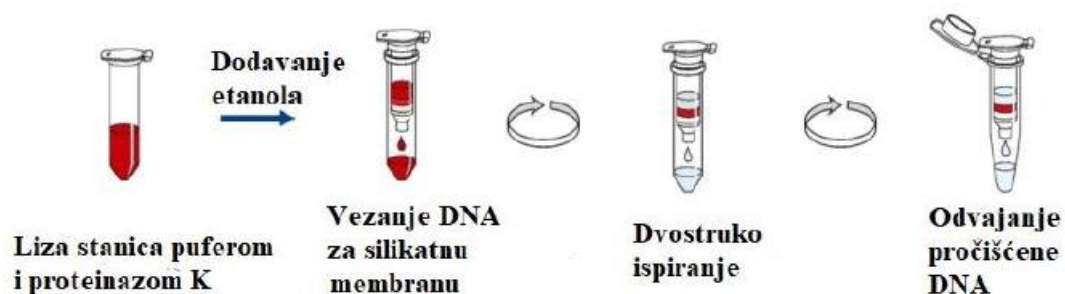
### 3.2.2. Izolacija DNA

Za izolaciju genomske DNA (gDNA) koristi se puna krv dobivena iz epruvete s antikoagulansom EDTA koristeći pritom komercijalno dostupne reagense. (Slika 13.)



**Slika 13.** Uzorak krvi s EDTA antikoagulansom  
(Izradio autor rada)

Prvotno je potrebno dodati 200 $\mu$ l pune krvi, Binding pufera koji će lizirati stanice te proteinaza K. Na ovaj način se iz jezgre oslobađa DNA. (Slika 14.) Dodaje se 100 $\mu$ l izopropanola u uzorak nakon inkubacije i nakon toga se vorteksira. Proces pročišćavanja DNA radi se u filter tubi gdje se DNA veže za silikatnu membranu, a supernatant se prikuplja u tubicama za sakupljanje (*engl. Collection tubes*). DNA se pročišćava od nečistoća dodavanjem 500 $\mu$ l Inhibitor Removal Buffera (“crni čep”) i Wash Buffera (“plavi čep”). Prije pohranjivanja potrebno je izoliranoj DNA dodati elucijskog pufera i onda je centrifugirati. Uzorak se može pohraniti na +4 ili -20°C.



**Slika 14.** Izolacija DNA (Preuzeto i prilagođeno:

<https://onelab.andrewalliance.com/library/nucleospin-blood-protocol-r9M3qzJ>)

### 3.2.3. Molekularne metode

Za određivanje alela sustava HLA koriste se metode molekularne biologije (Slika 15.): PCR-SSO (eng. *Polymerase chain reaction-Sequence Specific Oligonucleotides*) i PCR-SSP (eng. *Polymerase chain reaction- Sequence Specific Primer*).

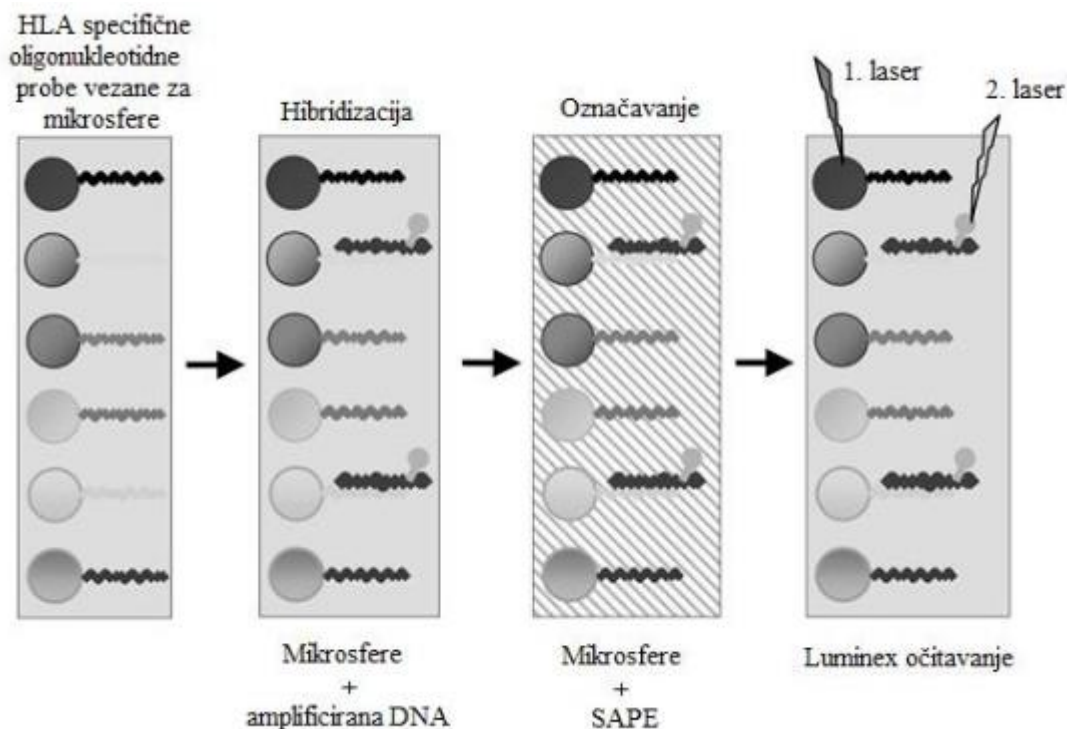


**Slika 15.** Thermocycler

(Snimljeno u Laboratoriju za tipizaciju tkiva)

### 3.2.4. PCR-SSO (engl. Polymerase chain reaction-Sequence Specific Oligonucleotide)

Princip ove metode je vezanje DNA produkta, kojeg smo izolirali iz uzorka, za mikrosfere. Mikrosfere su čestice na čijoj su površini smješteni kratki slijedovi DNA koji se nazivaju oligonukleotidne probe. Pomoću tih proba analizira se postojanost alela koji se žele ispitati u uzorku. Uređaj Luminex radi na principu detekcije florescencije dovodeći mikrosfere do snopa lasera. Različite kombinacije boja prisutne na svakoj mikrosferi omogućuju Luminexu identificirati svaku mikrosferu posebno. (Slika 16)

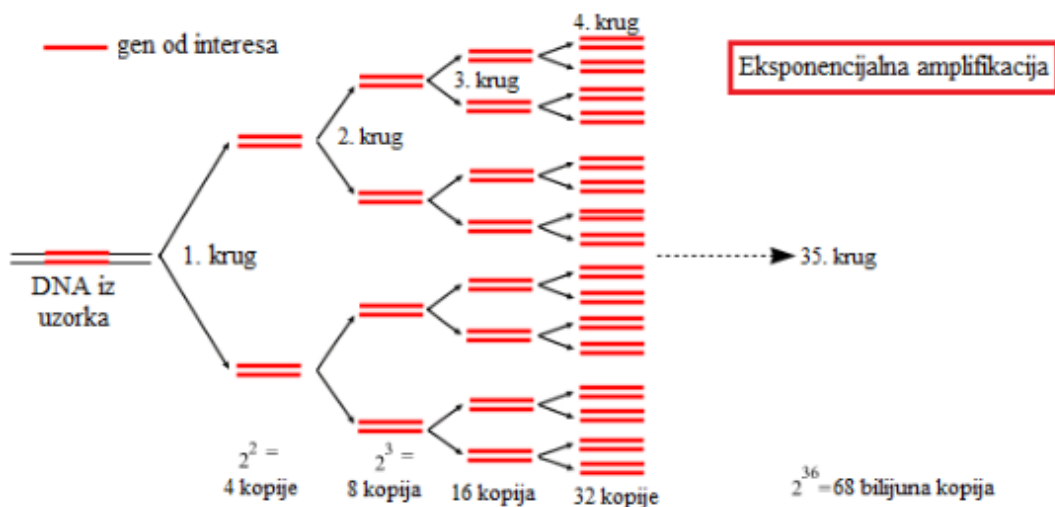


**Slika 16.** Princip izvođenja PCR-SSO metode  
(Preuzeto i prilagođeno iz: <https://www.omixon.com>)



## Amplifikacija

Procesom amplifikacije se nastoji umnožiti odsječak DNA od interesa. Za svrhu umnožavanja koristi se PCR reakcija koja sastoji od 3 koraka koji se odvijaju na različitim temperaturama te se ponavljaju 30 do 35 puta. Osnova ove metode je umnažanje egzona 2 i 3 pomoću koji se određuju aleli. Kako bi mogli koristiti PCR za umnažanje tj. amplifikaciju DNA, potrebno je pripremiti mješavinu Taq polimeraze, destilirane vode i Master MIX-a. U Master MIX-u nalaze se primeri, odnosno oligonukleidne početnice koji će se vezati za dijelove DNA. (Slika 17.) Nakon dodavanja DNA reakcijskoj smjesi ona ide u „Thermocycler“ gdje se amplificira.

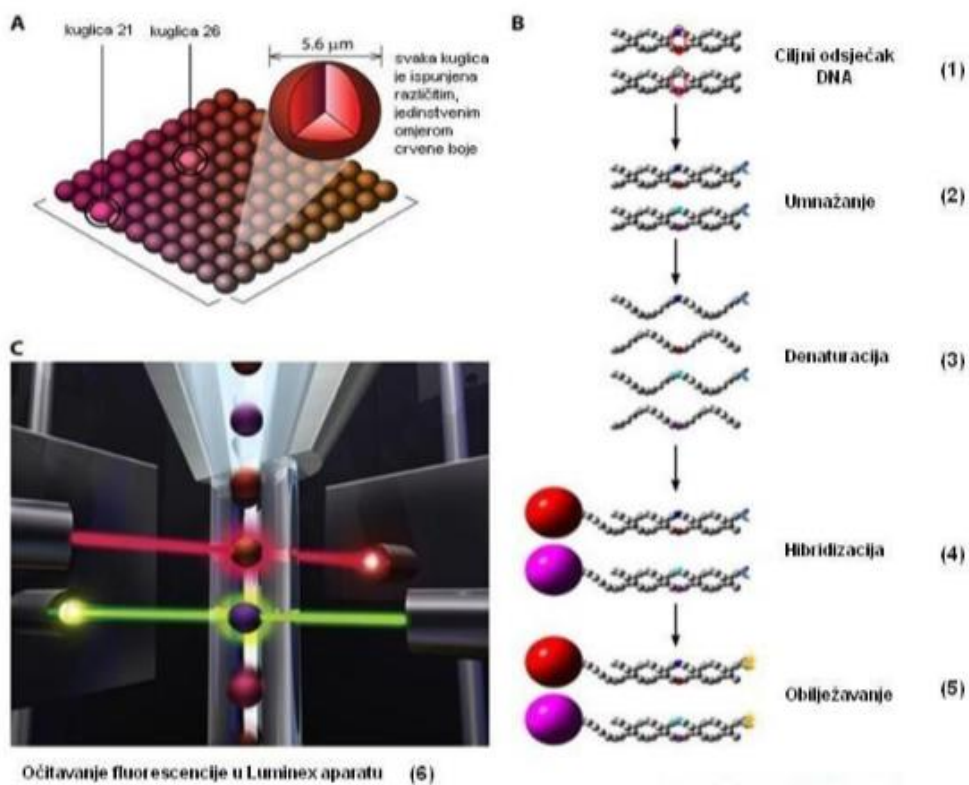


**Slika 17.** Shematski prikaz PCR reakcije

(Preuzeto iz: Andy Vierstraete, Principle of the PCR, 1999.)

## Hibridizacija

Za proces hibridizacije, koji traje 20 minuta, potrebno je pripremiti PCR product i suspenzije mikrosfera u ovom stupnju dolazi do specifičnog vezanja amplificiranog produkta i probe na mikrosferama. Dodaje se florescentna boja koja se sastoji od dilucijske otopine i streptavidina, kako bi se nastali kompleks mogao vizualizirati. Na Coster pločicu, na kojoj se odvija reakcija, veže se boja koja se vidi tijekom očitavanja na Luminex aparatu. (Slika 18).



**Slika 18.** Proces hibridizacije

(Preuzeto i prilagođeno iz: [https://www.researchgate.net/figure/Suspension-bead-array-A-Microspheres-56-m-in-diameter-are-filled-with-different\\_fig8\\_26888549](https://www.researchgate.net/figure/Suspension-bead-array-A-Microspheres-56-m-in-diameter-are-filled-with-different_fig8_26888549))

## Očitavanje i analiza rezultata

Zahvaljujući laserima u Luminex aparatu, fluorescencijom je moguće razlikovati pozitivni signal zbog povezanosti s mikrosferama. Osim razlikovanja, moguće je kvantificirati relativnu količinu amplifikata. Program Match IT DNA ima bazu podataka gena i antigena i uspoređuje ih sa pacijentovim kako bi se mogao izdati nalaz. Software u obliku liste kombinacije najčešćih alela prikazuje rezultate kojima odgovara dobivena kombinacija pozitivnih odnosno negativnih proba. (Slika 19.)

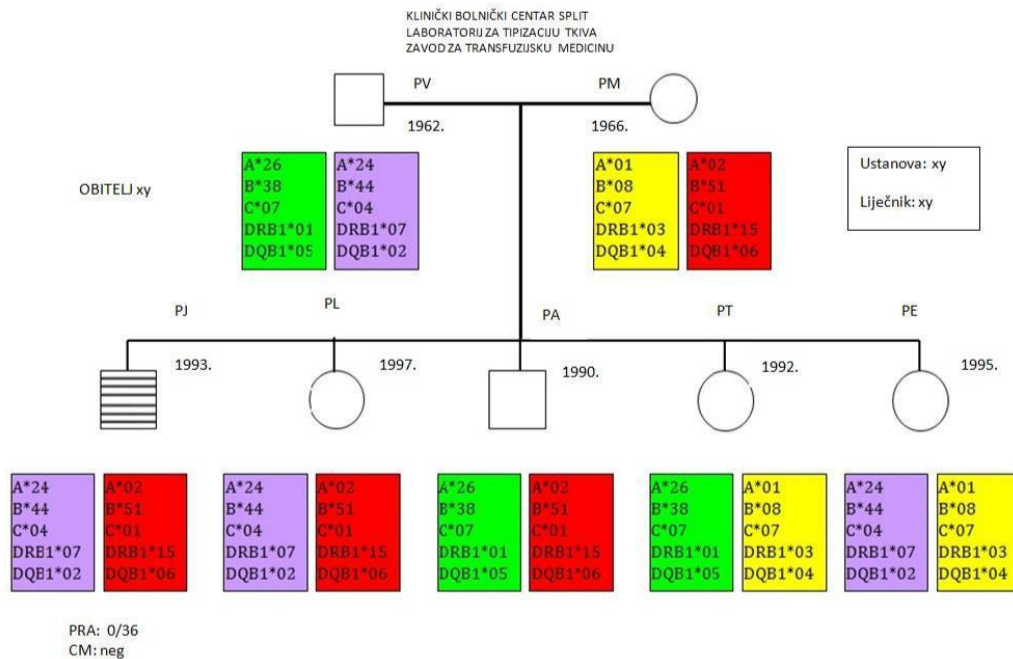


**Slika 19.** Analiza rezultata na Luminex® aparatu  
(Izradio autor rada u Laboratoriju za tipizaciju tkiva)

## 4. REZULTATI

Nakon dijagnosticirane teške hematološke bolesti, transplantacijski tim na čelu s liječnikom Zavoda za hematologiju KBC Split uputio je pacijenticu i njenu obitelj u Laboratorij za tipizaciju tkiva, kako bi se utvrdilo dali unutar obitelji postoji genotipski identični srodnik i na taj način započelo liječenje alogeničnom transplantacijom KMS.

Pacijentu, roditeljima, bratu i sestrama (Slika 20.) određeni su tkivni antigeni/geni sustava HLA molekularnom metodom PCR-SSO i serološkom metodom test mikrolimfocitotoksičnosti.



**Slika 20.** Shematski prikaz obitelji pacijenta za transplantaciju KMS

(Izradio autor rada)

Nakon tipizacije alela sustava HLA svih ispitanika, odredili smo genotip obitelji (moguće ga je bilo odrediti zbog prisustva obaju roditelja). Kao što je već ranije spomenuto, glavni ograničavajući faktor pri izboru za alogeničnu transplantaciju je pronalazak HLA identičnog srodnika. Zahvaljujući metodama kojima se određuju antigeni i aleli sustava HLA utvrdili smo da pacijent koji boliju od teške hematološke bolesti ima HLA genotipski identičnog srodnika

(sestre) budući su dijelili iste haplotipove koje su dobili od roditelja. U ovom istraživanju dokazali smo da je moguća transplantacija. Uz određivanje alela sustava HLA razred I i razred II također smo određivali i postotak panel reaktivnih antitijela metodom CDC (citotoksičnost ovisna o komplementu). Kod našeg pacijenta nisu pronađena panel reaktivna antitijela pa je posljedično i križna reakcija (*engl. Cross match*) između pacijenta i HLA identične sestre bio negativan.

## 5. RASPRAVA

Transplantacija krvotvornih matičnih stanica (TKMS) rutinski je postupak za liječenje onkoloških, hematoloških i imunoloških bolesnika. Zbog kompleksnosti izvođenja, mnogobrojnih komplikacija te visoke stope smrtnih ishoda u prošlosti to nije bila često korištena metoda. Zahvaljujući otkrivanju sustava tkivne snošljivosti i razvojem metoda molekularne biologije TKMS postaje rutinska metoda u liječenju pacijenata s teškim hematološkim bolestima. (24, 26)

Glavni ograničavajući faktor kod alogenične TKMS je pronalazak HLA genotipski identičnog darivatelja unutar obitelji. Po strogim zakonitostima genetike svega 30% pacijenata ima mogućnost da se liječi alogeničnom transplantacijom sa srodnog darivatelja koji može biti brat ili sestra. Samo u izuzetnim slučajima fenotipski darivatelj unutar obitelji može biti otac ili majka i to u slučaju ako su roditelji u krvnom srodstvu ili dijele iste antigene/alele. Da bismo mogli naći identičnog davatelja, potrebno je napraviti tipizaciju HLA pacijenta i članova obitelji koristeći serološke i molekularne metode u laboratorijima za tipizaciju tkiva. Ukoliko nemamo identičnog darivatelja unutar obitelji fenotipski identičnog darivatelja preliminarnim pretraživanjima tražimo u Hrvatskom i Svjetskom registru. (1,2,6)

Kako bi broj darivatelja u registrima kako hrvatskom tako i svjetskom rastao potrebna je neprestalna edukacija, jačanje svijesti o važnosti upisa u registar.

Upravo podizanjem svijesti o značaju transplantacije potičemo ljude na najplemenitiji čovjekov čin, a to je doniranje organa. Na taj način se omogućuje pacijentu kvalitetniji život i put ka ozdravljenju. Zaklada Ana Rukavina svojim kampanjama potiče podizanje svijesti o darivateljstvu. Ono što imamo u sebi, drugome može spasiti život. Sve što je potrebno je informirani pristanak, pristupnica te uzorak krvi.

## 6. ZAKLJUČAK

1. Bolesnici s benignim i malignim tumorima, imunološkim i hematološkim oboljenjima se u zadnjih nekoliko desetljeća podvrgavaju zahvatu transplantacije krvotvornih matičnih stanica.
2. Darivatelji za alogeničnu TKMS mogu biti unutar obitelji, odnosno braća i sestre i govorimo o srodničkoj alogeničnoj transplantaciji KMS. U slučaju nepostojanja podudarnog srodnika, traži se fenotipski identičan darivatelj u Svjetskom registru BMDW. Tom registru pripada i Hrvatski registar, uz čiju pomoć je do danas provedeno 168 transplantacija.
3. Ograničavajući faktor za alogeničnu TKMS su stroge zakonitosti genetike (Mendelove zakonitosti) jer samo 25-30% pacijenata pronađe srodnog darivatelja unutar obitelji.
4. Za određivanje antigena i alela sustava HLA koriste se dvije metode, serološka, tj. test mikrolimfocitotoksičnosti kao i molekularne metode PCR-SSO i PCR-SSP.
5. Zadnjih godina provodi se transplantacija s haploidentičnog srodnika, ali u tom slučaju je potrebna jača imunosupresija.

## 7. LITERATURA

1. John Wiley & Sons A/S · Tissue Antigens, 2010, 75, 291–455 291
2. Armson BA, Allan DS, Casper RF. Umbilical Cord Blood: Counselling, Collection, and Banking. *J Obstet Gynaecol Can.* 2015 Sep;37(9):832-844. doi: 10.1016/S1701-2163(15)30157-2. PMID: 26605456.
3. Ballen KK, Gluckman E, Broxmeyer HE. 2013, Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood.*122:491-8. doi: 10.1182/blood-2013-02-453175. Epub 2013 May 14. PMID: 23673863; PMCID: PMC3952633.
4. Batinić D., 2008, Imunološke pretrage u hematologiji. Vrhovac B i suradnici. InternaMedicina. Zagreb. Ljevak.
5. Bojanić I., 2009. Sakupljanje krvotvornih matičnih stanica iz krvi postupkom leukaferoze velikog volumena krvi (disertacija). Zagreb, Hrvatska: Medicinski fakultet
6. Čečuk-Jeličić,E, Jaman,S.,Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti. Skripta za studenete Odsjeka medicinsko-laboratorijske dijagnostike.
7. Gajović, S. Embrionalne matične stanice (I).2010, Od kuda se dobivaju, kako se uzgajaju i što sve od njih može nastati
8. Golemović, M., Škifić, M., Golubić Čepulić, B., 2012, Mezenhimske matične stanice: imunomodulatorne značajke i klinička primjena. *Liječnilki Vijesnik, Zagreb.* 134:42-49.
9. Aschan J. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: current status and future outlook. *Br Med Bull* 2006;77(78):23-36.
10. Hematopoeza. Medicinski leksikon - 1992. (mrežno izdanje). Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2023.
11. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28534115/> Asada N, Takeishi S, Frenette PS. 2017,Complexity of bone marrow hematopoietic stem cell niche. *Int J Hematol.*;106(1):45-54. doi: 10.1007/s12185-017-2262-9. Epub 2017 May 22. PMID: 28534115; PMCID:PMC8808638.
14. Bojanić I, Golubić Cepulić B. Umbilikalna krv kao izvor matičnih stanica [Umbilical cord blood as a source of stem cells]. *Acta Med Croatica.* 2006 Jun;60(3):215-25. Croatian. PMID: 16933834.



15. Mancusi A, Kanakry CG, Pierini A. Editorial: The Immunobiology of HLA-Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation. *Front Immunol.* 2020 May 20;11:1031. doi: 10.3389/fimmu.2020.01031. PMID: 32508848; PMCID: PMC7251076.
16. Premužić-Lampič M, 2000, Presadba koštane srži. Raič A. *Hematologija: klinička i laboratorijska.* Zagreb. Medicinska naklada.
17. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2004. *Tissue Antigens.* 2005;65:301–369.
18. European Federation of Immunogenetics - <https://efi-web.org/>; Nacionalni transplantacijski program - <https://zdravlje.gov.hr/programi-i-projekti/nacionalni-programi-projekti-i-strategije/nacionalni-transplantacijski-program/1528>
19. Rajić Lj., 2013. Alogenična transplantacija krvotvornih matičnih stanica u djece. *Paediatr Croat.*
20. Smoljanović, Mandac, I., Uloga hematopoetskih matičnih stanica u transplantacijskoj medicini, *Hematologija, Medix.* Stručni članak. God.28. br.155.
21. Thomas ED, Blume KG, Forman SJ 2003. *Hematopoietic Cell Transplantation.* 2nd ed. 1999 Blackwell Science Malden, MA. *Clinical Trials & Observation, 2003.* Transplantation, Factors affecting antibody levels after allogeneic hematopoietic cell transplantation.
22. Crnić- Martinović M., 2005, *Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti u čovjeka*
23. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Marušić M, Lukinović- Škudar V. i sur. (2004): *Imunologija.* Zagreb; Medicinska naklada;

## 8. ŽIVOTOPIS

### OPĆI PODACI

**Ime i prezime:** Mia Matić

**Datum i mjesto rođenja:** 22.6.2002. Hagen, Njemačka

**Adresa:** A.B. Šimića 72, Split.

**Mobitel:** 099 8382958

**E-mail adresa:** matic\_mia22@yahoo.com

### OBRAZOVANJE:

2008.-2011. Goetheschule, Hagen, Njemačka

2011.-2016. Osnovna škola Marka Marulića, Ljubuški

2016.-2020. Opća gimnazija, Ljubuški

2020.-2023. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija, Split; smjer: Medicinsko laboratorijska dijagnostika