

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Aleksandra Krstić

**PRAĆENJE HIMERIZMA ANALIZOM
GENETIČKIH MARKERA NAKON
ALOGENE TRANSPLANTACIJE
MATIČNIH ĆELIJA HEMATOPOEZE KOD
DECE OBOLELE OD HEMATOLOŠKIH
BOLESTI**

doktorska disertacija

Beograd, 2012.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Александра Крстић

**ПРАЋЕЊЕ ХИМЕРИЗМА АНАЛИЗОМ
ГЕНЕТИЧКИХ МАРКЕРА НАКОН
АЛОГЕНЕ ТРАНСПЛАНТАЦИЈЕ
МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА ХЕМАТОПОЕЗЕ
КОД ДЕЦЕ ОБОЛЕЛЕ ОД
ХЕМАТОЛОШКИХ БОЛЕСТИ**

докторска дисертација

Београд, 2012

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE**

Aleksandra Krstić

**CHIMERISM FOLLOW-UP BY GENETIC
MARKERS ANALYSIS IN CHILDREN WITH
HEMATOLOGICAL DISEASES AFTER
ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM
CELL TRANSPLANTATION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012.

Mentor:

Docent dr Oliver Stojković, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Komentor:

Profesor dr Marija Guć-Šćekić, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Članovi Komisije:

Profesor dr Ivana Novaković, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Docent dr Dragana Vujić, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

NS Danijela Radivojević, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane: 2012.

Ova doktorska disertacija je rađena u Laboratoriji za medicinsku genetiku Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta „Dr Vukan Čupić“ i DNK laboratoriji Instituta za sudsku medicinu, u Beogradu.

Zahvaljujem se Prof. dr Mariji Guć-Šćekić za dugogodišnju saradnju tokom koje mi je prenosila svoje znanje, pružala stručne savete i prijateljsku pomoć bez kojih ne bi bilo ovoga rada.

Zahvaljujem se docentu dr Oliveru Stojkoviću na izuzetnoj saradnji, korisnim sugestijama i inspirativnim razgovorima vezanim za ovaj rad.

Docentu dr Dragani Vujić se naročito zahvaljujem na stručnim savetima i podršci.

Prof. dr Ivani Novaković se zahvaljujem na stručnoj i prijateljskoj pomoći.

Posebno se zahvaljujem svojoj dragoj kolegici dr Danijeli Radivojević za izuzetnu zainteresovanost za ovu naučnu oblast i za pomoć u konačnoj realizaciji teksta.

Zahvaljujem se kolegama iz Italije, dr Momčilu Jankoviću, Prof. dr Andrea Biondiu i dr Giovanni Cazzanigi na stručnoj obuci i iskrenoj podršci u istraživačkom radu.

Specijalnu zahvalnost dugujem kolegici Tatjani Varljen za veliku pomoć u primeni STR-PCR metode.

Zahvaljujem se i kolegama Službe za transplantaciju matičnih ćelija hematopoeze i Odeljenja za hematologiju i onkologiju Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta „Dr Vukan Čupić“, bez čije saradnje izrada ovoga rada ne bi bila moguća.

Svoju zahvalnost dugujem svim kolegama iz Laboratorije za medicinsku genetiku koji su mi pružili praktičnu i prijateljsku pomoć u izradi ovoga rada.

Hvala mojoj porodici za pruženo razumevanje i podršku.

Naslov

Praćenje himerizma analizom genetičkih markera nakon alogene transplantacije matičnih ćelija hematopoeze kod dece obolele od hematoloških bolesti

Rezime

Transplantacija matičnih ćelija hematopoeze (TMČH) predstavlja uspešan vid lečenja za decu obolelu od različitih urođenih i stečenih bolesti hematopoeze. Praćenje himerizma posle alogene transplantacije matičnih ćelija hematopoeze značajno je za procenu rizika za odbacivanje kalema ili pojavu recidiva bolesti, a u cilju blagovremene primene odgovarajuće terapije. Glavni princip u detekciji himerizma je identifikacija i kvantitativna analiza genetičkih markera koji se u različitim alelskim formama javljaju kod davaoca i primaoca. Za praćenje himerizma primenjena je analiza mikrosatelitskih genetičkih markera, metodom STR-PCR, koja omogućava preciznu procenu udela alela davaoca i primaoca u uzorku periferne krvi transplantiranog bolesnika. Sa druge strane, u slučajevima obolelih od malignih bolesti hematopoeze, pored praćenja relativnog odnosa ćelija hematopoeze primaoca i davaoca praćeno je i prisustvo minimalne rezidualne bolesti (MRB). Praćenje MRB kod obolelih od leukemije moguće je vršiti različitim genetičkim metodama, zavisno od toga koji je specifični genetički marker otkriven prilikom postavljanja dijagnoze, pre transplantacije. U ovom radu su korišćene metode citogenetike i molekularne genetike (RT-PCR). Himerizam i prisustvo MRB su u ovoj studiji praćeni pet godina iz uzoraka periferne krvi ili kostne srži, u određenim vremenskim intervalima, sa medijanom od 11 meseci. Rezultati ovog rada su pokazali da je metoda STR-PCR efikasna metoda za praćenje himerizma i blagovremeno registrovanje odbacivanja kalema nakon transplantacije kod obolelih od nemalignih bolesti hematopoeze. Međutim, za blagovremeno otkrivanje pojave recidiva kod obolelih od malignih bolesti hematopoeze, neophodna je primena i savremenih genetičkih metoda koje su specifične za detekciju određenog malignog klona prisutnog kod obolelog pre transplantacije.

Ključne reči: molekularna genetika, transplantacija matičnih ćelija hematopoeze, himerizam, STR-PCR, RT-PCR

Naučna oblast: medicina **Uža naučna oblast:** humana genetika

UDK broj: 616.155-006.6-071-008-053.2:577.113(043.3)

Title

Chimerism follow-up by genetic markers analysis in children with hematological diseases after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Summary

Hematopoietic stem cells transplantation (HSCT) is a very successful treatment modality for children with different acquired or inborn hematological diseases. The main goal of post-transplantation chimerism monitoring in HSCT is to predict negative events, such as disease relapse and graft rejection, in order to intervene with appropriate therapy and to improve the probability of long-term disease free survival. In this context, by quantifying the relative amounts of donor and recipient cells present in the peripheral blood sample, it can be determined if engraftment has taken place at all, or if full or mixed chimerism exists. On the other hand, monitoring of minimal residual disease in patients with malignant hematological diseases helps in predicting the possibility of relapse. This study describes the implementation and first clinical results of polymerase chain reaction (PCR) amplification of polymorphic short tandem repeat (STR) markers and Amelogenin locus coupled with cytogenetics and reverse transcription PCR detection of recurrent translocations characteristic for childhood leukemia in monitoring of patients who underwent HSCT. Chimerism and MRD was regularly analyzed for five years from blood and marrow samples taken at various time points after transplantation with the median follow up of 11 months. Our results demonstrate that STR-based chimerism monitoring is sufficient in establishing the origin of engrafted cells after an allogeneic HSCT and in detecting graft rejection, but more specific and more sensitive methods for detection of minimal residual disease are necessary for identifying patients with imminent leukemia relapse.

Key words: molecular genetics, stem cell transplantation, chimerism, STR-PCR, RT-PCR

Scientific field: medicine / human genetics

UDK number: 616.155-006.6-071-008-053.2:577.113(043.3)

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1 Alogena transplantacija matičnih ćelija hematopoeze	
1.1.1 Kliničke indikacije za transplantaciju matičnih ćelija hematopoeze	
1.1.2 Režimi kondicioniranja	
1.1.3 Komplikacije posle transplantacije matičnih ćelija hematopoeze	
1.2 Analiza himerizma	
1.2.1 Metode za detekciju i praćenje himerizma	
1.2.2 Polimorfni regioni u humanom genomu	
1.3 Analiza minimalne rezidualne bolesti	
1.3.1 Citogenetika i molekularna citogenetika	
1.3.2 Molekularna genetika malignih bolesti hematopoeze	
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	26
3. MATERIJAL I METODE	27
3.1 Ispitanici	
3.2 Citogenetička analiza	
3.2.1 Kultura ćelija kostne srži	
3.2.2 Preparacija hromozoma	
3.2.3 Analiza kariotipa	
3.3 Izolacija DNK	
3.3.1 Izolacija DNK iz periferne krvi ili kostne srži	
3.3.2 Izolacija DNK iz dlake ili bukalnog brisa	

3.4 Fluorescentna multipleks PCR STR analiza

3.5 Detekcija dobijenih PCR produkata na kapilarnoj elektroforezi

3.6 Nespecifični produkti amplifikacije

3.7 Računanje procenta DNK davaoca i primaoca

3.8 Izdvajanje mononuklearnih ćelija

3.9 Izolacija RNK

3.10 RT-PCR za detekciju fuzionih rearanžmana

3.10.1 Reverzna transkripcija – sinteza cDNK

3.10.2 Reakcija lančane polimerizacije – PCR

3.11 Detekcija fuzionih produkata na gelu

3.12 Statističke metode

4. REZULTATI.....49

4.1 Praćenje himerizma STR-PCR metodom

4.1.1 Praćenje himerizma STR-PCR metodom kod bolesnika obolelih od nemalignih bolesti hematopoeze

4.1.2 Praćenje himerizma STR-PCR metodom kod bolesnika obolelih od malignih bolesti hematopoeze

4.1.3 Korelacija kliničkih parametara sa tipom himerizma

4.1.4 Prediktivni značaj metoda STR-PCR za odbacivanje kalema

4.2 Praćenje minimalne rezidualne bolesti kod bolesnika sa malignim bolestima posle transplantacije matičnih ćelija hematopoeze

4.2.1 Praćenje bolesnika metodama citogenetike

4.2.2 Praćenje RT-PCR metodom bolesnika koji su pre transplantacije imali neki od fuzionih genskih rearanžmana

4.2.3 Prediktivni značaj prisustva hromozomskih rearanžmana za pojavu recidiva bolesti

4.2.4 Analiza prediktornih faktora za ishod lečenja bolesnika sa malignim bolestima posle transplantacije matičnih ćelija hematopoeze

4.3 Analiza preživljavanja bolesnika posle transplantacije matičnih ćelija hematopoeze

5. DISKUSIJA.....78

5.1 Značaj praćenja himerizma STR-PCR metodom

5.2 Značaj praćenja minimalne rezidualne bolesti kod bolesnika sa hromozomskim aberacijama

5.3 Analiza prediktora ishoda lečenja i preživljavanja bolesnika nakon transplantacije matičnih ćelija hematopoeze

6. ZAKLJUČAK.....86

7. LITERATURA.....89

8. SKRAĆENICE.....101

9. BIOGRAFSKI PODACI AUTORA.....103

1. UVOD

1.1 Alogena transplantacija matičnih ćelija hematopoeze

Hematopoeza predstavlja razvoj ćelija krvne loze kroz mnogobrojne deobe i diferencijaciju pluripotentne matične ćelije, pretežno u kostnoj srži. Matične ćelije hematopoeze nastaju diferencijacijom mezodermalnih ćelija. Proliferacija, diferencijacija i dužina života ćelija hematopoeze su kontrolisani različitim faktorima rasta, kao i interakcijom ovih ćelija sa njihovom mikro-sredinom, preko brojnih signalnih puteva. Poremećaji u normalnom razvoju, sazrevanju ili funkciji ćelija krvne loze mogu nastati usled urođenih ili stečenih (malignih ili nemalignih) bolesti hematopoeze [1].

Istraživanja Donnall Thomasa i saradnika, od 1950. doprinela su uvođenju metoda transplantacije kostne srži kao jednog od terapijskih postupaka u lečenju hematoloških bolesti. Istovremeno otkriće antigena humanih leukocita je omogućilo bolje sparivanje davaoca i primaoca [2]. Nakon prve uspešne transplantacije 1968. godine do danas je u svetu urađeno preko dvesta hiljada transplantacija [3]. Donnall Thomas je za svoj doprinos u istraživanjima transplantacije kostne srži 1990. godine dobio Nobelovu nagradu iz oblasti fiziologije i medicine.

Transplantacija matičnih ćelija hematopoeze (TMČH) omogućava zamenu obolelog hematopoetskog tkiva bolesnika normalnim tkivom, a može biti autologa ili alogena. Kod alogene transplantacije, koja i predstavlja glavnu temu ove teze, matične ćelije se mogu uzeti od HLA (humani leukocitni antigen) identičnog srodnika, od HLA haplo-identičnog srodnika ili od HLA identičnog nesrodnog davaoca.

U prvim decenijama primene ove medicinske procedure, kostna srž davaoca bila je jedini izvor matičnih ćelija, dok je u poslednjih 15 godina najčešći izvor periferna krv nakon stimulacije sa granulocitnim faktorom rasta (G-CSF). Prednost upotrebe periferne

krvi u odnosu na druge izvore matičnih ćelija je brže prihvatanje kalema granulocitne i megakariocitne loze. Međutim, pokazalo se da kad je periferna krv izvor matičnih ćelija postoji veći rizik za pojavu bolesti kalem protiv domaćina (GVHD) [3].

Iako TMČH predstavlja standardnu proceduru u lečenju hematoloških bolesti, potrebna su dalja istraživanja koja će objasniti same molekularne mehanizme vezane za prihvatanje kalema, kao i za početak diferencijacije i proliferacije ćelija hematopoeze [4]. Proces prihvatanja kalema, odnosno „udomljavanja“ u kostnoj srži počinje regrutacijom cirkulišućih matičnih ćelija hematopoeze, nakon čega dolazi do trans-endotelijalne migracije. U kostnoj šupljini matične ćelije migriraju u tzv. „niše“, mesta na kojima kompleksne interakcije između ćelija, preko faktora rasta i adhezivnih molekula, dovode do proliferacije i diferencijacije [4, 5, 6, 7].

1.1.1 Kliničke indikacije za transplantaciju matičnih ćelija hematopoeze

Transplantacija matičnih ćelija hematopoeze se koristi za lečenje dece sa nemaligim bolestima kao što su [8,9]:

- stečena aplastična anemija
- teška kombinovana imunodeficijencija
- talasemijski sindrom
- Fankonijeva anemija
- urođena trombocitopenija
- kongenitalna neutropenija
- bolesti hromozomske nestabilnosti
- familijarna hemofagocitna limfohistiocitoza i druge.

Isto tako, TMČH se koristi i za lečenje dece sa malignim bolestima kao što su:

- akutne i hronične leukemije
- mijelodisplastični sindrom

- juvenilna mijelomonocitna leukemija
- tumori centralnog nervnog sistema
- recidiv Wilms-ovog tumora
- neuroblastom
- Ewingov sarkom
- limfomi.

Od svih malignih bolesti kod dece se najčešće javlja akutna limfoblastna leukemija (ALL) (80-85%), ređe akutna mijeloidna leukemija (AML) (10-15%), dok je hronična mijeloidna leukemija (HML) veoma retko prisutna. Najveći uspeh u lečenju leukemija postignut je upravo kod ALL (čak 80%), dok je decu obolelu od AML moguće izlečiti u svega 60% slučajeva, te oni predstavljaju grupu najčešćih kandidata za transplantaciju kostne srži [10]. Prema protokolima za lečenje leukemija transplantacija matičnih ćelija hematopoeze predstavlja opciju lečenja kod bolesnika svrstanih u grupu visokog rizika. Hromozomski rearanžmani kao što su translokacije t(9;22), t(4;11) i hipodiploidija, direktno svrstavaju bolesnike u grupu visokog rizika, što ih čini kandidatima za transplantaciju [11].

1.1.2 Režimi kondicioniranja

Režim kondicioniranja predstavlja proces pripreme bolesnika za TMČH. Cilj kondicioniranja je da se omogući uspešno prihvatanje kalema i da se postigne izlečenje. Režimi kondicioniranja se sastoje od kombinacije citostatika ili kombinacije citostatika sa ozračivanjem celog tela (TBI). Izbor režima kondicioniranja se vrši na osnovu dijagnoze, uzrasta bolesnika, poklapanja humanog leukocitnog antigena davaoca i primaoca, kao i prema riziku od pojave komplikacija vezanih za transplantaciju. U zavisnosti od intenziteta i uticaja na kostnu srž režimi kondicioniranja se mogu podeliti u dve grupe: mijeloablativni i nemijeloablativni (RIC) [3, 12, 13].

Idealni režim kondicioniranja kod alogene TMČH treba da ispuni sledeće kriterijume:

- da eliminiše maligne ćelije
- da formira prostor za ćelije davaoca u kostnoj srži bolesnika
- da suprimira imuni sistem domaćina kako bi se sprečilo odbacivanje kalema
- da eliminiše imunske memorijske ćelije
- da ima minimalni toksični efekat na tkiva domaćina [14].

1.1.3 Komplikacije posle transplantacije matičnih ćelija hematopoeze

Uprkos otkriću novih lekova, napretku u izboru davaoca, razvoju dijagnostičkih procedura, transplantacija je i dalje povezana sa visokim stepenom smrtnosti zbog mogućih komplikacija. Veoma je važno bolesnike posle transplantacije pratiti kako bi se blagovremeno i adekvatno reagovalo i sprečio neželjeni ishod.

Citostatici mogu da dovedu do pojave neželjenih efekata kao što su veno-okluzivna bolest (VOD), intersticijalna pneumonija (IP) ili neuro-toksičnost, a sve to može imati negativan uticaj na ishod transplantacije [15,16]. Sa druge strane, ozračivanje celog tela može da dovede do pojave sekundarnih maligniteta, endokranijalnih poremećaja, a kod dece može doći do zastoja u rastu [3,17].

Najčešće komplikacije nakon transplantacije su infekcije bakterijama, virusima i gljivicama. Drugu ozbiljnu komplikaciju nakon transplantacije predstavlja bolest kalem protiv domaćina koja dovodi do oštećenja tkiva i teške imuno-deficijencije. Najčešći uzrok smrti kod pacijenata koji su razvili GVHD su upravo infekcije bakterijama, virusima i gljivicama. Bolest kalem protiv domaćina u zavisnosti od vremena pojavljivanja može biti akutna ili hronična.

Akutna bolest kalem protiv domaćina javlja se u prva tri meseca nakon transplantacije. Ova pojava se bazira na imunnoj reakciji koju izaziva nepodudarnost HLA antigena davaoca i primaoca, odnosno HLA antigeni domaćina aktiviraju T ćelije davaoca.

Pokazalo se da eliminacija zrelih T ćelija davaoca značajno smanjuje pojavu bolesti kalem protiv domaćina, međutim povećava rizik od pojave relapsa i neprihvatanja kalema [18].

Hronična bolest kalem protiv domaćina predstavlja najčešći uzrok kasne smrti nakon transplantacije i kod 20-70% pacijenata javlja se posle 100 dana nakon TMČH [19]. Korelacija između pojave akutne i hronične GVHD još nije razjašnjena. Kliničke studije su pokazale da pojavi hronične bolesti ne mora da prethodi akutna forma, i obrnuto, da nakon akutne bolesti ne mora da se pojavi hronični oblik [3,19,20].

GVHD je nepoželjan kod urođenih bolesti hematopoeze ili stečene apalstične anemije, dok je veoma poželjan kod malignih bolesti, kao što su leukemije i Non-Hoćkinov limfom. Kod malignih bolesti je uspešnost transplantacije 60%. Međutim, veliki problem u postizanju potpunog izlećenja predstavlja povratak osnovne bolesti ili relaps. Iako incidenca pojave relapsa zavisi od mnogobrojnih faktora, bolesnici se prema statusu remisije pred samu transplantaciju mogu svrstati u dve grupe, grupu niskog i grupu visokog rizika. Bolesnici transplantirani u drugoj remisiji ili kasnije i u relapsu svrstavaju se u grupu visokog rizika. Bolesnici kod kojih dođe do relapsa imaju lošu prognozu, a ishod lećenja zavisi od toga koliko je vremena prošlo od transplantacije. U pojedinim centrima se danas koriste eksperimentalne metode lećenja koje se zasnivaju na kontrolisanoj imuno-terapiji koja podstiče pojavu bolesti kalem protiv leukemije. Kliničke studije su pokazale da je učestalost pojave relapsa najniža kod pacijenata koji su razvili akutni ili hronični oblik GVHD, nešto viša kod pacijenata bez simptoma GVHD, a najviša kod pacijenata kojima je urađena transplantacija depleciranim T-ćelijama. Ova saznanja su dovela do upotrebe GVHD i T ćelija u kontrolisanoj imuno-terapiji sa ciljem da se spreči pojava relapsa [19]. Prekidanje imunosupresivne terapije se može koristiti za aktivaciju T ćelija davaoca protiv leukemijskih ćelija domaćina, ali ovu proceduru najčešće mora pratiti i infuzija ćelija limfocita davaoca (DLI). Mnoge studije su pokazale da DLI ima izuzetan uspeh kod pacijenata sa HML (70-80%), dok s druge strane ima vrlo mali uspeh kod pacijenata sa AML i ALL (20-30%). Zašto je antitumorski efekat (GVL – graft versus leukemia) više izražen kod HML do danas još nije jasno [20, 21]. Najveće komplikacije kod primene DLI su pancitopenija i GVHD. Iako su reakcije GVHD i GVL veoma slične, razvijene su

manipulativne procedure koje razdvajaju GVL efekat od GVHD, sa ciljem da se postigne anti-tumorski efekat [22, 23, 24, 25, 26, 27].

Osetljive metode za detekciju minimalne rezidualne bolesti (MRB) su neophodne da bi se na vreme otkrili bolesnici sa visokim rizikom za relaps i kako bi se započela odgovarajuća imuno-terapija i postigao GVL efekat [28, 29, 30, 31].

1.2 Analiza himerizma

U grčkoj mitologiji Himera je bila stvorena sa glavom lava, telom kože i repom zmije [32]. U medicini „himera“ označava osobu koja ima jednu ili više ćelijskih linija poreklom od dve različite jedinice, dok himerizam u transplantacionoj biologiji predstavlja koegzistenciju ćelija krvne loze dva različita organizma u jednom telu.

Postoje različiti tipovi himerizma:

- kompletni himerizam (CC), u slučaju kada su u perifernoj krvi bolesnika prisutne samo ćelije davaoca (100%)
- mešani himerizam (MC), u slučaju kada su u perifernoj krvi bolesnika prisutne i ćelije davaoca i primaoca. Ukoliko su ćelije primaoca prisutne do 30% naziva se stabilni mešani himerizam
- split himerizam (SC), u slučaju kada su u perifernoj krvi bolesnika podeljene krvne loze, npr. T-ćelije 100% poreklom od davaoca, a mijeloidne ćelije 100% poreklom od primaoca [33].

U slučaju mešanog himerizma prisutne ćelije primaoca mogu biti normalne, zdrave ćelije hematopoeze, kao i leukemijske ćelije. Veoma je važno pratiti himerizam kako bi se odredilo koji su bolesnici u visokom riziku za odbacivanje kalema, pojavu relapsa ili GVHD. U poslednje dve decenije različite grupe naučnika i lekara su ispitivale značaj prisustva mešanog himerizma nakon TMČH, međutim još uvek nije ustanovljena precizna korelacija između MC i relapsa [34, 35, 36, 37]. Neke studije su pokazale da postoji veza između mešanog himerizma i relapsa [38, 39, 40, 41, 42], dok druge studije nisu uspele da pronađu takvu korelaciju [43,44,45, 46,47]. Ovi kontradiktorni rezultati u literaturi mogu biti objašnjeni različitim faktorima. Vreme i učestalost uzimanja uzoraka su važni faktori za otkrivanje mešanog himerizma. Prisustvo MC u ranom periodu posle TMČH ne mora biti povezano sa pojavom relapsa, dok je otkriće MC u kasnijem periodu od većeg značaja za pojavu relapsa. Sa druge strane osetljivost metoda za detekciju mešanog himerizma je različita. Korišćenjem veoma osetljivih metoda moguće je detektovati MC koji vodi

poreklo od normalnih dugo-živućih hematopoetskih ćelija ili od kontaminirajućih nehematopoetskih ćelija, te nema prediktivni značaj za pojavu relapsa [48]. Takođe, za praćenje himerizma koriste se nekad periferna krv, a nekad kostna srž. Fehse i saradnici su pokazali da je MC veći u kostnoj srži nego u perifernoj krvi, verovatno zbog prisustva stromalnih ćelija kostne srži koje se povuku aspiracijom [49]. Dakle, sve ove dileme ukazuju na neophodnost formiranja konsenzusa u vezi sa vremenskim intervalima, vrstom uzoraka i metodama korišćenih za analizu i praćenje himerizma.

1.2.1 Metode za detekciju i praćenje himerizma

Glavni princip u detekciji himerizma je utvrđivanje genetičkih markera koji se razlikuju kod davaoca i primaoca. U velikom broju studija korišćene su različite tehnike za praćenje himerizma nakon alogene TMČH, sa ciljem da se ustanovi koja je tehnika najbrža i najosetljivija. U početku su to bile citogenetičke tehnike (ako su davalac i primalac različitog pola), zatim utvrđivanje imunofenotipa eritrocita kao i njihovog enzimskog sastava, RFLP analiza polimorfnih regiona genoma, analiza visoko polimorfnih kratkih tandemskih ponovaka DNK (STR, VNTR), a u poslednje vreme najsenzitivnija metoda je *real-time* kvantitativni PCR [50]. Različite tehnike za praćenje himerizma, njihova specifičnost, osetljivost i informativnost prikazane su u tabeli 1.1.

Ranije tehnike za procenu himerizma, zasnovane na metodama fenotipizacije antigena crvenih i belih krvnih zrnaca, analizi izotipova imunoglobulina i citogenetičkim studijama, bile su ograničene stepenom polimorfnosti praćenih markera, malom senzitivnošću ili specifičnim zahtevima, kao što su razlika u polu između davaoca i primaoca. Jedna od veoma senzitivnih tehnika, fluorescentna in situ hibridizacija (FISH) za X i Y hromozom, mogla je da se primeni samo ukoliko su davalac i primalac različitog pola. Savremeni pristup u proceni himerizma započeo je sa RFLP analizom bialelskih i analizom minisatelitskih DNK markera. Mana ovih tehnika je bila relativno velika količina

potrebnog polaznog materijala, kao i niska senzitivnost pri detekciji ćelijskih populacija prisutnih u malom procentu.

Tabela 1.1. Tehnike koje se koriste za detekciju himerizma [34]

Tehnika	Prednosti	Nedostaci	Osetljivost	Informativnost
Imuno fenotipizacija eritrocita	Jednostavna, brza i veoma osetljiva metoda	Detektuje samo jednu ćelijsku liniju	0,04-3%	niska
Citogenetika	Efikasna je kada je prisutan MRB klon (npr. Ph-hromozom)	Detektuje samo ćelije u deobi	5-10%	niska
XY-FISH	Detektuje veliki broj ćelija	Koristi se samo kod različitog pola davaoca i primaoca	0,2-5%	visoka
RFLP	Detektuje sve ćelije sa jedrom iz malog uzorka	Složeni rezultati zbog velikog broja restrikcionih mesta	5-10%	visoka
STR/VNTR	Veoma polimorfni regioni, nezavisni od pola ili HLA tipa	Zbog prajmer-kompeticije manje senzitivna za male ćelijske populacije, nije leukemija specifična	0,1-5%	visoka
Markeri na Y-hromozomu	Veoma informativna kod TMČH različitog pola	Koristi se kada je davaoc ženskog pola	0,1-4%	visoka
Markeri na X-hromozomu	Veoma informativna kod HSCT različitog pola	Koristi se kada je davaoc muškog pola	0,1-4%	visoka
Real-time PCR	Brza, precizna kvantifikacija ćelija	Skupa, efikasna samo sa bialnim markerima	0,1-1%	visoka

Tek je uvođenje STR-PCR tehnologije, kao metode za brzu, specifičnu i senzitivnu analizu mikrosatelitskih genetičkih markera, obezbedilo efikasnu procenu himerizma. U ovom pristupu, fluorescentno obeleženi prajmeri se koriste za umnožavanje polimorfnih genskih lokusa, a kvalitativna i kvantitativna analiza umnoženih produkata u aparatima za kapilarnu elektroforezu omogućava preciznu procenu udela alela davaoca i primaoca u uzorku periferne krvi transplantiranog bolesnika. Budući da ovaj pristup obezbeđuje senzitivnost od 0,1 do 5%, Međunarodni Registar Transplantacije Kostne Srži (IBMTR – International Bone Marrow Transplant Registry), preporučuje PCR analizu mikrosatelitskih genskih lokusa u uzorcima periferne krvi pacijenata, kao senzitivna, reproducibilna i informativna postupak za procenu himerizma hematopoetskih tkiva [33]. Iako su ove metode široko prihvaćene, još uvek nije formirana standardizacija koja bi omogućila tumačenje i poređenje rezultata između različitih kliničkih centara.

Prednosti i nedostaci STR-PCR metode. Studije su pokazale da je STR-PCR metod senzitivna (0,1 do 5%), reproducibilna i informativna postupak za procenu himerizma hematopoetskih tkiva [33]. Potencijalni problem kod STR-PCR analize su tzv. “stater” pikovi, koji predstavljaju artefakt PCR amplifikacije. Teško ih je razlikovati od malih pikova DNK primaoca posle transplantacije što može da ometa analizu informativnih alela. Ovaj problem se izbegava korišćenjem komercijalnih kitova za simultanu analizu 16 genskih lokusa, tako da je za svaki par davalac - primalac moguće dobiti bar četiri informativna alela, i na taj način izabrati one lokuse koji nemaju “stater” pik ispred prvog alela [51].

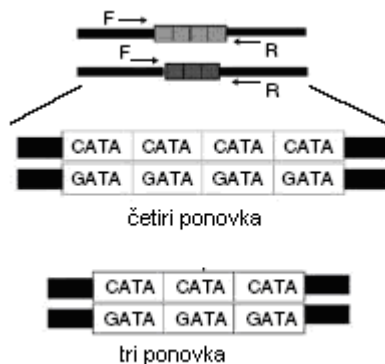
Prednosti i nedostaci XY-FISH metode. XY-FISH metoda je takođe veoma informativna i senzitivna kod bolesnika čiji je davalac suprotnog pola. Osetljivost FISH metode iznosi 0.2% ako se analizira najmanje 500 ćelija. Ova metoda omogućava da se na preparatima dobijenim bez kultivacije ćelija periferne krvi, analizom interfaznih jedara dobije precizna procena odnosa ćelija davaoca i primaoca u uzorku, za samo 24 h. Mana ove metode je što je ograničena samo za bolesnike sa davaocima suprotnog pola [52].

1.2.2 Polimorfni regioni u humanom genomu

Razvojem modernih tehnika molekularne biologije, u 70-im godinama 20. veka, naučnicima je omogućeno da konstruišu rekombinantne DNK molekule koje je moguće klonirati. Kloniranjem se dobija veliki broj kopija željenog molekula DNK (gena), sa kojima je moguće manipulirati na razne načine: mapiranje, sekvenciranje, mutiranje, kao i transformacija ćelija. Tako je do 1990. godine, otkriveno skoro 5500 gena, a spekulisalo se da se genom čoveka sastoji od skoro 100 000 gena. U oktobru 1990. godine osnovan je internacionalni „Projekat humani genom“, sa željom da se odredi sekvenca svih gena čoveka. Ovo je bio izuzetno obiman posao u kome su učestvovali naučnici iz celog sveta. Zahvaljujući automatizaciji DNK sekvenciranja i upotrebi kompjuterskih programa za ažuriranje dobijenih podataka posao je završen brže nego što se očekivalo. Godine 2001. ustanovljeno je da je ukupan broj gena čoveka svega 20000-25000. Otkriveno je da samo 1,5% genoma čine unikatne sekvence koje kodiraju proteine (geni), dok ostatak čine nekodirajući regioni. Deo nekodirajućih regiona čine regulatorne sekvence, dok je uloga najvećeg dela ovih regiona još uvek nepoznata [53].

Polimorfni DNK regioni, široko rasprostranjeni u humanom genomu, predstavljaju značajne genetičke markere koji se koriste za konstruisanje mape gena, u medicinskoj dijagnostici, kao i za identifikaciju osoba. DNK polimorfizmi predstavljaju jednu od dve ili više formi lokusa, koji se razlikuju u sekvenci nukleotida. Primeri DNK polimorfizama su polimorfizmi dužina restikcionih fragmenata (RFLPs), kratki tandemski ponovci (STRs), varijabilni broj tandemskih ponovaka (VNTRs), kao i polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (SNPs). Razvojem PCR tehnologije i otkrićem visoko polimorfnih regiona za mapiranje gena kao i za otkrivanje gena odgovornih za određene bolesti (genetičke analize vezanosti) smenjivala se upotreba RFLP sa STR i VNTR markerima, prisutnim na svakih 5×10^5 bp u humanom genomu, kao i sa najnovijom generacijom polimorfnih markera SNP, prisutnim na svakih 500 do 1000 bp u humanom genomu. VNTRs ili minisateliti se sastoje od 15-50 nukleotida dugačkih sekvenci, koje se ponavljaju u blokovima, dok su STRs ili mikrosateliti, sastavljeni od ponovljenih jedinica dužine 2-6 bp. Kod različitih osoba

osnovna ponovljena sekvenca ostaje ista, ali se broj ponavljanja ove sekvence razlikuje i predstavlja različite alele tog STR markera (slika 1.1) [34].



Slika 1.1. Aleli tetra-nukleotidnog kratkog tandemskog ponovka (STR) na dva hromozoma, razlikuju se po broju ponovaka (na jednom hromozomu su četiri, a na drugom tri ponovka).

STRs i VNTRs su veoma polimorfni regioni, imaju veliki broj alela. U humanom genomu je do danas poznato oko 10^6 STR markera (tabela 1.2) [51]. Analiza STR markera se smatra veoma informativnom i brzom metodom. Isto tako, lančano umnožavanje STR lokusa, iz veoma malih količina DNK, omogućava otkrivanje porekla DNK u bilo kom uzorku biološkog materijala [54].

Tabela 1.2. Polimorfni markeri u humanom genomu (GenBank®)[51]

HROMOZOM	STR MARKERI	RFLP MARKERI	OSTALI MARKERI
1	<i>F13B,RENA4, D1S1171</i>	<i>D1S7, D1S339</i>	<i>DIS80</i>
2	<i>TPOX, APOB, D2S410, D2S436, D2S1242</i>	<i>D2S44</i>	<i>apoB</i>
3	<i>D3S1349, D3S1352, D3S1358, D3S1359, 1744, ACPP</i>		
4	<i>FGA, FABP, GABARB15</i>	<i>D4S139</i>	<i>GC(PM), GYPA(PM)</i>
5	<i>CSF1PO, D5S373, D5S815, D5S818</i>	<i>D5S110</i>	
6	<i>F13A1, ACTBP2, FOP23, D6S366, D6S502, D6S965</i>	<i>D6S132</i>	<i>DQα</i>
7	<i>D7S460, D7S809, D7S820, D7S1517, D7S1520</i>	<i>D7S21, D7S22, D7S467</i>	<i>D758 (PM)</i>
8	<i>LIPOL, D8S306, D8S320, D8S323, D8S344, D8S347, D8S639, D8S1179</i>		
9	<i>D9S52</i>		
10	<i>D10S89</i>	<i>D10S28</i>	
11	<i>THO1, APOAII, D11S554, UGB</i>		<i>HBGG (PM)</i>
12	<i>VWA, CD4, PLA2A1, D12S67, D12S391, D12S1090</i>	<i>D12S11</i>	
13	<i>D13S308, D13S317</i>		
14	<i>D14S306</i>	<i>D14S13</i>	
15	<i>FES/FPS, CYAR04</i>		
16	<i>D16S537, D16S539</i>	<i>D16S85</i>	
17		<i>D17S79, D17S26</i>	<i>D17S5, YNZ22</i>
18	<i>MBP, D18S51, D18S535, D18S849</i>		
19	<i>D19S253</i>		
20	<i>D20S85, D20S470</i>		
21	<i>D21S11</i>		
22			
X	<i>HPRTB, ARA, STRX1, DXYS156</i>		<i>Amelogenin</i>
Y	<i>DYS19, DYS385, DYS389, DYS390, DYS391,</i>		<i>Amelogenin</i>

1.3 Analiza minimalne rezidualne bolesti

Minimalna rezidualna bolest (MRB) ukazuje na prisustvo leukemijskih ćelija ispod nivoa detekcije standardnim morfološkim pregledom kostne srži (10^{-2}). Razvijene su metode različite specifičnosti i senzitivnosti za detekciju MRB, kao što su analiza imunofenotipa, citogenetika, molekularna citogenetika (FISH), molekularna genetika (RT-PCR, qPCR) i druge [55]. Karakteristike najsavremenijih metoda koje se koriste za detekciju MRB prikazane su u tabeli 1.3.

Ispitivanje imunoloških osobina leukemijskih ćelija, tj. dokazivanje imunoloških markera na površini ili unutar ćelija, predstavlja najbitniju komponentu dijagnostičkog postupka kojim se postiže precizno tipiziranje leukemijskih ćelija. Ispitivanje se vrši savremenom tehnologijom – metodom protočne citometrije, koja uz pomoć lasera i kompjuterskih softvera velikom brzinom analizira leukemijske ćelije koje su prethodno posebnim postupkom obeležene fluorescentnim bojama. Analiza imunofenotipa metodom protočne citometrije se može primeniti za praćenje MRB kod 80-95% obolelih od akutne leukemije. Pored toga što je brza i osetljiva, ova metoda zbog kompleksnosti analize zahteva visoko obučene stručnjake i veoma je skupa.

Danas je citogenetika, kao najstarija metoda za otkrivanje hromozomskih rearanžmana i pored osetljivih, specifičnih savremenih metoda molekularne genetike, ostala nezamenjiva za praćenje bolesnika sa nespecifičnim hromozomskim aberacijama. Sa druge strane, metoda molekularne citogenetike – fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH) se koristi za analizu specifičnih submikroskopskih aberacija.

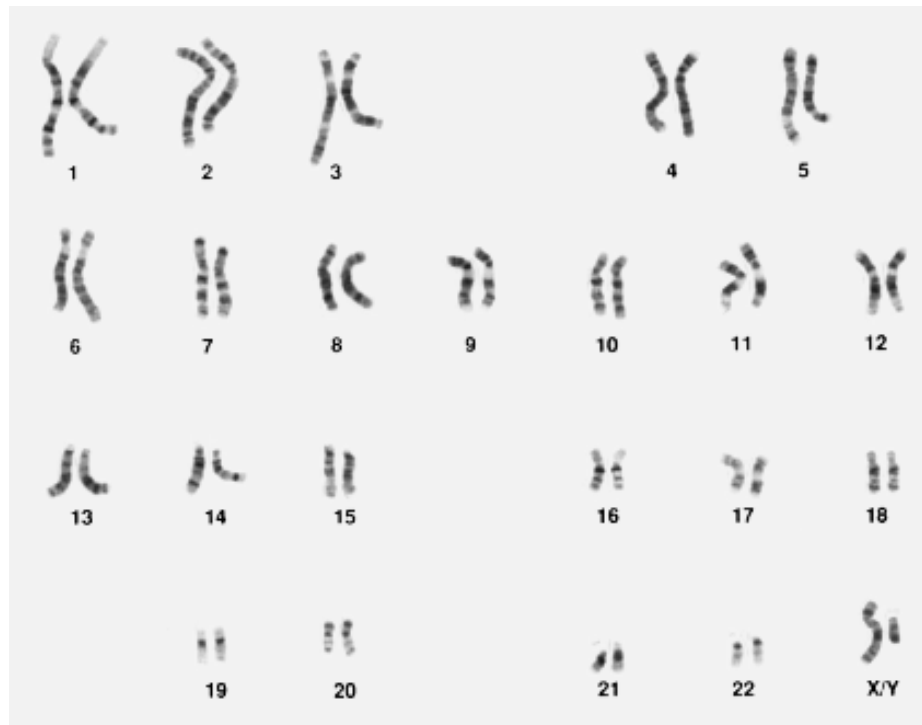
Metode molekularne genetike kao što su RT-PCR, analiza Ig/TCR rearanžmana ili qPCR imaju visoku osetljivost i leukemija specifičnost. Međutim, ove metode su veoma skupe i zahtevaju kompleksnu analizu [56].

Tabela 1.3. Karakteristike savremenih metoda koje se koriste za detekciju MRB nakon TMČH kod pacijenata obolelih od malignih bolesti [55]

	Imunofenotipizacija (protočna citometrija)	RT-PCR detekcija fuzionih gena	Molekularna citogenetika (FISH)	PCR analiza Ig/TCR rearanžmana
Primena				
B-ALL	80-95%	40-50%	50%	95%
T-ALL	>95%	10-20%	10%	95%
AML	>80%	20-40%	50%	10%
Osetljivost	10^{-3} - 10^{-4}	10^{-3} - 10^{-4}	10^{-2} - 10^{-3}	10^{-4} - 10^{-6}
Prednosti	Brza, precizna kvantifikacija	Specifična, brza	Specifična, brza	Specifična, brza, precizna kvantifikacija
Nedostaci	Kompleksna analiza, neophodni su sveži uzorci, variranje antigen ekspresije	RNK degradacija (lažno neg. rezultati), neprecizna kvantifikacija	Veoma skupa	Kompleksna analiza, veoma skupa, evolucija klona ometa analizu

1.3.1 Citogenetika i molekularna citogenetika

Polovinom 20. veka Nowell i Hungeford su opisali prvu hromozomsku aberaciju povezanu sa leukemijom kod ljudi. Oni su pokazali prisustvo neobično malog hromozoma u leukemijskim ćelijama bolesnika obolelih od hronične mijeloidne leukemije i nazvali ga Philadelphia (Ph) hromozom po gradu u kome je otkriven. Klasična citogenetika počinje razvojem tehnika za preparaciju hromozoma ćelija periferne krvi, kostne srži i drugih tkiva, početkom šezdesetih godina prošlog veka [57].



Slika 1.2. Normalan muški kariotip, tehnika G traka

Razvoj različitih tehnika diferencijalnog bojenja hromozoma, kao što su tehnike G, C, Q, R i NOR-traka, početkom sedamdesetih, omogućio je preciznu identifikaciju hromozomskih parova (slika 1.2). Primenom ovih tehnika definisan je i veliki broj hromozomskih aberacija u malignim ćelijama različitih tkiva. Tako je razvojem citogenetike pokazano da je Ph hromozom derivat hromozoma 22 i da je nastao nakon recipročne translokacije $t(9;22)(q34;q11)$ između dugog kraka hromozoma 9 i dugog kraka hromozoma 22 (slika 1.3). Danas se za precizan opis aberacija koristi međunarodno utvrđena citogenetička nomenklatura “International System of Cytogenetic Nomenclature 2009” [58].



Slika 1.3. Hromozomi 9 i 22 i njihovi derivati nastali nakon translokacije $t(9;22)(q34;q11)$
(G bending)

U velikom broju hromozomskih aberacija kod humanih neoplazija otkrivenih poslednjih godina potvrđena je hipoteza da su somatske mutacije u hematopoetskoj matičnoj ćeliji direktan uzrok neoplastičnog procesa [59]. Paralelno sa razumevanjem bazičnog biološkog mehanizma nastanka maligne transformacije, rastao je i klinički značaj citogenetski detektovanih aberacija kao dijagnostičkih i prognostičkih parametara.

Veliki broj karakterističnih hromozomskih promena specifičan je za pojedine maligne bolesti. Otkriveno je preko 15000 hromozomskih aberacija koje mogu biti uzrok nastanka maligniteta. Sve su grupisane, kao specifične odnosno nespecifične za određeni tip maligniteta u Katalogu hromozomskih aberacija kancera „*Database of Chromosome Aberrations in Cancer*“ [60]. U tabeli 1.4 prikazane su specifične, rekurentne translokacije koje se javljaju kod leukemija dečijeg uzrasta.

Prednosti i nedostaci metoda citogenetike. Citogenetika predstavlja sastavni deo obavezne laboratorijske dijagnostike leukemija, anemija, solidnih tumora i limfoma. Metodama klasične citogenetike je moguće otkriti prisustvo specifičnih i nespecifičnih strukturnih promena na hromozomima, kao i odstupanje od normalnog broja hromozoma (aneuploidiju ili poliploidiju). Prednosti citogenetike u odnosu na PCR metode molekularne genetike su u tome što je mogućnost detekcije različitih aberacija šira, u smislu da je moguće otkriti nespecifične hromozomske aberacije, kao i delecije ili duplikacije. S druge strane, nedostatak metoda citogenetike je mala osetljivost, odnosno nemogućnost detekcije

leukemijskog klonu kada je prisutan u malom procentu kao i nemogućnost detekcije hromozomskih aberacija manjih od 4 Mb.

Tabela 1.4. Specifične hromozomske aberacije za određene tipove leukemija [60]

TIP LEUKEMIJE	HROMOZOMSKA ABERACIJA
B-ALL	t(12;21)(p13;q22)
	t(1;19)(q23;p13)
	t(4;11)(p13;q23)
	t(9;22)(q34;q11)
	t(8;14)(q24;q32)
	t(5;14)(q31;q32)
	t(11;19)(q23;p13)
	t(9;11)(p22;q23)
	t(17;19)(q22;p13)
	t(11;19)(q23;p13)
T-ALL	t(11;14)(p13;q11)
	t(10;14)(q24;q11)
	t(1;14)(p32;q11)
AML	t(8;21)(q22;q22)
	t(16;16)(p13;q22)
	inv(16)(p13;q22)
	t(15;17)(q22;q12)
	t(11;17)(q34;q11)
HML	t(9;22)(q34;q11)

Zbog ograničenja metoda klasične citogenetike za analizu specifičnih aberacija koristi se i metoda molekularne citogenetike - FISH, koja omogućava detekciju submikroskopskih aberacija kao i retkih mozaičnih klonova. FISH se zasniva na korišćenju fluorescentno obeležene genske probe koja se vezuje za komplementarnu DNK sekvencu. Fluorescentne signale je moguće analizirati pomoću svetlosnog mikroskopa, kako na

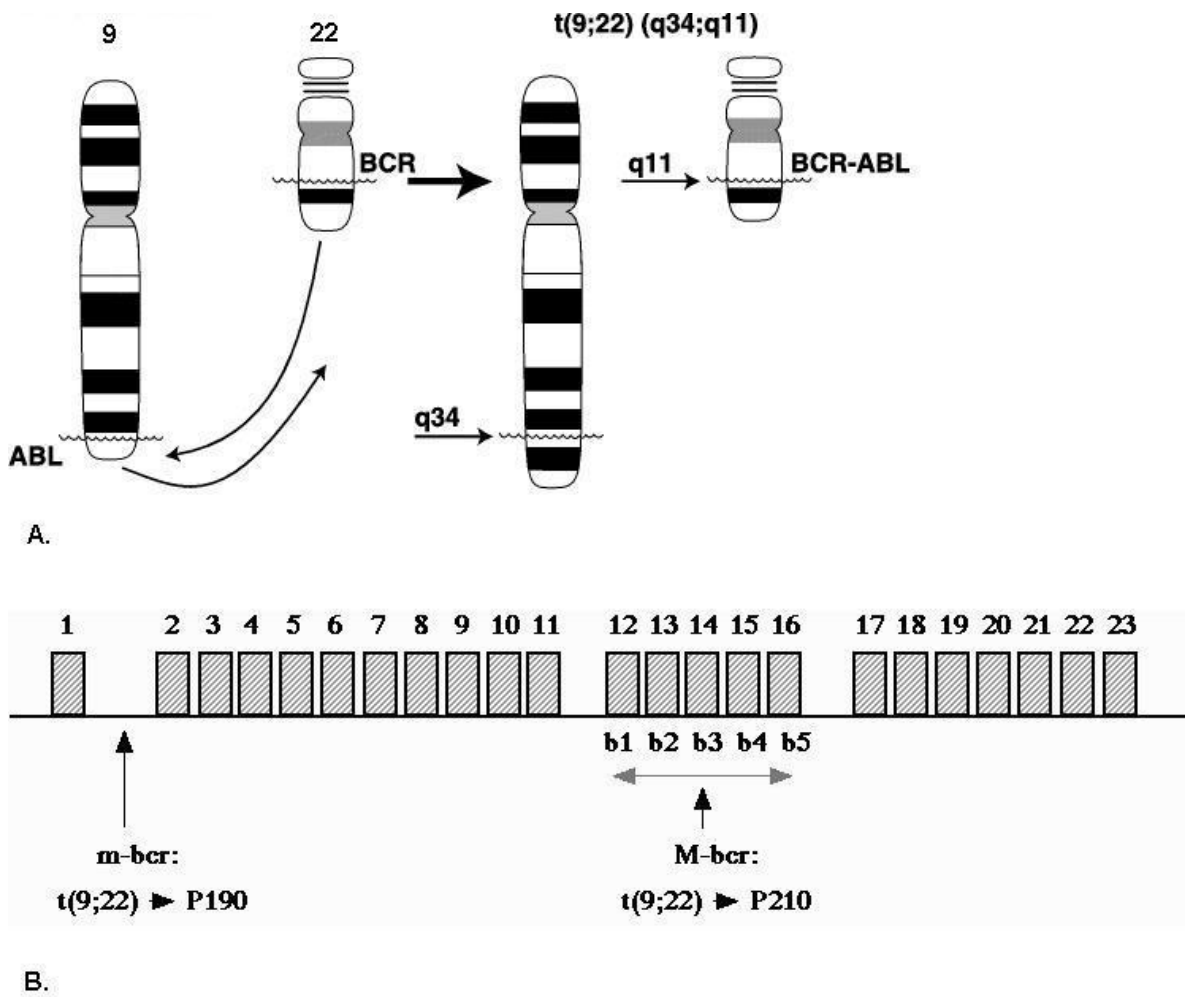
hromozomima u okviru metafazne figure, tako i na interfaznim jedrima. Najznačajnija primena FISH metode u dijagnostici malignih bolesti je detekcija fuzionih transkripata *BCR-ABL*, *TEL-AML1* kod leukemija, kao i rearanžmana *MLL* gena i njegovih mnogobrojnih tzv. „partner“ gena (*AF4*, *AF6*, *AF9*, *ELL*, *ENL*, *AFX1*, itd.) [61].

FISH metoda ima veću osetljivost od klasične citogenetike i može se koristiti za praćenje MRB.

1.3.2 Molekularna genetika malignih bolesti hematopoeze

Hromozomske aberacije dovode do gubitka ili do promene mesta i strukture jednog ili više gena transformišući ćelijsku aktivnost od normalne ka neoplastičnoj [62]. Strukturnim rearanžmanima hromozoma, translokacijom, insercijom, inverzijom itd., aktiviraju se onkogeni. Nasuprot tome, gubitak hromozomskog materijala, delecija ili monozomija, dovode do inaktivacije tumor-supresor gena čime se narušava njihova antionkogen funkcija. U oba slučaja dolazi do maligne transformacije ćelije usled sinteze izmenjenog produkta, normalnog produkta u neodgovarajuće vreme ili sinteze neodgovarajuće količine produkta pomenutih gena [63]. Najčešće kombinacija mutacija na proto-onkogenima i na tumor-supresor genima zaustavlja ćelijske mehanizme regulacije rasta i diferencijacije i dovodi do malignizacije tkiva. Za inicijaciju i nastanak većine kancera potrebno je da se desi više mutacija u somatskoj ćeliji i da se one nagomilavaju u toku života. Neke mutacije su prisutne u različitim tipovima kancera, tako da različite kombinacije mutacija na više gena mogu da dovedu do formiranja istog tumora, dok su neke mutacije specifične za određeni tip tumora [64,65].

Razvojem molekularne genetike dokazano je da pojava poznate translokacije t(9;22)(q34;q11) dovodi do formiranja fuzionog gena *BCR-ABL* koji nastaje spajanjem 3' dela *ABL* gena koji kodira protein tirozin kinazu na hromozomu 9 i 5' dela *BCR* gena na hromozomu 22, koji kodira fosfo-protein (slika 1.4). Danas je poznato da ovaj rearanžman ima za posledicu neregulisanu aktivnost proteina tirozin kinaze koja kroz izmenjene puteve



Slika 1.4. Shema nastanka Ph hromozoma: A. Translokacija $t(9;22)(q34;q11)$

B. Struktura BCR gena sa prekidima u minor i major klaster regionu

signalne transdukcije dovodi do nekontrolisane deobe ćelije (nezavisne od faktora rasta) i neoplastične transformacije [66,67,68]. Ovaj rearanžman se javlja kod 95% HML odraslih, i kod 2-5% ALL i 3% HML dečijeg uzrasta. U većini HML slučajeva prekid u *BCR* genu se dešava u delu koji je označen kao major klaster region (M-bcr) između egzona 13 i 14 (b2a2) ili između egzona 14 i 15 (b3a2). U oba slučaja hibridni gen kodira himerni protein od 210 kDa (p210 tirozin kinaza). U većini ALL slučajeva prekid u *BCR* genu se dešava u prvom intronu (e1a2), označenom kao minor klaster region (m-bcr), i tada nastaje himerni protein od 190 kDa (p190 tirozin kinaza) [69,70,71]. Kliničke studije su pokazale da je aktivnost p190 tirozin kinaze veća od p210 tirozin kinaze, što objašnjava činjenicu da bolesnici sa p190 transkriptom imaju veći rizik za pojavu relapsa nakon TMČH od bolesnika sa p210 transkriptom [73].

Metode molekularne genetike su omogućile da se nakon ovog otkrića detektuju i ostali geni koji usled translokacija formiraju fuzione gene, da se otkrije funkcija ovih gena i način na koji dovode do razvoja različitih tipova leukemija. Za pojavu leukemije dečjeg uzrasta prognostički i dijagnostički najznačajnije aberacije pored translokacije t(9;22), su t(12;21), rearanžmani *MLL* gena i translokacija t(15;17). Ustanovljeno je da translokacija t(12;21)(p13;q22) dovodi do formiranja fuzionog gena *TEL-AML1* koji za posledicu ima inhibiciju transkripcije preko izmenjene aktivnosti transkripcionih faktora *TEL (ETV6)* i *AML1* [74]. Translokacije koje obuhvataju 11q23 region za posledicu imaju konstitutivnu aktivnost *MLL* transkripcionog faktora [75]. Takođe, dokazano je da translokacija t(15;17)(q22;q12) dovodi do formiranja fuzionog gena *PML-RAR α* što za posledicu ima promenu u funkciji receptora retinoične kiseline i izaziva blok u diferencijaciji ćelija [76]. U tabeli 1.5 prikazani su molekularni mehanizmi i učestalost rekurentnih translokacija koje se najčešće javljaju kod leukemija dečjeg uzrasta.

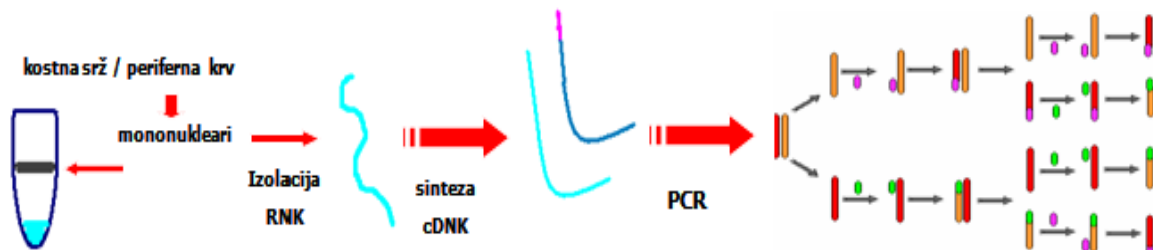
Hromozomske aberacije se mogu koristiti kao leukemija specifični markeri za praćenje MRB. Imajući u vidu da standardna citogenetika u otkrivanju hromozomskih aberacija ima svoja ograničenja, odnosno osetljivost od svega 10%, od velikog značaja je upotreba PCR metoda molekularne genetike u ove svrhe. PCR tehnike imaju mogućnost da otkriju jednu ćeliju leukemijskog klona među blizu milion normalnih ćelija, što im daje veliku moć u detekciji MRB.

Tabela 1.5. Učestalost i molekularni mehanizmi prognostički i dijagnostički najznačajnijih aberacija kod leukemije dečijeg uzrasta

TIP LEUKEMIJE	HROMOZOMSKE ABERACIJE	FREKVENCIJA U DEČJEM UZRASTU	FUZION I GEN	FUNKCIJA PROTEINA
B-ALL	t(12;21)(p13;q22)	25%	TEL-AML1	transkripcioni faktor
	t(1;19)(q23;p13)	5%	PBX-E2A	transkripcioni faktor
	t(4;11)(p13;q23)	6%	MLL-AF4	transkripcioni faktor
	t(9;22)(q34;q11)	2-5%	BCR-ABL	tirozin kinaza
T-ALL	TAL1 delecija	20-25%	SIL-TAL	transkripcioni faktor
	t(11;14)(p13;q11)	4%	TCR	transkripcioni faktor
AML	t(8;21)(q22;q22)	12%	AML1-ETO	transkripcioni faktor
	t(16;16)(p13;q22)	12%	CBFβ-MYH11	transkripcioni faktor
	inv(16)(p13;q22)			transkripcioni faktor
	t(15;17)(q22;q12)	75%	PML-RARα	ćelijski receptor
	t(11;17)(q34;q12)		RARα-PLZF	ćelijski receptor
HML	t(9;22)(q34;q11)	3%	BCR-ABL	tirozin kinaza

PCR je moguće izvoditi direktno na DNK kada je fragment koji umnožavamo relativno mali, odnosno kada je razmak između tačaka prekida mali. Međutim kod pomenutih rekurentnih translokacija prekidi se dešavaju uglavnom u delovima introna, tako da nastaju veliki produkti koje je nemoguće umnožiti. Iz tog razloga se za detekciju fuzionih rearanžmana koristi metoda RT-PCR, odnosno u PCR reakciji koristi se komplementarna cDNK reverzno transkribovana na RNK transkriptima fuzionih gena (slika 1.5). Kada je potrebno povećati osetljivost PCR analize radi se tzv. „nested“ PCR,

gde se u drugoj PCR reakciji umnožavaju PCR produkti iz prve reakcije korišćenjem unutrašnjih prajmera [77].



Slika 1.5. Shema PCR reakcije nakon reverzne transkripcije (RT-PCR)

Prednosti i nedostaci PCR metode. Prednost korišćenja PCR metode u detekciji MRB je njena visoka osetljivost i leukemija specifičnost. Međutim, ova metoda nije kvantitativna i ne može se primenjivati kod pacijenata koji nisu bili pozitivni za neku od rekurentnih translokacija prilikom postavljanja dijagnoze. Takođe, velika osetljivost metode omogućava da dođe do kontaminacije PCR produkata što može navesti na lažno pozitivne rezultate [55]. S druge strane, RNK molekul je veoma osetljiv i lako se degraduje, što može imati za posledicu lažno negativne rezultate. Neophodno je uvek imati na umu ove činjenice i preduzimati sve mere prevencije.

Važan princip u detekciji fuzionih gena na nivou RNK transkripata je paralelna analiza ekspresije nekog konstitutivno aktivnog gena zato što prinos i kvalitet RNK i cDNK može mnogo da varira. Ova analiza predstavlja unutrašnju kontrolu kvaliteta uzorka bolesnika [39]. Izbor adekvatnog kontrolnog gena je komplikovan zbog mogućeg postojanja pseudogena ili nefunkcionalnih gena čija je sekvenca ista kao tražena iRNK. Studije su pokazale da je uobičajeno korišćen *ABL* gen pogodan kao kontrolni gen za RT-PCR analizu *BCR-ABL* rearanžmana kao i drugih čestih translokacija kod leukemija dečijeg uzrasta [78,79,80].

Značaj molekularne genetike. Zahvaljujući razvoju tehnika citogenetike i molekularne genetike sve su veći uspjesi u lečenju pacijenata obolelih od hematoloških maligniteta. Metode citogenetike i molekularne genetike omogućavaju potvrdu dijagnoze, samim tim i pravilan izbor terapije, praćenje bolesnika nakon primenjene terapije ili transplantacije matičnih ćelija hematopoeze, radi blagovremenog otkrivanja pojave relapsa i svrstavaju bolesnike u određenu grupu rizika (standardni, srednji ili visoki) [81]. Razumevanje mehanizama koji se dešavaju nakon hromozomskih rearanžmana omogućilo je sintezu specifičnih lekova koji deluju na molekulskom nivou direktno na produkte rearanžmana odgovorne za razvoj leukemije. Trenutno se uspešno koriste inhibitori *BCR-ABL* tirozin kinaze u lečenju HML i retinoična kiselina (ATRA) u lečenju akutne promijelocitne leukemije, dok su u toku ispitivanja za sintezu lekova koji bi direktno na molekularnom nivou suzbili malignu transformaciju u slučaju drugih poznatih genskih rearanžmana [10,82]. Sva ova saznanja ukazuju na neophodnu kombinovanu primenu metoda citogenetike i molekularne genetike u dijagnostici hematoloških bolesti.

Uzorci tkiva za dijagnostiku MRB - periferna krv ili kostna srž. Imajući u vidu da se bolesnici nakon TMČH često kontrolišu, važno je napraviti pravilan izbor uzorka za analizu. Upotreba periferne krvi za analizu MRB je praktičnija od kostne srži. Aspiracija kostne srži je bolna i ne može se sprovoditi često, naročito kod dece.

Rađene su studije sa ciljem da se uporedi nivo detekcije MRB u perifernoj krvi i kostnoj srži kod različitih tipova leukemija (tabela 1.6). Kod HML, studije su pokazale da je moguće koristiti samo perifernu krv za analizu MRB jer je potvrđeno poklapanje *BCR-ABL* nivoa u perifernoj krvi i kostnoj srži [83,84]. Kod Ph pozitivnih ALL se nivo *BCR-ABL* transkripta takođe poklapa u perifernoj krvi i kostnoj srži [85]. Kod AML pacijenata sa *inv(16)* i *t(8;21)* pokazalo se da je za analizu MRB informativnija kostna srž [86,87], dok je nivo *PML-RAR α* transkripta jednak u perifernoj krvi i kostnoj srži [88].

Analiza kostne srži nakon TMČH je pokazala da su stromalne ćelije poreklom od domaćina dok su makrofagi adherentnog sloja poreklom od davaoca. Analiza himerizma iz kostne srži može, iz ovih razloga, dovesti do lažno pozitivnih rezultata [89]. Takođe, pokazalo se da leukemijske ćelije nisu homogeno raspoređene u kostnoj srži, te da uzimanje

uzorka za analizu MRB samo sa jednog mesta može dovesti do lažno negativnog rezultata [90,91].

Tabela 1.6. Nivo detekcije minimalne rezidualne bolesti u perifernoj krvi i kostnoj srži kod različitih tipova leukemija [83,84,85,86,87,88].

Analiza MRB	PK	KS
HML Ph+	✓	✓
ALL Ph+	✓	✓
AML t(15;17)	✓	✓
AML t(8;21)	✗	✓
AML inv(16)	✗	✓
kariotip	✗	✓

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovoga rada je da se kod bolesnika posle TMČH odredi optimalni dijagnostički pristup za praćenje pojave relapsa ili odbacivanja kalema, uzimajući u obzir korelaciju između prisustva odgovarajućih genetičkih markera i posttransplantacionog kliničkog toka.

Kako bi se postigao ovaj cilj potrebno je ispuniti sledeće podciljeve:

1. U zavisnosti od prirode bolesti (prisustva odgovarajućih genetičkih markera) odrediti strategiju za primenu odgovarajućih genetičkih metoda za praćenje pacijenata (STR-PCR, citogenetika, RT-PCR).
2. Ustanoviti odgovarajuće uzorke za analizu (dlaka, bukalni bris, kostna srž ili periferna krv).
3. Odrediti optimalne intervale uzimanja uzoraka radi postizanja odgovarajuće informativnosti o stanju pacijenta posle TMČH.
4. Ispitati prognostički značaj prisustva mešanog odnosno kompletnog himerizma.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Ispitanici

Himerizam je praćen kod 47 ispitanika kojima je urađena transplantacija matičnih ćelija hematopoeze. TMČH je urađena kod 13 ispitanika sa nemaligim bolestima i 34 ispitanika sa malignim bolestima, sa sledećom uputnom dijagnozom: 8 ispitanika sa aplastičnom anemijom, 1 ispitanik sa talasemijom major kome je dva puta rađena transplantacija, 1 sa osteopetrozom, 2 sa imunodeficijencijom, 1 sa hemofagocitnom limfohistiocitozom, 10 sa AML, 13 sa ALL, 4 sa MDS, 3 sa HML, dvoje sa juvenilnom mijelomonocitnom leukemijom, 1 sa bifenotipskom leukemijom i 1 sa Non-Hoćkinovim limfomom. Kod 35 ispitanika je izvršena alogena transplantacija sa identičnim HLA davaocima (brat/sestra), kod 7 ispitanika urađena je haplo-identična transplantacija roditelj – dete, dok je kod 6 ispitanika urađena transplantacija sa nesrodnim identičnim davaocem (tabela 3.1).

Kod davaoca i primaoca sprovedena je pre transplantacije i samo kod primaoca posle transplantacije, STR-PCR analiza u sledećim vremenskim intervalima: svakih 30 dana do 6 meseci, svakih 60 dana od 6 meseci do godinu dana, svakih 90 dana u drugoj godini, a zatim svakih 6 meseci do pet godina nakon TMČH. Takođe je kod ispitanika sa malignim bolestima rađena citogenetička i RT-PCR analiza pre i posle transplantacije.

Tabela 3.1. Kliničke karakteristike bolesnika

BOLESNIK	POL	UZRAST (godina)	DIJAGNOZA	DONOR	BROJ TMČH	STANJE PRE TMČH	REŽIM KONDICIO NIRANJA	DUŽINA PRAĆENJA (meseći)	GVHD	ISHOD
1.	M	16	Aplastična anemia	SI	1	/	MA	8	/	Kompli kacije
2.	M	17	Aplastična anemia	SI	1	/	MA	48	/	Živ bez bolesti
3.	M	10	Aplastična anemia	SI	1	/	MA	60	/	Živ bez bolesti
4.	M	12	Aplastična anemia	SI	1	/	MA	49	/	Živ bez bolesti
5.	M	14	Aplastična anemia	NSI	1	/	MA	18	Akutni	Živ bez bolesti
6.	M	18	Aplastična anemia	SI	1	/	MA	6	Akutni	Živ bez bolesti
7.	Ž	4	Aplastična anemia	SI	1	/	MA	11	Akutni	Živ bez bolesti
8.	Ž	7	Aplastična anemia	SI	1	/	MA	15	Akutni	Živ bez bolesti
9.	M	8	Talasemija major	SI	1	/	MA	12	Akutni	recidiv
10.	M	10	Talasemija major	SI	2	/	MA	22	Akutni	Živ bez bolesti

11.	Ž	0,5	Osteopetroza	SHI	1	/	MA	1	Akutni	Komplikacije
12.	M	0,5	Imunodefijencija	NSI	1	/	MA	23	Akutni	Živ bez bolesti
13.	M	1	Imunodefijencija	SI	1	/	MA	48	Akutni	Živ bez bolesti
14.	Ž	1	Hemofagocitna limfhistiocitoza	NSI	1	/	MA	5	Akutni	Komplikacije
15.	M	2	AML	SI	1	II Remisija	MA	53	Akutni+hronični	Živ bez bolesti
16.	Ž	2	AML	SI	1	II Remisija	MA	4	/	Recidiv
17.	Ž	18	AML	SI	1	II Remisija	MA	3	Akutni	Komplikacije
18.	Ž	10	AML	SI	2	II Remisija	MA	7	Akutni+hronični	Recidiv
19.	M	2	AML	SHI	1	Relaps	MA	8	Akutni	Recidiv
20.	M	14	AML	SI	1	I Remisija	MA	38	Hronični	Živ bez bolesti
21.	Ž	10	AML	SHI	1	I Remisija	MA	28	Akutni	Živ bez bolesti

22.	Ž	10	AML	SHI	1	II Remisija	MA	28	Akutni+hroničn	Živ bez bolesti
23.	M	6	AML	SI	1	II Remisija	MA	4	Akutni	Komplikacije
24.	M	8	AML	SI	1	II Remisija	MA	12	Akutni	Živ bez bolesti
25.	M	11	ALL	SI	1	II Remisija	MA+TBI	5	Akutni	Živ bez bolesti
26.	Ž	5	ALL	SI	1	I Remisija	MA+TBI	6	Akutni	Recidiv
27.	M	8	ALL	SI	1	I Remisija	MA+TBI	1	/	Živ bez bolesti
28.	M	16	ALL	SI	1	Aktivna bolest	MA	2	/	Recidiv
29.	M	9	ALL	SI	1	I Remisija	MA+TBI	67	Akutni	Živ bez bolesti
30.	Ž	4	ALL	SI	1	I Remisija	MA+TBI	16	Akutni	Živ bez bolesti
31.	Ž	14	ALL	SI	1	I Remisija	MA+TBI	10	Akutni	Živ bez bolesti
32.	M	12	ALL	SI	1	Relaps	MA+TBI	8	Akutni	Recidiv

33.	Ž	10	ALL	SI	1	I Remisija	MA+TBI	8	Akutni	Živ bez bolesti
34.	Ž	8	ALL	SI	1	Aktivna bolest	MA+TBI	3	Akutni	Recidiv
35.	Ž	13	ALL	NSI	1	I Remisija	MA+TBI	11	Akutni	Živ bez bolesti
36.	Ž	16	ALL	SI	1	I Remisija	MA+TBI	5	Akutni	Živ bez bolesti
37.	M	6	ALL	SI	1	I Remisija	MA+TBI	2	Akutni	Živ bez bolesti
38.	Ž	8	MDS	SI	1	I Remisija	MA	4	Akutni	Komplikacije
39.	M	14	MDS	SI	1	Aktivna bolest	MA	32	Akutni	Živ bez bolesti
40.	M	13	MDS	SHI	1	Aktivna bolest	MA	3	Akutni	Komplikacije
41.	M	10	MDS	SI	1	Aktivna bolest	MA	5	Akutni	Živ bez bolesti
42.	M	11	HML	NSI	1	I Remisija	MA	28	Akutni	Živ bez bolesti
43.	M	13	HML	NSI	1	I Remisija	MA	27	Akutni	Živ bez bolesti

44.	Ž	11	HML	SHI	1	I Remisija	MA	68	Akutni	Živ bez bolesti
45.	Ž	4	Bifenotipska leukemija	SI	1	I Remisija	MA	3	Akutni	Recidiv
46.	Ž	1	JMML	SI	1	I Remisija	MA	7	Akutni	Živ bez bolesti
47.	Ž	4	JMML	SHI	1	Aktivna bolest	MA	24	Akutni	Živ bez bolesti
48.	M	17	NHL	SI	1	II Remisija	NMA	3	/	Recidiv

SHI – srodni haplo-identični donor, SI – srodni identični, NSI – nesrodni identični,

MA – mijeloablativni, NMA – nemijeloablativni, MA+TBI – mijeloablativni+zračenje celog tela,

3.2 Citogenetička analiza

Za citogenetičku analizu korišćeni su aspirati kostne srži. Preparacija hromozoma je vršena nakon 24h kultivacije bez mitogena [72].

3.2.1 Kultura ćelija kostne srži

Za kultivaciju ćelija kostne srži korišćen je sledeći protokol:

- U 10 ml RPMI 1640 sa 20% FCS sade se ćelije kostne srži u koncentraciji $1,0-1,5 \times 10^6$ ćelija/ml.
- Nakon 24h inkubacije na 37°C , kulturama se dodaje se 0.02mg/ml kolhicina i inkubiraju se još 1h na 37°C .

3.2.2 Preparacija hromozoma

Protokol za dobijanje hromozomskih preparata se odvija na sledeći način:

1. Ćelijske suspenzije nakon 24h kultivacije se centrifugiraju na 2500 obrtaja 10min.
2. Supernatant se odliva i dodaje se 10ml hipotoničnog rastvora i inkubira se u vodenom kupatilu 20min. na 37°C . Dodaje se po 5 kapi tritona i centrifugira se na 2500 obrtaja 10 min.
3. Supernatant se odlije, a talogu se dodaje 10ml fikstiva i ostavi se da stoji na sobnoj temperaturi 20 min.
4. Centrifugira se na 2500 obrtaja 10 min. Supernatant se odlije, a talogu se dodaje 1ml fiksativa, resuspenduje se i pipetom prebaci u drugu epruvetu. Tako spojeni materijal se ponovo centrifugira na 2500 obrtaja 10 minuta. Zatim se supernatant odlije, a talogu se zavisno koliko ga ima, dodaje 3-4 kapi fiksativa i 3-4 kapi 60%-tne sirćetne kiseline.
5. Na čistu pločicu nakapava se 2-3 kapi materijala i suši preko plamena.
6. Dobijeni preparati se boje po Gimzi:
 - 1ml boje rastvara se u 9ml pufera (pH 7,6). Pufer se pravi tako što se u 1 litar destilovane vode rastvori 8,27g Na_2HPO_4 i 0,69g KH_2PO_4 .
 - Preparati se boje 7-10 min.

3.2.3 Analiza kariotipa

Dobijeni hromozomski preparati se analiziraju na svetlosnom mikroskopu. Analiza se radi na najmanje 22 metafazne figure prilikom postavljanja dijagnoze kao i nakon transplantacije radi kontrole pojave recidiva. U slučajevima slabog mitotskog indeksa, pregledaju se svi preparati i analiza se vrši na svim viđenim metafaznim figurama.

3.3 Izolacija DNK

Za praćenje himerizma DNK se izoluje iz periferne krvi, kostne srži, dlake ili bukalnog brisa [72].

3.3.1 Izolacija DNK iz periferne krvi ili kostne srži

Genomska DNK je izolovana iz uzorka PK ili KS pacijenta i davaoca na sledeći način:

1. U 200 μ l periferne krvi dodaje se 400 μ l litičkog pufera (50mM TRIS, 25mM EDTA, 1M NaCl, STAB 8%).
2. Inkubira se u vodenom kupatilu 15minuta na 68°C.
3. Zatim se dodaje hloroform u odnosu 1:1 i snažno promućka.
4. Uzorak se centrifugira 5 min na max rpm.
5. Zatim se supernatant prebaci u novu mikrotubu, dodaje se STAB (0,2%) u odnosu 1:1.
6. Uzorak se centrifugira 5 min na max rpm.
7. Supernatant se prospe, a talog se ispere sa 300 μ l 1,2M NaCl, i dodaje se 850 μ l apsolutnog etanola (ohlađenog u frizu). Kada se promućka vidi se DNK.
8. Uzorak se centrifugira 5 min na max rpm.
9. Talog DNK se ispere sa 500 μ l 70%EtOH.
10. Uzorak se ponovo centrifugira 5 min na max rpm.
11. Odlije se alkohol, ostavi se otvorena mikrotuba da se osuši. DNK se rastvori u odgovarajućoj količini destilovane vode.
12. DNK koncentracija se određuje pomoću UV spektrofotometra na 260 nm.

3.3.2 Izolacija DNK iz dlake ili bukalnog brisa

Genomska DNK se u ovom radu izoluje iz uzorka dlake ili bukalnog brisa pacijenata upotrebom *Qiagen DNeasy* komercijalnog kita.

Qiagen DNeasy komercijalni kit sadrži sledeće reagense:

- ATL pufer
- proteinazu K
- 1M DTT
- AL pufer
- AW1 pufer
- AW2 pufer
- AE pufer
- *DNeasy Mini spin* kolonu sa epruvetom za skupljanje od 2ml

Procedura:

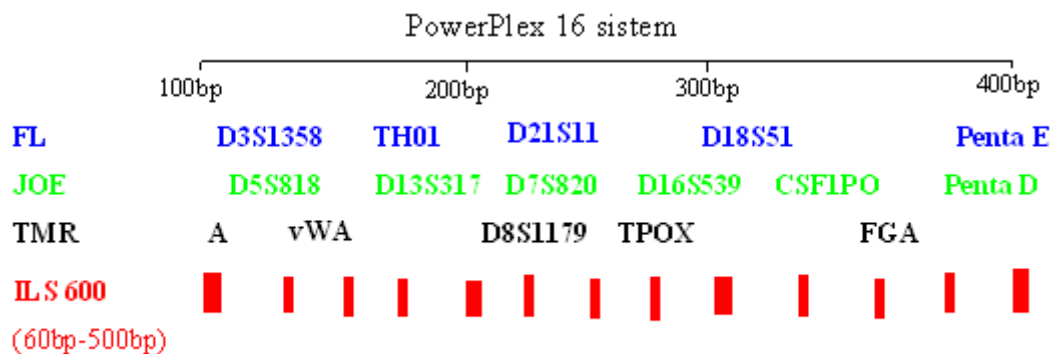
1. Sipa se 300µl ATL pufera, 20µl proteinaze K i 20µl 1M DTT u 1.5ml ependorf epruvetu.
2. Dodaje se 0.5–1 cm dlake sa korenom ili vata sa brisa.
3. Meša se na vorteksu 10 s.
4. Inkubira se na 56°C do potpunog liziranja (preko noći), povremeno mešajući.
5. Uzorak se meša na vorteksu 15 s.
6. Dodaje se 300µl AL pufera i meša se na vorteksu.
7. Dodaje se 300µl etanola (96%) i meša se na vorteksu.
8. Pipetira se smeša u *DNeasy Mini spin* kolonu u epruveti za skupljanje od 2ml.
9. Centrifugira se 1 minut na 8000 rpm. Zatim se odbaci tečnost u epruveti za skupljanje.
10. Prebaci se *DNeasy Mini spin* kolona u novu epruvetu za skupljanje od 2ml.
11. Dodaje se 500µl AW1 pufera i centrifugira se 1 minut na 8000 rpm. Odbaci se tečnost u epruveti za skupljanje.
12. Prebaci se *DNeasy Mini spin* kolona u novu epruvetu za skupljanje od 2ml.

13. Dodaje se 500µl AW2 pufera i centrifugira se 3 minuta na 14000 rpm. Tečnost u epruveti za skupljanje se odbaci.
14. Prebaci se *DNeasy Mini spin* kolona u novu epruvetu od 2ml.
15. Dodaje se 200µl AE pufera direktno preko kolone i inkubira se na sobnoj temperaturi 1 minut, a zatim se centrifugira 1 minut na 8000 rpm, da bi se DNK vezana na koloni rastvorila.

3.4 Fluorescentna multipleks STR-PCR analiza

Za istovremeno umnožavanje 15 STR i Amelogenin lokusa u ovom radu su korišćeni komercijalni kompleti „PowerPlex 16 System“ (Promega) i „Identifiler“ (Applied Biosystems). Naši rezultati su pokazali da su oba komercijalna kompleta jednako pouzdana za praćenje himerizma kod bolesnika nakon transplantacije.

„PowerPlex 16 System“ komplet (slika 3.1) omogućava detekciju 15 STR i Amelogenin lokusa u tri fluorescentne boje: po jedan prajmer za Penta E, D18S51, D21S11, TH01 i D3S1358 su obeleženi fluorescein-om (FL); po jedan prajmer za FGA, TPOX, D8S1179, vWA i Amelogenin lokus su obeleženi sa carboxy-tetramethylrhodamine-om (TMR); po jedan prajmer za Penta D, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, i D5S818 su obeleženi sa 6-carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxy-fluorescein-om (JOE) (Promega-tehnička uputstva).

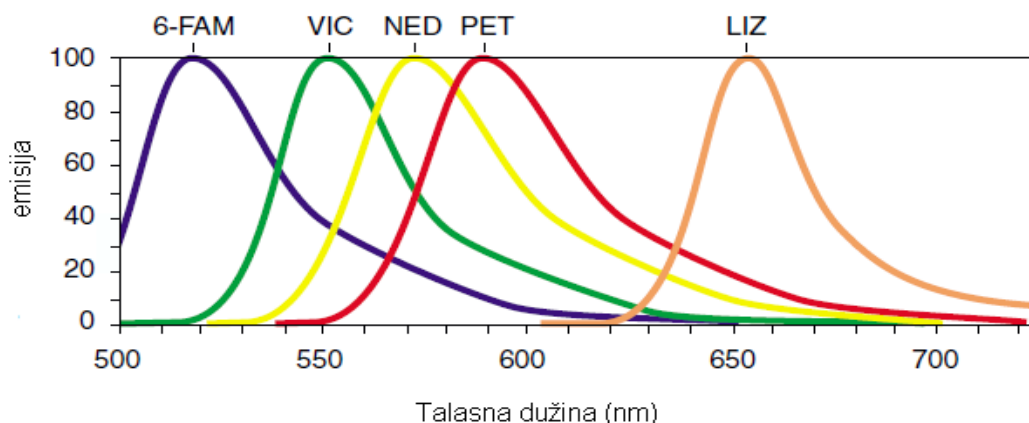


Slika 3.1. Raspored 15 STR i Amelogenin lokusa na osnovu veličine fragmenata i boje kojom su obeleženi

“PowerPlex 16 System” komercijalni komplet sadrži sledeće reagense:

- Gold Star 10 x pufer
- PowerPlex 16 10 x prajmer mix
- 9947A DNK (10ng/ μ l)
- PowerPlex 16 allelic ladder mix
- Internal Lane Standard (ILS) 600

Komercijalni komplet „Identifiler“ sadrži prajmere za 15 STR lokusa i Amelogenin obeležene sa 4 boje, dok peta boja obeležava GeneScan-500 Standard (tabela 3.1, slika 3.2) (Identifiler – Applied Biosystems tehnička uputstva).



Slika 3.2. Talasne dužine boje kojom su obeleženi STR lokusi u komercijalnom kompletu „Identifiler“ (Applied Biosystems)

Tabela 3.1. Boje kojima su obeleženi STR lokusi u komercijalnom kompletu „Identifiler“

STR lokus	Boja
D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO	6-FAM
D3S1358, TH01, D13S 317, D16S539, D2S1338	VIC
D19S433, vWA, TPOX, D18S51	NED
Amelogenin, D5S818, FGA	PET
GeneScan-500 Standard	LIZ

„Identifiler“ komercijalni komplet sadrži sledeće reagense:

- AmpF STR PCR reakcioni mix pufer
- AmpF STR Identifiler prajmer mix
- AmpliTaq Gold DNK polimerazu
- 9947A DNK (10ng/ μ l)
- AmpF STR Identifiler allelic ladder mix
- GeneScan-500 Standard

Reakciona smeša za simultano umnožavanje 16 genskih lokusa sadrži sledeće reagense:

- | | |
|--|-----------------|
| • voda bez nukleaze | do 25 μ l |
| • Reakcioni pufer | 2.5 μ l |
| • PowerPlex 16/Identifiler (10x) prajmer mix | 2.5 μ l |
| • AmpliTaq Gold DNK polimeraza(4u) | 0.8 μ l |
| • uzorak DNK (0.5-1.0ng) | do 19.2 μ l |

Reakcija lančanog umnožavanja molekula DNK za „PowerPlex 16 System“ komplet se odvija u Perkin Elmer 9700 aparatu pod sledećim uslovima:

95°C	11 min.		
96°C	1 min.		
94°C	30 sek.	}	10 ciklusa
60°C	30 sek.		
70°C	45 sek.		
90°C	30 sek.	}	22 ciklusa
60°C	30 sek.		
70°C	45 sek.		
60°C	30 min.		
4°C	∞		

Reakcija lančanog umnožavanja molekula DNK za „Identifiler“ komercijalni komplet se odvija u Perkin Elmer 9700 aparatu pod sledećim uslovima:

95°C	11 min.		
94°C	60 sek.	}	28 ciklusa
59°C	60 sek.		
72°C	60 sek.		
60°C	60 min.		
4°C	∞		

U svakoj reakciji za pozitivnu kontrolu koristi se 9947A DNK, dok se za negativnu kontrolu dodaje voda bez nukleaze u PCR smešu.

PCR produkti se čuvaju na -20°C , zaštićeni od svetla.

3.5 Detekcija dobijenih PCR produkata na kapilarnoj elektroforezi

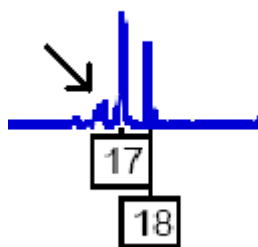
Svaka od fluorescentnih boja emituje svoj maksimum fluorescencije na različitim talasnim dužinama, što omogućava njihovu detekciju pomoću kapilarne elektroforeze (ABI PRISM 310), i analizu dobijenih podataka, koja podrazumeva određivanje veličine fragmenata, visine i površine ispod pika, pomoću Genescan i Genotyper kompjuterskog programa (Applied Biosystems).

Priprema uzoraka za detekciju na ABI PRISM 310 aparatu se vrši na sledeći način:

1. Koktel za punjenje (rastvor A) se pravi tako što se pomeša $0,5\ \mu\text{L}$ ILS 600/GeneScan-500 standarda x broj injekcija i $9,5\ \mu\text{L}$ HI-DI formamida x broj injekcija i meša se 15s na vorteksu.
2. Zatim se pomeša $10\ \mu\text{L}$ rastvora A i $1\ \mu\text{L}$ umnoženog PCR produkta.
3. Takođe se pomeša $10,0\ \mu\text{L}$ rastvora A i $1,0\ \mu\text{L}$ „allelic ladder mix”.
4. Smeše se potom denaturišu na 95°C 3 minuta, i prebace se odmah na led.
5. Uzorci se onda prebace na postolje aparata.
6. Pripremi se kompjuterski program za analizu podataka i startuje se sistem kapilarne elektroforeze (ABIPRISM 310 – uputstvo za upotrebu).

3.6 Nespecifični produkti amplifikacije

Nespecifični produkti amplifikacije (tzv. „stater“ pikovi) predstavljaju artefakt STR-PCR amplifikacije koji nastaju zbog proklizavanja DNK polimeraze u toku lančanog umnožavanja. Sastoje se od malih pikova koji su za jedan ponovak kraći od glavnog pika. „Stater“ pikovi tetranukleotidnih ponovaka su za 4 bp kraći od glavnog pika i najčešće čine 5-10% površine glavnog pika (slika 3.3). Informativni aleli za praćenje himerizma se biraju tako da nemaju „stater“ pikove.



Slika 3.3. “Stater“ pik ili nespecifični produkt amplifikacije kraći od glavnog pika za 4bp

3.7 Računanje procenta DNK davaoca i primaoca

Odnos količine DNK davaoca i primaoca moguće je kvantitativno proceniti STR-PCR analizom. Količina DNK u uzorku odgovara visini ili površini ispod pika informativnih alela. U ovom radu je u većini slučajeva količina DNK procenjivana na osnovu površine ispod pika. Dok je visina pika korišćena za procenu u slučajevima kada je produkt amplifikacije lošiji, te su pikovi niski i teže je napraviti razliku između površina.

Specifične formule za računanje formirane su u zavisnosti od toga da li su davalac i primalac homozigoti ili heterozigoti za informativni alel. S obzirom da je DNK primaoca nakon transplantacije najčešće manje prisutna, računa se procenat donorske DNK, a procenat DNK primaoca se računa oduzimanjem od 100%.

U ovom radu su korišćene formule za računanje odnosa DNK u mešanim uzorcima prema autorima Clayton i Buckleton [92] (tabela 3.2).

Tabela 3.2. Formule za računanje proporcije količine DNK u mešanim uzorcima

Kombinacija genotipova			M_x
4 alela	1,2	3,4	$\hat{M}_x = \frac{\phi_1 + \phi_2}{\phi_1 + \phi_2 + \phi_3 + \phi_4}$
3 alela	1,1	2,3	$\hat{M}_x = \frac{\phi_1}{\phi_1 + \phi_2 + \phi_3}$
	2,3	1,1	$\hat{M}_x = \frac{\phi_2 + \phi_3}{\phi_1 + \phi_2 + \phi_3}$
	1,2	1,3	$\hat{M}_x = \frac{\phi_2}{\phi_2 + \phi_3}$
2 alela	1,1	2,2	$\hat{M}_x = \frac{\phi_1}{\phi_1 + \phi_2}$
	1,2	2,2	$\hat{M}_x = \frac{2\phi_1}{\phi_1 + \phi_2}$
	1,1	1,2	$\hat{M}_x = \frac{\phi_1 - \phi_2}{\phi_1 + \phi_2}$
	1,2	1,2	Nije informativno
1 alel	1,1	1,1	Nije informativno

M_x - proporcija mešavine, Φ - površina ispod pika

3.8 Izdvajanje mononuklearnih ćelija

Za molekularnu analizu prisustva fuzionih transkripata mononuklearne ćelije se izdvajaju iz periferne krvi ili kostne srži pacijenta na sledeći način [72]:

1. U graduisanu konusnu epruvetu od 14ml sa poklopcem sipa se 3 ml ficoll 1119 i 3 ml ficoll 1077.
2. Zatim se, lagano niz zid, sa sterilnom plastičnom pipetom sipa uzorak PK ili KS (prethodno razblaženu sa fiziol. rast. 1:1) do 8 ml. Ako ima više krvi radi se u dve epruvete.
3. Uzorci se centrifugiraju 30 minuta na 1900 rpm.
4. Sa sterilnom plastičnom pipetom se zatim izvuče gornji prsten u jednu epruvetu (limfociti), a donji prsten (granulociti) u drugu epruvetu.
5. Talogu ćelija se dodaje fiziološki rastvor do vrha epruvete i centrifugira se 10 minuta na 1000 rpm.
6. Na kraju se za limfocite pipetom izbaci supernatant, doda se rastvor guanidina i prebaci u epruvete od 2 ml. Uzorci se čuvaju na -20°C .
7. Za granulocite se izbaci supernatant i talog ćelija se čuva na -80°C .

3.9 Izolacija RNK

Izolacija RNK se radi iz prethodno izdvojenih mononukleara. Zbog osetljivosti RNK molekula radi se brzo i na ledu [72]:

1. Uzorci mononukleara se odmrznu, ceo uzorak se izmućka snažno sa špricom i iglom, prebaci se 300 μl u mikrotubu od 1.5ml i stavi na led. Ostatak mononukleara se vrati na -20°C .
2. Zatim se dodaje 1/10 V Na acetata (30 μl), ista zapremina fenola pH 4 (330 μl) i 100 μl hloroforma.
3. Snažno se promućka 10 sekundi.
4. Uzorci se nakon toga ostave 10 min na ledu.
5. Centrifugira se 10 minuta na 13 000 rpm, na $+4^{\circ}\text{C}$.
6. Zatim se supernatant prebaci u nove ependorfice od 1.5 ml.

7. Dodaje se 300 μ l izopropanola ~ 1:1V.
8. Uzorci se promućkaju gore dole i ostave 10 min na sobnoj temperaturi.
9. Zatim se centrifugiraju 15 minuta na 13000 rpm, na +4°C.
10. Supernatant se odbaci a talogu se dodaje 500 μ l etanola (-20°C) i lagano promućka.
11. Centrifugira se 5 minuta na 13000 rpm, na +4°C.
12. Ponovo se supernatant odbaci i talog se još jednom ispere sa 500 μ l etanola (-20°C).
13. Centrifugira se 5 minuta na 13000 rpm, na +4°C.
14. Na kraju se izbacij supernatant i talog se osuši 10 min u eksikatoru.
15. Dobijena RNK se rastvori u vodi bez nukleaze.
16. RNK se čuva na -80°C.

3.10 RT-PCR za detekciju fuzionih rearanžmana

Procedura RT-PCR se radi u dva koraka: sinteza komplementarne cDNK, a zatim reakcija lančane polimerizacije – PCR [77].

3.10.1 Reverzna transkripcija – sinteza cDNK

1. Naprave se MIX1 i MIX2 na sledeći način:

MIX 1		MIX2	
Oligo nukleotidi 5 μ M	1 μ l	Pufer 5x	4 μ l
H ₂ O	8 μ l	dNTP 10mM (0.5mM)	1 μ l
RNK 0.5 μ g/ μ l (1 μ g)	2 μ l	DTT 0.1 M (10mM)	2 μ l
		H ₂ O	0.5 μ l
		Rnaza Inhibitor (40U/ μ l)	1 μ l
		Reverzna transkriptaza (200U/ μ l)	0.5 μ l

2. Obeleže se ependorfice od 0,2 ml za uzorke i razlije se MIX1.
3. U svaku mikrotubu se dodaje po 2 μ l RNK.
4. Zatim se uzorci inkubiraju na 70°C 3 minuta.
5. Nakon inkubacije se dodaje MIX2 i uzorci se ostave 5 minuta na sobnoj temperaturi.
6. Uzorci se dalje prebace u PCR, prema sledećem programu:

42°C 60 min

95°C 5 min

4°C 5 min

7. Dobijene cDNK se čuvaju na +4°C ili na -20°C.

3.10.2 Reakcija lančane polimerizacije – PCR

PCR je raden prema standardizovanoj metodi BIOMED-1 Concerted Action [77].

Za analizu fuzionih produkata *BCR-ABL* gena koriste se sledeći prajmeri:

BCR-e1 A 5' GACTGCAGCTCCAATGAGAAC 3'

ABL-a3 B 5' GTTTGGGCTTCACACCATTCC 3'

BCR-e1 C 5' CAGAACTCGCAACAGTCCTTC 3'

ABL-a3 D 5' TTCCCCATTGTGATTATAGCCTA 3'

BCR-b1 A 5' GAAGTGTTTCAGAAGCTTCTCC 3'

ABL-a3 B 5' GTTTGGGCTTCACACCATTCC 3'

BCR-b2 C 5' CAGATGCTGACCAACTCGTGT 3'

ABL-a3 D 5' TTCCCCATTGTGATTATAGCCTA 3'

Za analizu fuzionih produkata *TEL-AML1* gena koriste se sledeći prajmeri:

TEL-A 5' TGCACCCTCTGATCCTGAAC 3'

TEL-C 5' AAGCCCATCAACCTCTCTCATC 3'

AML1-B 5' AACGCCTCGCTCATCTTGC 3'

AML1-D 5' TGGAAGGCGGCGTGAAGC 3'

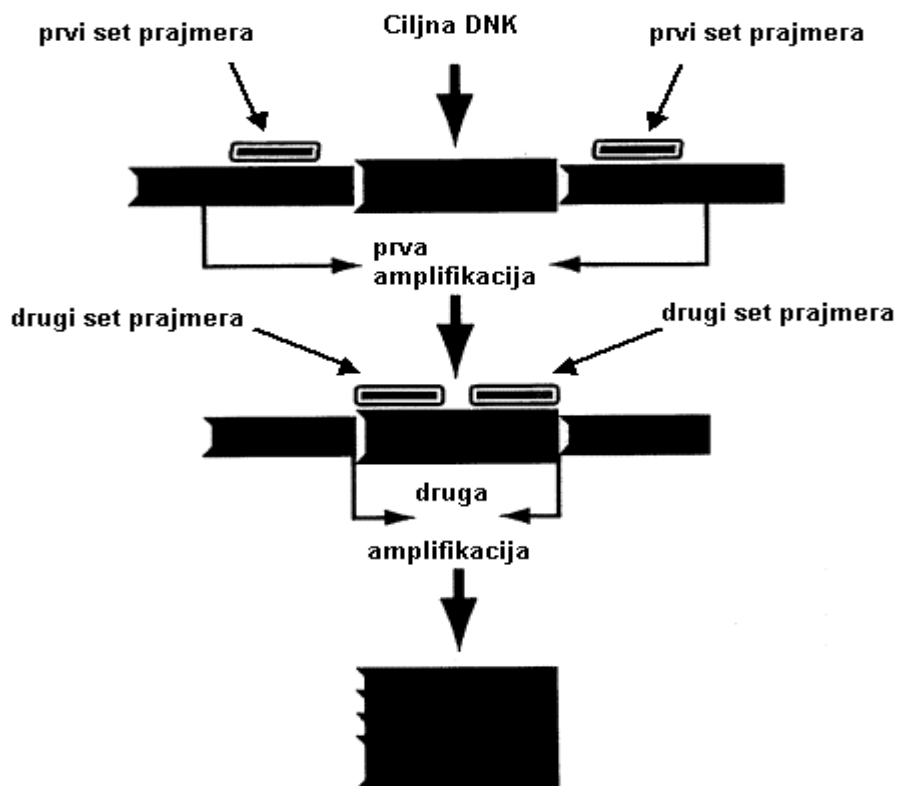
Za svaku PCR reakciju neophodno je napraviti smešu na sledeći način:

H₂O		16.4 µl
pufer 10x	(1x)	2.5 µl
MgCl₂ 25 mM	(1.5mM)	1.5 µl
dNTP 10mM	(200 µM)	0.5 µl
oligo F	(10pm/µl) (0.4 µM)	1 µl
oligo R	(10pm/µl) (0.4 µM)	1 µl
Taq Pol.	(5U/ µl) (0.5U)	0.1 µl
		<hr/> 23 µl
cDNK		2 µl
Ukupna zapremina		25 µl

Uslovi po kojima se odvija PCR reakcija u aparatu Perkin Elmer 2400, su sledeći:

	94 °C	2 min
	<hr/>	
35 ciklusa	94 °C	30 sec
	65° C	30 sec
	72° C	30 sec
	4° C	∞

Prilikom postavljanja dijagnoze radi se tzv. „first“ PCR sa spoljašnjim prajmerima (A i B), dok se kod pacijenata koji su bili pozitivni, kontrola radi osetljivijom metodom tzv. „nested“ PCR (slika 3.4). U „nested“ PCR reakciji se po istom programu koriste unutrašnji prajmeri (C i D), a umesto cDNK u reakcionu smešu se dodaje PCR produkt iz prve reakcije („first“ PCR). Na ovaj način se osetljivost analize povećava sa 10^{-3} na 10^{-6} [77].



Slika 3.4. Shematski prikaz metode tzv. „nested“ PCR [72]

Za kontrolu kvaliteta RNK i cDNK, po istom programu, koristi se amplifikacija *ABL* gena uz pomoć sledećih prajmera:

Oligo D 5' TGTGATTATAGCCTAAGACCCGGAG 3'

Oligo Ia 5' ATCTGCCTGAAGCTGGTGGGCT 3'

Kao pozitivna kontrola u PCR reakciji koristi se cDNK od ranije dijagnostikovanih pozitivnih pacijenata, a za negativnu kontrolu se umesto cDNK dodaje voda.

3.11 Detekcija fuzionih produkata na gelu

Produkti amplifikacije su analizirani nakon elektroforeze na 2% gel od agaroze bojenom etidijum bromidom (0.5µg/ml). Za procenu veličine produkata na gelu korišćen je 1kb Marker (Invitrogen). Uslovi elektroforeze su bili sledeći: U=80V, I=40mA, vreme 45-50 min. Nakon završene elektroforeze produkti su vizuelizovani i analizirani na UV transiluminatoru.

3.12 Statističke metode

Dobijeni podaci su obrađeni i prikazani na tabelama i grafikonima u zavisnosti od prirode posmatrane varijable.

Deskripcija numeričkih obeležja u ovom radu urađena je klasičnim metodama opisne statistike i to od mera srednjih vrednosti aritmetičkom sredinom i medijanom, a od mera varijabiliteta standardnom devijacijom, koeficijentom varijacije i standardnom greškom, kao i minimalnom i maksimalnom vrednošću. Relativni brojevi su korišćeni u svim tabelama.

Za testiranje normalne raspodele, distribucija numeričkih varijabli proverena je testom po Kolmogorov Smirnovu. Kako su sve numeričke varijable zadovoljile ovaj kriterijum u njihovoj daljoj analizi korišćene su parametarske metode.

U analizi rezultata, u zavisnosti od prirode samih varijabli, korišćeni su Pirsonov χ^2 test, i to u obliku testova slaganja i tablica kontingencija, za poređenje razlike između učestalosti kod neparametarskih obeležja, za jedno odnosno dva obeležja. Kod numeričkih ograničenja primenjen je Fišerov test tačne verovatnoće.

Za poređenje prosečnih vrednosti parametarskih obeležja korišćen je Studentov t test za dve grupe podataka. Kao neparametarske dopune kod nezavisnih uzoraka primenjen je test sume rangova, a kod zavisnih test ekvivalentnih parova.

Kod analize statističke povezanosti karakteristika upotrebljene su metode jednostruke parametarske korelacije i regresije, kao i neparametarska korelacija.

U identifikaciji prediktora rezultujućih obeležja primenjena je logistička regresija za binomne i multiple ishode.

Za analizu faktora koji utiču na preživljavanje ispitivanih bolesnika upotrebljene su metode po Kaplan Majeru i Koksova regresija za identifikaciju prediktora ishoda.

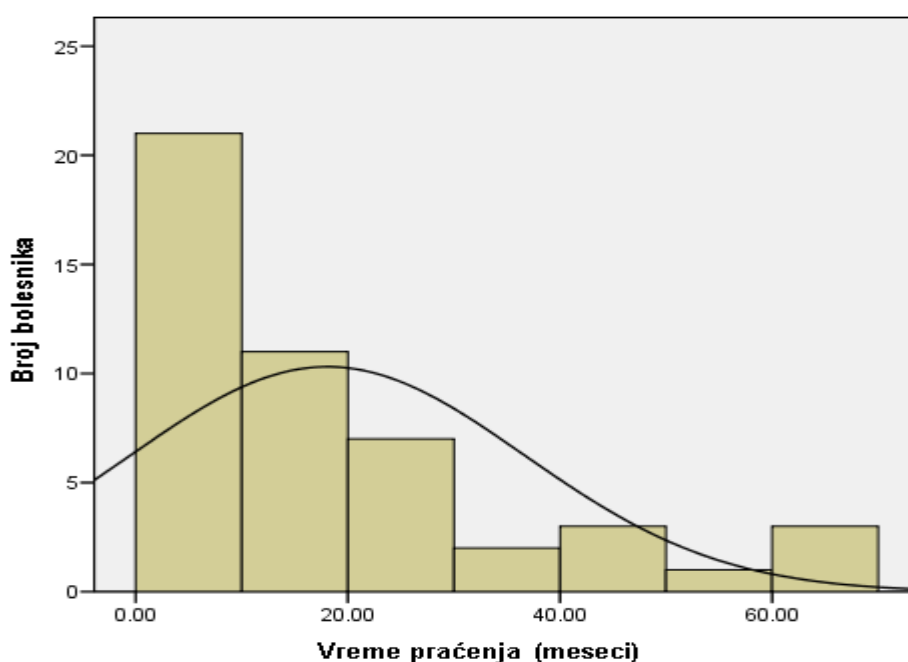
U svim primenjenim analitičkim metodama nivo značajnosti bio je 0,05.

Za pravljenje baze i obradu podataka upotrebljen je program Instituta Katedre za medicinsku statistiku i informatiku Medicinskog fakulteta u Beogradu.

4. REZULTATI

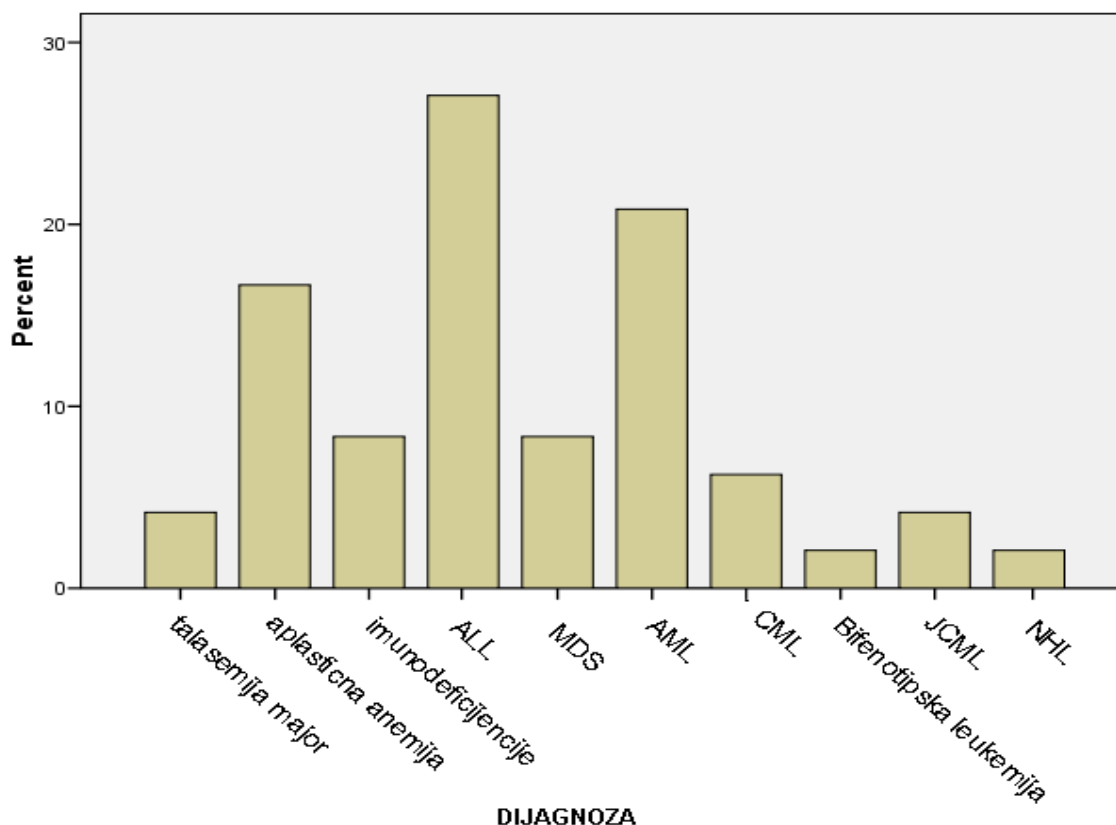
U grupi bolesnika kojima je urađena alogena TMČH praćen je himerizam primenom metode STR-PCR kod svih bolesnika. Citogenetička analiza je rađena kod bolesnika obolelih od malignih bolesti pre i posle TMČH, dok su RT-PCR metodom posle transplantacije praćeni samo oni bolesnici koji su imali neki od fuzionih rearanžmana pre transplantacije.

U grupi od 47 bolesnika koji su praćeni u ovom radu prosečna starost bila je 9,2 godina (Med 10,0; SD 5,2) dok je prosečno vreme praćenja bilo 18,1 meseci (Med 11,0; SD 18,6) (grafikon 4.1). Odnos polova u ovoj grupi bio je sledeći: 26 bolesnika muškog pola i 21 ženskog pola.



Grafikon 4.1. Grafički prikaz raspodele bolesnika prema vremenu praćenja posle TMČH

Od 47 ispitivanih bolesnika, 34 je imalo malignu, a 13 nemalignu bolest hematopoeze. Raspodela bolesnika u odnosu na dijagnozu prikazana je na grafikonu 4.2. U analiziranoj grupi bolesnika preovlađivale su dijagnoze AML, ALL i aplastična anemija ($F = 11,046$; $p < 0,01$).



Grafikon 4.2. Grafički prikaz raspodele bolesnika prema dijagnozi bolesti

U grupi od 47 bolesnika analiziranih u ovom radu, kod 35 je transplantacija urađena sa kostnom srži srodnog identičnog davaoca, kod 7 sa kostnom srži srodnog haploidentičnog davaoca i kod 6 bolesnika je bio nesrodni identični davalac. Režim kondicioniranja bolesnika pre transplantacije je kod 35 bio mijeloablativni, kod 12 bolesnika mijeloablativni sa zračenjem, dok je kod jednog bio nemijeloablativni (RIC).

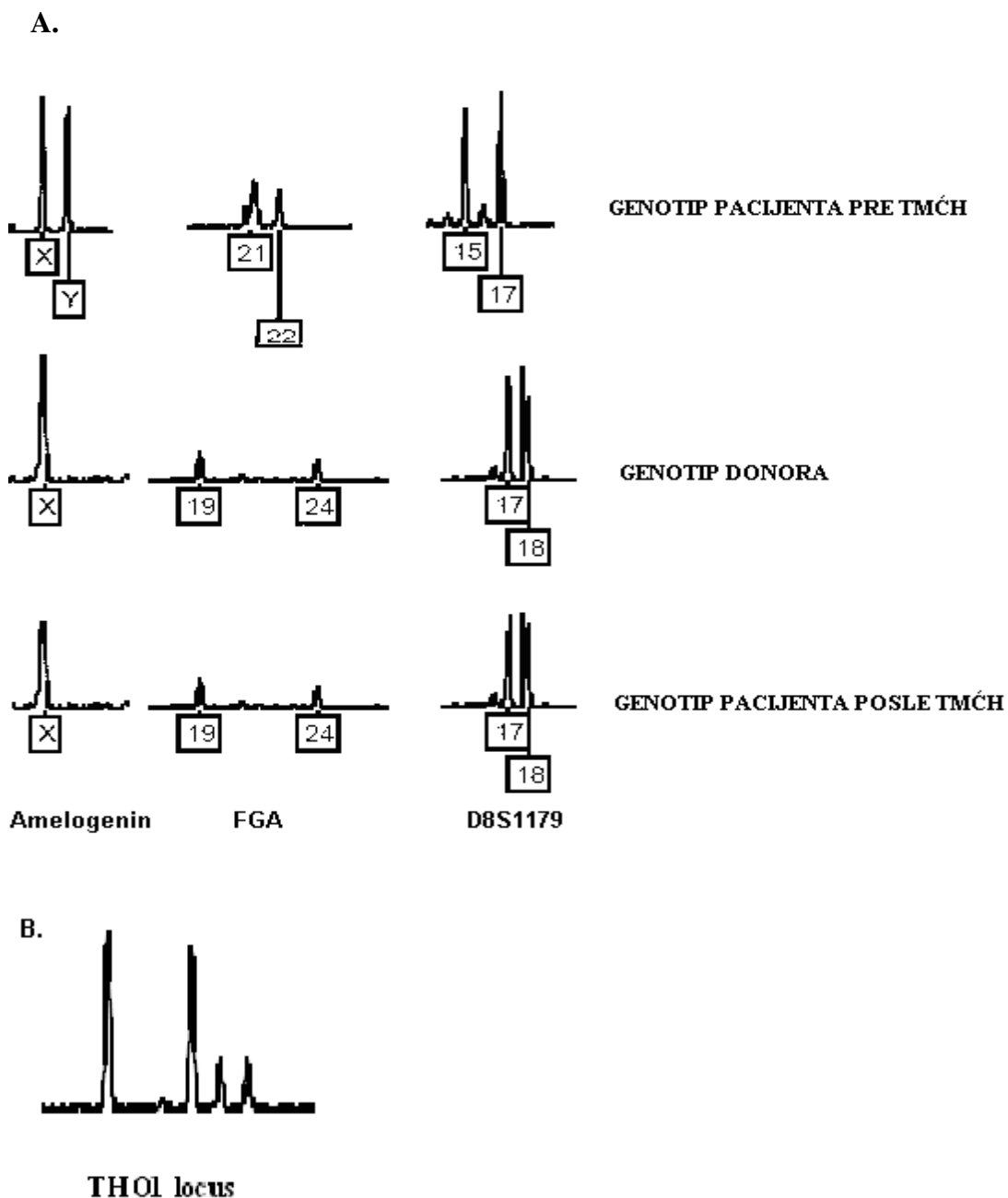
Analiza prisustva GVHD kod svih bolesnika pokazala je da je kod 30 registrovan akutni, kod jednog hronični, kod pet bolesnika oba, a 12 bolesnika nije imalo GVHD.

U cilju da se proceni uspešnost u lečenju transplantacijom analizirali smo sledeće parametre: petogodišnje ukupno preživljavanje (OS), incidencu relapsa (RI) i mortalitet vezan za transplantaciju (TRM). Na kraju studije u analiziranoj grupi bolesnika petogodišnje ukupno preživljavanje (OS) iznosilo je 66,7%, incidenca relapsa bila je 20,8%, dok je mortalitet vezan za transplantaciju (TRM) iznosio 14,6%. Dobijena razlika u korist ukupno preživelih bolesnika bila je statistički značajna ($\chi^2 = 5,333$; $p < 0,05$).

4.1 Praćenje himerizma STR-PCR metodom

Urađena je PCR analiza 15 mikrosatelititskih genetičkih markera i amelogenin lokusa kod svih davaoca i primaoca pre transplantacije, kako bismo odredili njihov genotip i utvrdili koji su lokusi informativni za praćenje himerizma, odnosno koji se lokusi razlikuju bar za jedan alel kod davaoca i primaoca (slika 4.1).

Uzorci su kvantifikovani na najmanje četiri lokusa, tako da je količina DNK procenjena na osnovu dobijene srednje vrednosti površine ispod pika informativnih alela, što je ovu semikvantitativnu metodu učinilo preciznijom. Upotreba 16 genskih lokusa za analizu omogućila je da se dobije relevantan broj informativnih lokusa, čak i u grupi srodnih parova davalac – primalac. U analiziranoj grupi od 48 parova davalac – primalac, 5 je bilo informativno na 4 lokusa, dok je ostalih 43 bilo informativno na više od 4 lokusa.



Slika 4.1. A. Primer 3 informativna genska lokusa (amelogenin, FGA i D8S1179) kod bolesnika broj 4 pre TMČH, kao i davaoca i bolesnika posle TMČH sa potpunim himerizmom. B. Elektroferogram TH01 genskog lokusa sa 4 različita alela kod bolesnika broj 3 posle TMČH ukazuje na prisustvo mešanog himerizma

Svim bolesnicima je posle transplantacije rađena analiza himerizma iz uzoraka periferne krvi, bukalnog brisa i dlake, a samo bolesnicima obolelim od malignih bolesti i iz kostne srži. Analiza je pokazala da su uzorci periferne krvi i kostne srži verni pokazatelji stanja himerizma kod bolesnika posle transplantacije, dok je u uzorcima dlake uvek registrovan kompletni genetički profil primaoca. U bukalnom brisu se posle transplantacije uvek registruje nestabilni mešani himerizam, te ga je moguće koristiti za analizu jedino pre transplantacije. Ova saznanja su omogućila da se kontrolišu i bolesnici kojima je transplantacija matičnih ćelija urađena sa kostnom srži nepoznatog nesrodnog davaoca iz međunarodne banke. S obzirom da nam je genetički profil davaoca u tom slučaju bio nepoznat, poređenje smo vršili sa dlakom bolesnika koja reprezentuje čist genetički profil bolesnika pre transplantacije.

4.1.1 Praćenje himerizma STR-PCR metodom kod bolesnika obolelih od nemalighnih bolesti hematopoeze

U grupi od 13 bolesnika obolelih od nemalighnih bolesti hematopoeze praćen je himerizam posle alogene TMČH kod osmoro dece sa aplastičnom anemijom, kod dvoje sa imunodeficijencijom, i po jednog sa recesivnim oblikom osteopetroze, sa hemofagocitnom limfocitocitozom i sa talasemijom major kome je dva puta urađena transplantacija (tabela 4.1). Mešani himerizam (MC) je registrovan kod 6/14 (43%) slučajeva, dok je kompletni himerizam (CC) registrovan kod ostalih 8/14 (57%). Nepovoljan ishod je registrovan kod 4/14 (29%) bolesnika, od kojih je troje bilo sa MC i jedan sa CC. Kod 3 bolesnika je prilikom praćenja himerizma registrovano opadanje procenta donorskih ćelija u perifernoj krvi, dok je u jednom slučaju sa osteopetrozom smrtni ishod nastupio u drugom mesecu posle transplantacije, bez registrovanog pada himerizma. U grupi bolesnika kod kojih je registrovano opadanje procenta donorskih ćelija bilo je moguće uraditi novu transplantaciju samo kod jednog bolesnika sa talasemijom major. Stabilni mešani himerizam se održavao kod tri bolesnika. Na kraju studije, povoljan ishod transplantacije registrovan je kod 10/14 (OS=71%) bolesnika sa nemalighnim bolestima hematopoeze (3 sa MC i 7 sa CC).

Tabela 4.1. Himerizam kod bolesnika sa nemalignim bolestima hematopoeze

BOLESNIK	DIJAGNOZA	DONOR	TIP HIMERIZMA	PRAĆENJE (meseći)	ISHOD
1.	Aplastična anemija	SI	MC	18	smrtni
2.	Aplastična anemija	SI	MC	48	Živ bez bolesti
3.	Aplastična anemija	SI	MC	60	Živ bez bolesti
4.	Aplastična anemija	SI	MC	49	Živ bez bolesti
5.	Aplastična anemija	NSI	CC	18	Živ bez bolesti
6.	Aplastična anemija	SI	CC	6	Živ bez bolesti
7.	Aplastična anemija	SI	CC	11	Živ bez bolesti
8.	Aplastična anemija	SI	CC	15	Živ bez bolesti
9.	Talasemija major	SI	MC	12	odbacio kalem
10.	Talasemija major	SI	CC	22	Živ bez bolesti
11.	Osteopetroza	SHI	CC	1	smrtni
12.	Imunodeficijencija Sy Omen	NSI	CC	23	Živ bez bolesti
13.	Imunodeficijencija Wiscot Aldrich	SI	CC	48	Živ bez bolesti
14.	Hemofagocitna limfohistiocitoza	NSI	MC	5	smrtni

SI-srodni identični, SHI-srodni haploidentični, NSI-nesrodni identični, MC-mešani himerizam, CC-kompletni himerizam.

4.1.2 Praćenje himerizma STR-PCR metodom kod bolesnika obolelih od malignih bolesti hematopoeze

U grupi od 34 bolesnika obolelih od malignih bolesti hematopoeze, praćen je himerizam posle alogene TMČH kod desetoro dece sa AML, 13 sa ALL, 4 sa MDS, troje sa HML, dvoje sa juvenilnom mijelomonocitnom leukemijom i po jednog sa bifenotipskom leukemijom i Non-Hoćkinovim limfomom (tabela 4.2).

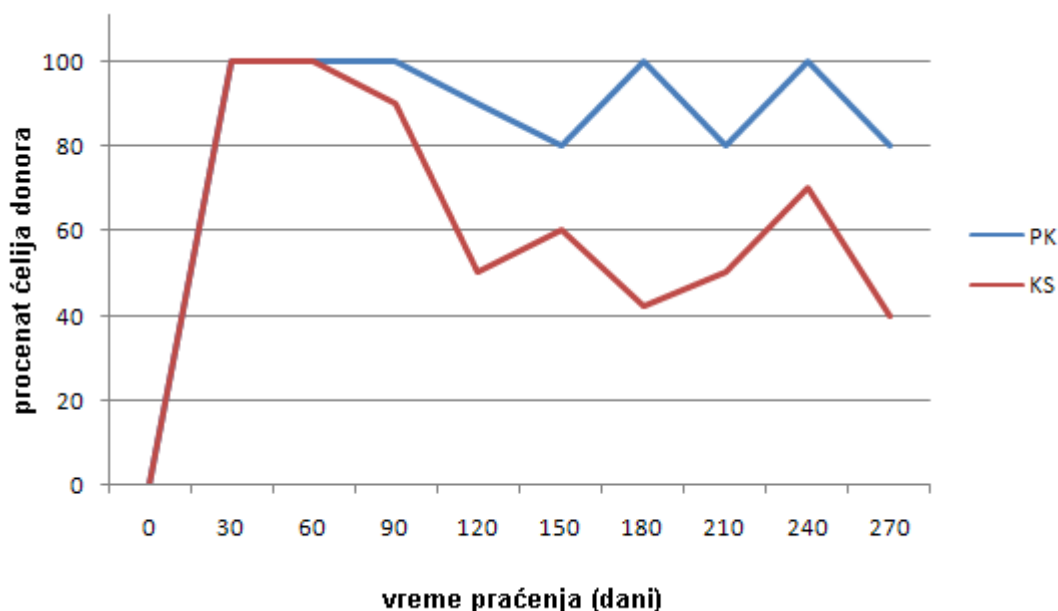
Tabela 4.2. Himerizam kod bolesnika sa malignim bolestima hematopoeze

BOLESNIK	DIJAGNOZA	DONOR	STANJE PRE TMČH	TIP HIMERIZMA	DUŽINA PRAĆENJA	ISHOD
15.	AML	SI	II Remisija	CC	53	Živ bez bolesti
16.	AML	SI	II Remisija	CC	4	smrtni
17.	AML	SI	II Remisija	CC	3	smrtni
18.	AML	SI	II Remisija	CC	7	smrtni
19.	AML	SHI	Relaps	CC	8	smrtni
20.	AML	SI	I Remisija	CC	38	Živ bez bolesti
21.	AML	SI	I Remisija	CC	28	Živ bez bolesti
22.	AML	SHI	II Remisija	CC	28	Živ bez bolesti
23.	AML	SI	II Remisija	CC	4	smrtni
24.	AML	SI	II Remisija	CC	12	Živ bez bolesti
25.	ALL	SI	II Remisija	CC	5	Živ bez bolesti
26.	ALL	SI	I Remisija	CC	6	smrtni
27.	ALL	SI	Aktivna bolest	CC	2	smrtni
28.	ALL	SI	I Remisija	CC	1	Živ bez bolesti

29.	ALL	SI	I Remisija	CC	67	Živ bez bolesti
30.	ALL	SI	Aktivna bolest	CC	16	Živ bez bolesti
31.	ALL	SI	I Remisija	CC	10	Živ bez bolesti
32.	ALL	SI	Relaps	CC	8	smrtni
33.	ALL	SI	I Remisija	CC	8	Živ bez bolesti
34.	ALL	SI	Aktivna bolest	CC	3	smrtni
35.	ALL	NSI	Aktivna bolest	CC	11	Živ bez bolesti
36.	ALL	SI	I Remisija	CC	5	Živ bez bolesti
37.	ALL	SI	I Remisija	CC	2	Živ bez bolesti
38.	MDS	SI	Aktivna bolest	CC	32	Živ bez bolesti
39.	MDS	SHI	Aktivna bolest	CC	3	smrtni
40.	MDS	SI	Aktivna bolest	CC	5	Živ bez bolesti
41.	MDS	SI	I Remisija	CC	4	smrtni
42.	HML	NSI	I Remisija	CC	28	Živ bez bolesti
43.	HML	NSI	I Remisija	CC	27	Živ bez bolesti
44.	HML	SHI	I Remisija	CC	68	Živ bez bolesti
45.	Bifenotipska leukemija	SI	I Remisija	CC	3	smrtni
46.	JMML	SI	Aktivna bolest	CC	24	Živ bez bolesti
47.	JMML	SI	Aktivna bolest	CC	7	Živ bez bolesti
48.	NHL	SI	II Remisija	CC	3	smrtni

Od 34 bolesnika obolelih od malignih bolesti u trenutku pre transplantacije, 14 bolesnika je bilo u prvoj remisiji, 9 u drugoj remisiji, dok je 9 bolesnika imalo aktivnu bolest, a dvoje relaps.

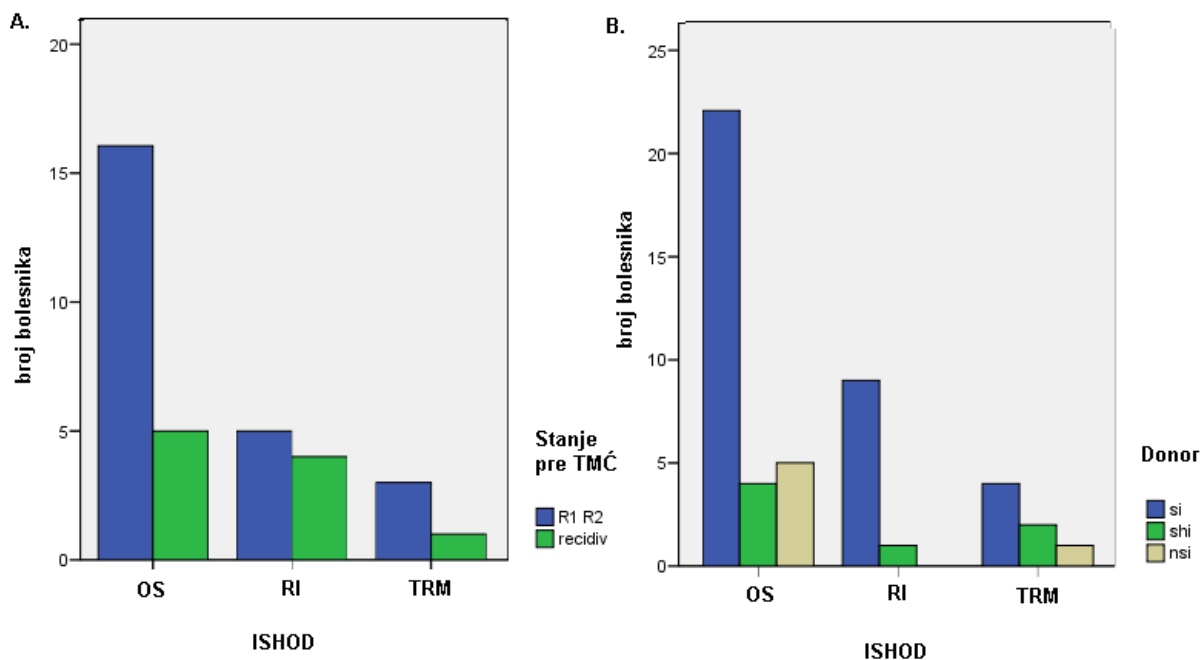
Iako je kod svih bolesnika posle transplantacije registrovan kompletni himerizam, uspešan ishod transplantacije je postignut kod 21/34 (OS=62%) bolesnika, dok je kod 13/34 (38%) bolesnika nastupio smrtni ishod u prvih godinu dana posle transplantacije.



Grafikon 4.3. Registrovana razlika vrednosti himerizama praćenog paralelno u kostnoj srži i perifernoj krvi kod bolesnika broj15

S obzirom da je kod bolesnika obolelih od malignih bolesti himerizam praćen paralelno u kostnoj srži i perifernoj krvi, kod 7 bolesnika je prvo registrovan pad himerizma u kostnoj srži, a samo kod 4 i u perifernoj krvi (grafikon 4.3), dok je kod 6 bolesnika smrtni ishod nastupio brzo bez registrovanog pada himerizma. Smrtni ishod je u ovoj grupi bolesnika kod četvero nastupio kao posledica komplikacija nastalih zbog same transplantacije, dok je kod 9 bolesnika bio rezultat povratka osnovne bolesti. U

analiziranoj grupi bolesnika kod kojih je došlo do povratka osnovne bolesti nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na njihovo stanje pre TMČH, kao ni u odnosu na tip donora (grafikonu 4.4).



Grafikon 4.4. A. Ishod lečenja u odnosu na stanje pre TMČH kod analiziranih bolesnika. **B.** Ishod lečenja u odnosu na tip donora kod analiziranih bolesnika

4.1.3 Korelacija kliničkih parametara sa tipom himerizma

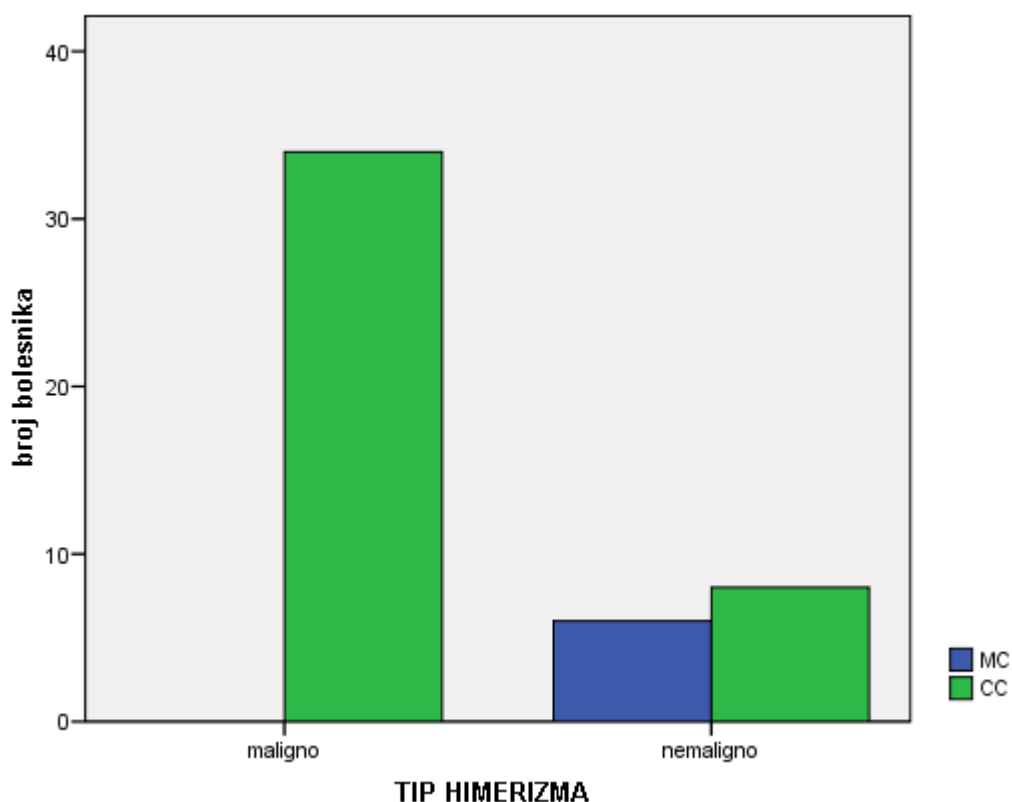
U ovom radu je poređena povezanost tipa himerizma (CC ili MC) u odnosu na sledeće kliničke parametre: uzrast, pol, tip oboljenja (maligno ili nemaligno), tip donora, režim kondicioniranja, pojavu GVHD, ishod, dužinu praćenja, broj TMČH i u odnosu na uzorak uzet za analizu (periferna krv ili kostna srž). Vrednosti statističke značajnosti povezanosti kliničkih parametara sa registrovanim tipom himerizma kod svih analiziranih bolesnika prikazane su u tabeli 4.3.

Tabela 4.3. Analiza povezanosti kliničkih parametara sa registrovanim tipom himerizma kod svih bolesnika i njihov statistički značaj

Tip himerizma / klinički parametri	MC	CC	p
Uzrast bolesnika Srednja vrednost	10,6667	8,7750	NS
Pol			
Muški	5 (83%)	22 (52%)	NS
Ženski	1 (17%)	20 (48%)	
Tip oboljenja			
Maligno	0	34 (81%)	P = 16,653; p < 0,01
Nemaligno	6 (100%)	8 (19%)	
Donor			
Srodni identični	5 (83%)	30 (71%)	NS
Srodni haplo-identični	0	7 (17%)	
Nesrodni identični	1 (17%)	5 (12%)	
Režim kondicioniranja			
Mijeloablativni	6 (100%)	29 (69%)	NS
Mijeloablativni +zračenje	0	12 (29%)	
Nemijeloablativni	0	1 (2%)	
GVHD			
Pozitivan	2 (33%)	31 (74%)	NS
Negativan	4 (67%)	11 (26%)	
Ishod			
5-god. ukupno preživljavanje (OS)	3 (50%)	28 (67%)	NS
Incidenca relapsa (RI)	1 (17%)	9 (21%)	
Mortalitet vezan za TMČH (TRM)	2 (33%)	5 (12%)	
Dužina praćenja			
Srednja vrednost (meseci)	30,3333	16,2593	z = 4,977; p < 0,05
Broj TMČH			
Jedna	5 (83%)	41 (98%)	NS
Dve	1 (17%)	1 (2%)	
Uzorak			
Periferna krv	0	34(60%)	$\chi^2 = 4,087$; p < 0,05
Kostna srž	8 (100%)	26 (40%)	

NS- Nije značajna statistička razlika (p > 0,05)

Primenom statističkih metoda poređenje prosečnih vrednosti numeričkih karakteristika u odnosu na tip himerizma u perifernoj krvi kod naših bolesnika pokazano je da ne postoje značajne razlike u odnosu na uzrast i pol, što ide u prilog tvrdnji da su grupe dobro i slučajno odabrane. Jedino je zabeležena statistički značajna razlika u odnosu na vreme praćenja ($z = 4,977$; $p < 0,05$), a ono je bilo daleko duže kod bolesnika sa MC. Ukrštanje tipa himerizma u perifernoj krvi i tipa oboljenja kod naših bolesnika pokazuje razliku koja je statistički visoko značajna ($P = 16,653$; $p < 0,01$), a posledica je prisustva nalaza MC samo u krvi obolelih od nemalighnih bolesti dok kod obolelih od malignih bolesti nalaz MC nije registrovan (grafikon 4.5).



Grafikon 4.5. Raspodela tipa himerizma u perifernoj krvi u odnosu na tip oboljenja (maligno ili nemaligno) kod naših bolesnika

U daljoj analizi poređena je podela po tipu himerizma u perifernoj krvi kod naših bolesnika sa svim atributivnim karakteristikama i nije nađena statistički značajna razlika po polu, ishodu, tipu donora, režimu kondicioniranja, kao ni pojavi GVHD.

Poređenje tipa himerizma u odnosu na uzorak uzet za analizu (kostna srž ili periferna krv) je pokazalo statistički značajnu razliku ($\chi^2 = 4,087$; $p < 0,05$), koja je posledica ranijeg otkrivanja opadajućeg himerizma u kostnoj srži u odnosu na perifernu krv kod ovih bolesnika.

4.1.4 Prediktivni značaj metoda STR-PCR za odbacivanje kalema

Opadajući mešani himerizam predstavlja znak odbacivanja kalema i registrovan je u vremenskom periodu do 12 meseci kod bolesnika sa nemaligim bolestima, a do 8 meseci kod bolesnika sa malignim bolestima. Praćenje himerizma STR-PCR metodom kod naših bolesnika u određenim vremenskim intervalima je pokazalo da ni u jednom slučaju nije registrovan opadajući mešani himerizam posle godinu dana (tabela 4.4).

Tabela 4.4. Raspodela registrovanog kompletnog himerizma (CC), stabilnog mešanog himerizma (SMC) i opadajućeg mešanog himerizma (OMC) kod naših bolesnika praćena u intervalima od 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21 i 24 meseca u odnosu na dijagnozu

Vreme posle TMČH	Nemaligno oboljenje			Maligno oboljenje			Ukupan broj bolesnika
	CC	SMC	OMC	CC	SMC	OMC	
1 mesec	10	4	0	34	0	0	48
2 meseca	9	4	1	33	0	1	48
3 meseca	7	4	2	29	0	3	45
4 meseca	7	4	1	27	0	0	39
5 meseci	7	4	1	25	0	0	37
6 meseci	7	4	1	24	0	1	37
8 meseci	7	4	1	22	0	2	35
10 meseci	7	4	0	21	0	0	32
12 meseci	7	4	0	21	0	0	32
15 meseci	7	3	0	21	0	0	31
18 meseci	7	3	0	21	0	0	31
21 meseca	7	3	0	21	0	0	31
24 meseca	7	3	0	21	0	0	31

CC-kompletni himerizam, SMC-stabilni mešani himerizam, OMC-opadajući mešani himerizam

Koksovim regresionim modelom analizirani su prediktori ishoda lečenja tj. karakteristike koje mogu prognozirati pojavu smrtnog ishoda. Kao značajni prediktor ishoda izdvojena je promena himerizma registrovana 4. i 5. meseca posle TMČH (tabela 4.5). Iz navedenog sledi da registrovana promena himerizma predstavlja pouzdan prediktor pojave smrtnog ishoda u kritičnom periodu od prvih 6 meseci.

Tabela 4.5. Promena himerizma u proteklom vremenu posle transplantacije kao prediktor pojave smrtnog ishoda (Koksov regresioni model)

Promena himerizma	Skor	df	p
Himerizam 15 dan	,342	1	,559
Himerizam 30 dan	,342	1	,559
Himerizam 60 dan	4,872	2	,088
Himerizam 90 dan	,124	1	,588
Himerizam 120 dan	24,501	1	,000*
Himerizam 150 dan	24,501	1	,000*

* p < 0,05

4.2 Praćenje minimalne rezidualne bolesti kod bolesnika sa malignim bolestima posle alogene transplantacije matičnih ćelija hematopoeze

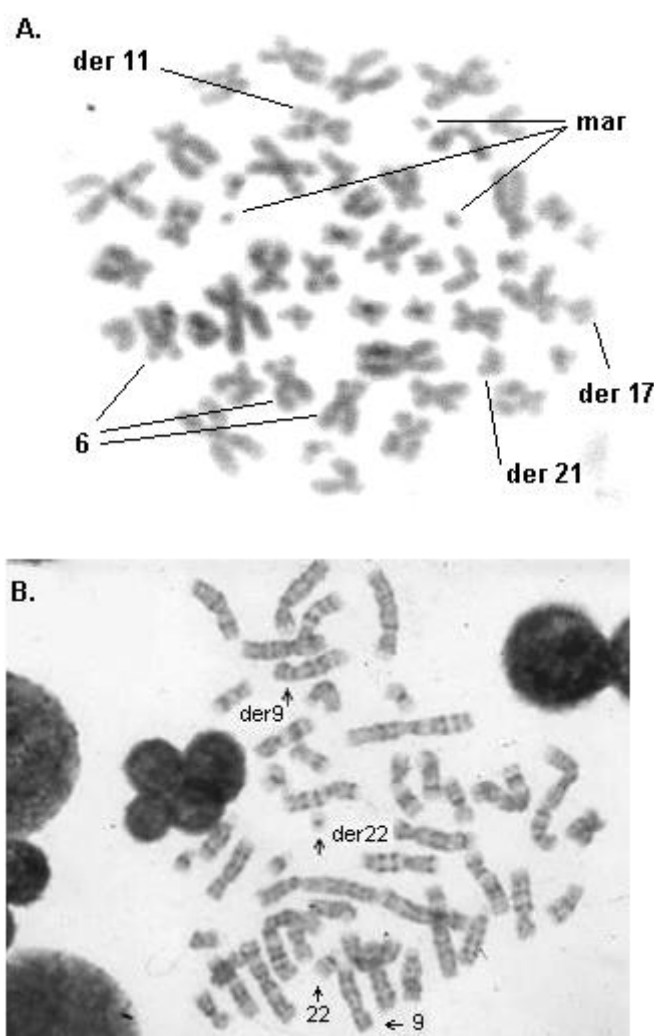
Oboleli od malignih bolesti su pre transplantacije analizirani na prisustvo hromozomskih rearanžmana. Citogenetička analiza iz kostne srži rađena je kod svih bolesnika i posle TMČH kako bi se isključila pojava sekundarnog maligniteta ili evolucije malignog kлона. S druge strane, RT-PCR metodom posle transplantacije praćeni su samo bolesnici koji su bili pozitivni za neki od fuzionih rearanžmana pre transplantacije. U tabeli 4.6 su prikazane hromozomske aberacije registrovane pre i posle TMČH u našoj grupi bolesnika.

Tabela 4.6. Hromozomske aberacije kod bolesnika sa malignim bolestima hematopoeze pre i posle TMČH

BOLESNIK	DIJAGNOZA	HROMOZOMSKA ABERACIJA pre TMČH	HROMOZOMSKA ABERACIJA posle TMČH	DUŽINA PRAĆENJA (meseći)	ISHOD
13.	AML	/	49,XX,+X,+8,+21	4	Relaps
15.	AML	48,XX, t(11;17)(q23;q21), +2mar	51,XX, +6, t(11;17)(q23;q21), +der21,+3mar	8	Relaps
16.	AML	50-54 HR	50-54 HR	10	Relaps
19.	AML	46,XX, t(2;11)(q31;p15)		28	Živ bez bolesti
20.	AML	46,XY, t(9;21)(p22;q11)		4	Komplikacije zbog TMČH
21.	AML	46,XY,add(6)(p23)		12	Živ bez bolesti
23.	ALL	<i>BCR/ABL- p190</i>	<i>BCR/ABL-p190</i>	6	Relaps
24.	ALL	<i>TEL/AML1</i>		1	Živ bez bolesti
25.	ALL	/	47,XY,+mar	2	Relaps
34.	ALL	<i>TEL/AML1/45Hr</i>	<i>TEL/AML1/kompleksni kariotip</i>	3	Relaps
35.	ALL	<i>BCR/ABL- p190</i>		11	Živ bez bolesti
36.	ALL	<i>BCR/ABL- p190</i>		5	Živ bez bolesti
37.	ALL	<i>BCR/ABL- p190</i>		2	Živ bez bolesti
39.	MDS	45,XY,-7		3	Komplikacije zbog TMČH
41.	MDS	45,XY,-7		4	Komplikacije zbog TMČH
42.	HML	<i>BCR/ABL- p210</i>	<i>BCR/ABL-p210</i>	28	Živ bez bolesti
43.	HML	<i>BCR/ABL- p210</i>		27	Živ bez bolesti
44.	HML	<i>BCR/ABL- p210</i>		68	Živ bez bolesti
45.	Bifenotipska leukemija	46,XX,t(9;22)(q34;q11)/ <i>BCR/ABL-p210</i>	<i>BCR/ABL-p210</i>	3	Relaps

4.2.1 Praćenje bolesnika metodama citogenetike

Analiza kariotipa bolesnika je urađena prilikom postavljanja dijagnoze, pre transplantacije matičnih ćelija hematopoeze. Kod 9/34 (26%) bolesnika je registrovan aberantan kariotip, kod 21/34 (62%) je registrovan normalan kariotip, dok kod 4/34 (11%) bolesnika nije bilo moguće uraditi citogenetičku analizu zbog slabog mitotskog indeksa. Bolesnicima je kontrolisan kariotip posle transplantacije.



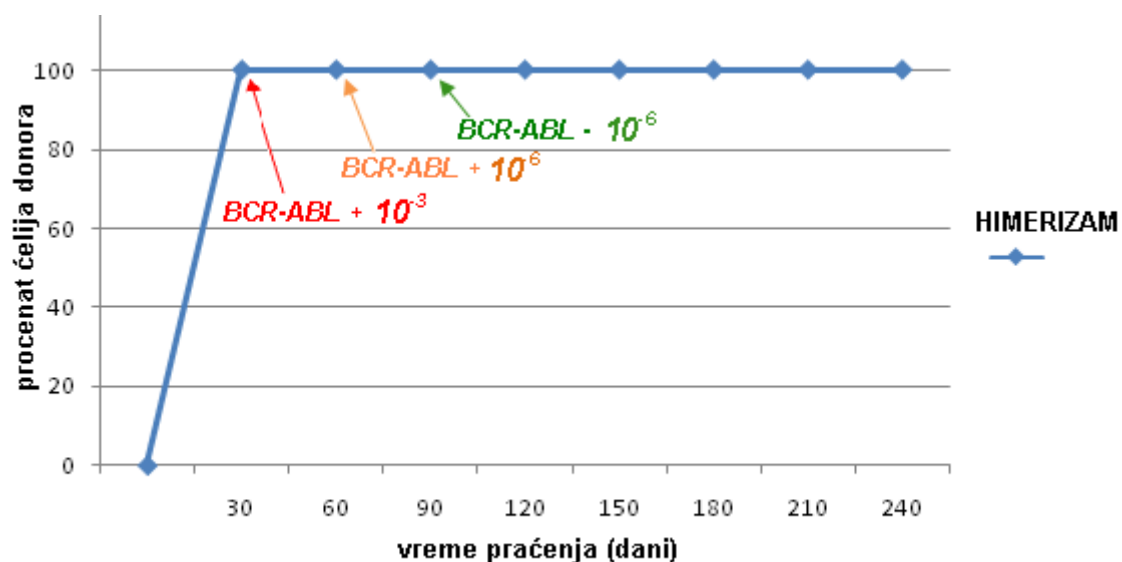
Slika 4.2. A: Aberantan kariotip kod bolesnika broj 15: 51,XX,t(11;17)(q23;q21),+6+der21, +3mar. **B:** Aberantan kariotip kod bolesnika broj 45 sa Ph hromozomom: 46,XX,t(9;22)(q34;q11)

Kod 5/34 (15%) bolesnika je otkriven aberantan kariotip posle transplantacije, od toga je jedan (bolesnik broj 16) imao isti klon kao pre TMČH, kod dva bolesnika (broj 15, broj 34) je došlo do evolucije klona, dok je kod 2 bolesnika (broj 13 i broj 25) došlo do pojave novog aberantnog klona (tabela 4.6). Na slici 4.2 prikazane su mitotske figure sa aberantanim kariotipom videne pod svetlosnim mikroskopom na primeru dva bolesnika broj 15 i broj 45.

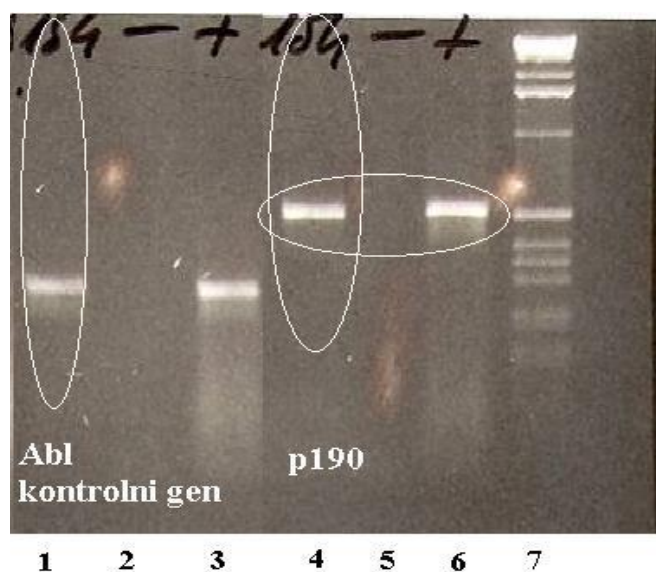
4.2.2 Praćenje RT-PCR metodom bolesnika koji su pre transplantacije imali neki od fuzionih genskih rearanžmana

RT-PCR metodom je praćeno 10/34 (29%) bolesnika kod kojih je pre transplantacije registrovan fuzioni genski rearanžman (tabela 4.6). Kod 8 bolesnika (broj: 23, 35, 36, 37, 42, 43, 44, 45) bio je prisutan fuzioni rearanžman *BCR/ABL*, dok je kod dva bolesnika (broj: 24, 34) perzistentno pre TMČH bio prisutan *TEL/AML1* rearanžman.

Posle TMČH bolesnicima je rađena RT-PCR analiza paralelno iz uzoraka kostne srži i iz periferne krvi u prvih šest meseci, dok je dalje praćenje nastavljeno samo iz uzoraka periferne krvi. U slučaju 4/10 bolesnika (broj: 23, 34, 42, 45) je i posle TMČH registrovano prisustvo rearanžmana, dok su ostali bili negativni. Posle transplantacije, jedan bolesnik je bio pozitivan za *TEL/AML1* rearanžman, dok su tri bolesnika bila pozitivna za *BCR/ABL* rearanžman, od kojih je kod dva došlo do recidiva bolesti i smrtnog ishoda, a kod jednog bolesnika (broj 42) primenjena terapija dovela je do razvoja GVHD, tj. u ovom slučaju GVL, što je imalo za posledicu gubitak *BCR/ABL* rearanžmana prvo iz kostne srži, a zatim i iz periferne krvi (grafikon 4.6). Na slici 4.3 prikazana je detekcija fuzionog produkta *BCR/ABL*-p190 na agaroznom gelu, na primeru bolesnika broj 23.



Grafikon 4.6. Kod bolesnika broj 42 registrovan je kompletni himerizam posle TMČH metodom STR-PCR, dok je 30. i 60. dana posle TMČH metodom RT-PCR registrovano prisustvo *BCR-ABL* rearanžmana koji se izgubio 90 dana posle TMČH

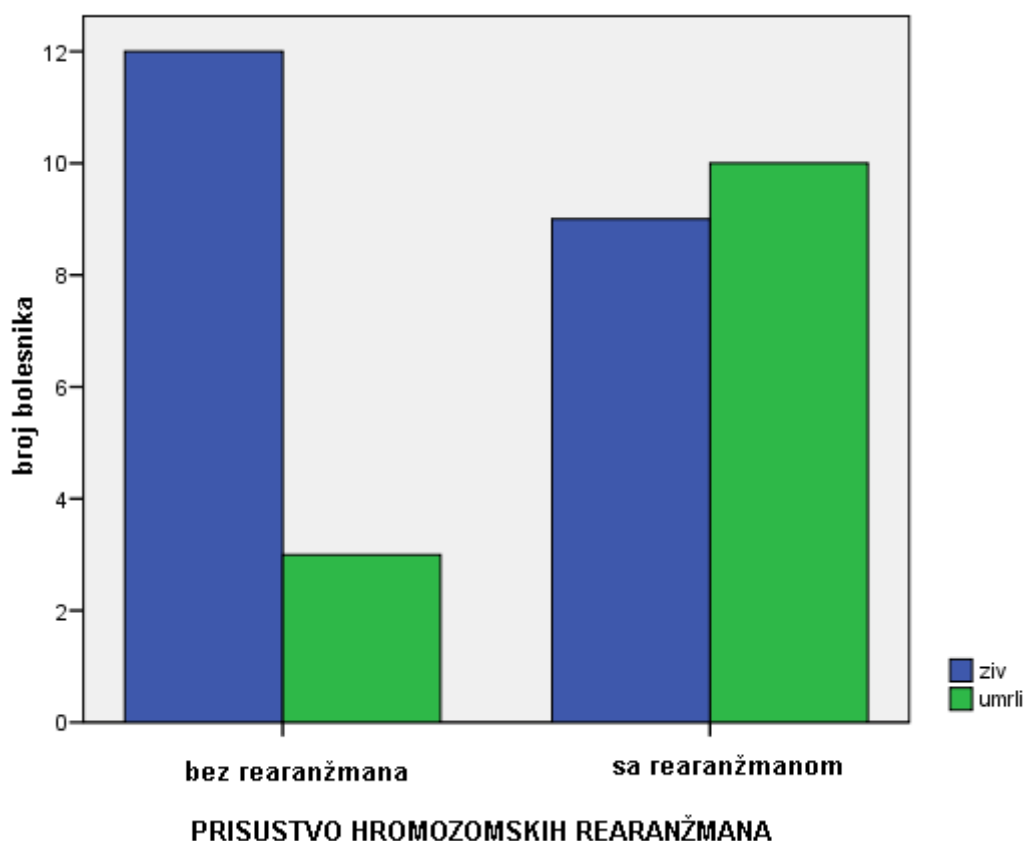


Slika 4.3. PCR produkti, 2% agarozni gel, 85V, 50 min. U koloni 1 i 3 su PCR produkti koji predstavljaju kontrolu kvaliteta dobijene cDNK (ABL gen). U koloni 4 je prisutan fuzioni produkt *BCR/ABL*-p190 kod bolesnika #23. Kolone 2 i 5 su negativna kontrola. Kolona 6 je pozitivna kontrola za *BCR/ABL*-p190. U koloni 7 je marker od 1 kb (Invitrogen)

4.2.3 Prediktivni značaj prisustva hromozomskih rearanžmana za pojavu recidiva bolesti

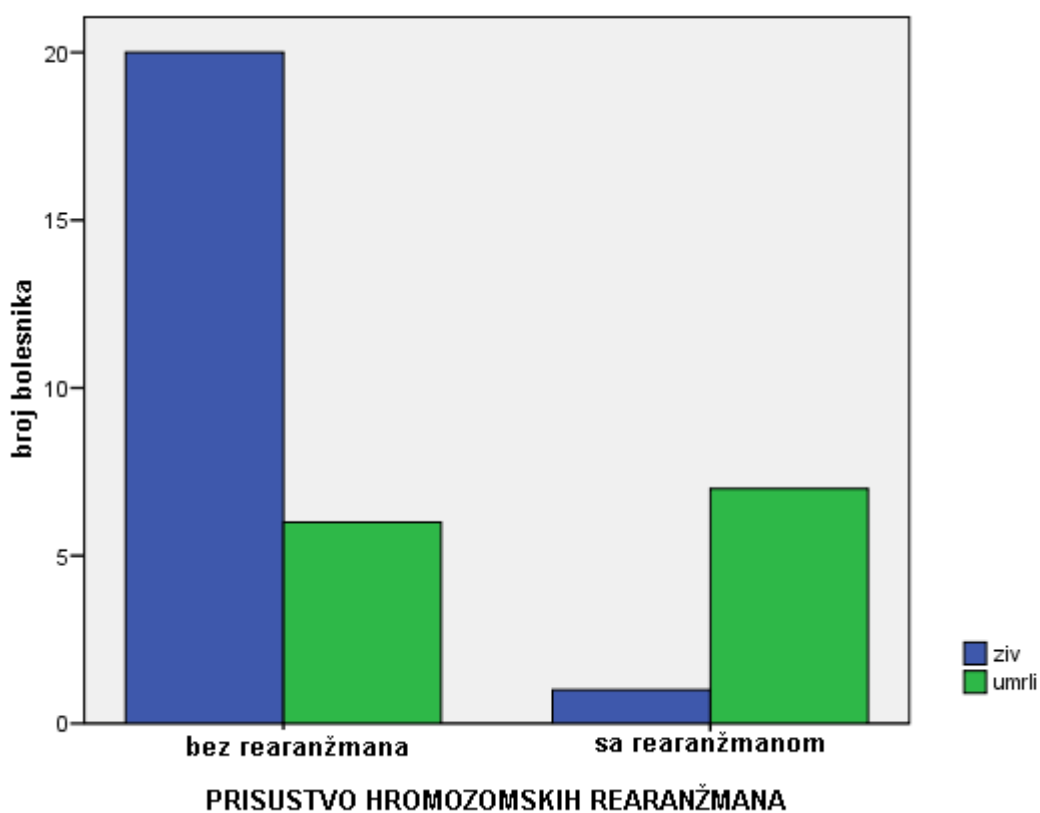
U daljoj analizi upoređeno je prisustvo hromozomskih rearanžmana pre i posle TMČH u odnosu na stanje pre TMČH, režim kondicioniranja, kao i na pojavu GVHD kod praćenih bolesnika i nije nađena statistički značajna razlika.

Analiza je pokazala da postoji značajan uticaj prisustva hromozomskih rearanžmana pre i posle TMČH u odnosu na ishod lečenja. Poređenje prisustva hromozomskih rearanžmana pre TMČH u odnosu na ishod lečenja pokazalo je statistički značajnu razliku ($P = 0,030$; $p < 0,05$), koja je posledica većeg broja živih bolesnika bez rearanžmana pre TMČH (80,0%) u odnosu na bolesnike sa hromozomskim rearanžmanima pre TMČH (47,4%) (grafikon 4.7).



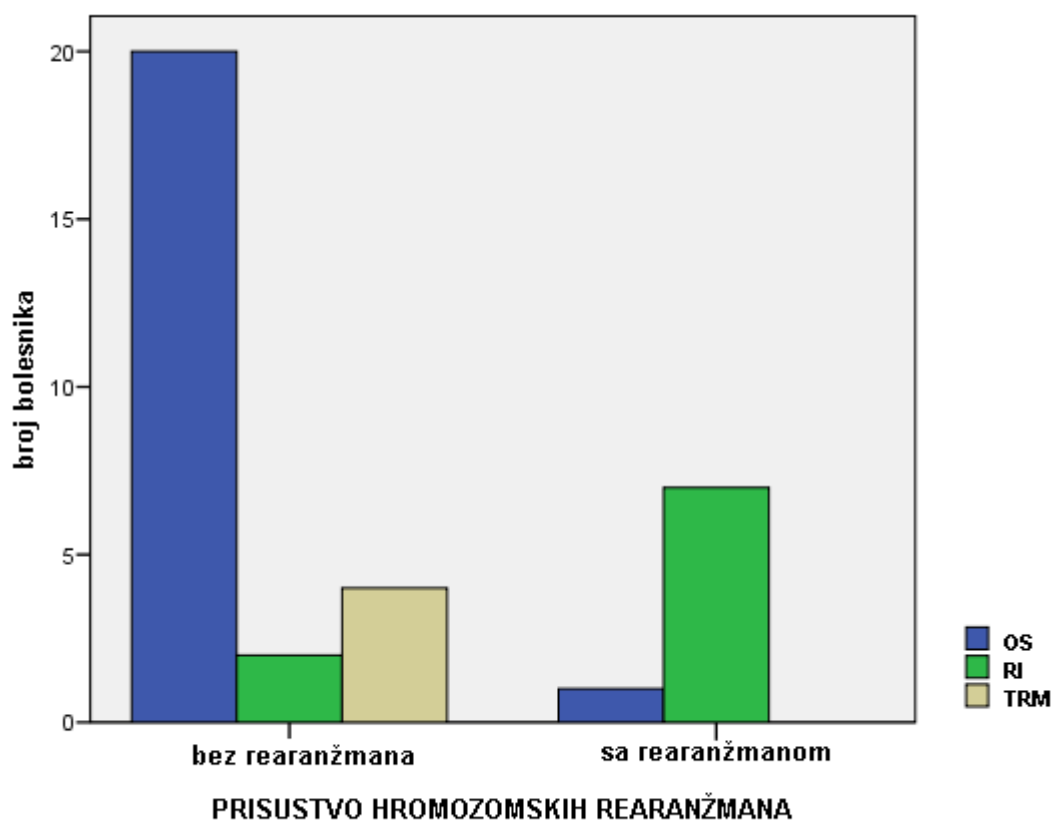
Grafikon 4.7. Grafički prikaz raspodele prisustva hromozomskih rearanžmana pre TMČH u odnosu na ishod lečenja kod naših bolesnika

U sledećem koraku interesovalo nas je da li prisustvo hromozomskih rearanžmana posle TMČH ima uticaj na ishod lečenja transplantacijom. Analiza je pokazala postojanje statistički visoko značajne razlike ($\chi^2 = 10,751$; $p < 0,01$), koja je posledica činjenice da su svi bolesnici sa hromozomskim aberacijama registrovanim posle TMČH umrli, osim jednog kod koga je ukidanje imunosupresivne terapije i GVL imalo pozitivan efekat (grafikon 4.8).



Grafikon 4.8. Grafički prikaz raspodele prisustva hromozomskih rearanžmana posle TMČH u odnosu na ishod lečenja kod naših bolesnika

Analiza uticaja prisustva hromozomskih rearanžmana posle TMČH na ukupno preživljavanje i incidencu relapsa kod naših bolesnika pokazala je statistički visoko značajnu razliku ($\chi^2 = 20,062$; $p < 0,01$), koja je posledica većeg ukupnog preživljavanja bolesnika bez rearanžmana (OS=95%). Takođe, analiza je pokazala da je veća incidenca relapsa bila kod bolesnika koji su imali rearanžman posle TMČH (grafikon 4.9).

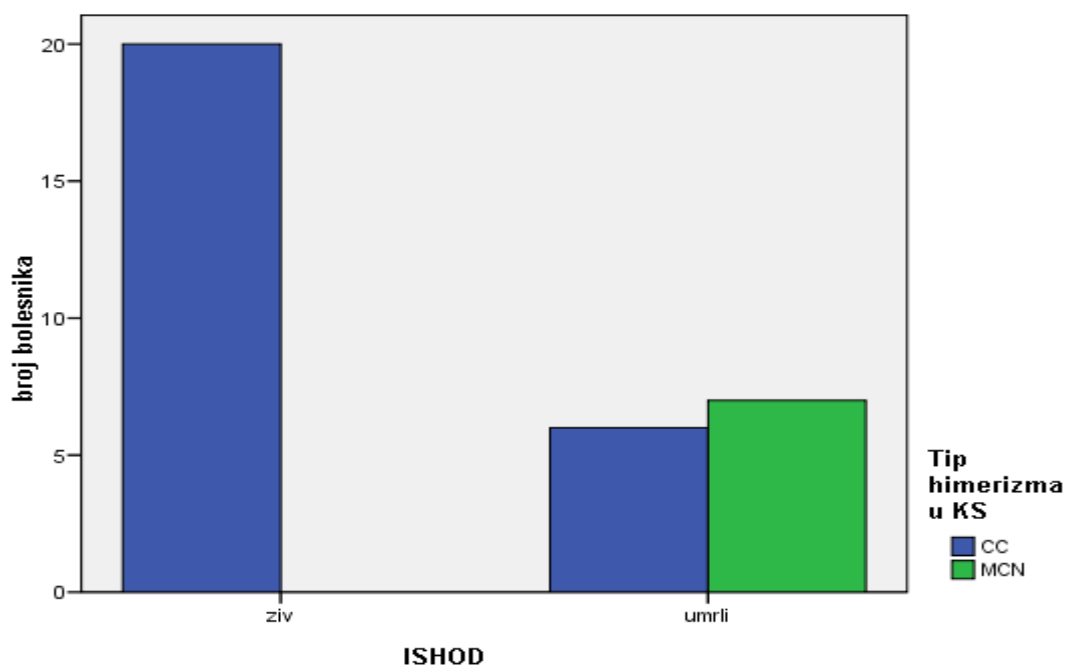


Grafikon 4.9. Grafički prikaz raspodele prisustva hromozomskih rearanžmana posle TMČH u odnosu na ishod lečenja (OS, RI, TRM) kod naših bolesnika

4.2.4 Analiza prediktornih faktora za ishod lečenja bolesnika sa malignim bolestima posle transplantacije matičnih ćelija hematopoeze

U cilju definisanja značajnih prediktora za ishod lečenja metodom transplantacije kod bolesnika sa malignim bolestima hematopoeze analizirali smo uticaj sledećih parametara: uzrast, pol, stanje pre TMČH, vrsta donora, režim kondicioniranja, GVHD, tip himerizma u perifernoj krvi, tip himerizma u kostnoj srži, prisustvo hromozomskih rearanžmana pre TMČH i posle TMČH (tabela 4.7).

Parametri koji su kod malignih bolesnika pokazali statističku razliku u odnosu na ishod lečenja su prisustvo hromozomskih rearanžmana pre TMČH (grafikon 4.7), prisustvo hromozomskih rearanžmana posle TMČH (grafikon 4.8) i opadajući himerizam u kostnoj srži posle TMČH. Poređenje ishoda lečenja i tipa himerizma u kostnoj srži kod obolelih od malignih bolesti pokazuje razliku koja je statistički visoko značajna ($P = 0,000$; $p < 0,01$). Ova razlika je posledica većeg broja bolesnika sa kompletnim himerizmom u kostnoj srži koji su živi bez bolesti posle transplantacije (76,9%) u odnosu na bolesnike sa opadajućim mešanim himerizmom koji su svi umrli (100,0%) (grafikon 4.10).



Grafikon 4.10. Grafički prikaz raspodele prisustva opadajućeg mešanog himerizma u kostnoj srži posle TMČH u odnosu na ishod lečenja bolesnika

Tabela 4.7. Statistički značaj povezanosti kliničkih parametara sa ishodom lečenja TMČH kod praćenih bolesnika

Klinički parametri / Ishod lečenja TMČH	Živi	Umrli	p
Uzrast bolesnika			
Srednja vrednost	8,8095	9,3077	NS
Pol			
muški	11	6	NS
ženski	10	7	
Stanje pre TMČH			
I remisija	16	8	NS
II remisija ili recidiv	5	5	
Tip donora			
Srodni identični	14	11	NS
Srodni haplo-identični	4	2	
Nesrodni identični	3	0	
Režim kondicioniranja			
Mijeloablativni	12	10	NS
Mijeloablativni +zračenje	8	3	
Nemijeloablativni	1	0	
GVHD			
Pozitivan (akutni, hronični ili oba)	18	10	NS
Negativan	3	3	
Tip himerizma u perifernoj krvi			
CC	28	14	NS
MC	5	4	
Tip himerizma u kostnoj srži			
CC	22	5	P = 0,000; p < 0,01
MC	0	7	
Prisustvo hromozomskih rearanžmana pre TMČH			
negativan	12	3	P = 0,030; p < 0,05
pozitivan	9	10	
Prisustvo hromozomskih rearanžmana posle TMČH			
negativan	20	6	$\chi^2 = 10,751$; p < 0,05
pozitivan	1	7	

Poređenjem ishoda lečenja kod obolelih od malignih bolesti u odnosu na uzrast, pol, tip donora, stanje pre TMČH, režim kondicioniranja, pojavu GVHD, kao i nalaz himerizma u perifernoj krvi, nije nađena značajna razlika.

U daljem radu su Koksovim regresionim modelom analizirani prediktori ishoda lečenja tj. karakteristike koje mogu prognozirati pojavu smrtnog ishoda kod malignih bolesti posle TMČH. Kao značajni prediktor ishoda izdvojili su se prisustvo hromozomskih rearanžmana pre TMČH i prisustvo hromozomskih rearanžmana posle TMČH. Nisu bili značajni režim kondicioniranja, stanje pre TMČH, pojava GVHD, vrsta donora, pol, uzrast kao ni primarna dijagnoza (tabela 4.8).

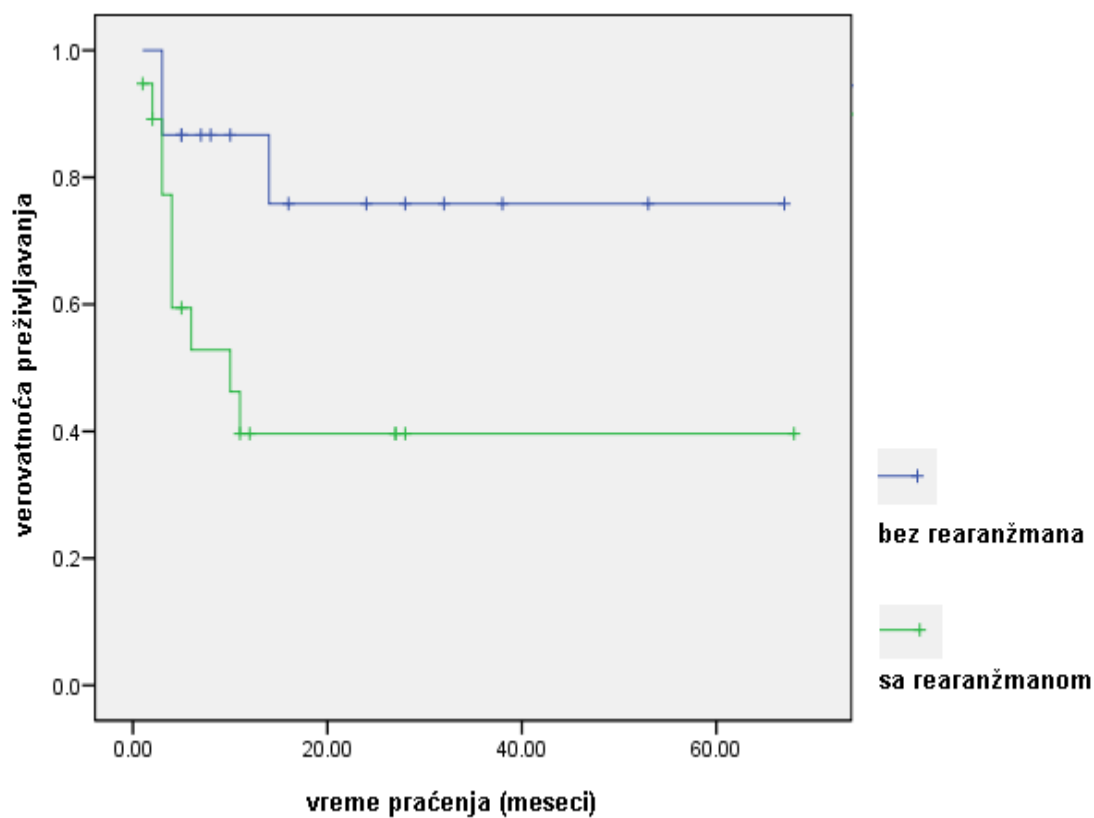
Tabela 4.8. Kliničke karakteristike kao prediktori pojave smrtnog ishoda (Koksov regresioni model)

Kliničke karakteristike	Skor	df	p
Dijagnoza	3,596	6	,731
Uzrast	,004	1	,949
Pol	1,311	1	,252
Donor	1,401	1	,236
Prisustvo hromozomskog rearanžmana pre TMČH	5,410	1	,020*
Prisustvo hromozomskog rearanžmana posle TMČH	11,561	1	,001*
Stanje pre TMČH	,063	1	,801
Režim kondicioniranja	,596	1	,440
Pojava GVHD	,032	1	,859

* $p < 0,05$

U sledećem koraku, Kaplan Majerovom metodom analizirano je postojanje razlike u preživljavanju u odnosu na prisustvo hromozomskih rearanžmana pre TMČH kod bolesnika sa malignim bolestima. Rezultat Log Rank testa (Log Rank = 2,991; $p < 0,05$) je pokazao da postoji statistički značajna razlika u dužini preživljavanja, a nastaje zato što su bolesnici bez hromozomskih rearanžmana imali bolje preživljavanje

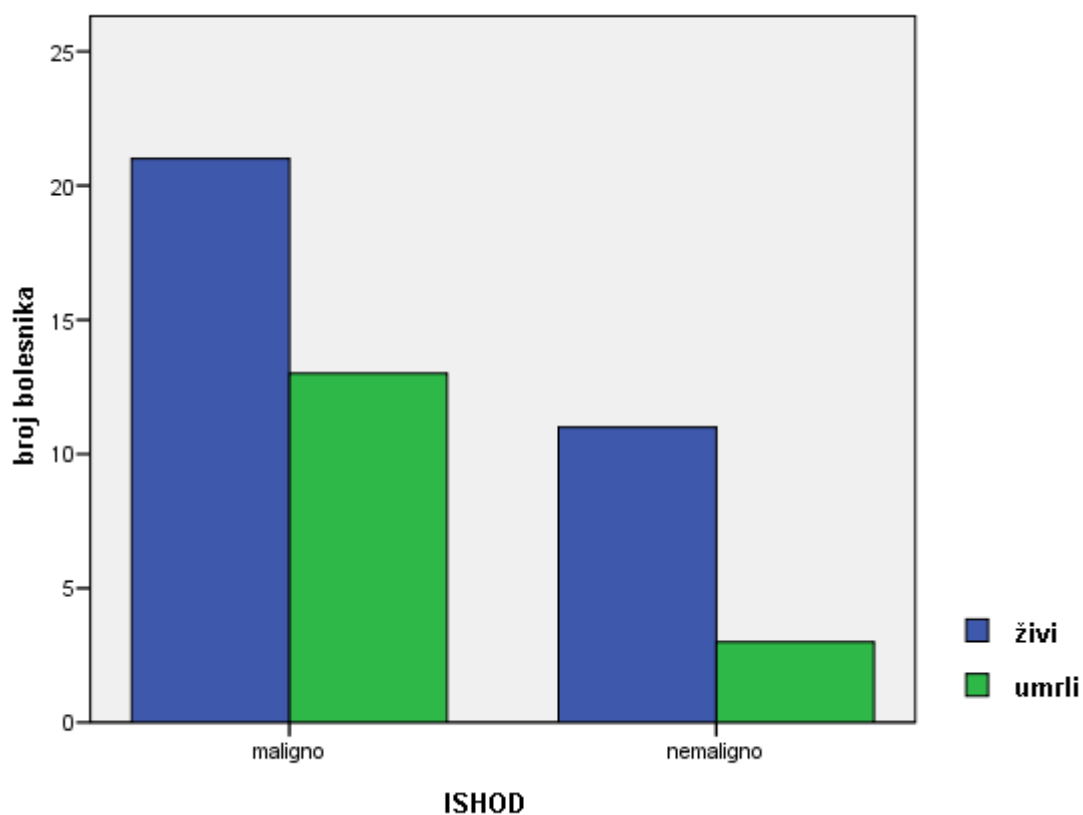
(medijana 40,0 meseci) u odnosu na bolesnike sa hromozomskim rearanžmanima (medijana 10,0 meseci), što je prikazano na grafikonu 4.11.



Grafikon 4.11. Kaplan Majerova kriva preživljavanja u odnosu na prisustvo hromozomskih rearanžmana pre TMČH kod praćenih bolesnika (Log Rank = 4,463; $p < 0,05$)

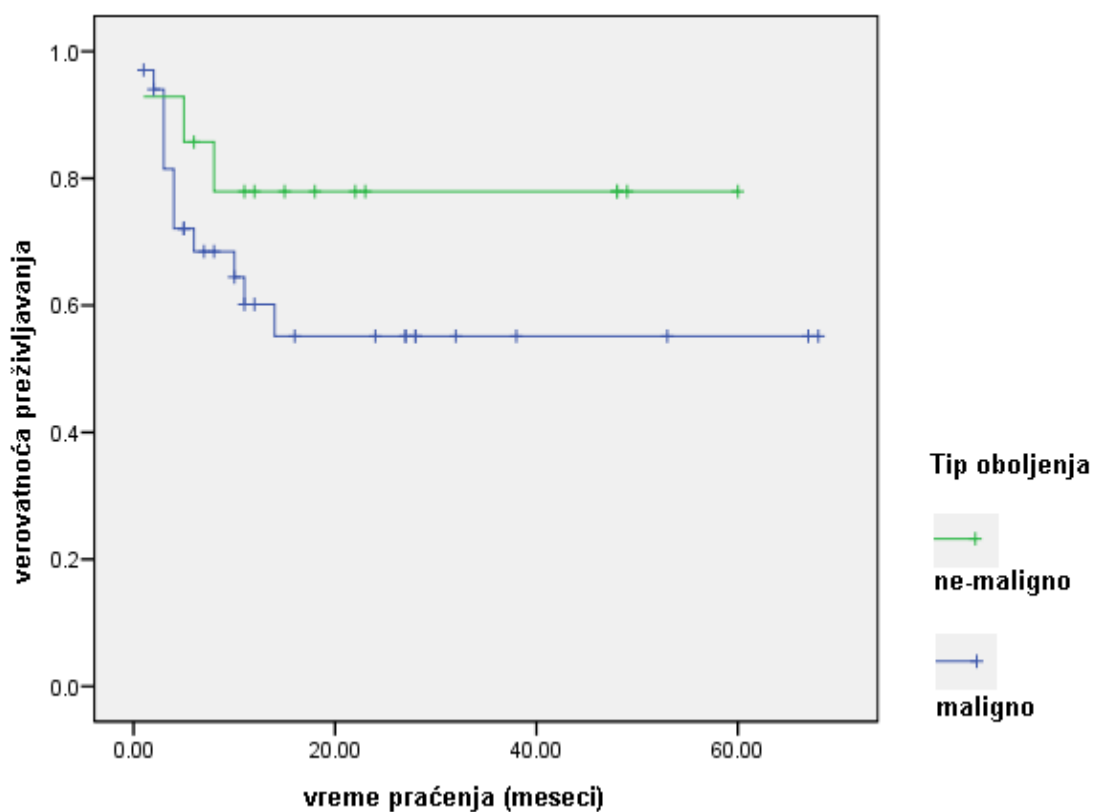
4.3 Analiza preživljavanja bolesnika posle transplantacije matičnih ćelija hematopoeze

Analiza ishoda lečenja bolesnika transplantacijom u praćenoj grupi bolesnika je pokazala da je veći broj umrlih bolesnika sa malignim bolestima (38,2%) u odnosu na obolele od nemalighnih bolesti hematopoeze (21,4%) (grafikon 4.12).



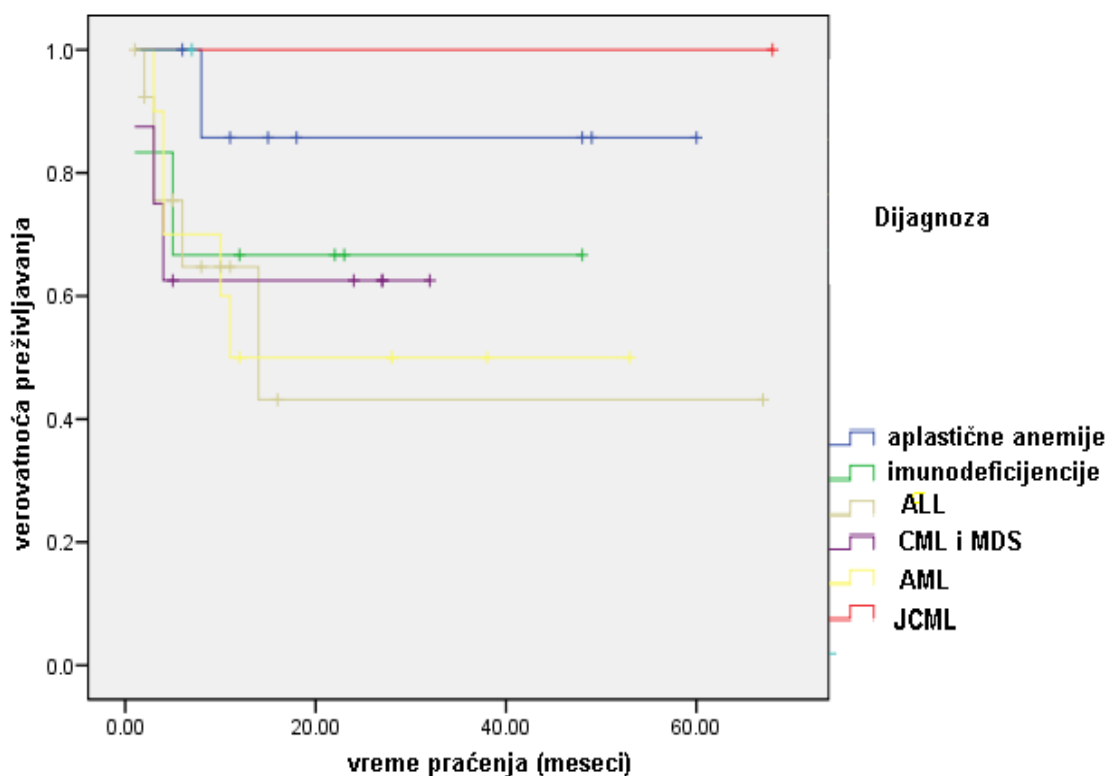
Grafikon 4.12. Grafički prikaz raspodele ishoda lečenja u odnosu na tip oboljenja (maligno ili nemalighno)

Međutim, dalja analiza Kaplan Majerovom metodom postojanja razlike u preživljavanju bolesnika posle TMČH u odnosu na tip oboljenja (maligno i nemaligno) je pokazala da nema statistički značajne razlike u dužini preživljavanja u grupi bolesnika sa malignim i nemaligim bolestima, što se može videti na grafikonu 4.13 (Log Rank = 1,630; $p > 0,05$).



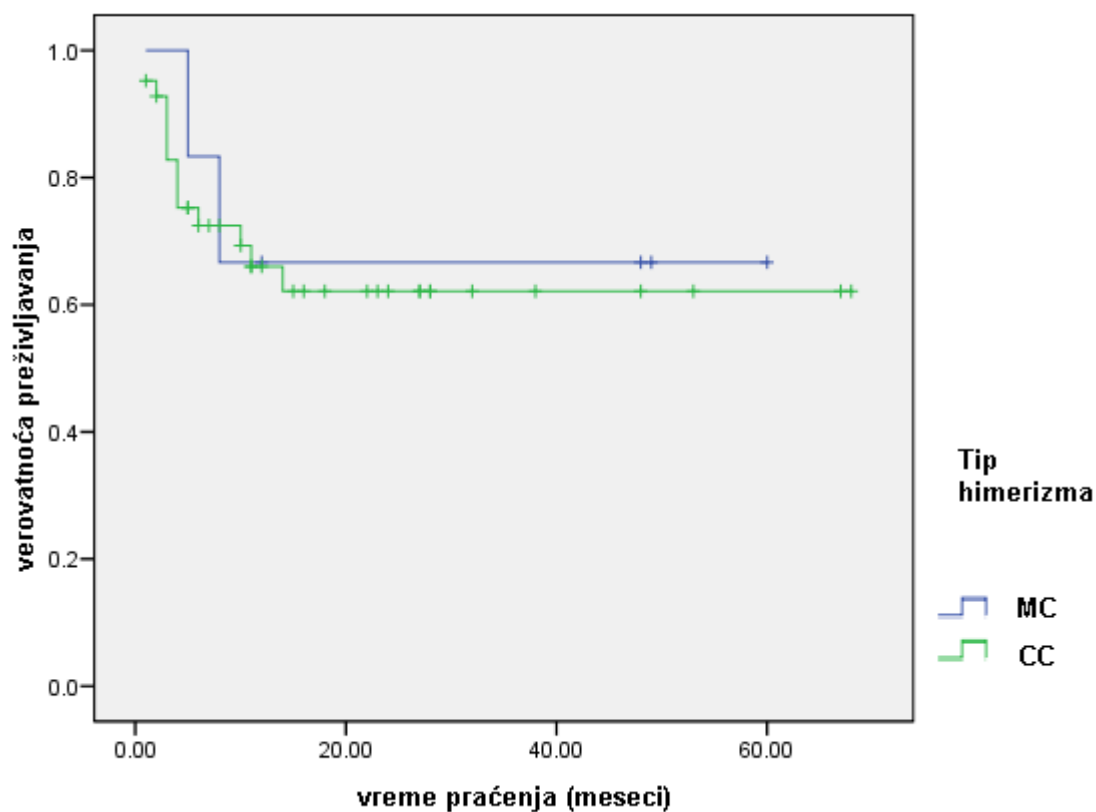
Grafikon 4.13. Kaplan Majerova kriva preživljavanja u odnosu na prisustvo maligne i nemaligne bolesti kod praćenih bolesnika (Log Rank = 1,630; $p > 0,05$)

U sledećem koraku analizirano je Kaplan Majerovom metodom postojanje razlike u preživljavanju u odnosu na postavljenu dijagnozu kod naših bolesnika. Rezultat Log Rank testa (Log Rank = 3,509; $p > 0,05$) je pokazao da nema statistički značajne razlike u dužini preživljavanja između bolesnika u odnosu na primarnu dijagnozu (grafikon 4.14).



Grafikon 4.14. Kaplan Majerova kriva preživljavanja u odnosu na postavljenu dijagnozu pre TMČH u grupi analiziranih bolesnika (Log Rank = 3,509; $p > 0,05$)

Radi utvrđivanja postojanja razlike u preživljavanju u odnosu na tip himerizma u perifernoj krvi svih bolesnika obuhvaćenih ovom studijom urađena je analiza Kaplan Majerovom metodom. Rezultat Log Rank testa (Log Rank = 0,065; $p > 0,05$) je pokazao da nema statistički značajne razlike u dužini preživljavanja između bolesnika sa registrovanim MC i CC nalazom u perifernoj krvi (grafikon 4.15).



Grafikon 4.15. Kaplan Majerova kriva preživljavanja u odnosu na tip himerizma u perifernoj krvi u ispitivanoj grupi bolesnika (Log Rank = 0,065; $p > 0,05$)

5. DISKUSIJA

Više od četiri decenije alogena TMČH predstavlja značajan oblik lečenja bolesnika sa malignim i nemalignim bolestima hematopoeze za koje nema drugih mogućnosti lečenja. Novi savremeni pristup ovom tipu lečenja podrazumeva adekvatnu pre- i post-transplantacionu dijagnostiku. U toku post-transplantacionog perioda blagovremeno praćenje hematopoetskog himerizma kod svih bolesnika predstavlja važan dijagnostički dokaz prihvatanja kalema [36]. Glavni princip u detekciji himerizma je utvrđivanje genetičkih markera koji se razlikuju kod davaoca i primaoca, kao i izbor adekvatne genetičke metode za brzo dobijanje rezultata i praćenje bolesnika u određenim vremenskim intervalima zavisno od tipa bolesti i kliničke slike [34].

Debata o rezultatima multicentrične studije evropskog konzorcijuma za himerizam objavljena je 2003 godine u naučnom časopisu *Leukemia* [36]. Cilj ove studije je bio da se formira konsenzus vezan za testiranje himerizma, u smislu definisanja optimalnog vremena za praćenje himerizma, kao i kliničkih implikacija rezultata praćenja himerizma na prognozu bolesti i izbor odgovarajuće terapije. Autori su istakli značaj harmonizacije i standardizacije metodologije za molekularno praćenje bolesnika nakon TMČH [93]. Po ugledu na studije u svetu, u ovom radu je standardizovana genetička dijagnostika kod dece kojima je urađena alogena transplantacija u Srbiji, odnosno ustanovljeni su optimalni vremenski intervali kao i izbor optimalne genetičke metode radi implementacije internacionalnih kriterijuma u lečenju i uniformne evaluacije i komparacije rezultata sa svetskim centrima.

S druge strane, studije su pokazale da je kod bolesnika sa malignim bolestima, dijagnostika minimalne rezidualne bolesti od velikog značaja za predviđanje recidiva bolesti i blagovremenu intervenciju. Izbor adekvatne dijagnostičke metode je od velikog značaja za dobijanje kompletne slike o stanju bolesnika u toku post-transplantacionog perioda [94].

Kombinacija analize himerizma i analize minimalne rezidualne bolesti daje najbolje rezultate za procenu statusa post-transplantacione remisije i omogućava da se individualno kod svakog bolesnika izabere strategija za prevenciju pojave recidiva ili odbacivanja kalema [95].

5.1 Značaj praćenja himerizma STR-PCR metodom

Iako se STR-PCR metoda koristi za praćenje himerizma u mnogim laboratorijama u svetu, još uvek nije formirana standardizacija vremenskih intervala kao ni tipova uzoraka za analizu [96]. Pored toga, upoređuju se kliničke studije i diskutuje koliki je prognostički značaj mešanog himerizama za pojavu relapsa kod različitih hematoloških bolesti [52,97]. U ovom radu prihvaćene su, uz izvesne modifikacije, preporuke Američkog društva za transplantacije koje su objavljene 2001 godine, a u čijoj izradi je učestvovao veći broj dijagnostičkih centara. Ove preporuke podrazumevaju da za analizu himerizma treba koristiti osetljive, informativne tehnike (kao što su STRs ili VNTRs) koje pružaju reproducibilne rezultate. Bolesnike treba redovno pratiti u prvih godinu dana, i duže ukoliko to klinička slika zahteva. Što se tiče uzoraka za analizu, preporuka je da generalno treba koristiti perifernu krv, a u slučajevima detekcije minimalne rezidualne bolesti potrebno je analizu raditi iz kostne srži [33].

Rezultati ove studije, kao i rezultati studija drugih autora su pokazali da upotreba STR-PCR metode omogućava veliku osetljivost, preciznost i brzo dobijanje rezultata [98]. Osetljivost STR-PCR metode se kreće između 0,1% i 5% zbog same kompetitivne prirode metode lančanog umnožavanja DNK molekula. STR marker sistemi su često korišćeni u forenzici za identifikaciju osoba, kao i u medicini za praćenje himerizma kod bolesnika posle alogene TMČH. Pogodnost ovih metoda je velika osetljivost i reproducibilnost, dok informativnost zavisi od izbora markera za analizu s obzirom da su davalac i primalac u većini slučajeva u srodstvu. U cilju postizanja veće preciznosti u proceni odnosa DNK poreklom od primaoca i davaoca u analiziranom uzorku važno je izabrati veći broj informativnih alela [99,100]. Korišćenjem multipleks analize na 16 genskih lokusa povećava se preciznost kvantifikacije DNK molekula u uzorku, jer se dobija veći broj informativnih lokusa u slučaju srodnih parova. Takođe, na taj način moguće je izbeći lokuse kod kojih se pojavila nespecifična amplifikacija. U ovom radu je korišćeno najmanje četiri informativna alela za procenu udela DNK u mešanom uzorku, što je doprinelo preciznosti analize.

Pored izbora odgovarajuće metode za praćenje himerizma naši rezultati su pokazali da je važno izabrati i adekvatan uzorak za analizu. U ovom radu je dokazano

da je u uzorcima dlake uvek registrovan kompletni genetički profil primaoca, te je moguće pratiti i bolesnike kojima je transplantacija matičnih ćelija urađena sa kostnom srži nepoznatog nesrodnog davaoca iz međunarodne banke. U ispitivanoj grupi bolesnika obolelih od malignih bolesti himerizam je praćen paralelno u kostnoj srži i perifernoj krvi. Kod 7 bolesnika je prvo registrovan pad himerizma u kostnoj srži, a samo kod 4 paralelno i u perifernoj krvi, dok je kod 6 bolesnika smrtni ishod nastupio brzo bez registrovanog pada himerizma. Analiza naših rezultata je pokazala ranije otkrivanje opadajućeg himerizma u kostnoj srži nego u perifernoj krvi kod bolesnika koji odbacuju kalem i potvrdila činjenicu da kostna srž predstavlja informativniji uzorak za analizu himerizma objavljenu u radu Becka i saradnika 2006. godine [97]. Imajući u vidu invazivnu prirodu uzimanja uzorka kostne srži preporučljivo je ovu analizu raditi u periodu najvećeg rizika za odbacivanje kalema, što je prema našim rezultatima u prvih godinu dana nakon transplantacije, kao i u slučajevima kada klinička slika to zahteva.

U grupi bolesnika obolelih od nemalignih bolesti uspešni ishod transplantacije je ostvaren kod 10 (71%) bolesnika, od toga 3 sa MC i 7 sa CC. Od ukupno 6 bolesnika sa mešanim himerizmom, kod tri bolesnika obolela od aplastične anemije stabilno se održava MC, dok su preostala tri bolesnika odbacila kalem. Od osam bolesnika sa CC samo je u jednom slučaju, sa osteopetrozom, smrtni ishod nastupio u drugom mesecu posle transplantacije, bez registrovanog pada himerizma. Iako je kod 3 slučaja prilikom praćenja himerizma registrovano opadanje procenta donorskih ćelija u perifernoj krvi, jedino je bilo moguće uraditi novu transplantaciju u slučaju jednog bolesnika sa talasemijom major.

Prisustvo opadajućeg himerizma znači pojavu recidiva bolesti i predstavlja loš prognostički faktor. Studije koje istražuju značaj mešovitog himerizma za pojedine bolesti matičnih ćelija hematopoeze, kao i korelaciju između kompletnog himerizma i remisije su u toku [95]. Iako oboleli mogu ostati u remisiji i pored prisustva recipijentnih ćelija, mešoviti himerizam predstavlja visoki rizik za pojavu relapsa. Naši rezultati su pokazali da je uspešan ishod transplantacije kod bolesnika sa MC postignut samo u slučaju obolelih od nemalignih bolesti, što je potvrdilo činjenicu da je stabilni mešani himerizam dovoljan da se poboljša zdravstveno stanje bolesnika obolelih od naslednih ili stečenih nemalignih bolesti hematopoeze. S obzirom da je cilj transplantacije kod ovih bolesnika da kalem poboljša funkcionisanje hematopoeznog tkiva, nije neophodno da kalem u potpunosti zameni hematopoezni sistem domaćina. S

druge strane, registrovanje opadanja genetičkog materijala davaoca kod obolelih od malignih bolesti omogućava blagovremenu reakciju, što podrazumeva nisku dozu infuzije limfocita donora (DLI) sa oprezom da se izazove kontrolisana bolest kalem protiv domaćina koja će ispoljiti antitumorski efekat [95]. Međutim, u slučajevima kada je mali vremenski interval između pojave mešanog himerizma i pojave relapsa blagovremena intervencija nije moguća. Korelacija između himerizma i relapsa je u nekim studijama potvrđena [101,102,103,104], dok u drugim nije potvrđena [47,105,106,107,]. Ove razlike se delimično mogu objasniti različitim protokolima za uzimanje uzoraka [95]. Guimond i sar. su pokazali da mešani himerizam u različitim subpopulacijama ćelija hematopoeze može imati različit značaj za prognozu. Na primer mešani himerizam T ćelija i NK ćelija je dokazan kod bolesnika kod kojih je došlo do relapsa dok nije bio prisutan kod bolesnika koji su ušli u remisiju [108]. Analiza himerizma u različitim subpopulacijama ćelija hematopoeze značajno povećava senzitivnost analize i mogućnost preciznije prognoze kliničkog ishoda.

U grupi bolesnika sa malignim bolestima u ovom radu nije uspostavljena sigurna korelacija između kompletnog himerizma i remisije, dok je, s druge strane, pojava mešanog himerizma u svakom slučaju značila i progresiju bolesti. Naši rezultati su pokazali da naročito značajan faktor za predviđanje lošeg ishoda kod bolesnika sa malignim bolestima predstavlja pojava opadajućeg himerizma u prvih šest meseci. Prisustvo ćelija domaćina predstavlja ili opstanak ćelija leukemijskog klona ili opstanak normalnih ćelija hematopoeze domaćina ili kombinaciju oba slučaja. Prisustvo hematopoetskih ćelija domaćina može da inhibira imunokompetentne ćelije donora, što može da uzrokuje da se maligni klon ponovo razvije. Podaci iz literature potvrđuju da prisustvo hematopoetskih ćelija domaćina u frakciji mononuklearnih ćelija znači pojavu hematološkog relapsa bolesti zbog toga što mešani himerizam smanjuje efekat “kalem protiv leukemije” (*graft-versus-leukemia*) [33,34,95].

Iako je u grupi bolesnika obolelih od malignih bolesti hematopoeze, nakon transplantacije, registrovan kompletni himerizam kod svih, uspešan ishod transplantacije je postignut kod 62% bolesnika, dok je kod 38% bolesnika nastupio smrtni ishod u prvih godinu dana nakon transplantacije. Naši rezultati se poklapaju sa podacima registrovanim u literaturi da kod malignih bolesti uspešnost u postizanju remisije transplantacijom prelazi 60% [109].

Analiza dobijenih rezultata je pokazala da je kod 4 bolesnika obolelih od malignih bolesti smrtni ishod bio rezultat komplikacija nastalih zbog same transplantacije, dok je kod 9 bolesnika bio rezultat povratka osnovne bolesti. Nasuprot činjenici da su kliničke studije pokazale da je učestalost pojave relapsa najniža kod bolesnika koji su razvili akutni ili hronični oblik GVHD [110], u našoj grupi bolesnika nije se pokazala povezanost između povratka osnovne bolesti i prisustva GVHD. Međutim, registrovano je da je većina naših bolesnika sa smrtnim ishodom u momentu transplantacije bila svrstana u grupu visokog rizika, odnosno, bila u drugoj remisiji, relapsu ili aktivnoj bolesti, što potvrđuje podatak iz literature da bolji ishod transplantacije imaju bolesnici tretirani u toku prve remisije [20]. Analiza naših rezultata je pokazala da pol, tip donora i režim kondicioniranja nemaju uticaj na tip himerizma kod bolesnika posle transplantacije, što odgovara podacima iz literature [33].

Praćenje bolesnika nakon transplantacije STR-PCR metodom i analiza promene stanja himerizma u određenim vremenskim intervalima je pokazala da je opadajući mešani himerizam registrovan do 12 meseci kod bolesnika sa nemaligim bolestima, a do 8 meseci kod bolesnika sa malignim bolestima. Ovaj podatak ukazuje da postoji najveći rizik za pojavu lošeg ishoda upravo u prvih godinu dana nakon transplantacije, što je u skladu sa rezultatima objavljenim u literaturi [111].

5.2 Značaj praćenja minimalne rezidualne bolesti kod bolesnika sa hromozomskim aberacijama

Praćenje himerizma STR-PCR metodom ima prognostički značaj u smislu da li je došlo do prihvatanja kalema, ali ne može služiti kao indirektni pokazatelj za postojanje minimalne rezidualne bolesti. Naši rezultati su pokazali da detekcija minimalne rezidualne bolesti mora da bude specifična za određeni maligni klon i mora se pratiti analizom ćelija kostne srži. Poznato je da prisustvo mešanog himerizma ne znači i obavezno prisustvo malignog klona, koji je moguće pratiti jedino korišćenjem specifičnih PCR tehnika ukoliko je bolesnik pre transplantacije bio pozitivan za neki od fuzionih rearanžmana ili je poznat TCR- ili IG- genski rearanžman [112,113,114].

Za praćenje minimalne rezidualne bolesti u našem radu korišćene su metode molekularne genetike (RT-PCR) i metode citogenetike. Pored toga što su metode

citogenetike manje osjetljive (10%) [34] one su veoma informativne i još uvek nezamenljive. Iako su osjetljive metode molekularne genetike razvijene za detekciju najčešćih hromozomskih rearanžmana, u našem radu je pokazano da je jedino metodama citogenetike moguće pratiti bolesnike sa retkim nespecifičnim hromozomskim rearanžmanima [77]. Takođe, analiza kariotipa iz kostne srži omogućava da se otkrije aberantni klon kod bolesnika kod kojih je došlo do komplikacija nakon TMČH. Podaci mnogobrojnih studija su pokazali da se sekundarne kariotipske promene u kostnoj srži mogu javiti i nekoliko meseci pre hematološke i kliničke manifestacije uznapredovale bolesti tako da predstavljaju značajan prognostički parametar [63]. U našem radu, registrovana su dva slučaja sa pojavom evolucije malignog klona, nažalost sa smrtnim ishodom.

Prisustvo aberantnog kariotipa pre transplantacije omogućava direktno praćenje leukemijskog klona nakon TMČH u kostnoj srži bolesnika metodama citogenetike i molekularne genetike. U našoj grupi bolesnika sa malignim bolestima, pre transplantacije matičnih ćelija hematopoeze, registrovano je 19 (56%) bolesnika sa nekim od hromozomskih rearanžmana. Od toga 8 (24%) sa nespecifičnim hromozomskim aberacijama metodama citogenetike i 10 (29%) sa specifičnim genskim rearanžmanima metodama molekularne genetike. Analizom kariotipa posle transplantacije je registrovan aberantan kariotip kod 5 (15%) bolesnika, od toga jedan sa istim klonom kao pre TMČ, dva bolesnika sa evolucijom klona, i 2 bolesnika sa novim aberantnim klonom. RT-PCR metodom posle transplantacije je kod 4 bolesnika registrovano prisustvo rearanžmana, od kojih je kod tri došlo do recidiva bolesti i smrtnog ishoda, dok je kod jednog bolesnika sa kompletnim himerizmom primenjena terapija dovela do razvoja GVHD, tj. u ovom slučaju, 'graft – versus – leukemija' (GVL) što je imalo za posledicu uspešan ishod transplantacije gubitkom *BCR/ABL* rearanžmana prvo iz kostne srži, a zatim i iz periferne krvi. S obzirom da prisustvo leukemijskog klona nakon TMČH u kostnoj srži predstavlja lošu prognozu za bolesnika, poželjno je da se razvije GVHD kako bi se ispoljio antitumorski GVL efekat, što se postiže davanjem male doze infuzije limfocita davaoca [115].

U našoj grupi od 8 bolesnika sa prisutnim hromozomskim rearanžmanom posle transplantacije intervencija je bila moguća u dva slučaja. Kod jednog bolesnika je urađena nova TMČH, dok je drugi bolesnik nakon ukidanja imunosupresivne terapije zahvaljujući GVL efektu, izgubio *BCR/ABL* klon, uspešno izlečen. U literaturi je

opisana izrazita korelacija između prisustva MRB i relapsa, i pokazano je da je bolja prognoza za bolesnike kojima je transplantacija urađena u kompletnoj kliničkoj i molekularnoj remisiji [116]. Knechtli i saradnici su objavili u studiji na 112 bolesnika da je od 32 bolesnika koji su bili MRB pozitivni, 26 (88%) imalo relaps bolesti i loš ishod lečenja [117]. Za bolesnike sa perzistentno prisutnim klonom je potrebno individualno planirati praćenje, što podrazumeva vršiti češće analize, ukinuti imunosupresivnu terapiju, omogućiti da se razvije GVL efekat kako bi se smanjio rizik od relapsa [94].

U mnogim studijama se diskutuje dilema kada koristiti perifernu krv za praćenje bolesnika nakon transplantacije, a kada kostnu srž [33,94,95,116]. Brisco i saradnici su pokazali u svojoj studiji da je registrovani nivo minimalne rezidualne bolesti u perifernoj krvi bio 10 puta manji nego u kostnoj srži kod bolesnika obolelih od B-ALL [118]. U ovom radu je potvrđeno, kao i u literaturi, da je kostna srž informativnija od periferne krvi za detekciju opadajućeg himerizma i za praćenje minimalne rezidualne bolesti. Dokazano je da se pad procenta donorskih ćelija ili leukemijski klon registruju ranije u kostnoj srži nego u perifernoj krvi. Ovi podaci ukazuju na potrebu da se u cilju blagovremene terapijske reakcije, kod bolesnika koji su u visokom riziku, praćenje himerizma i MRB vrši analizom uzoraka kostne srži.

5.3 Analiza prediktora ishoda lečenja i preživljavanja bolesnika nakon transplantacije matičnih ćelija hematopoeze

U cilju definisanja značajnih prognostičkih faktora za ishod lečenja metodom transplantacije matičnih ćelija hematopoeze analiziran je uticaj sledećih parametara: uzrast, pol, stanje pre TMČ, vrsta donora, režim kondicioniranja, GVHD, tip himerizma u perifernoj krvi, tip himerizma u kostnoj srži, prisustvo hromozomskih rearanžmana pre i posle TMČH. Parametri koji su kod obolelih od malignih bolesti pokazali statistički značajnu razliku u odnosu na ishod lečenja su prisustvo hromozomskih rearanžmana pre TMČH ($p < 0,05$), prisustvo hromozomskih rearanžmana posle TMČH ($p < 0,01$) i opadajući himerizam u kostnoj srži posle TMČH ($p < 0,01$). Iako Uzunel i saradnici navode da je pojava bilesti kalem-protiv-domaćina važna za odbranu od relapsa maligne bolesti, u ovoj studiji nije potvrđena korelacija između pojave relapsa i bilesti kalem-protiv-domaćina [94]. Nasuprot tome, ova studija potvrđuje rezultate

Luznika i saradnika da je incidenca relapsa viša kod bolesnika koji su transplantirani u drugoj remisiji u odnosu na one koji su transplantirani u prvoj remisiji [20].

Analiza Koksovim regresionim modelom je izdvojila prisustvo hromozomskih rearanžmana pre i posle TMĆ kao značajne prediktore lošeg ishoda, dok za prognozu ishoda lečenja nisu bili značajni režim kondicioniranja, pojava GVHD, vrsta donora, pol, uzrast kao ni postavljena dijagnoza. Analiza je pokazala da je kod bolesnika sa hromozomskim rearanžmanima pre i posle TMĆH najčešći ishod bio recidiv. Svi bolesnici sa hromozomskim aberacijama registrovanim posle TMĆH su umrli, osim jednog kod koga je ukidanje imunosupresivne terapije imalo pozitivan efekat. Naši rezultati su pokazali da je ukupno petogodišnje preživljavanje bolesnika bez rearanžmana pre TMĆH bilo značajno veće u odnosu na ukupno preživljavanje bolesnika sa hromozomskim rearanžmanima pre TMĆH (OS=80,0% vs. OS=47,4%). Ovi podaci su u skladu sa podacima iz literature koji ukazuju da prisustvo hromozomskih rearanžmana svrstava bolesnike u grupu visokog rizika [94,109]. Takođe, naša studija je pokazala da su bolesnici bez hromozomskih rearanžmana imali duže ukupno preživljavanje (medijana 40,0 meseci) u odnosu na bolesnike sa hromozomskim rearanžmanima (medijana 10,0 meseci), što je potvrđeno Kaplan Majerovom metodom ($p < 0,05$).

Ortega i saradnici (1999.) su u grupi pacijenata kojima je urađena alogena transplantacija opisali da su bolesnici sa ALL imali lošiju prognozu u odnosu na bolesnike sa drugim malignim bolestima hematopoeze [119]. Za potvrdu činjenice da li dijagnoza akutne limfoblastne leukemije ili akutne mijeloidne leukemije predstavlja nezavisni prognostički faktor potrebno je uraditi studiju dužeg praćenja na većem broju bolesnika, imajući u vidu da u našoj studiji Kaplan Majerovom metodom nije bilo moguće dokazati postojanje razlike u preživljavanju u odnosu na postavljenu dijagnozu.

Analiza ukupnog preživljavanja bolesnika nakon transplantacije u ovoj studiji pokazala je da je veći broj umrlih u grupi sa malignim bolestima (38,2%) u odnosu na grupu sa nemalignim bolestima (21,4%). Ovi rezultati su u skladu sa podacima iz literature, prema kojima konačni ishod lečenja zavisi od tipa bolesti pre transplantacije [33,109].

6. ZAKLJUČAK

Imajući u vidu analizu odnosa kliničkih parametara, ishoda lečenja i prisustva određenih genetičkih markera izvedeni su sledeći zaključci vezani za optimalni dijagnostički pristup u praćenju bolesnika posle TMČH:

1. Zavisno od prisustva nemalignih ili malignih bolesti hematopoeze predlaže se sledeći pristup za praćenje bolesnika nakon TMČH:
 - a. Kod bolesnika obolelih od nemalignih bolesti dovoljno je pratiti himerizam u precizno definisanim vremenskim intervalima STR-PCR metodom kao veoma brzom, informativnom, reproducibilnom i dovoljno osetljivom za blagovremeno registrovanje odbacivanja kalema.
 - b. Kod bolesnika obolelih od malignih bolesti neophodno je pored praćenja himerizma u precizno definisanim vremenskim intervalima STR-PCR metodom, pratiti i određene leukemija specifične markere (hromozomske rearanžmane) metodama citogenetike i molekularne genetike koji su se u ovoj studiji pokazali kao značajni prediktori pojave recidiva.
2. Izbor uzoraka se vrši prema metodi za praćenje bolesnika:
 - a. Za praćenje himerizma STR-PCR metodom preporučuje se da se pre transplantacije analiza genetičkog profila davaoca i primaoca vrši iz bukalnog brisa. Nakon transplantacije nije moguće vršiti analizu iz bukalnog brisa zbog mešanja epidermalnih ćelija sluzokože sa leukocitima, već se bolesnik prati analizom iz periferne krvi. U slučaju bolesnika kojima je transplantacija matičnih ćelija urađena sa kostnom srži nepoznatog nesrodnog davaoca iz međunarodne banke, poređenje se vrši sa dlakom koja reprezentuje samo genetički profil bolesnika pre transplantacije. Pojavu opadajućeg himerizma moguće je registrovati ranije u kostnoj srži nego u perifernoj krvi, a izbor uzorka se vrši u zavisnosti od kliničke slike pacijenta u datom trenutku.

- b. Za praćenje leukemija specifičnih markera neophodno je vršiti citogenetičku analizu iz kostne srži, a RT-PCR analizu paralelno iz periferne krvi i iz kostne srži u prvih godinu dana nakon transplantacije, a po potrebi¹ i duže.
3. Na osnovu analize prediktorne sposobnosti određenih vremenskih momenata (tzv. „time points“) za pojavu lošeg ishoda transplantacije izdvojila su se dva pristupa prema tipu oboljenja:
 - a. Kod bolesnika obolelih od nemalighnih bolesti rezultati su pokazali da je opadajući mešani himerizam registrovan u većini slučajeva u prvih šest meseci, i sporadično do godinu dana nakon TMČH. Dakle, obolele od nemalighnih bolesti neophodno je pratiti na svakih 30 dana do 6 meseci, zatim na 60 dana do 12 meseci, na 90 dana u drugoj godini i dalje na 6 meseci do pet godina nakon TMČH.
 - b. Kod bolesnika obolelih od malignih bolesti rezultati su pokazali da je opadajući mešani himerizam registrovan u većini slučajeva u prvih šest meseci, i sporadično do 8 meseci nakon TMČH. Dakle, zbog invazivnije prirode bolesti obolele od malignih bolesti neophodno je pratiti na svakih 30 dana do 8 meseci, zatim na 60 dana do 2 godine, na 90 dana u trećoj godini i dalje na 6 meseci do pet godina nakon TMČH.
 - c. Ukoliko klinička slika zahteva u konkretnim slučajevima analizu treba raditi i van ovih definisanih vremenskih intervala, a kod bolesnika kojima je registrovan opadajući himerizam analizu treba raditi na 15 dana.
4. Analiza prognostičkog značaja prisustva mešanog odnosno kompletnog himerizma je pokazala sledeće:
 - a. Kod bolesnika obolelih od nemalighnih bolesti prisustvo stabilnog mešanog himerizma nema lošiju prognozu od kompletnog himerizma, što objašnjava sama priroda bolesti.

¹ Ukoliko klinička slika ukazuje na pogoršanje zdravstvenog stanja bolesnika

- b. Kod svih bolesnika obolelih od malignih bolesti registrovano je prisustvo kompletnog himerizma koje međutim nije bilo sigurni prediktor dobrog ishoda. Ovo saznanje je ukazalo na neophodno praćenje minimalne rezidualne bolesti kao sigurnijeg prediktora recidiva kod bolesnika obolelih od malignih bolesti zbog svoje specifičnosti i veće osjetljivosti.
- c. Prisustvo opadajućeg mešanog himerizma i u slučaju malignih i nemalignih bolesti predstavlja lošu prognozu, odnosno ukazuje na pojavu recidiva ili odbacivanje kalema.

7. LITERATURA

1. Kline RM. Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplantation. New York: Informa Healthcare USA Inc; 2006.
2. Dausset J, Brecy H. Identical nature of the leucocyte antigens detectable in monozygotic twins by means of immune iso-leuco-agglutinins. *Nature*. 1957;180(4599):1430.
3. Ringden O, Le Blanc K. Allogeneic stem cell transplantation: state of the art and new perspectives. *APMIS*. 2005; 113:813-20.
4. Nilsson SK, Simmons PJ, Bertoncello I. Hemopoietic stem cell engraftment. *Exp Hematol*. 2006; 34:123-9.
5. Lapidot T, Axetlet D, Kollet O. How do the stem cells find their way home? *Blood*. 2005; 106:1901-10.
6. Haspel RL, Miller KB. Hematopoietic stem cells: source matters. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2008; 3(4):229-36.
7. Islam MS, Ni Z, Kaufman DS. Use of human embryonic stem cells to understand hematopoiesis and hematopoietic stem cell niche. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2010; 5(3):245-50.
8. Little MT, Storb R. History of hematopoietic stem cell transplantation. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2:231-8.
9. Rainer TH, Cameron PA, Smit D, Ong KL, Hung AN, Nin DC, et al. Evaluation of WHO criteria for identifying patients with severe acute respiratory syndrome out of hospital: prospective observational study. *BMJ*. 2003; 326(7403):1354-8.
10. Niini Tarja: Cytogenetic and Molecular Genetic Changes in Childhood Acute Leukaemias, Academic dissertation: Department of Medical Genetics, Haartman Institute, University of Helsinki; 2002.
11. Fronkova E, Mejstrikova E, Avigad S, Chik KW, Castillo L, Manor S, et al. Minimal residual disease (MRD) analysis in the non-MRD-based ALL IC-BFM 2002 protocol for childhood ALL: is it possible to avoid MRD testing? *Leukemia*. 2008; 22: 989–997.
12. Baron F, Baker JE, Storb R, Gooley TA, Sandmaier BM, Maris MB, et al. Kinetics of engraftment in patients with hemathologic malignancies given

- allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *Blood*. 2004;104:2254-2262.
13. Barrett AJ and Savani BN. Stem cell transplantation with reduced intensity conditioning regimens: a review of ten years experience with new transplant concepts and new therapeutic agents. *Leukemia*. 2006;20:1161-1172.
 14. Vriesendorp HM. Aims of conditioning. *Exp Hematol* 2003;31(10):844-54.
 15. Ringden O, Labopin M, Tura S, Arcese W, Iriando A, Zittoun R, et al. A comparison of busulfan versus total body irradiation combined with cyclophosphamid as conditioning for autograft or allograft bone marrow transplantation in patients with leukemia. *Br J Haematology*. 1996; 93:637-45.
 16. Socie G and Gluckman E. Allogeneic stem cell transplantation: current issues and future prospects. *Ann Med International*. 1999;150:642-655.
 17. Ferry C and Socié G. Busulfan-cyclophosphamide versus total body irradiation-cyclophosphamide as preparative regimen before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: what have we learned? *Exp Hematol*. 2003;31(12):1182-6.
 18. Baird K and Pavletic SZ. Chronic graft versus host disease. *Curr Opin Hematol*. 2006;13:426-435.
 19. Lee SJ. New approaches for preventing and treating chronic graft versus host disease. *Blood*. 2005; 105: 4200-4206.
 20. Luznik L and Fuchs EJ. Donor lymphocyte infusions to treat hematologic malignancies in relapse after allogeneic blood or bone marrow transplantation. *Cancer Control*. 2002; 9: 123-137.
 21. Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, et al. Graft versus leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood*. 1995; 86:2041-2050.
 22. Dazzi F, Szydlo RM, Craddock C, Cross NC, Kaeda J, Chase NC, et al. Comparison of single dose and escalating dose regimens of donor lymphocyte infusions for relapse after allografting for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000; 95: 67-71.
 23. Nimer SD, Giorgi J, Gajewski JL, Ku N, Schiller GJ, Lee K, et al. Selective depletion of CD8+ cells for prevention of graft-versus host disease after bone marrow transplantation. A randomized controlled trial. *Transplantation*. 1994; 57:82-87.

24. Alyea EP, Soiffer RJ, Canning C, Neuberg D, Schlossman R, Pickett C, et al. Toxicity and efficacy of defined doses of CD4+ donor lymphocytes for treatment of relapse after allogeneic bone marrow transplant. *Blood*. 1998; 91: 3671-3680.
25. Koh MB, Prentice HG, Lowdell MW. Selective removal of alloreactive cells from hemathopoietic stem cell grafts: graft engineering for GVHD prophylaxis. *Bone Marrow Transplant*. 1999; 23:1071-1079.
26. Molldrem JJ, Lee PP, Wang C, Felio K, Kantarjian HM, Champlin RE and Davis MM. Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat med*. 2000;6:1018-1023.
27. Mutis T, Verdijk R, Schrama E, Esendam B, Brand A and Goulmy E. Feasibility of immunotherapy of relapsed leukemia with ex vivo-generated cytotoxic T lymphocytes specific for hematopoietic system restricted minor histocompatibility antigens. *Blood*. 1999; 93: 2336-2341.
28. Raiola AM, Van Lint MT, Valbonesi M, Lamparelli T, Gualandi F, Occhini D, et al. Factors predicting response and graft versus host disease after donor lymphocyte infusions: study of 593 infusions. *Bone Marrow Transplant*. 2003; 31:687-693.
29. Matsue K, Tabayashi T, Yamada K, and Takeuchi M. Eradication of residual bcr-abl positive clone by inducing graft versus host disease after allogeneic bone marrow transplantation in patients with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 2002; 29:63-66.
30. Sanchez J, Serrano J, Gomez P, Martínez F, Martín C, Madero L, et al. Clinical value of immunological monitoring of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia after allogeneic transplantation. *Br J Haematol*. 2002; 116:686-694.
31. Bader P, Klingebiel T, Schaudt A, Theurer-Mainka U, Handgretinger R, Lang P, et al. Prevention of relapse in pediatric patients with acute leukemias and MDS after allogeneic SCT by early immunotherapy initiated on the basis of increasing mixed chimerism: a single center experience of 12 children. *Leukemia*. 1999;13:2079-2086.
32. Rose HJ. *A Handbook of Greek mythology*. London and New York: Routledge;1989.

33. Antin JH, Childs R, Filipovich AH, Giralt S, Mackinnon S, Spitzer T, Weisdorf D. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic Transplantation: Recommendations from workshop at the 2001 tandem meetings. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2001; 7:473-485.
34. Khan F, Agarwal A and Agarwal S. Significance of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation: variations on old theme. *Bone Marrow Transplantation*. 2004; 34,1-12.
35. Socie G, Lawler M, Gluckman E, McCann SR and Brison O. Studies of hemopoietic chimerism following allogeneic bone marrow transplantation in the molecular biology era. *Leukemia Research*. 1995; 19: 497-504.
36. Lion T and Muller-Bérat N. Chimerism testing after allogeneic stem cell transplantation: importance of timing and optimal technique for testing in different clinical–biological situations. *Leukemia*. 2003; 17: 612
37. Klingebiel T, Niethammer D, Dietz K, Bader P. Progress in chimerism analysis in childhood malignancies- the dilemma of biostatistical considerations and ethical implications. *Leukemia*. 2001; 15: 1989-1991.
38. Mattsson J, Uzunel M, Tammik L, Aschan J and Ringdén 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(12):1976-85.
39. Lion T. Current recommendations for positive controls in RT-PCR assays. *Leukemia*. 2001; 15: 1033-1037.
40. Bader P, Beck J, Frey A, Schlegel PG, Hebarth H, Handgretinger R, et al. Serial and quantitative analysis of mixed hemopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant*. 1998; 28: 487-495.
41. Barrios M, Jimenez-Velasco A, Roman-Gomez J, Madrigal ME, Castillejo JA, Torres A, et al. Chimerism status is a useful predictor of relapse after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. *Haematologica*. 2003; 88: 801-810.
42. Fernandez-Aviles F, Urbano-Ispizua A, Aymerich M, Colmer D, Rovira M, Martinez C, et al. Serial quantification of lymphoid and myeloid mixed chimerism using multiplex PCR of STR markers predicts graft rejection and

- relapse, after allogeneic stem cell transplantation of CD34+ selected cells from peripheral blood. *Leukemia*. 2003; 17:613-620.
43. Bertheas MF, Lafage M, Levy P, Blaise D, Stoppa AM, Viens P, et al. Influence of mixed chimerism on the results of allogeneic bone marrow transplantation for leukemia. *Blood*. 1991; 78: 3103-3106.
 44. Molloy K, Goulden N, Lawler M, Cornish J, Oakhill A, Pamphilon D et al. Patterns of hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation for childhood acute lymphoblastic leukemia from volunteer unrelated donors. *Blood*. 1996; 87: 3027-3031.
 45. Wash R, Bertz H, Kunzmann R and Finke J. Incidence of mixed chimerism and clinical outcome in 101 patients after myeloablative conditioning regimens and allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2000; 109: 743-750.
 46. van Leeuwen JE, van Tol MJ, Joosten AM, Wijnen JTh., Meera Khan P and Vossen JM. Persistence of host-type hematopoiesis after allogeneic bone marrow transplantation for leukemia is significantly related to the recipients age and the conditioning regimen, but it is not associated with an increased risk of relapse. *Blood*. 1994; 83: 3059-3067.
 47. Choi SJ, Lee KH, Lee JH, et al. Prognostic value of hematopoietic chimerism in patients with acute leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: prospective study. *Bone Marrow Transplant*. 2000; 26:327-332.
 48. Mangioni S, Balduzzi A, Rivolta A, Rovelli A, Nesi F, Rossi V, et al. Long term persistence of hematopoietic chimerism following sex-mismatched bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1997; 20:969-973.
 49. Fehse B, Chuklovin A, Kuhlcke K, Marintz O, Vorwing O, Renges H, et al. Real time quantitative Z-chromosome specific PCR for monitoring hematopoietic chimerism after sex-mismatched allogeneic bone marrow transplantation. *J Hematother Stem Cell Res*. 2001;10:419-425.
 50. Alizadeh M, Bernard M, Danic B, Birebent B, Lapart C, Lamy T, et al. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood*. 2002; 99:4618-4625.
 51. Schichaman SA, Suess P, Vertino AM and Gray PS. Comparison of short tandem repeat and variable number tandem repeat genetic markers for quantitative

- determination of allogeneic bone marrow transplant engraftment. *Bone Marrow Transplantation*. 2002; 29: 243-248.
52. Buno I, Nava P, Simon A, Gonzalez-Rivera M, Jimenez JL, Balsalobre P, et al. A comparison of FISH and multiplex STR PCR quantifying chimerism after stem cell transplantation. *Haematologica*. 2005; 90 (10):1373-1379.
53. Russell JP. *A Molecular Approach*. 2nd ed. Pearson Benjamin Cummings; 2006.
54. Sparkes R, Kimpton CP, Watson S, Oldroyd NJ, Clayton TM, Barnett L, et al. The validation of a 7-locus multiplex STR tests for use in forensic casework. *Int J Legal Med*. 1996; 109:186-194.
55. Cazzaniga G, Gaipa G, Rossi V and Biondi A. Monitoring of minimal residual disease in leukemia, advantages and pitfalls. *Annals of Medicine*. 2006; 38(7):512 – 521.
56. van der Velden VHJ, Boeckx N, Van Wering ER, Van Dongen JJM. Detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. 2004:146-155.
57. Moorhed PS, Nowell PS. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res*. 1960; 20:613-6.
58. Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ. *ISCN: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature: Recommendations of the International Committee on Human Cytogenetic Nomenclature*. Basel: S. Karger; 2009.
59. Mitelman F. *Catalog of Chromosomal Aberrations of Cancer*. 5th ed. New York: Wiley-Liss; 1994.
60. Mitelman F, Johansson B and Mertens F (Eds.) (2007): *Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer*, <http://cgap.nci.nih.gov>
61. Jołkowska J, Derwich K and Dawidowska M. Methods of minimal residual disease (MRD) detection in childhood haematological malignancies *Journal of Applied Genetics*. 2007;48 (1): 77-83.
62. Haim S, Mitelman F. *Cancer Cytogenetics*. 1st ed. New York: Alan R Liss Inc; 1987.
63. Haim S, Mitelman F. *Cancer Cytogenetics*, 2nd ed. Wiley-Liss Inc; 1995.
64. Weinberg RA. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res*. 1989 Jul 15; 49(14):3713-21.

65. Stanbridge EJ. Functional evidence for human tumour suppressor genes: chromosome and molecular genetic studies. *Cancer Surv.* 1992;12:5-24.
66. Clark SS, McLaughlin J, Crist WM, Champlin R and Witte ON. Unique forms of the abl tyrosine kinase distinguish Ph1 positive CML from Ph1-positive ALL. *Science.* 1987; 235:85-8.
67. Fainstein E, Marcelle C, Rosner A, Canaani E, Gale RP, Drexler O, et al. A new fused transcript in Ph chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Nature.* 1987; 330: 386-8.
68. Hermans A, Heisterkamp N, von Linden M, van Baal S, Meijer D, van der Plas D, et al. Unique fusion of bcr and c-abl genes in Ph chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Cell.* 1987; 51: 33-40.
69. Cross NC. Assessing residual leukaemia. *Baillieres Clin Hematol.* 1997;10: 389-403.
70. Paietta E, Racevskis J, Bennett JM, Neuberg D, Cassileth PA, Rowe JM, et al. Biologic heterogeneity in Philadelphia chromosome positive acute leukaemia with myeloid morphology: the Eastern Cooperative oncology group experience. *Leukemia.* 1998;12: 1881-1885.
71. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukaemia. *Blood.* 2000; 96: 3343-3356.
72. Dracopoli NC, Haines JL, Korf BR, et al. *Short Protocols in Human Genetics.* New Jersey: John Wiley and Sons, Inc; 2004.
73. Stirewalt DL, Guthrie KA, Beppu L, Bryant EM, Doney K, Gooley T, et al. Predictors of relapse and overall survival in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia after transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2003; 9: 206-212.
74. Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2004; 350:1535-48.
75. Forestier E, Johansson B, Gustafsson G, Borgstrom G, Johansson J and Heim S. Prognostic impact of karyotypic findings in childhood acute lymphoblastic leukemia: Nordic series comparing two treatment periods. *Br J Haematol.* 2000; 110: 147-53.
76. Melnick A, Licht JD. Deconstructing a disease: RAR-alpha, its fusion partners and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 1999; 93: 3167-215.

77. van Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: Investigation of minimal residual disease in acute leukaemia. *Leukemia*. 1999; 13:1901-1928.
78. Olavarria E, Kanfer E, Szydlo R, et al. Early detection of BCR-ABL transcripts by quantitative reverse polymerase-chain reaction predicts outcome after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2001(97):1560-1565.
79. Tobal K, Moore H, Macheta M, Yin JA. Monitoring minimal residual disease and predicting relapse in APL by quantitating PML-RARalpha transcripts with sensitive competitive RT-PCR method. *Leukemia*. 2001; 15: 1060-1065.
80. Evans PA, Short MA, Jack AS, Norfolk DR, Child JA, Shiach CR, et al. Detection and quantitation of the CBFbeta/MYH11 transcripts associated with the inv(16) in presentation and follow-up samples from patients with AML. *Leukemia*. 1997; 11: 364-369.
81. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison Ch and Harrison G. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: Analysis of 1612 patients entered into the MRC AML 10 Trial. *Blood*. 1998; 92(7): 2322-2333.
82. Licht JD, Strenberg DW. The molecular pathology of acute myeloid leukemia. *Hematology*. 2005; 137-143.
83. Kiss TL, Xu WM, Jamal N and Messner HA. Comparative testing of peripheral blood and bone marrow for BCR-ABL transcripts in patients post allogeneic bone marrow transplantation and during interferon treatment for chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1999; 34: 493-500.
84. Lin F, Goldman JM, Cross NC. A comparison of the sensitivity and blood and bone marrow for the detection of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. *Br J Haematol*. 1994; 86: 683-685.
85. van Rhee F, Marks DI, Lin F, Szydlo RM, Treleaven J., Hochhaus A, et al. Quantification of residual disease in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukaemia: comparison of blood and bone marrow. *Leukemia*. 1995; 9: 329-335.
86. Elmaagacil AH, Beleen DW, Becks H W, Mobascher A, Stockova J, Trzensky S, et al. Detection of CBFbeta/MYH11 fusion transcripts in patients with

- inv(16) acute myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplantation or peripheral blood progenitor cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1998; 21: 159-166.
87. Tobal K, Johnson PR, Saunders MJ, Harrison CJ and Liu Yin JA. Detection of CBFbeta/MYH11 transcripts in patients with inversion and other abnormalities of chromosome 16 at presentation and remission. *Br J Haematol.* 1995; 91: 104-108.
88. Gallagher RE, Yaep BY, Bi W, Livak KJ, Beaubier N, Rao S, et al. Quantitative real-time PCR of PML-RAR alpha mRNA in acute promyelocytic leukemia: assesment of prognostic significance in adult patients from intergroup protocol 0129. *Blood.* 2003; 101: 2521-2528.
89. Simmons PJ, Przeporka D, Thomas ED, Torok Storb B. Host origin of marrow stromal cells following allogeneic bone marrow transplantation. *Nature.* 1987; 328:429-432.
90. Martens AC, Schultz FW, Hagenbeek A. Nonhomogeneous distribution of leukemia in the bone marrow during minimal residual disease. *Blood.* 1987;70: 1073-1078.
91. Hann IM, Jones PH, Evans DI. Discrepancy of bone marrow aspirations in acute lymphoblastic leukemia in relapse. *Lancet.* 1997; 1:1215-1216.
92. Clayton T, Buckelton J. Forensic DNA evidence interpretation. In: Buckelton J, editor. *Mixtures.* CRC Press. 2005; 325-383.
93. Lion T, Watzinger F. Chimerism analysis following nonmyeloablative stem cell transplantation. *Methods in molecular medicine* 2006; 125:275-95.
94. Uzunel M, Mattsson J, Jaksch M, Remberger M and Ringdén O. The significance of graft-versus-host disease and pretransplantation minimal residual disease status to outcome after allogeneic stem cell transplantation in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2001; 98: 1982-1985.
95. Bader P, Niethammer D, Kreyenberg H, Klingebiel T. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplantation,* 2005; 35: 107-119.
96. Mc Cann SR and Lawler M. The value of molecular monitoring in haematological malignancy; minimal residual disease (MRD), relapse and chimerism. In: Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Gratwohl A, Masszi T, editors. *EBMT-ESH Handbook* 2008; 255-273.

97. Beck O, Seidl C, Lehrnbecher T, Kreyenberg H, Schwabe D, Klingebiel T, et al. Quantification of chimerism within peripheral blood, bone marrow and purified leukocyte subsets: comparison of singleplex and multiplex PCR amplification of short tandem repeat (STR) loci. *Eur J Haematol.* 2006; 76: 237–244.
98. Hoelle W, Beck JF, Dueckers G, Kreyenberg H, Lang P and Gruhn B. Clinical relevance of serial quantitative analysis of hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation in children for severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplantation.* 2004; 33: 219-223.
99. Koldehoff M, Steckel NK, Hlinka M, Beelen DW and Elmaagacli AH. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by real-time polymerase chain reaction with single nucleotide polymorphisms, standard tandem repeats, and Y-chromosome-specific sequences. *American journal of haematology.* 2006; 81(10):735-46.
100. Thiede C, Bornhauser M, Oelschlagel U, Brendel C, Leo R, Daxberger H, et al. Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers. *Leukemia.* 2001; 15:293–302.26.
101. Bader P, Hoelle W, Klingebiel T, Handgretinger R, Benda N, Schlegel PG, et al. Quantitative assessment of mixed hematopoietic chimerism by polymerase chain reaction after allogeneic BMT. *Anticancer Res.* 1996; 16:1759-1763.
102. Ramirez M, Diaz MA, Garcia-Sanchez F, Velasco M, Casado F, Villa M, et al. Chimerism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplantation.* 1996; 18: 1161-1165.
103. Formankova R, Honzatkova L, Sieglova Z, Stary J, Sedlacek P and Brdicka R. Detailed monitoring of hematopoietic chimerism in child treated by adoptive immunotherapy for high risk of relapse after BMT for acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplantation.* 2000; 25:453-456.
104. Gorczynska E, Turkiewicz D, Toporski J, Kalwak K, Rybka B, Ryczan R, et al. Prompt initiation of immunotherapy in children with an increasing number of autologous cells after allogeneic HCT can induce complete donor-type chimerism: report of 14 children. *Bone Marrow Transplantation.* 2004; 33:211-217.

105. Schattenberg A, de Witte T, Salden M, Vet J, van Dijk B, Smeets D, et al. Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with lymphocyte-depleted bone marrow is not associated with a higher incidence of relapse. *Blood*. 1989; 73: 1367-1372.
106. Suttrop M, Shmitz N, Dreger P, Schaub J and Löffler H. Monitoring of chimerism after allogeneic bone marrow transplantation with unmanipulated marrow by use of DNA polymorphisms. *Leukemia*. 1993; 7:679-687.
107. Schaap N, Schattenberg A, Mensink E, Preijers F, Hillegers M, Knops R, et al. Long term follow-up of persisting mixed chimerism after partially T-cell depleted allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2002; 16:13-21.
108. Guimond M, Busque L and Baron C, Bonny Y, Belanger R, Mattioli J, et al. Relapse after bone marrow transplantation: evidence for distinct immunological mechanisms between adult and pediatric populations. *Br J Haematol*. 2000; 109: 130-137.
109. Cairo MS, Gross TG. Hematopoietic stem cell transplantation in children and adolescents with malignant diseases. In: Bishop MR, editor. Hematopoietic stem cell transplantation. New York: Springer Science; 2009: p455-496.
110. Jaksch M, Remberger M, Mattsson J. Increased immune transcript levels are correlated with acute graft-versus-host disease and cytomegalovirus response after allogeneic stem cell transplantation. *Transplantation*. 2004; 77(2):195-200.
111. Winiarski J, Gustafsson A, Wester D and Dalianis T. Follow-up of chimerism, including T- and B-lymphocytes and granulocytes in children more than one year after allogeneic bone marrow transplantation. *Pediatric transplantation*. 2000; 4(2):132-9.
112. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003; 17: 2257-2317.
113. Gabert J, Beillard E, van der Velden V, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of real-time quantitative reverse transcriptase PCR of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – a Europe Against Cancer programme. *Leukemia*. 2003; 17: 2318-2357.

114. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J and van Dongen JJM. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches and laboratory aspects. *Leukemia*. 2003; 17:1013-1034.
115. Mutis T, Schrama E, van Luxemburg-Heis SA, Falkenburg JH, Melief CJ and Goulmy E. HLA class II restricted T-cell reactivity to a developmentally regulated antigen shared by leukemic cells and CD34+ early progenitor cells. *Blood*. 1997; 90:1083-1090.
116. Cazzaniga G, Giuseppe G, Vincenzo R and Andrea B. Minimal residual disease as a surrogate marker for risk assignment to ALL patients. *Rev Clin Exp Hematol*. 2003; 7:292
117. Knechtli CJ, Goulden NJ, Hancock JP, Harris EL, Garland RJ, Jones CG, et al. Minimal disease status as a predictor of relapse after allogeneic bone marrow transplantation for children with acute lymphoblastic leukemia. *Br J Hematol*. 1998; 102:860-871.
118. Brisco MJ, Sykes PJ, Hughes E, Dolman G, Neoh SH, Peng LM, et al. Monitoring minimal residual disease in peripheral blood in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Br J Hematol*. 1997;99:314-319.
119. Ortega M, Escudero T, Caballín MR, Olive T, Ortega JJ and Coll MD. Follow-up of chimerism in children with hematological diseases after allogeneic hematopoietic progenitor cell transplants. *Bone Marrow Transplant*. 1999; 24:81-7.

8. SKRAĆENICE

ALL – akutna limfoblastna leukemija
AML - akutna mijeloidna leukemija
AML1 – engl. “acute myeloid leukemia 1“ gen
ABL – Ablson gen
APL – akutna promijelocitna leukemija
ATRA – engl. “all-trans retinoic acid“ lek
BCR – engl. „Breakpoint Cluster Region“ gen
HML – hronična mijeloidna leukemija
cDNK – komplementarna DNK
CC – kompletni himerizam
DNK – dezoksiribonukleinska kiselina
DLI – engl. „donor lymphocyte infusion“
dNTP – dezoksiribonukleotidtrifosfat
FISH – fluorescentna in situ hibridizacija
GVHD – engl. „graft-versus-host disease“ - bolest kalema protiv domaćina
GVL – engl. „graft-versus-leukemia“ - reakcija kalema protiv leukemije
G-SCF – engl. „granulocyte colony-stimulating factor“
HLA – humani leukocitni antigen
HGP – engl. “Human Genome Project“ - projekat humanog genoma
IBMTR – engl. „international bone marrow transplant registry“
JMML – juvenilna mijelomonocitna leukemija
KS – kostna srž
MRB – minimalna rezidualna bolest
MDS – mijelodisplastični sindrom
MC – mešani himerizam
MLL – engl. „myeloid/lymphoid leukemia“ gen
NHL – Non Hočkin limfom
NSI – nesrodni identični davalac
OS – ukupno preživljavanje

Ph – Filadelfija hromozom

PCR – engl. “polimerase chain reaction“ - reakcija lančane polimerizacije

PK – periferna krv

PML – engl. “promyelocytic leukemia protein“

RARa – engl. “retinoic acid receptor alpha“

RFLP – engl. „restriction fragment length polymorphisms“ - polimorfizmi dužina restrikcionih fragmenata

RI – incidenca relapsa

RIC – engl. “reduced intensity conditioning“

RNK – ribonukleinska kiselina

iRNK – informaciona ribonukleinska kiselina

RT-PCR – reakcija lančane polimerizacije nakon reverzne transkripcije

Real time PCR (qPCR) – kvantitativna reakcija lančane polimerizacije

SI – srodni identični davalac

SHI – srodni haplo-identični davalac

STRs – engl. “short tandem repeats“ - kratki tandemske ponovci

SNPs – engl. “single nucleotide polymorphism“ - polimorfizmi jednog nukleotida

TMČH – transplantacija matičnih ćelija hematopoeze

TcR – T ćelijski receptor

TRM – engl. “transplantation related mortality“ - smrt vezana za transplantaciju

TBI – engl. “total body radiation“ – zračenje celog tela

TEL (ETV6) – engl. “translocation ETS leukemia“ gen

VNTRs – engl. “variable nucleotide tandem repeats“ - varijabilni tandemske ponovci

VOD – engl. “veno-occlusive disease“

9. BIOGRAFSKI PODACI AUTORA

Aleksandra Krstić je rođena 01.10.1973. godine u Beogradu. Osnovnu školu i gimnaziju prirodno-matematičkog smera završila je u Beogradu. Biološki fakultet, smer Molekularna biologija i fiziologija, upisala je školske 1992/1993. godine u Beogradu. Diplomirala je 1998. godine na odseku Eksperimentalna biomedicina sa prosečnom ocenom 8,17 odbranivši rad pod nazivom: *“Translokacija t(1;11)(p32;q23) u akutnoj limfoblastnoj leukemiji dečijeg uzrasta”*, sa ocenom 10 i time stekla zvanje MSc (master). Master rad je urađen u Laboratoriji za medicinsku genetiku Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta R. Srbije ”Dr Vukan Čupić”, pod vođstvom Prof. Marije Guć-Šćekić.

Od februara 1999. godine je zaposlena u Laboratoriji za medicinsku genetiku, Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta R. Srbije ”Dr Vukan Čupić”, gde i sada radi na poslovima dijagnostike malignih bolesti kod dece.

U 2005. godini pohađala je obuku u DNK laboratoriji Instituta za sudsku medicinu u Beogradu, gde je savladala tehnike detekcije i interpretacije STR polimorfniha markera u humanom genomu. Cilj obuke je bio primena ovih metoda molekularne biologije u praćenju himerizma, posle transplantacije matičnih ćelija hematopoeze, kod dece obbolele od hematoloških bolesti.

U 2007. godini, boravila je u istraživačkom centru “M. Tettamanti”, bolnice “San Gerardo” u Monci, Italija. Cilj boravka je bio obuka za rad u oblasti molekularne dijagnostike najčešćih translokacija kod leukemije dečijeg uzrasta.

Doktorske studije Medicinskog fakulteta u Beogradu, smer Molekularna medicina, upisala je 2007. godine. Aleksandra Krstić je član Udruženja genetičara Srbije i Evropske Asocijacije Hematologa.

U toku svog dosadašnjeg rada Aleksandra Krstić je objavila ukupno 42 naučne publikacije koje obuhvataju: 4 rada u međunarodnom časopisu, 1 rad u istaknutom tematskom zborniku vodećeg nacionalnog značaja, 2 rada u vodećem časopisu nacionalnog značaja, 2 rada u časopisu nacionalnog značaja, 19 saopštenja sa međunarodnog skupa štampano u izvodu i 15 saopštenja sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Александра Крстић

број уписа 07-ДС-ММ-05

Изјављујем

Да је докторска дисертација под насловом

Праћење химеризма анализом генетичких маркера након алогене трансплантације матичних ћелија хематопоезе код деце оболеле од хематолошких болести

- резултат сопственог истраживачког рада
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица

Потпис докторанда

У Београду, 30.05.2012.

AKrstić

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Александра Крстић

Број уписа 07-ДС-ММ-05

Студијски програм молекуларна медицина

Наслов рада

**Праћење химеризма анализом генетичких маркера након
алогене трансплантације матичних ћелија хематопоезе код
деце оболеле од хематолошких болести**

Ментор Доцент др Оливер Стојковић

Коментор Професор др Марија Гућ-Шћекић

Потписани Александра Крстић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијма Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 30.05.2012.

Потпис докторанда

AKrstić

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку "Светозар Марковић" да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Праћење химеризма анализом генетичких маркера након алогене трансплантације матичних ћелија хематопоезе код деце оболеле од хематолошких болести

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молим да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа)

У Београду, 30.05.12.

Потпис докторанда

Krstić