

**UNIVERZITET ODBRANE U BEOGRADU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**  
**VOJNOMEDICINSKA AKADEMIJA**

**Ocena efekata ABO-inkompatibilnosti i peri-transplantacijskih *in vivo* i *ex vivo* tretmana na prihvatanje alokalema i pojavu komplikacija posle transplantacije matičnih ćelija hematopoeze**

– disertacija –

**Marika Ljubenov**

Beograd, 2015. godina

Ovaj rad je izrađen u Institutu za transfuziologiju i hemobiologiju, Klinici za hematologiju, Institutu za medicinska istraživanja i Institutu za biohemiju Vojnomedicinske akademije u Beogradu i u Odeljenju za eksperimentalnu hematologiju Instituta za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu.

Ovim istraživanjem hemobioloških osobina matičnih ćelija do kliničke evaluacije, odnosno praćenja toka i ishoda transplantacija ABO-inkompatibilnih matičnih ćelija rukovodili su doc. dr Gordana Ostojić (mentor rada), prof. dr Dragana Stamatović i prof. dr Bela Balint, dopisni član SANU. Ovaj rad je bilo moguće i uspešno privesti kraju zahvaljujući njihovoj nesebičnoj pomoći, entuzijazmu i konstruktivnim sugestijama.

Izražavam zahvalnost prof. dr Mileni Todorović-Balint koja mi je svojim savetima pomagala u realizaciji i proceni terapijskih efekata transplantacija matičnih ćelija.

Dugujem veliku zahvalnost članovima kolektiva Instituta za transfuziologiju i hemobiologiju, Klinike za hematologiju, Instituta za medicinska istraživanja i Instituta za patologiju i sudsku medicinu Vojnomedicinske akademije – koji su mi dali stručnu i praktičnu podršku pri realizaciji ovog istraživanja.

Mojoj porodici veliko hvala na razumevanju tokom izrade ove disertacije.

## Sadržaj

<b>DOSADAŠNJA SAZNANJA</b>	<b>6</b>
<b>Osnovi hematopoeze i hemobiologija matičnih ćelija</b>	<b>8</b>
<b>Matične ćelije u transplantacijskoj medicini</b>	<b>15</b>
Izvori i prikupljanje matičnih ćelija za transplantaciju	17
Najučestalije komplikacije transplantacija	23
Prilagođene/inovativne transplantacije matičnih ćelija	26
Transplantacija MĆ nepodudarnih u sitemu ABO	27
Značaj istraživanja	31
<b>HIPOTEZA</b>	<b>33</b>
<b>CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b>	<b>34</b>
<b>MATERIJAL I METODI ISTRAŽIVAČKOG RADA</b>	<b>35</b>
<b>Dizajn istraživanja</b>	<b>35</b>
<b>Obeležja posmatranja</b>	<b>35</b>
<b>Bolesnici i laboratorijska ipitivanja</b>	<b>36</b>
<b>Imunohematološka ispitivanja</b>	<b>39</b>
<b>Statistička obrada podataka</b>	<b>42</b>
<b>REZULTATI</b>	<b>43</b>
<b>Eksperimentalna i preklinička istraživanja</b>	<b>43</b>
Optimizacija, kontrola i održavanje kvaliteta afereznih protokola	44
Imunohematološka testiranja	47

<b>Klinička ispitivanja – lečenje ABO-kompatibilnim vs. ABO-inkompatibilnim MČ</b>	<b>63</b>
Ispitivanje prihvatanja alokalema i komplikacije transplantacija	64
<b>DISKUSIJA</b>	<b>68</b>
<b>ZAKLJUČCI</b>	<b>92</b>
<b>LITERATURA</b>	<b>94</b>

## Dosadašnja saznanja

Hematopoeza se odvija u hemobiološkom "sistemu" koji predstavlja jednu kompleksnu funkcionalnu, ali ne i anatomske precizno odredljivu celinu. Čine ga različita tkiva/organi koji učestvuju u stvaranju ili "genezi" krvnih ćelija – kostna srž (KS), timus, slezina, limfni čvorovi, limfno tkivo digestivnog trakta i koža. Za vreme embrionalnog razvoja hematopoeza se odvija u žumančanoj kesi. U ranom fetalnom životu, hematopoetski organ je jetra, a potom kostna srž. Kostna srž po svojoj masi spada u najveće "organe", čini jedan od najsloženijih multifunkcijskih sistema organizma. U njoj se odvijaju, u prvom redu, procesi stvaranja krvnih ćelija ili hematopoeze pod kontrolom regulatora – medijatora/modulatora.

Stvaranje zrelih ćelija odigrava se konstantno iz primitivnih (toti/multi/pluripotentnih) i zrelijih matičnih ćelija (MĆ) pod regulacijom faktora rasta (citokina sa hematopoeznim dejstvom) i drugih celularnih i humoralnih činilaca mikrosredine. Tako, pored MĆ, za proces hematopoeze od posebnog su značaja ćelije mikrosredine koje deluju međućelijskim interakcijama, odnosno sintezom ili ekspresijom regulacijskih molekula – na primer, stromalne ćelije, koje pripadaju mezenhimu (endotelske ćelije, fibroblasti i osteoblasti) ili ćelijama hematopoetskog tkiva (makrofazi). One stvaraju specifične komponente ekstracelularnog matriksa (ECM), a takođe proizvode citokine sa hematopoetskim efektima (1–4).

Na taj način, regulatore ove mikrosredine moguće je podeliti na citokine koji kontrolišu samoobnavljanje, proliferaciju i diferencijaciju MĆ i na adhezivne molekule koji potpomažu proces hematopoeze u kostnoj srži i koji su posrednici u fizičkoj vezi između MĆ i stromalnih ćelija mikrosredine. Od biološki aktivnih molekula koji učestvuju u

regulaciji hematopoeze jedno od centralnih mesta zauzimaju citokini – faktori rasta hematopoeze. Organizovani u vidu složene citokinske mreže, oni deluju na već spomenute procese samoobnavljanja, proliferacije i diferentovanja, ali učestvuju i u regulaciji plastičnosti ili "transdiferentovanja" MĆ u posebnim okolnostima. Ukratko, plastičnost podrazumeva da MĆ ispoljavaju potencijal transformacije u ćelije različitih loza. MĆ mogu da ispoljavaju dve vrste plastičnosti – intrahematopoeznu (unutrašnju ili linijsku) i intersistemsku. Prvo je svojstvo opredeljenih hematopoeznih MĆ da mogu da se "konvertuju" u ćelije druge krvne loze. Intersistemska plastičnost podrazumeva sposobnost MĆ da se u odgovarajućim uslovima diferentuju u ćelije miokarda, ćelije jetre, epitelne ćelije, nervne ćelije – te se one primenjuju u kardiologiji, neurologiji i drugim medicinskim disciplinama u cilju obnove oštećenog tkiva.

U fazi fiziološke ravnoteže hematopoeze u kostnoj srži dnevno se stvara nekoliko biliona krvnih ćelija. Kada postoje povećane potrebe za pojedinim vrstama krvnih ćelija, procesi hematopoeze mogu biti desetostruko ili još više povećani. Tako, usled delovanja štetnih fiziko-hemijskih agenasa i/ili bolesti, može doći do narušavanja ravnoteže (homeostaze) hematopoeze, uprkos delovanju kompenzatornih mehanizama. U takvim okolnostima potrebno je primenjivati lečenje (hemoterapiju u širem smislu) – čiji je cilj fizička nadoknada i/ili biološka stimulacija stvaranja deficitarnih sastojaka krvi. U kostnoj srži – pored hematopoeze – odigravaju se i neki drugi hemobiološki procesi. Zajedno sa slezinom i limfnim žlezdama, kostna srž ima funkciju i limforetikulskog organa (limfocitogeneza), usled čega može da utiče na funkcije humoralnog i ćelijskog imuniteta. Pored toga, posredstvom ćelija mononukleusno-fagocitnog sistema (MNFS), kostna srž učestvuje i u procesima raspoznavanja i otklanjanja "ostarelih" krvnih ćelija, odnosno različitih patogenih agenasa iz cirkulacije (2, 3–9).

\*

\*

\*

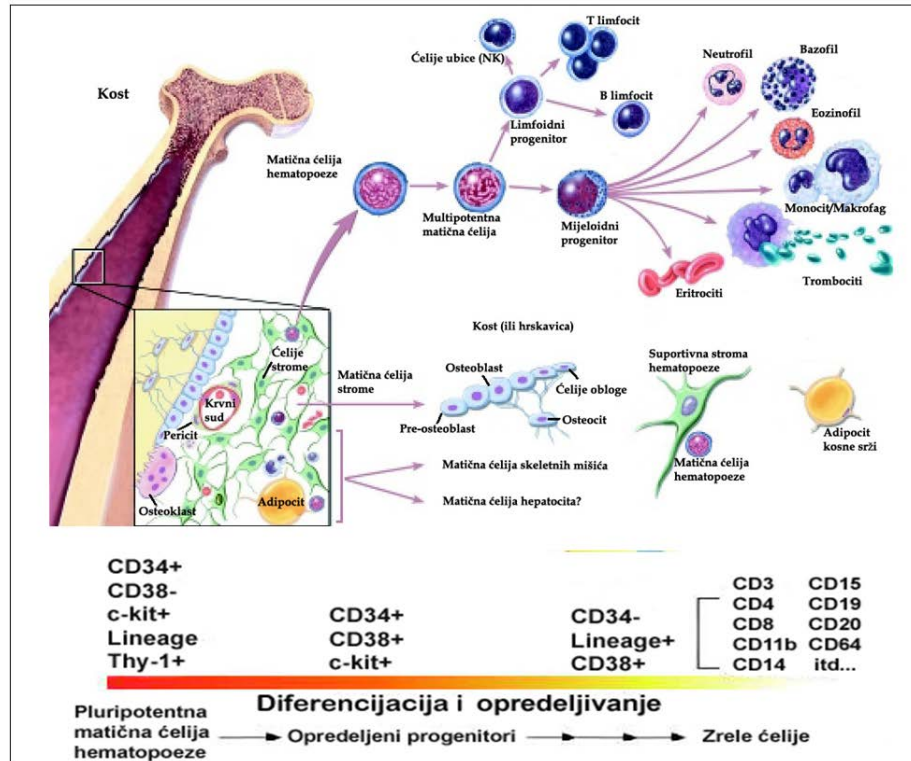
Sumarno, primitivne toti/pluri/multipotentne MĆ samoobnavljanjem ostvaruju kontinuitet sopstvene populacije, a diferentovanjem i proliferacijom obnavljanje ćelija pojedinih ćelijskih (krvnih) loza u toku celog života jedinke. Za razliku od

toti/pluri/multipotentnih, opredeljene MĆ se odlikuju veoma ograničenom sposobnošću samoobnove i povećanom proliferativnom aktivnošću. Osnovno i još uvek nepotpuno razjašnjeno pitanje je na koji način se "donosi odluka" o samoobnavljanju ili diferencijaciji MĆ. Poznata su dva modela regulacije funkcija MĆ. Prvi (stohastički) model pretpostavlja da stimulans iz okoline utiče na verovatnoću da će se MĆ obnoviti ili diferentovati. Prema drugom (determinističkom) modelu odgovarajući spoljašnji stimulans deluje direktno na MĆ – pri čemu je od posebnog značaja dejstvo okružujuće mikrosredine na funkcije pluripotentne MĆ. Brojna bazična istraživanja i kliničke studije rezultovale su napretkom u razumevanju i tumačenju hemobiologije MĆ, ali i njihovom rastućom terapijskom primenom – proširujući mogućnosti i pristupe upotrebe ovih ćelija u transplantacijskoj i regenerativnoj medicini (2–4, 10–15).

## **Osnovi hematopoeze i hemobiologija matičnih ćelija**

Stvaranje različitih vrsta i populacija krvnih, ali i somatskih ćelija posredstvom njihovih "prethodnika" (matične, progenitorske i prekurzorske ćelije – opredeljene za više ili samo jednu lozu) je složeni hemobiološki događaj koji je nazvan hematopoezom i/ili citogenezom. To je kontinuiran proces stvaranja ćelija, koje bez obzira na njihovu morfološku i funkcionalnu raznolikost vode poreklo od zajedničke toti/pluri/multipotentne MĆ. Pomoću samoobnavljanja, MĆ održavaju konstantnost sopstvene populacije u uslovima fiziološke ravnoteže, a do određene granice i u uslovima kada je ta ravnoteža narušena. Diferentovanjem iz najprimitivnijih populacija MĆ nastaju najpre ćelije koje su i dalje pluripotentne, ali sa unekoliko redukovanim potencijalom samoobnavljanja. Iz ćelija opredeljenih za dve ili samo jednu lozu – čiji je kapacitet samoobnavljanja veoma skroman ili ne postoji – daljim diferentovanjem nastaju zrele krvne ćelije. Tako, hematopoezu je moguće definisati kao kontinuirani proces stvaranja ćelija, koje (bez obzira na njihovu morfološku i funkcionalnu raznolikost) vode poreklo od zajedničke MĆ. Razlikovati navedene populacije MĆ je morfološki praktično nemoguće, a čak i koristeći fenotipizaciju (ispitivanje prisustva specifičnih ćelijskih membranskih antigena) nije lako (slika 1).

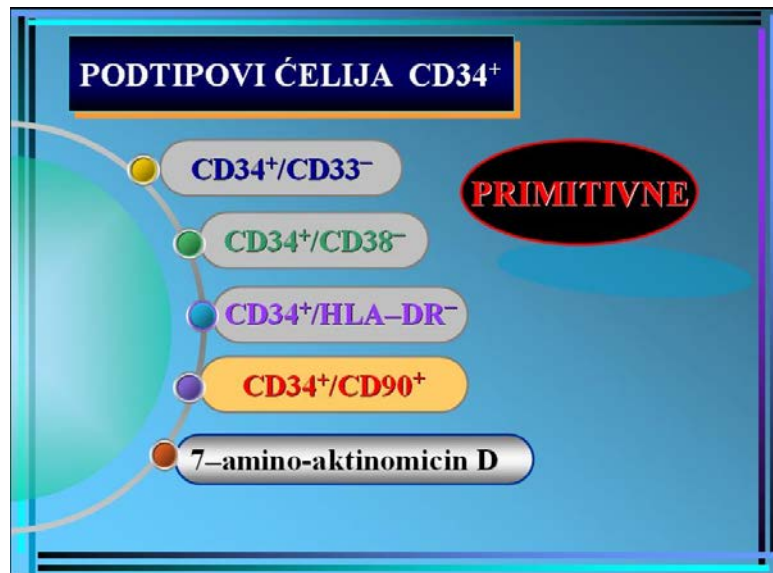




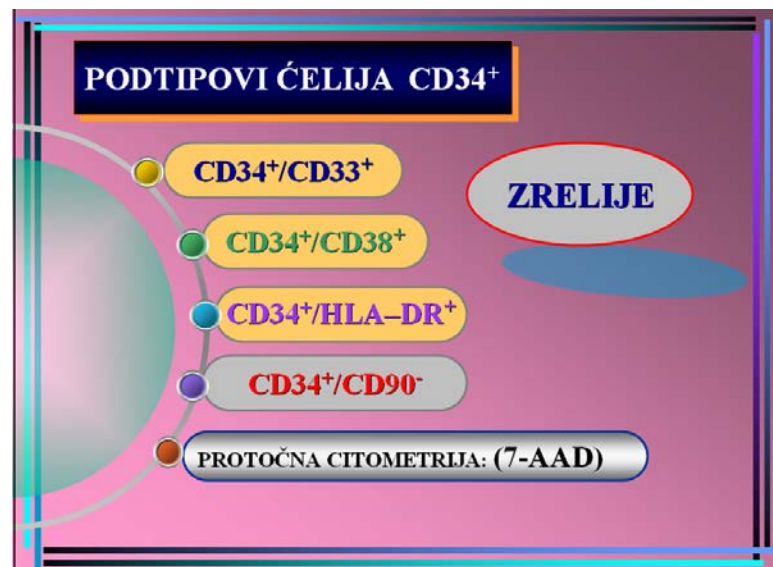
**Slika 1.** Proces hematopoeze i ekspresija specifičnih antigena CD

Kao što je prikazano, populacije hematopoetskih MĆ i progenitora iskazuju (ekspresija) antigen CD34, zbog čega su označene i kao CD34<sup>+</sup> ćelije. Sažeto, CD34 je obeležje skupa ćelija (cluster designation) na osnovu eksprimovanja transmembranskog glikoproteina na membrani MĆ, ali i nekih drugih ćelija strome. Poznate su manje razvijene i zrelije podgrupe ili podtipovi CD34<sup>+</sup> ćelija. Danas je opšteprihvaćeno (slike 2A i 2B) da primitivniju podgrupu (subset) CD34<sup>+</sup> ćelija karakteriše fenotip: CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup>), dok je zrelija podgrupa označena fenotipom: CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD90<sup>-</sup> (2-5).

A)



B)



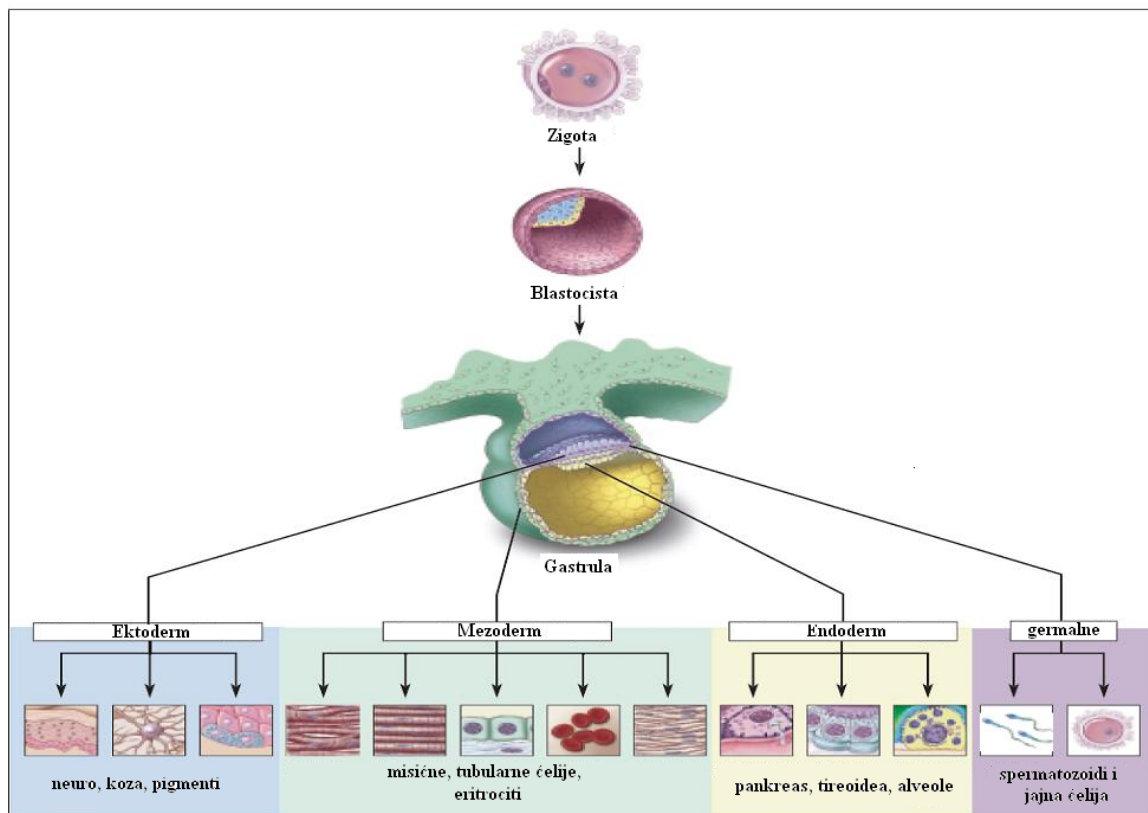
**Slika 2.** Primitivni (A) i zreliji (B) podtipovi/subsetovi ćelija CD34<sup>+</sup>

Različite populacije/odeljci MĆ hematopoeze čine jedan "razvojni kontinuum" ćelija nejednakog stepena zrelosti i opisuju se kao ćelije piramidalne organizacije – nju čine tri glavne kategorije: a) odeljak toti/multi/pluripotentnih MĆ; b) odeljak oligo/unipotentnih (opredeljenih) MĆ i c) odeljak morfološki prepoznatljivih (nezrelih i zrelih) prekurzora/ćelija. Nomenklatura i neke od osnovnih bioloških karakteristika pojedinih populacija toti/pluri/multipotentnih, kao i zrelijih populacija (oligo/unipotentnih) MĆ sumarno su prikazani u tabeli 1 (3, 9).

## Sumarni prikaz stepena funkcionalnosti i biološki potencijal matičnih ćelija

ĆELIJSKA POPULACIJA	OSNOVNE KARAKTERISTIKE
Totipotentna MĆ	Ćelija koja je umešna da formira kompletan organizam u celini. Primer: totipotentni zigot kičmenjaka.
Pluripotentna MĆ	Odlika ćelija koja može da stvara sve ćelijske linije organizma, uključujući germinalne ćelije, kao i neke ili sve vrste ekstraembrionalnih ćelija. Primer: embrionalna matična ćelija.
Multipotentna MĆ	Mogućnost stvaranja multiple ćelijske loze koje potom sačinjavaju neko tkivo ili neka tkiva. Primer: multipotentna hematopoezna matična ćelija.
Oligopotentna MĆ	Sposobnost geneze dve ili više ćelijske linije istog tkiva. Primer: opredeljena MĆ hematopoeze koja diferencijacijom daje morfološki prepoznatljive ćelije.
Unipotentna MĆ	Mogućnost formiranja individualnih, pojedinačnih ćelijskih linija. Primer: spermatogonijska matična ćelija.

Oplođena jajna ćelija (zigot) je praktično jedini "pravi" ekvivalent totipotentnoj MĆ sa neograničenim potencijalom diferentovanja i proliferacije – ona je jedina ćelija sa kapacitetom stvaranja ćelija neophodnih za razvoj svih fetalnih i adultnih tkiva i/ili organa. Ipak, ne karakteriše je svojstvo samoobnavljanja. Embrionalne matične ćelije (EMĆ) – čineći grozdove ćelija u unutrašnjosti blastociste – predstavljaju zrelije, pluripotentne MĆ, koje mogu formirati različite ćelijske linije, ali uz progresivno opadajući potencijal diferentovanja u daljem razvoju fetusa (slika 3).



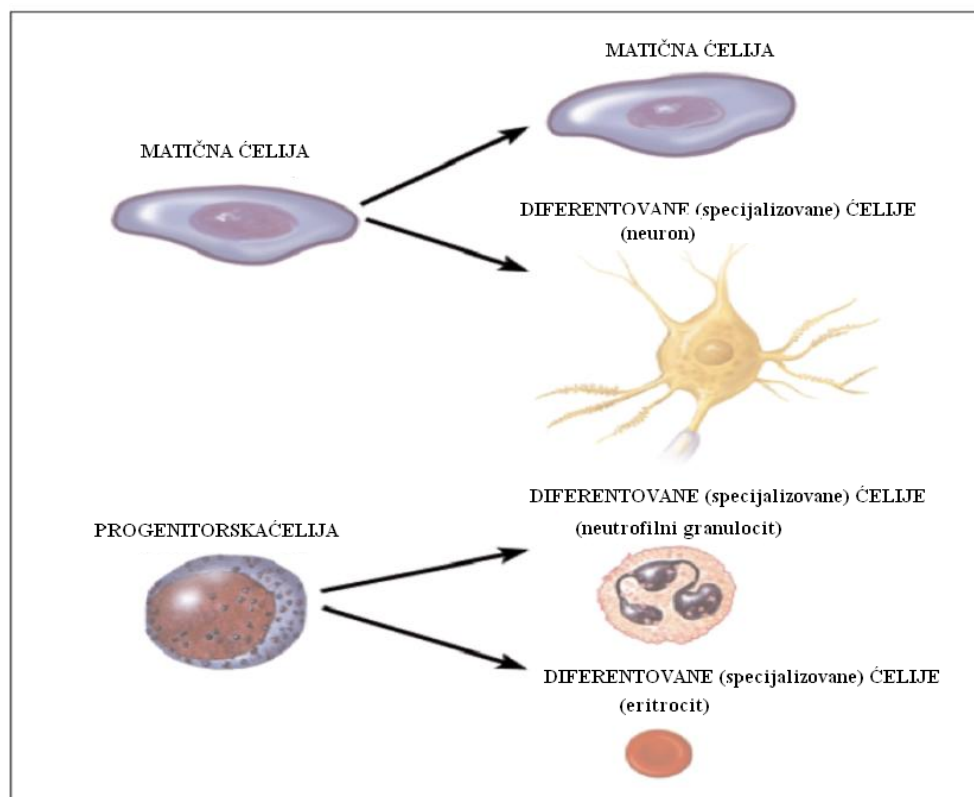
**Slika 3.** Razvoj zigota do efektorskih ćelija (diferentovanih tkiva)

Tako, iz endoderma blastociste će nastati ćelije/tkivo timusa, tireoidne i paratireoidne žlezde, zatim larinks, trahea, pluća, mokraćna bešika, uterus, vagina, pankreas, jetra. Iz mezoderma potiču kostna srž, korteks nadbubrega, limfno tkivo, skeletni, glatki i srčani mišić, urogenitalni sistem, vaskularni sistem i drugo. Iz ektoderma nastaju koža, srž nadbubrega, nervno tkivo, oko i drugo. Pluripotentne MĆ će daljim tokom razvoja dati adultne ili tkivno specifične MĆ, iz kojih nastaju posebna tkiva/organi (2–4).

**Embrionalne MĆ.** One nastaju iz ćelija blastociste u posebnim uslovima kultivisanja i verovatno se donekle razlikuju od onih ćelija koje se razvijaju u *in vivo* uslovima. Totipotentne, pluripotentne i delom multipotentne MĆ nalaze se u embrionalnom i fetalnom periodu i u različitom stepenu pokazuju osobinu "plastičnosti", odnosno sposobnosti da se u *ex vivo* uslovima, pod dejstvom egzogenih regulatora/modulatora (različitih citokina), razvijaju u zrelije ćelije kao što su makrofagi, adipociti, oligodendrociti, pankreasne i druge ćelije. Danas ima više ćelijskih linija sa humanim MĆ, izolovanim iz blastociste ili embrionalnog tkiva. Dokazano je da se iz EMĆ mogu *ex vivo* razvijati funkcionalne i po strukturi *normalne* ćelije (na primer, hematopoezne ćelije,

kardiomiociti i ćelije pankreasa koje luče insulin). Iako imaju normalan kariotip i veliki kapacitet proliferacije, nije za očekivati da će se EMC, bez daljeg usavršavanja i modifikacija metodologije, u bliskoj budućnosti upotrebiti u lečenju zbog mogućnosti spontanog razvoja malignih ćelija i drugih potencijalnih komplikacija (2–4, 8).

**Adultne MĆ.** To su specijalizovane MĆ, koje su izolovane ili dokazane u mnogim tkivima odraslog organizma, a čija je uloga u održavanju tkivne homeostaze i koje, kao i sve MĆ, imaju najmanje dve osobine: prva je sposobnost samoobnavljanja i druga, sposobnost diferentovanja u više ćelijskih tipova u okviru tkiva u kome se nalaze, dajući im karakterističnu morfologiju i specijalizovanu funkciju. Od MĆ najpre nastaju tzv. "intermedijarne ćelije" ili oblici, koje potom sazrevaju postizujući stadijume definitivnog diferentovanja. Ove "intermedijarne ćelije" se nazivaju progenitorskim i/ili prekursorskim ćelijama (3, 4). One u fetalnom ili adultnom tkivu predstavljaju delimično diferentovane ćelije, koje se u slučaju bioloških potreba dele i daju povećan broj zrelih ćelija (slika 4).

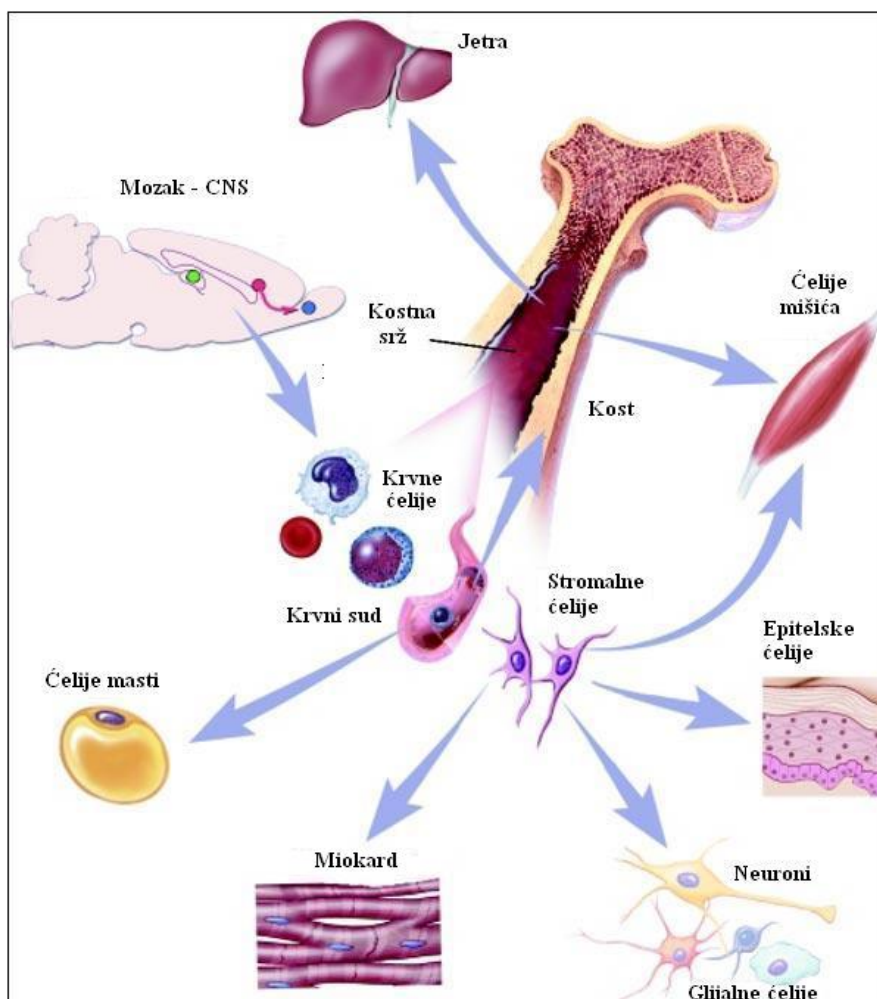


**Slika 4.** Različite osobine matičnih/progenitorskih/prekursorskih ćelija

Primer na slici je MĆ hematopoeze koja daje drugu generaciju MĆ i neuron. S druge strane, progenitorska ćelija ima sposobnost ćelijske deobe i daje dve vrste zrelih ćelija

(neutrofil i eritrocit). Izuzetno mala zastupljenost adultnih MĆ u hematopoeznom tkivu dodatno otežava njihovu bolju hemobiološku evaluaciju. Naime, prosečna učestalost MĆ iznosi jedan na 10 000 – 15 000 ukupnih ćelija u kostnoj srži (KS). One su opisivane po tkivu odakle su izdvojene: kostna srž, jetra, mozak, srce, zubna pulpa, folikul dlake, koža, mišići, masno tkivo, krv, retina, kornea, epitel gastrointestinalnog trakta (2–4, 6, 8).

**Primena MĆ u regenerativnoj medicini.** Kao što je rečeno, embrionalne MĆ su sposobne da se diferenciraju u sve tipove ćelija. Dugo se smatralo da adultne MĆ diferenciranjem mogu da daju samo ćelije karakteristične za tkivo u kome se nalaze. Međutim, ovaj koncept je napušten zbog novih saznanja koja su pokazala da postoji sposobnost adultnih MĆ transdiferenciranja u ćelije druge loze. Naime, ustanovljeno je da slične osobine embrionalnih MĆ imaju i neke populacije adultnih MĆ (2–4, 10–15).



**Slika 5.** Preliminarni podaci o plastičnosti nehumanih adultnih matičnih ćelija

U slici 5. pokazano je da adultne hematopoezne i/ili mezenhimske MĆ imaju visoki potencijal diferentovanja ne samo u sve vrste krvnih ćelija, nego i u somatske ćelije – u određenim uslovima one transdiferentovanjem mogu dati osteocite, hondroците, hepatocite, ćelije nervnog i mišićnog tkiva, itd.

Zahvaljujući ovoj sposobnosti toti/pluripotentne MĆ (raspoložujući sa "neograničenim" biološkim potencijalom), slično mezenhimalnim i endotelnim MĆ, primenljive su i na polju reparativne ili regenerativne medicine (10–21). Drugim rečima, njihova terapijska primena je opravdana u lečenju bolesnika sa oštećenjem miokarda, jetre, pankreasa, moždanog i vaskularnog tkiva, itd. U tom kontekstu, prve kliničke studije su pokazale da ubrzavanje ili "implantacija" MĆ u neko oštećeno i/ili ishemijsko područje rezultuje njihovim prihvatanjem ("homing") i sledstvenom transdiferencijacijom u ćelijske linije datog organa/tkiva, uključujući i genezu kolateralnih krvnih sudova. Pri tome, faktori rasta angiogeneze pospešuju formiranje kolateralnih kapilara i arteriola, a sam proces je poznat kao "terapijska angiogeneza" ili "neoangiogeneza". Na osnovu iznetog, jasno je da koncept plastičnosti MĆ omogućava njihovu sve širu terapijsku primenu u oblastima regenerativne medicine. Mehanizmi koji omogućavaju transdiferencijaciju ili "reprogramiranje" MĆ – posredstvom spoljašnjih ("extrinsic") i/ili unutrašnjih ("intrinsic") faktora – još su uvek samo delimično razjašnjeni. Međutim, postignuti povoljni klinički rezultati govore u prilog opravdanosti (uz stalno unapređenje postupaka) terapije primenom MĆ (3, 4, 14, 15, 21).

Opisano svojstvo plastičnosti, je upravo i podstaklo intenzivna istraživanja usmerena ka njihovoj potencijalnoj primeni u ćelijskoj terapiji i reparativnoj ili regenerativnoj medicini i tkivnom inženjerstvu.

## **Matične ćelije u transplantacijskoj medicini**

Alogena transplantacija MĆ hematopoeze se više decenija uspešno primenjuje u lečenju brojnih urođenih i stečenih, malignih i benignih hematoloških ali i drugih oboljenja. Prve transplantacije MĆ hematopoeze kod ljudi izvedene su pre oko pet decenija, ali su često

bile bez očekivanog terapijskog efekta. Narednih godina transplantacije su primenjivane u lečenju bolesnika sa akcidentalnom akutnom radijacionom bolešću, sa određenim oblikom i stadijumom leukemije, teškom aplastičnom anemijom i kombinovanim deficitom imuniteta. Međutim, tek su sticanjem saznanja na polju multidisciplinarnih nauka obezbeđeni uslovi za široku primenu pojedinih oblika transplantacija MĆ hematopoeze u lečenju najrazličitijih patoloških stanja.

Zahvaljujući bazičnim biološkim naukama umnogome su razjašnjeni priroda, poreklo i fenotipske karakteristike MĆ hematopoeze, potom njene sposobnosti repopulacije i diferencijacije u zrele ćelije krvi. Usavršeni su postupci prikupljanja, a potom i uspešnog "storniranja" MĆ hematopoeze za obavljanje bezbedne transplantacije MĆ hematopoeze. Rekombinantnim tehnikama sintetisani su hematopoetski faktori rasta koji su omogućili mobilizaciju MĆ hematopoeze iz kostne srži u perifernu krv, koja je tokom prethodnih decenija postala dominantan izvor MĆ hematopoeze, prevashodno za autolognu transplantaciju MĆ hematopoeze. Osavremenjavanje ćelijskih separatora omogućilo je prečišćavanje ("purging") suspenzije MĆ hematopoeze, kao i selekciju samo odabranih ćelija za ćelijsku terapiju. Takođe, upotreba separatora nove generacije omogućila je savladavanje nepodudarnosti u krvnogrupnom sistemu ABO (ABO-inkompatibilnost) kod alogenih transplantacija MĆ hematopoeze (2–4, 22–26).

Uvedeni i usavršavani su novi "kondicioni režimi" i osavremenjena potporna post-transplantacijska terapija što je doprinelo poboljšanju ukupnih rezultata transplantacije. Otkriće svojstava plastičnosti MĆ hematopoeze i njihove sposobnosti diferencijacije u ćelije najrazličitijih tkiva značajno je proširilo indikacije za primenu transplantacijskih procedura. Uprkos svim navedenim dostignućima multidisciplinarnih nauka brojna pitanja iz oblasti transplantacijske medicine i danas su bez odgovora i zahtevaju buduća istraživanja.

\*

\*

\*

Sve to potvrđuje da su načela i principi na kojima se zasniva transplantacija MĆ hematopoeze u lečenju bolesnika izvedena iz eksperimentnih i prekliničkih modela. Od prvih pokušaja transplantacija MĆ kostne srži, do uvođenja alternativnih izvora MĆ, kao



što su periferna i umbilikalna krv, iznalaženja procedura *ex vivo* manipulacija ćelija bilo je potrebno da prođe više od pola veka (22–38).

Singene transplantacije se izvode između genetski podudarnih osoba (jednojavni blizanci). Alogene transplantacije MĆ se izvode između genetski neidentičnih osoba, ali usklađenih na osnovu ispitivanja podudarnosti antigena u sistemu HLA. Autolognom transplantacijom MĆ se želi postići repopulacija bolesnikove kostne srži sopstvenim ćelijama posle primene visokodozne hemioterapije u lečenju malignih i nekih autoimunskih oboljenja (2–4).

Fenomen ABO-inkompatibilnosti primaoca i davaoca nije kontraindikacija za izvođenje transplantacije – uprkos nekim ograničenjima, tj. zahteva izvođenja specifičnih postupaka *ex vivo* obrade ćelijske suspenzije i *in vivo* pretretman primaoca. Učestalost ABO inkompatibilije se potencijalno očekuje kod oko jedne trećine od ukupnog broja transplantacija. Postoje tri oblika ABO-inkompatibilnosti: a) minor – čija je karakteristika prisustvo antitela u suspenziji MĆ usmerenih protiv eritrocitnih antigena primaoca; b) major – koju odlikuje prisustvo antitela u cirkulaciji primaoca koja su usmerena protiv eritrocitnih antigena davaoca; c) bidirekcijska ili major-minor inkompatibilija koja predstavlja istovremenu kombinaciju prethodna dva oblika (2–4).

Pored faktora kao što su vrsta oboljenja, stadijum bolesti, uzrast bolesnika, kondicioni režim i profilaksa post-transplantacijskih komplikacija, podudarnost HLA davaoca i primaoca ostaje jedan od ključnih parametara koji utiče na peri-transplantacijski morbiditet i smrtnost, odnosno na sam klinički ishod transplantacije. O detaljima koji su vezani za indikacije, klinički tok i ishod transplantacija kod pojedinih bolesti neće biti prodiskutovano u ovom tekstu.

### **Izvori i prikupljanje matičnih ćelija za transplantaciju**

Već je spomenuto da zahvaljujući njihovom potencijalu za samoobnavljanje, kao i dovoljno velikom kapacitetu da proliferišu i diferentuju u potomstvo svih krvnih loza, toti/multi/pluripotentne MĆ mogu obezbediti potpunu i dugotrajnu rekonstituciju

hematopoeze (repopulacija kostne srži) posle delimičnog ili potpunog oštećenja – što je zapravo osnov za njihovu primenu.

Normalno stanište – tako i prvobitni izvor MĆ hematopoeze bila je kostna srž (1–3, 27–29). Dugotrajna ispitivanja na polju bazične medicine su jasno pokazala da se ove ćelije mogu naći i u perifernoj krvi u veoma malom postotku. Nakon oporavka kostne srži po primeni mijeloablativnih agenasa postotak MĆ hematopoeze u perifernoj krvi bolesnika se značajno povećava. Sagledavanje biologije MĆ hematopoeze, kao i razvoj tehnika genetskog inženjerstva sa sintezom rekombinantnih hematopoetskih faktora rasta (rHuG-CSF, rHuGM-CSF, receptor za interleukin 3 ili rIL-3), omogućilo je značajno plodonosniju periferizaciju (mobilizaciju) MĆ hematopoeze iz kostne srži u perifernu krv (2–5, 30–34). Osim toga, izučavanje biologije pupčane vrpce (umbilikalna krv) pokazalo je da ista poseduje visok postotak primitivnijih MĆ hematopoeze pogodnih za repopulaciju KS i diferentovanje u zrele ćelije krvi (2, 35–38).

U slučajevima autolognih transplantacija, periferna krv postala je primarni, gotovo jedini izvor MĆ. Višedecenijsko iskustvo u transplantacijskoj medicini je jasno pokazalo da postoje brojne prednosti alogene transplantacije MĆ hematopoeze poreklom iz periferne krvi u odnosu na kostnu srž, i to, u pogledu bržeg prihvatanja alogenog kalema, sa sledstveno značajno manjom incidencom ranih post-transplantacijskih komplikacija vezanih za period jatrogene pancitopenije. Međutim, odložene imunske komplikacije, poput hronične bolesti kalema protiv domaćina (Graft versus Host Disease – GvHD), mogu biti značajno češće onda, kada se kao izvor koristi periferna krv (2–4, 30–34). Korišćenje MĆ poreklom iz umbilikalne krvi je danas još uvek, praktično, na nivou kliničkih studija (35–38).

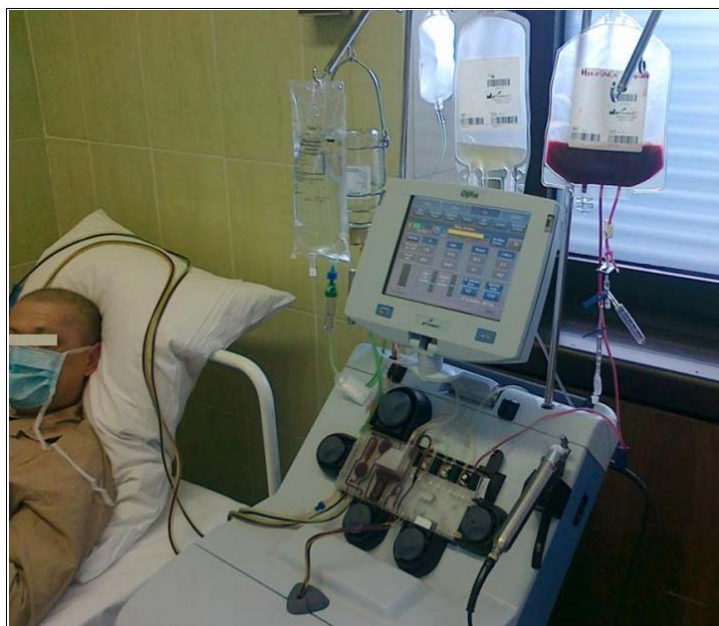
U rutinskim radu, MĆ najčešće se prikupljaju posle mobilizacije iz periferne krvi aferezom mononukleusnih ćelija (MNĆ) – među kojima su prisutne i MĆ – ili danas ređe iz spongioznih delova kostiju (multiplim aspiracijama). Najzad, potencijalni izvor matičnih ćelija je i krv pupčanika (umbilikalne MĆ). Posle prikupljanja iz navedenih izvora, MĆ mogu biti transplantirane neposredno po uzimanju (uz procesiranje po potrebi) ili posle skladištenja u zamrznutom stanju (kriokonzervisane autologne MĆ) (4–8, 39–47).

**Aferezno prikupljanje matičnih ćelija.** Transplantaciju MĆ prikupljenih iz periferne krvi karakterišu: a) odsustvo rizika od infekcije kostiju multiplim punkcijama i aspiracijama, opšte anestezije i rada u operacionoj sali i b) brža rekonstitucija hematopoeze.

Broj bolesnika lečenih primenom MĆ periferne krvi poslednjih decenija je u stalnom porastu – oko 70–80% svih "konvencionalnih" transplantacija (4, 32–34).

Afereze MĆ su u potpunosti automatizovane, izvode se primenom separatora krvnih ćelija sa standardizovanim protokolima, uz kontrolu i očuvanje kvaliteta pripremljene suspenzije ćelija. Antikoagulacija se postiže pomoću rastvora ACD (formule A ili B farmakopeje SAD). Venski pristup cirkulaciji se najčešće ostvaruje preko antekubitalnih vena, a po potrebi, koristi se kateter postavljen u venu supklaviju, a ređe u neku centralnu venu (2–4).

Tokom sedamdesetih godina uočeno je da broj MĆ u krvi značajno raste (za oko pet do petnaest puta) tokom hematopoetskog oporavka posle citostatske terapije, a kombinacija hemioterapije i odgovarajućih hematopoetskih citokina još više povećava (za oko šezdeset puta) zastupljenost MĆ u cirkulaciji. Ova saznanja o stimulaciji i preraspodeli MĆ hematopoeze u organizmu, omogućila su izvođenje autolognih transplantacija MĆ mobilisanih u perifernu krv, najpre u tretmanu bolesnika sa leukemijom, limfomom, multiplim mijelomom (2–4, 32–34), a zatim i nekim autoimunskim bolestima (48–50). Prva saopštenja o transplantaciji alogernih MĆ mobilisanih u perifernu krv datiraju iz sredine osamdesetih godina, a takve procedure se primenjuju i u našoj zemlji počev od 1995. godine (slika 6).



**Slika 6.** Afereza MĆ iz periferne krvi posle mobilizacije hemioterapijom i rHuG-CSF

Da bi prinos MĆ aferezom bio zadovoljavajući, potrebna je efikasna mobilizacija. Zavisno od vrste transplantacije ona se postiže: a) primenom ciklofosfamida ili polihemioterapije i supkutanom aplikacijom rHuG-CSF (12–16  $\mu\text{g}/\text{kgtm}/\text{dan}$  – autologna transplantacija) i b) ubrizgavanjem rHuG-CSF u dozi od 5–10  $\mu\text{g}/\text{kgtm}/\text{dan}$  (aloga transplantacija) (2–4).

Postoje podaci o primeni još većih doza rHuG-CSF u autolognoj transplantaciji MĆ (do 32  $\mu\text{g}/\text{kgtm}/\text{dan}$  – u tri jednake doze) kod "slabih respondera" koji nisu reagovali na mobilizaciju adekvatno posle dvodnevne stimulacije. Najzad, ima saopštenja o primeni antagonista receptora 4 hemokina CXC (CXCR4), označenom kao AMD-3100 (Mozobil ili Plerixafor) kod bolesnika koji takođe ne reaguju adekvatno na mobilizacijski režim. Upotreba AMD-3100 u kombinaciji sa rHuG-CSF rezultuje efikasnijom mobilizacijom MĆ (2–6).

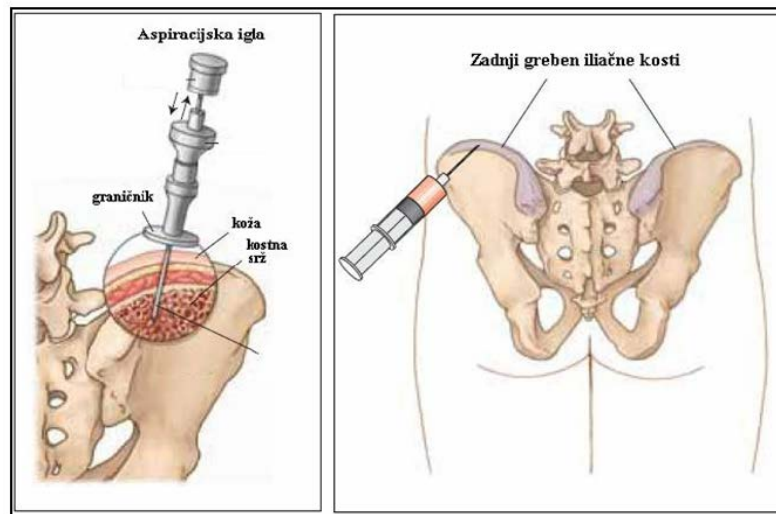
Jedno od bitnih parametara tokom prikupljanja MĆ, je određivanje najpogodnijeg vremena ("timing") njihove afereze ("harvesting"). Kod alogenih transplantacija MĆ periferne krvi prva afereza izvodi se petog dana od početka subkutane primene rHuG-CSF. Optimalni termin prve afereze kod autolognih transplantacija MĆ moguće je odrediti na osnovu vrednosti hemograma. Dugo je vladalo mišljenje da je preduslov efikasne afereze MĆ broj leukocita u perifernoj krvi  $\geq 5\text{--}10 \times 10^9/\text{L}$  posle mobilizacijske pancitopenije (2).

Međutim, danas se smatra najpouzdanijim prediktorom uspešnosti mobilizacije (sa sledstvenim MĆ) kvantifikacija  $\text{CD}34^+$  pre afereze; taj broj  $\text{CD}34^+$  treba da iznosi  $\geq 20\text{--}50/\mu\text{L}$  u perifernoj krvi da bi bilo moguće obezbediti optimizirani prinos MĆ tokom prikupljanja (3–4). Efikasnost prikupljanja MĆ i kvalitet ćelijske suspenzije ("harvest") mogu biti procenjeni kvantifikacijom MNC, a posebno  $\text{CD}34^+$  ćelija. Smatra se da broj MNC treba da bude najmanje  $2\text{--}4 \times 10^8/\text{kgtm}$ , odnosno broj  $\text{CD}34^+$   $2\text{--}4 \times 10^6/\text{kgtm}$  (preporučljivo  $\geq 5 \times 10^6/\text{kgtm}$ ) primaoca da bi transplantacija mogla biti uspešna (3–5).

Na kraju, navedene vrednosti samo sa rezervom mogu garantovati trajnu i kompletnu rekonstituciju hematopoeze posle transplantacije. Da bi prinos ćelija mogao biti postignut, potrebno je: a) da volumen procesirane krvi jednom aferezom iznosi oko dva do tri volumena cirkulišuće krvi, pri čemu procedura traje oko 4–5 sati i b) da afereze budu izvođene dva do tri (a po potrebi i više) puta, a volumen procesirane krvi u proseku iznosi

oko 15–20 L. Ako ukupni volumen procesirane krvi tokom jedne afereze iznosi najmanje tri volumena bolesnikove cirkulišuće krvi, govori se o "aferezi velikog volumena" (Large Volume Leukapheresis – LVL) (2–4, 33).

**Aspiracija matičnih ćelija iz kostne srži.** Uzimanje ćelija kostne srži se ostvaruje aspiracijama iz zadnjeg i prednjeg grebena bedrene kosti u operacionoj sali, uz opštu anesteziju davaoca. Da bi se obezbedio potreban broj ukupnih nukleisanih ćelija (Total Nucleated Cells – TNCs  $\geq 3 \times 10^8$ /kgtm primaoca), treba uraditi oko 100–200 uboda/aspiracija, pri čemu zapremina aspirata iznosi oko 1 000 mL (najviše 15–20 mL/kgtm davaoca) (1–4). Princip i tehnika prikupljanja ćelija prikazani su u slici 7.



**Slika 7.** Šematski prikaz prikupljanja MĆ iz iliačne kosti aspiracijom

Aspirat po uzimanju treba profiltrovati u cilju otklanjanja čestica masnog tkiva i ćelijskih agregata. Kao antikoagulans, koriste se citrat (ACD) i/ili heparin u fiziološkom rastvoru, uz upotrebu nekog ćelijskog medijuma. U cilju sprečavanja pojave anemije kod davaoca, oko sedam dana pre transplantacije treba uzeti krv za autolognu transfuziju koja se izvodi tokom prikupljanja aspirata. Kada postoji major i bidirekcijska ABO-inkompatibilnost ili su predviđene kriokonzervacija (retko), odnosno primena MĆ u regenerativnoj medicini, neophodno je njihovo koncentrisanje/procesiranje. To je moguće postići izdvajanjem MNC iz aspirata (procesiranje – slika 8) i imunomagnetnom selekcijom (pozitivna ili negativna) ćelija CD34<sup>+</sup> (4, 22–26).



**Slika 8.** Postupci *ex vivo* manipulacije aspirata kostne srži

Na kraju, potrebno je istaći da postoje transplantacijske ustanove čija je osnovna delatnost formiranje registra potencijalnih nesrodnih davalaca MĆ. Tako, transplantacija MĆ od nesrodnog alogenog davaoca predstavlja posebno polje interesovanja i ispitivanja proteklih decenija, kao i formiranje, odnosno proširivanje registra potencijalnih davalaca ovih ćelija (2, 4).

S obzirom na to da svega oko 20 – 30% bolesnika ima kompatibilnog davaoca unutar porodice – regrutovanje alogenog nesrodnog donora dobija sve veći značaj u savremenoj transplantacijskoj medicini. Zbog toga, napori su usmereni i u pravcu usavršavanja metoda koji dozvoljavaju haploidentične srodne transplantacije (na primer, roditelj) i nesrodnih HLA-kompatibilnih davalaca kao izvor MĆ. Organizovani su Nacionalni registri davalaca kostne srži i kod nas, a zatim su podaci objedinjeni organizovanjem jedinstvene baze podataka u Svetskom registru davalaca ćelija kostne srži ili Bone Marrow Donors Worldwide (BMDW). Osnovni zadatak BMDW je da prikuplja podatke iz nacionalnih organizacija širom sveta koje imaju sopstvene registre davalaca MĆ i da omogući pretraživanje i distribuciju podataka nacionalnim registrima i centrima za transplantaciju. Pronalaženje kompatibilnog nesrodnog davaoca na ovaj način je značajno uspešnije (za oko 90% bolesnika omogućeno je iznalaženje donora) sa razvojem BMDW. Razvojem tehnika i testova visoke rezolucije, omogućen je izbor nesrodnog davaoca sa najvećim stepenom podudarnosti, što smanjuje i rizik od imunski posredovanih komplikacija. Prve nesrodne alogene transplantacije MĆ su izvedene početkom ove decenije i kod nas – danas je VMA

zasada jedini i Referentni centar Srbije za lečenje odraslih bolesnika primenom ove vrste terapije (4).

### **Najučestalije komplikacije transplantacija**

U delu teksta koji sledi biće spomenuti najbitniji potencijalni nepovoljni efekti i komplikacije transplantacije. Mehanizmi njihove etiopatogeneze i dijagnostikovanje ovih neželjenih događaja biće ukratko razmatrani u delu Diskusija. Od sporednih efekata i komplikacija transplantacije MĆ, treba navesti mukozitis, cistitis, neurološke ili pulmonalne komplikacije, zatim neprihvatanje/odbacivanje alotransplantata, GvHD i transfuzijom udruženu GvHD (Transfusion-Associated Graft versus Host Disease – TA-GvHD), zatim virusne i ostale infekcije i drugo (4, 51–70).

Među najčešćim uzrocima neuspeha transplantacija MĆ hematopoeze treba razmotriti neprihvatanje alokalema, "osveženje" (relaps) bolesti i pojavu nepovoljnih efekata, odnosno komplikacija – kao što su GvHD, virusne i ostale infekcije i drugo (1, 2).

Neprihvatanje alokalema je posledica reakcije "domaćin protiv kalema" zbog imunizacije primaoca na antigene davaoca ili nepovoljnih uticaja mikrosredine u kostnoj srži. Neprihvatanje transplantata se prvenstveno javlja kod multitransfundovanih bolesnika sa aplastičnom anemijom – i to, u oko 40–60% transplantacija – što, pored alosenzitizacije, ukazuje na mogućnost uticaja i lokalnih činilaca u kostnoj srži bolesnika. Njegova znatno ređa pojava kod bolesnika sa leukemijom je rezultat supresije funkcije imunskog sistema bolesnika. Prevencija ovih efekata, među ostalima, podrazumeva terapijsku primenu filtrovanih (leukodeplecija) hemoprodukata pre transplantacije (2–4, 52).

U etiopatogenezi GvHD, najbitniju ulogu imaju davaočevi funkcionalno očuvani limfociti T, u sadejstvu sa drugim imunokompetentnim efektorskim ćelijama i brojnim citokinima. Uz to, nastanku bolesti svakako može doprineti kombinovani deficit funkcije imunskog sistema primaoca, prvenstveno deficit funkcije limfocita B, što povlači sa sobom neefikasnost u eliminisanju određenih stranih antigena specifičnih za transplantirane ćelije. Prema mišljenju nekih, od značaja je i smanjena aktivnost timusa primaoca – zbog čega je učestalost GvHD kod starijih osoba veća. U zavisnosti od vremena ispoljavanja, etiopatogeneze, ciljnih tkiva, kliničke slike i ishoda – razlikuju se akutni i hronični GvHD. Akutni GvHD (aGvHD) se javlja u prvih

100 dana nakon alogene transplantacija MĆ hematopoeze. U slučaju alogene transplantacije MĆ hematopoeze od srodnog HLA identičnog davaoca incidenca aGvHD iznosi 30–60%. Ciljna tkiva su koža, gastrointestinalni sistem, jetra i hematopoezni organi. Bolest ima četiri stepena, zavisno od broja i intenziteta zahvaćenosti pojedinih tkiva i organa (4, 68–70): a) prvi, sa kožnim lezijama (na primer, difuzni eritem), ali bez oštećenja jetre i gastrointestinalnog sistema; b) drugi, sa eritemom, makulama i bulama kože sa znacima oštećenja jetre i umerenom dijarejom; c) treći, sa teškim kožnim lezijama (javlja se i nekroza) i bitnim patološkim promenama u jetri i celom digestivnom sistemu uz pojavu pancitopenije; d) četvrti, sa simptomima i znacima trećeg stepena uz veoma narušeno stanje bolesnika.

Mere prevencije GvHD obuhvataju redukciju broja svih ili određenih subpopulacija limfocita T u suspenziji MĆ hematopoeze, zatim upotrebu antitimocitnog globulina (ATG) u kondicioniranju, uz post-transplantacijsku imunosupresivnu terapiju kod bolesnika (2). Najčešće korišćena post-transplantacijska imunosupresivna terapija u prevenciji GvHD je kombinacija ciklosporina A, metotreksata sa ili bez dodatka metilprednizolona. Ovako sprovedenom prevencijom učestalost GvHD je smanjena za 20–30%. Kao prva linija u lečenju aGvHD primenjuju se kortikosteroidi u dozi od 2–5 mg/kg telesne mase bolesnika, tokom 7–10 dana. Ukoliko izostane željeni terapijski odgovor, bolest se svrstava u "kortikosteroid–rezistentni" GvHD (30–60% lečenih), a u daljem toku se primenjuje druga terapijska linija koju čine ATG, anti CD3 antitela, anti IL–2R antitela. Uprkos primenjenoj terapiji, u slučaju intenzivnog stepena aGvHD (stepen 4) smrtnost iznosi i 30–60% (2–4).

Hronični GvHD se javlja nakon 100 dana od transplantacije, a uz infekcije predstavlja glavni uzrok morbiditeta i mortaliteta kod dugoživećih bolesnika nakon alogene transplantacije MĆ hematopoeze. Sa porastom broja alogenih transplantacija, kako od podudarnih, tako i od nepotpuno podudarnih, srodnih ili nesrodnih davaoca, posebno sa izvorom MĆ hematopoeze iz periferne krvi, raste i incidenca hroničnog GvHD. Uopšteno, ona iznosi od 30–80% dugoživećih bolesnika. Po etiopatogenetskoj osnovi i kliničkim manifestacijama hronični GvHD je model indukovane autoimunske systemske bolesti vezivnog tkiva. Centralnu ulogu u etiopatogenezi hroničnog GvHD čini reaktivnost donorskih limfocita T, uz prevagu T<sub>H</sub>2 citokina i disregulaciju limfocita B sa posledičnom abnormalnom produkcijom autoantitela na ciljane antigene različitih tkiva i organa. Hronični GvHD se manifestuje različitim stepenom kožnih lezija, promenama na vidljivim sluznicama (najčešće oblika bukalnog mukozitisa i



keratokonjunktivitisa), sicca sindromima, poliserozitisom, gastrointestinalnim i hepatičnim poremećajem, opstruktivnom bolešću pluća, opštom slabošću i drugim (2–4).

Prema stepenu proširenosti lezija hronični GvHD se deli na limitiranu i ekstenzivnu formu, a prema stepenu aktivnosti postoje dva oblika hroničnog GvHD – inaktivna i aktivna forma, koja zahteva lečenje. Terapija hroničnog GvHD obuhvata primenu brojnih imunosupresivnih, imunomodulacijskih i antiangiogenih agenasa, kao što su: kortikosteroidi, ciklosporin A, azathioprin, cyclophosphamid, thalidomid, FK-506, mikofenolat-mofetil, ekstrakorporalna fotoforeza, PUVA, antitela protiv faktora nekroze tumora alfa (anti-TNF- $\alpha$ ) i anti-CD20 (4).

Treba istaći da počev od pripremne faze transplantacije, hemoprodukti namenjeni suportivnom lečenju bolesnika treba da budu ozračeni gama zracima (u dozi od 25 Gy po jedinici), uz redukciju broja i/ili inaktivaciju leukocita. Leukodeplecija se postiže fitrovanjem hemoprodukata (koncentrovani eritrociti i trombociti) – pri čemu, stepen leukodeplecije treba da iznosi  $\geq 3-4$  Log radi prevencije alosenzibilizacije i transfuzijom udružene bolesti kalema protiv domaćina TA-GvHD. Inaktivacija leukocita (ali i patogena, potencijalno prisutnih u hemoproduktima, se dodatno postiže ultravioletnim ozračivanjem, uz korišćenje nekog fotosenzitišućeg sredstva (2–4). Kod nekih imunosuprimovanih bolesnika, ipak, može da se razvije TA-GvHD. To je veoma teška komplikacija i neretko vodi letalnom ishodu. Kožne manifestacije TA-GvHD kod našeg bolesnika posle transplantacije MĆ prikazane su u slici 9.



**Slika 9.** Bolesnik sa teškim oblikom TA-GvHD i letalnim ishodom

Oportunističke i ostale infekcije kod bolesnika lečenih transplantacijom MĆ hematopoeze, zbog suprimovanog imunskog sistema i agranulocitoze, često su uzrok porasta učestalosti transfuzijom udruženog morbiditeta (TRM). Njihov razvoj se može povezati i sa postojanjem GvHD, u kojoj je teško narušena kožna i gastrointestinalna barijera bolesnika. Obično, u ranom posttransplantacijskom periodu se javljaju bakterijske i gljivične infekcije, a potom virusne (najčešće izazvane citomegalovirusom) infekcije (2–4, 51, 59–64).

Od ostalih nepovoljnih efekata transplantacije MĆ, najčešće se javljaju hemoragijski cistitis, zatim venookluzivna bolest (naročito kod bolesnika sa oštećenom funkcijom jetre), miokardiopatija, leukoencefalopatija, herpes zoster, katarakta i sterilnost. Ovi nepovoljni efekti se, po pravilu, javljaju kao posledica intenzivne hemioterapije i smanjene funkcije imunskog sistema bolesnika i takođe mogu doprineti porastu učestalosti TRM, ali i mortaliteta.

### **Prilagođene/inovativne transplantacije matičnih ćelija**

Prvobitni koncept transplantacije MĆ je podrazumevao primenu visokih (letalnih) doza hemio-radioterapije za kontrolu bolesti (eradikaciju klona malignih ćelija), praktično uz destrukciju i imunskog sistema primaoca. Transplantirane MĆ služile su samo kao potpora ("resuscitacija" mijeloablacijskog stanja) za repopulaciju KS i rekonstrukciju hematopoeze bolesnika. Međutim, primena ovih intenzivnih kondicionih režima pri transplantaciji je praćena visokom incidencom TRM ( $\geq 30\%$ ) zbog jatrogene aplazije KS ili usled toksičnog oštećenja parenhimskih organa. Zato, alogene transplantacije su do skora bile rezervisane samo za bolesnike mlađeg uzrasta i zadovoljavajućeg (relativno dobrog) opšteg stanja (2–4).

Tokom daljeg razvoja transplantacijske medicine, sagledana je i mogućnost primene i delovanja alogenih imunokompetentnih ćelija poreklom iz kalema (2, 71–74). Tako, uočeno je pokretanje niza kaskadnih imunski-posredovanih reakcija, čiji je kranji rezultat bio ispoljavanje efekata, označenog kao kalem protiv leukemije ili tumora (Graft versus Leukemia / Tumor – GvL/T), sa sledstvenom prevencijom recidiva maligne bolesti. Uočeno je da inicijalni

intenzivni kondicioni režimi nisu "dovoljni" za dugotrajnu kontrolu maligne bolesti – učestalost relapsa leukemija posle transplantacije iznosio je i do 50%. Pored toga, kliničke studije tokom proteklih decenija su pokazale da boljoj kontroli maligne bolesti (osim kondicionog režima) mogu doprineti i imunski mehanizmi (GvL). To potvrđuju i sledeće činjenice: a) veća učestalost relapsa posle singene transplantacije i b) manji rizik od recidiva bolesti kod bolesnika sa određenim stepenom hroničnog GvHD. Naime, za nastanak efekta GvL/T odgovorni su limfociti T, NK ćelije i citokini, slično kao kod GvHD, ali su "target" antigeni u ovom slučaju na malignim ćelijama (4, 71–74).

Tokom predhodnih decenija uvedeni su novi kondicioni režimi redukovano intenziteta (RIC) sa "nemijeloablativnom" pripremom za transplantaciju MĆ. Primena RIC protokola omogućava izvođenje alogene transplantacije kod starijih bolesnika i/ili kod onih sa komorbiditetom. Dodatni cilj primene RIC je brža rekonstitucija donorskih imunokompetentnih limfocita T, odnosno stvaranje ravnoteže između davaočevog i primaočevog imunskog sistema – što vodi fenomenu "mešanog himerizma". Upravo mešani himerizam nastao nakon alogene transplantacije je pogodna osnova za dalje imunski-posredovane terapijske pristupe (prekid post-transplantacijske imunosupresivne terapije ili primena donor specifičnih limfocita), a sa ciljem stvaranja "kompletnog donorskog himerizma", a time i uslova za efikasniju eradikaciju malignog klona. Preliminarni rezultati primene alogene transplantacije MĆ uz RIC su ohrabrujući, a efikasnost zavisi od prirode osnovne bolesti. Takođe je potvrđeno da je izvođenje ove vrste transplantacije u prednosti nad klasičnom mijeloablativnom transplantacijom – zbog mogućnosti obnove primaočeve hematopoeze u slučaju odbacivanja kalema, manje učestalosti intenzivnog stepana aGvHD i infekcija (2–4).

### **Transplantacija MĆ nepodudarnih u sitemu ABO**

Antigeni ABO/H zajedno sa prirodno prisutnim komplementarnim antitelima (anti-A i anti-B, klase IgM i IgG) karakterišu tkivno/krvno grupni sistem ABO/H (u daljem tekstu: sistem ABO). Ovi antigeni u strukturi eritrocitne membrane i tkivima pripadaju liposolubilnim, a u većini telesnih tečnosti hidrosolubilnim grupnospecifičnim supstancama. Na hromozomu 9 su

lokalizovani odgovajući geni za regulaciju ekspresije antigena ABO. Oni kodiraju tri glikoziltransferaze, regulatore vezivanja specifičnog imunodominantnog monosaharida (glikozilacija) – fukoze, N-acetil-galaktozamina i galaktoze na osnovni lanac antigena. Krajnji ishod ovog procesa je formiranje četiri krvne grupe A, B, AB i O (4, 7).

Podudarnost u glavnom histokompatibilnom sistemu, odnosno sistemu HLA je od presudnog značaja za uspešnost alogene transplantacije MĆ. Suprotno, kao što je već rečeno, ABO-inkompatibilnost primaoca i davaoca prisutna je u oko jedne trećine od ukupnog broja transplantacija. Opisane su tri vrste ABO-inkompatibilnosti – major, minor i kombinovana bidirekcijska ili major/minor (4, 75–95).

O major ABO-inkompatibilnosti (na primer, primalac O, a davalac B) se govori kada primalac u svojoj cirkulaciji ima prirodno prisutna antitela anti-A/B. O sličnoj grupi (major) inkompatibilnosti se govori kada su prisutna neka druga iregularna imunska antitela – kao što su anti-D iz sistema Rhesus ili anti-K iz sistema Kell – u plazmi primaoca usmerena protiv antigena koja se nalaze na membrani eritrocita davaoca. Ukoliko su njihov titar i aviditet "klinički značajni", potrebno ih je otkloniti ili barem redukovati njihov plazmatski sadržaj izmenama plazme (4, 7, 95).

Priprema suspenzije MĆ za transplantaciju u slučaju ABO-inkompatibilne transplantacije podrazumeva otklanjanje/redukciju eritrocita (procesiranjem) iz aspirata. Znači, ova procedura se odnosi na prečišćavanje MĆ uzetih aspiracijama iz kostne srži, jer prikupljanje MĆ iz periferne krvi pomoću separatora krvnih ćelija podrazumeva automatizovano maksimalno smanjenje broja eritrocita u ćelijskoj suspenziji. Primaoci krvne grupe O koji dobijaju MĆ od osobe krvne grupe A mogu da nastave sa stvaranjem anti-A i anti-B antitela u post-transplantacijskom periodu i do narednih tri do četiri meseca (ponekad i duže) (4, 7, 22–26, 95).

Većina autora smatra da major ABO-inkompatibilnost ne utiče na oporavak hematopoeze procenjenog na osnovu postizanja željenog kritičnog broja ("praga") granulocita i trombocita (4, 75–94). Eritrocitni oporavak može biti usporen, iznosi  $\geq 40$  dana posle transplantacije MĆ. Prisustvo, na primer, antitela anti-A ili anti-B može da uspori proces eritrocitopoeze (odloženo stvaranje eritrocita krvne grupe A ili B), ali tek u završnoj fazi ovog procesa, jer na progenitorima (BFU-E i CFU-E) još nisu eksprimovani antigeni ABO. Potpora primaoca eritrocitima se izvodi prema postojećim preporukama

(prikazano u kasnijem delu teksta – slika 10), iako neki autori uvek predlažu primenu eritrocita krvne grupe O da bi se izbegle konfuzije (2, 4, 7, 95).

Naši rezultati (2, 4) pokazuju da je za održavanje hemoglobina na vrednostima 80–100 g/L posle transplantacije MĆ, potrebno bilo transfundovati 2–6 jedinica eritrocita, u zavisnosti od vrste i stadijuma osnovnog oboljenja i izvora MĆ. Istina, primaoci ABO-inkompatibilnih (major) transplantacija zahtevali su nešto veći broj transfuzija eritrocita u poređenju sa primaocima ABO-kompatibilnih MĆ (tabela 2).

Tabela 2.

### Potencijalne komplikacije posle ABO-inkompatibilne transplantacije MĆ







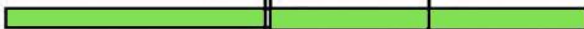






ABO-inkompatibilnost	POSLEDICE I KOMPLIKACIJE
<b>Minor</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- odložena hemolizna reakcija</li> <li>- povećan rizik nastanka GvHD</li> </ul>
<b>Major</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- intenzivna neposredna hemolizna reakcija</li> <li>- kasniji oporavak eritrocitopoeze</li> <li>- odložena hemolizna reakcija (retko)</li> <li>- čista eritrocitna aplazija</li> <li>-transplantacijom udružena mikroangiopatija</li> </ul>
<b>Bidirekcijska</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- neposredna i odložena hemolizna reakcija</li> <li>- kasniji oporavak eritrocitopoeze</li> <li>- smanjeno prosečno preživljavanje</li> <li>- čista eritrocitna aplazija</li> <li>- povećan rizik nastanka GvHD</li> </ul>



Minor ABO-inkompatibilnost (na primer, primalac B i davalac O) je stanje kada se u davaočevoj plazmi, tako i u suspenziji prikupljenih MĆ, nalaze antitela, anti-A/anti-B usmerena protiv antigena primaočevih eritrocita. Pre ubrizgavanja aspirata, poželjno je redukovati količinu plazme, a time i antitela procesiranjem (slika 8). Cilj takve procedure je da se izbegne unošenje inkompatibilnih antitela u krvotok primaoca. U suprotnom, transplantacija bi mogla rezultovati blažim oblikom imunske hemolize. Ona se obično manifestuje počev od 7–10 dana posle transplantacije i traje oko dve naredne nedelje. To obično nije posledica pasivnog unošenja inkompatibilnih antitela, nego njihove naknadne produkcije *in vivo* od strane donorskih limfocita B. Zbog toga, minor ABO-inkompatibilnost je udružena sa većim rizikom od hemolize, ako je broj limfocita B veći u suspenziji MĆ (2, 4, 7, 95). Hemolizna reakcija posle ABO-inkompatibilne transplantacije

MĆ može biti uzrokovana postojećim ili naknadno stvorenim aloreaktivnim antitelima. Zavisno od toga kada se manifestuju, one su razvrstane u neposredne ili odložene reakcije. Od imunohematoloških nalaza, karakterističan je pozitivni direktni antiglobulinski test (DAT). Laboratorijski može biti potvrđen nalaz hemoglobinemije i eventualno hemoglobinurije. Međutim, kod oko 30% takvih bolesnika, uprkos pozitivnom nalazu DAT, ne postoje klinički manifestni, niti laboratorijski detektibilni znaci hemolize. Plazma ili hemoprodukti sa većom količinom plazme tokom sledstvenih transfuzija treba da budu kompatibilne. Po nekim preporukama, bolesnicima lečenim minor ABO-inkompatibilnim transplantacijama treba dati plazmu grupe AB. Najzad, eritrociti pripremljeni tokom transfuzijske potpore treba da budu krvne grupe davaoca (4, 7, 67, 90).

Najzad, major/minor ili bidirekcijska inkompatibilnost ABO (na primer, primalac B, dok je davalac A) predstavlja kombinaciju opisane major i minor inkompatibilnosti, a time predstavlja rizik za primaoca zbog mogućeg razvoja različitih imunski posredovanih reakcija i komplikacija "domaćin protiv kalema" i "kalem protiv domaćina" (4, 7, 95).

Tokom potporne hemoterapije posle ABO-inkompatibilnih transplantacija, postoje specifičnosti koje treba poštovati radi prevencije sporednih efekata/komplikacija (2–4, 95–99). Kod major inkompatibilnosti potrebno je transfundovati eritrocite krvne grupe primaoca dok su primaočeva antitela (anti-A/B) detektabilna u cirkulaciji i dok se rezultat DAT ne "negativizuje". Plazma i hemoprodukti koji sadrže veće količine plazme (koncentrovani trombociti) treba da budu krvne grupe davaoca, da ne bi došlo do pasivnog prenosa "inkompatibilnih" antitela anti-A/anti-B (slika 10).

VRSTA	TRANSPLANTACIJA		I	II
<b>MAJOR</b>				
Eritrociti				
Pl i Tr				
<b>MINOR</b>				
Eritrociti				
Pl i Tr				
<b>MAJOR/MINOR</b>				
Eritrociti	 O			
Pl i Tr	 AB			

 — PRIMALAC SPECIFIČNI  
 — DONOR SPECIFIČNI

**I** — nedetektabilna originalna antitela  
**II** — nedetektabilni originalni eritrociti

### **Slika 10.** Supstitucijska hemoterapija kod ABO-inkompatibilnih transplantacija

Suprotno tome, posle minor inkompatibilne transplantacije MĆ, treba transfundovati eritrocite davaočeve krvne grupe, odnosno plazmatske produkte i trombocite krvne grupe primaoca – dok prvobitni (sopstveni) eritrociti ne "iščeznu" iz krvotoka. Na kraju, bolesnicima lečenim major/minor ABO-inkompatibilnom transplantacijom MĆ treba transfundovati eritrocite krvne grupe O dok su im detektabilna prvobitna aloantitela, odnosno plazmatske produkte i trombocite grupe AB dok su u njihovoj cirkulaciji detektabilni prvobitni (sopstveni) eritrociti (2–4, 95–99).

Opisane su mogućnosti i ograničenja, odnosno dijagnostički i/ili prediktivni značaj specifičnih imunohematoloških ispitivanja posle transplantacija ABO-inkompatibilnih MĆ, čiji je cilj utvrđivanje prihvatanja/odbacivanja ABO-inkompatibilnih ili ABO-kompatibilnih MĆ (95, 100–104). Principi koji važe za ova testiranja, sa posebnim osvrtom na utvrđivanje ekspresije recipijent/donor specifičnih eritrocitnih antigena, biće detaljno opisani i prodiskutovani u kasnijem delu teksta.

### **Značaj istraživanja**

Ukoliko se uzima u obzir nemerljiv značaj transplantacije MĆ u lečenju bolesnika sa hematološkim bolestima, a da problemi vezani za uvođenje jednog opštevažećeg peritransplantacijskog protokola kod postojanja imunske barijere u sistemu ABO između potencijalnog davaoca i primaoca još uvek nisu u potpunosti rešeni – svako istraživanje koje može rezultovati poboljšanjima u kliničkom ishodu tretmana, kao i dugo-vremenskim prihvatanjem ABO-inkompatibilnog alokalema je opravdano. Poseban značaj ovog ispitivanja ogleda se u tome što se oporavak, kao i pojava neposrednih i/ili odloženih komplikacija transplantiranog bolesnika, mogu pratiti na osnovu različitih imunohematoloških i citogenetskih markera i sam ishod procedure pretpostaviti analizirajući sve podatke.

Moguće je tvrditi da je transplantacija ABO-inkompatibilnih MĆ veoma obećavajuća terapijska alternativa za bolesnike kojima je lečenje tim ćelijama indikovano i kada ne stoji na raspolaganju ABO kompatibilni davalac. Uvođenje i/ili usavršavanje novih – efikasnih, sigurnih – postupaka redukcije ne samo inkompatibilnih eritrocita, već i otklanjanja

aloantitela iz cirkulacije bolesnika, a time i poboljšanje uslova za dugotrajno i kompletno prihvatanje transplantata i prevencija imunski posredovanih komplikacija, nameću se kao imperativ.



## Hipoteza

Ako se ima u vidu nemerljiv značaj transplantacija MĆ u tretmanu bolesnika sa različitim malignim hemopatijama i nekim drugim poremećajima, i ako je, pri tome poznato da problemi vezani za izvođenje transplantacija, posebno ABO-inkompatibilnih još uvek nisu u potpunosti rešeni, svako istraživanje koje može rezultovati optimiziranom kinetikom i potpunim prihvatanjem presađenih MĆ i boljim opštim oporavkom, odnosno kvalitetnijim životom bolesnika je etički opravdano.

Na osnovu zakonitosti transplantacijske imunologije, sopstvenih iskustava vezanih za prikupljanje, *ex vivo* manipulisanje i terapijsku primenu MĆ, realno je postaviti sledeću radnu hipotezu:

- primenom sopstvenog afereznog protokola za prikupljanje MĆ i redukcijom aloantitela anti-A/B u cirkulaciji primaoca izmenom plazme biće sprečena pojava neposredne hemolizne reakcije,
- procesiranjem aspirata kostne srži po originalnoj proceduri i primenom adekvatne post-transplantacijske imunosupresije biće obezbeđeno brzo i kompletno prihvatanje ABO-inkompatibilnih MĆ po ne sporijoj kinetici i u ne manjem stepenu u poređenju sa ABO-kompatibilnim MĆ, uz efikasnu prevenciju potencijalnih imunski-posredovanih komplikacija.

## Ciljevi istraživanja

Osnovni cilj ovog istraživanja je uvođenje i usavršavanje *ex vivo* i *in vivo* peri-transplantacijskih manipulacija/postupaka kod transplantacije ABO-inkompatibilnih MĆ, sa posebnim osvrtom na efikasnost i sigurnost takvih protokola. Za proveru navedene radne hipoteze postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

- odrediti uticaj izvora matičnih ćelija i genske podudarnosti na kinetiku prihvatanja alokalema – repopulacija kostne srži i dinamika uspostavljanja donor-specifične hematopoeze;
- ispitati vrstu i stepen himerizma metodom semikvantitativne hemofenotipizacije u čvrstoj fazi (upotreba tehnike krvnogrupnih kartica sa mikrokuglicama), uz određivanje citogenetskih markera u cilju potvrde prihvatanja alokalema;
- utvrditi učestalost i vrstu imunski-posredovanih komplikacija transplantacija – kao što su hemolizna reakcija, odloženo prihvatanje alokalema, akutni i hronični GvHD, relaps bolesti;
- analizirati međusobnu povezanost ispitivanih parametara (prihvatanje alokalema vs. pojava komplikacija) i korelaciju tih parametara sa kliničkom slikom, tokom i preživljavanjem bolesnika lečenih transplantacijom MĆ.

## **Materijal i metodi istraživačkog rada**

### **Dizajn istraživanja**

Istraživanje je obavljeno po tipu kombinovane retrospektivno-prospektivne kliničko-laboratorijske studije u kojoj je ukupno ispitivano 202 bolesnika, lečenih različitim modalitetima alogene transplantacije MĆ.

Ova studija je podrazumevala preklinička ispitivanja efikasnosti *ex vivo* procedura procesiranja suspenzije prikupljenih ćelija i izvođenje kliničke studije sa pretežno prospektivnom grupom bolesnika (n = 62) kojima su transplantirane ABO-inkompatibilne major, minor ili major/minor ABO-inkompatibilne MĆ. Kontrolnu grupu je činila većim delom retrospektivna grupa bolesnika (n = 140) koji su lečeni alotransplantacijom MĆ od donora iste krvne grupe u sistemu ABO.

### **Obeležja posmatranja**

Procena i praćenje prihvatanja alokalema i remisije bolesti je izvedena na osnovu ispitivanja i determinisanja određenih pokazatelja i markera kod bolesnika posle alogene transplantacije MĆ.

- Hematološki oporavak – kvantifikacija parametara hemograma (analiza krvne slike sa leukocitarnom formulom) – je obavljena u Institutu za medicinsku biohemiju VMA.

- Medularna i citogenetska remisija – praćenje promena u celularnosti kostne srži i utvrđivanje citogenetskih markera (npr. "Philadelphia" i polni hromozom) – su obavljani u Citološkoj laboratoriji Instituta za patologiju i sudsku medicinu VMA.
- Imunohematološki status/konverzija – kvalitativna i semikvantitativna testiranja eritrocitnih antigena, odnosno prisustvo recipijent i/ili donor specifičnih antitela (IgG i IgM) izvedena su u Institutu za transfuziologiju i hemobiologiju VMA.
- Klinički tok/ishod – praćenje opšteg stanja transplantiranog bolesnika (generalno poboljšanje ili gubitak određenih simptoma vezanih za osnovnu bolest) i kliničke remisije bili su izvedeni na Klinici za hematologiju VMA.

Transplantacija ABO-inkompatibilnih MĆ, uz izvođenje procedura *ex vivo* manipulacije ćelijske suspenzije, kao i primena specifičnog imunomodulacijskog protokola su odobreni od strane Etičkog komiteta VMA.

## Bolesnici i laboratorijska ispitivanja

U ovo istraživanje uključeni su bolesnici sa različitim hematološkim oboljenjima i poremećajima, oba pola, uzrasta od 9 do 58 godina koji su tretirani različitim modalitetima alogene transplantacije MĆ (tabela 3).

Tabela 3.

### Bolesnici lečeni alogenom transplantacijom MĆ

PARAMETRI	BROJ BOLESNIKA	
POL	Muški	125
	Ženski	77
TRANSPLANTACIJA	ABO-kompatibilna	140
	ABO-inkompatibilna	62
	Major	23
TIP INKOMPATIBILNOSTI	Minor	30
	Bidirekcijske	9
<b>UKUPNO</b>		<b>202</b>

Kao što je to u tabeli 4. prikazano, oni su bolovali od različitih benignih i malignih bolesti: teške aplastične anemije (SAA), hronične mijeloidne leukemije (CML), akutne mijeloidne leukemije (AML), akutne limfoblastne leukemije (ALL), mijelodisplaznog sindroma (MDS), multiplog mijeloma (MM), ekstramedularne AML ili granulocitnog sarkoma i limfoma (Non-Hodgkinov limfom – NHL; Hodgkinova bolest – HD).

Tabela 4.

**Bolesnici sa različitim dijagnozama lečeni transplantacijom MĆ**

<b>DIJAGNOZA</b>	<b>BROJ BOLESNIKA</b>
<b>Teška aplastična anemija</b>	26
<b>LEUKEMIJE</b>	
<b>AML</b>	57
<b>Granulocitni sarkom</b>	3
<b>ALL</b>	65
<b>CML</b>	34
<b>LIMFOMI</b>	
<b>NHL</b>	1
<b>HD</b>	2
<b>Mijelodisplazni sindrom</b>	10
<b>Multipli mijelom</b>	4
<b>UKUPNO</b>	<b>202</b>

Pripremni (kondicioni) režimi su bili prilagođeni prirodi osnovne bolesti – pri čemu, u slučaju akutnih i hroničnih leukemija pripremni režim je bio kombinacija busulphana (16 mg/kgtm per os tokom 4 dana) i cyclophosphamida (120 mg/m<sup>2</sup> tokom dva dana), kod SAA kombinacija cyclophosphamida (200 mg/m<sup>2</sup> tokom četiri dana) i ATG (3,75 mg/kgtm/dan tokom pet dana), a kod MM visoke doze melphalana (200 mg/m<sup>2</sup> tokom jednog dana) ili kombinacija standardnog protokola "busulphan-cyclophosphamid 2", uz jednokratnu primenu melphalana u dozi 140 mg/m<sup>2</sup>.

Tokom ovih transplantacija date su MĆ prikupljene od srodnih i nesrodnih (Matched Unrelated Donor – MUD) davalaca – videti tabelu 5.

Tabela 5.

**Izvor matičnih ćelija hematopoeze**

<b>TRANSPLANTACIJE/IZVOR</b>	<b>KOSTNA SRŽ</b>	<b>PERIFERNA KRV</b>	<b>UKUPNO</b>
<b>Srodne</b>	72	90	162
<b>Nesrodne</b>	5	35	40
<b>UKUPNO ALOGENIH</b>	77	125	202

Kao što je prikazano, srodni (porodični) davaoci su korišćeni kod oko 75% transplantacija. Prilikom MUD transplantacija, davaoci (n = 40; u pet slučajeva izvor MĆ je bila kostna srž) koji su odabrani iz Svetskog registra davalaca kostne srži (BMDW) i bili su potpuno podudarni u sistemu HLA-DR. Oni su ispunili sve opštevažne kriterijume za davaoce krvi (sem uzrasta), a bili su klinički i laboratorijski potvrđeno zdravi. Razlike donora/recipijenta po krvnogrpnim sistemima eritrocita nisu predstavljale kontraindikaciju za izvođenje transplantacije MĆ.

Kada je izvor MĆ bila kostna srž (n = 77), uzimanje aspirata obavljeno je u hirurškoj sali u opštoj anesteziji davaoca iz zadnjeg, a po potrebi i prednjeg grebena bedrene kosti, a samo u izuzetnim slučajevima i iz sternuma. Kod većeg broja transplantacija (n = 125) izvor MĆ je bila periferna krv posle petodnevne mobilizacije rekombinantnim humanim faktorom rasta granulocitopoeze (rHuG-CSF; doza = 5–12 µg/kg/dan). Prethodno profiltrovana i po potrebi procesirana (aspirat) ili "nativna" (harvest iz periferne krvi) suspenzija MĆ infundovana je kroz centralnovenski kateter neposredno po prikupljanju, uz specifičnu imunoprofilaksnu premedikaciju primaoca i forsiranu diurezu.

Neposredni laboratorijski monitoring hemograma, biohemizma i imunskih markera obavljani su dva sata po izvedenoj transplantaciji, a potom jednom dnevno u posttransplantacijskom periodu. Prihvatanje alogenog kalema objektivizirano je dostupnim, standardnim tehnikama – na osnovu parametara krvne slike (neutrofili  $\geq 0,5 \times 10^9/L$  i trombociti  $\geq 20 \times 10^9/L$  tokom tri uzastopna dana), zatim celularnosti kostne srži, uz citogenetske (citogenetski marker bolesti, polni hromozom) ili imunohepatološke analize

(eritrocitni fenotip) stepena himerizma. S tim u vezi, imunoematološki, medularni i citogenetski markeri prihvatanja alokalema testirani su 28. dana posle transplantacije, a potom po potrebi.

U cilju medikamentozne prevencije GvHD data je trojna imunosupresivna terapija po tzv. standardnom (ili "shorte") Seattle protokolu. Primenjen je sledeći "timing" ove imunosupresivne terapije: 1) methotrexat + prvog, + trećeg, + šestog i + jedanaestog dana; 2) ciklosporin A od - prvog do + 180. dana; 3) methylprednisolon od + sedmog do +28. dana. Dijagnostika i stepenovanje akutnog i hroničnog GvHD vršeni su opšteprihvaćenim metodama. Prevencija mogućih vidova infekcije (virusnih, gljivičnih, pneumocystis carini) je sprovedena redovnom primenom antimikrobnih agenasa (acyclovir, fluconazol, trimethoprim – sulphometoxazol) uz intravenske imunoglobuline (tipa 7S).

Prevencija imunski-posredovanih komplikacija hemoterapije obavljena je primenom filtrovanih i ozračenih (gama zraci; doza = 25 Gy / jedinica) produkata od krvi. Prilikom suportivne hemoterapije, kod major i bidirekcijske ABO–inkompatibilnosti transfundovani su eritrociti krvne grupe O u neposrednom posttransplantacijskom periodu, a posle prihvatanja alokalema donor-specifični eritrociti. Ostali dati hemoprodukti (plazma i koncentrovani trombociti) su bili krvne grupe AB ili odabrani na osnovu vrste ABO-inkompatibilije i prisustva specifičnih aloantitela u njima, a u skladu sa preporukama prikazanim u slici 10.

## **Imunoematološka ispitivanja**

Generalno, uzorci krvi bolesnika uzimani i ispitivani su u sve tri faze transplantacije. U prvoj fazi ili pre-transplantacijskom periodu (obrada bolesnika i davaoca) kod svih osoba ispitivani su eritrocitni fenotipovi ABO i sistema Rhesus, Kell, Kidd, P, MNS, Duffy i Lewis (u daljem tekstu: ostali sistemi), kao i indirektni antiglobulinski test (IAT), uz DAT. Kod major ABO-inkompatibilnosti, ispitivan je primaočev titar aloantitela anti-A/B korišćenjem donorskih eritrocita radi donošenja odluke o izvođenju izmene plazme (željeni titar  $\leq 16$ ). U drugoj fazi ili peri-transplantacijskom periodu praćeni su DAT i IAT dva sata i 24 sata posle transplantacije

MĆ. Najzad, u trećem ili post-transplantacijskom periodu za vreme aplazije, bolesnicima su pripremani odgovarajući kompatibilni eritrociti koji su se, po mogućnosti, razlikovali po nekom ili više antigenskih markera od fenotipa primaoca. Time je omogućeno praćenje nestanka transfundovanih ćelija iz cirkulacije, uz imunohematološko praćenje markera prihvatanja alokalema. U ovom periodu ispitivan je titar (ili nestanak) antitela u plazmi primaoca jer konverzija krvne grupe podrazumeva i stvaranje donor-specifičnih limfocita B i njima svojstvenih (specifičnih) antitela anti-A/B.

Uzorci krvi (primaoca, davaoca MĆ i davalaca eritrocita za suportivni tretman) uzeti su u epruvete od 3 mL sa etilen-diamin-tetra-acetatnom kiselinom (EDTA; Venosafe, Terumo) za hemofenotipizaciju (ABO i ostalih sistema), zatim ispitivanje IAT i DAT. Za IAT i ispitivanje titra prirodno prisutnih i imunskih antitela bio korišćen serum, tj. krv uzeta u epruveti bez antikoagulansa (Venosafe, Terumo) u zapremini od 9 mL. Korišćeni test eritrociti bili su optimizirani (3–5% ćelijska suspenzija u 0,9% rastvoru NaCl) za rad pomoću krvnogrupnih kartica (Ortho-Clinical Diagnostics, USA).

Antihuman-globulinsko (AHG) testiranje u ovom istraživanju dizajnirano je tako da se izvodi primenom kartica sa mikrokuglicama (Ortho-Bio-Vue Sistem, USA) u rastvoru niskog jonskog napona (BLISS), uz korišćenje inkubatora i centrifuge Ortho-Bio-Vue Systema. Ove kartice su fabrički pripremljene tako da svaka kolona sadrži AHG reagens za jedno testiranje.

Osnovni cilj izvođenja DAT je bio ispitivanje prisustva eritrocitnih antitela klase IgG i IgM ili njihovih kompleksa sa komponentama komplementa, a koji su vezani za specifične membranske receptore eritrocita. Procedura testiranja DAT izvedena je po uputstvu proizvođača, a u skladu sa modifikacijama naše Laboratorije za imunohematologiju sa imunogenetikom – koje su ranije detaljno opisane (104). Kod pozitivnog rezultata test je ponovljen na kartici sa monospecifičnim reagensima anti-IgG i anti-C3b, anti-C3d (DAT kartica) Ortho-Bio-Vue Sistema. Vezana antitela klase IgG su analizirana (ispitivana) naknadno iz eluata, posle njihovog izolovanja sa membrane eritrocita nekom od dostupnih procedura elucije (kiselinom, hloroformom, hlorokvinom ili toplotom).

Cilj izvođenja IAT je bio ispitivanje prisustva slobodnih eritrocitnih antitela takođe obe klase (IgG i IgM) ili kompleksa antitela i komponenti komplementa, koje se nalaze u plazmi, odnosno serumu bolesnika. Ispitivanje je obavljeno pomoću kartice Poly/Neutral



Ortho-Bio-Vue Sistema – sa šest kolona (u prve tri nalazi se polyspecifični AHG, a u preostale tri neutralni rastvor sa bovinim albuminom, makro-molekulskim potencijatorima reakcije, natrijum azidom i EDTA). Primenjena je ranije detaljno opisana procedura testiranja (104). Što se interpretacije rezultata tiče, odsustvo aglutinacije ili hemolize eritrocita je tumačen kao negativan rezultat. O pozitivnom rezultatu se govorilo kada je postojala vidljiva aglutinacija eritrocita ili hemoliza, sa ili bez aglutinacije. Opisani su različiti stepeni intenziteta aglutinacije:

- reakcija 4+ = aglutinirani eritrociti formirali su nakupine na vrhu kuglica u koloni;
- reakcija 3+ = većina aglutiniranih eritrocita bila je zadržana u gornjoj polovini kolone;
- reakcija 2+ = aglutinirani eritrociti su viđeni celom dužinom kroz kolonu;
- reakcija 1+ = većina aglutiniranih eritrocita je zadržana u donjoj polovini kolone;
- reakcija 0,5+ = većina eritrocita je prolazila kroz kolonu i formirala je razbijeno (ne ravno) dugme na dnu kolone;
- reakcija negativan ili 0 = kada su svi eritrociti prolazili kroz kolonu, formirajući ravno (glatko) dugme na dnu kolone.

Prisustvo iregularnih (prirodnih i imunskih) antitela je ispitivano različitim tehnikama, u tečnoj fazi (u epruveti), odnosno u čvrstoj fazi pomoću specifičnih kartica Ortho-Bio-Vue Sistema. Njihovo titriranje je primenjeno kao semikvantitativan metod za određivanje koncentracije antitela u uzorku seruma po ranije opisanoj metodi (104).

Hemofenotipizacijom je ispitano prisustvo i stepen ekspresije antigena krvnogrupnih sistema: ABO, Rhesus (antigeni C, C<sup>w</sup>, c, D, E i e), Kell (K i k), Kidd (Jk<sup>a</sup> i Jk<sup>b</sup>), P1 (P1), MNS (M, N, S i s), Duffy (Fy<sup>a</sup> i Fy<sup>b</sup>), i Lewis (Le<sup>a</sup> i Le<sup>b</sup>) na membrani DAT negativnih eritrocita davaoca i primaoca MČ. Korišćeni su specifični test reagensi po metodama koje su preporučene od strane proizvođača. Pozitivna (eritrociti sa prisutnim antigenom) i negativna (odsustvo antigena na ispitivanim eritrocitima) kontrola su uključene u svaku seriju testiranja – osim prilikom upotrebe ABO/Rh i Rh/K kartica (Ortho-Clinical Diagnostics, USA) koje u sebi već imaju kontrolnu kolonu. Testiranje na Poly karticama za otkrivanje prisustva antigena k, Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, S i s, izvedeno je u sredini sa BLISS-om. Što se interpretacije i stepenovanja dobijenih nalaza tokom ovih testiranja tiče, rezultati su izražavani jačinom aglutinacije u opsegu od 0 do 4+.

Potrebno je istaći da mešano polje ("mix field") predstavlja nalaz dve ili više različitih populacija eritrocita u ispitivanom uzorku krvi, odnosno u cirkulaciji bolesnika. Fenomen mešanog polja bilo je prikazan mikroskopskim ispitivanjem u tečnoj fazi, a još jasnije

upotrebom kartica za fenotipiziranje. Naime, u koloni kartice sa određenim test serumom – a na osnovu zadržavanja aglutinata, odnosno prolaženja neaglutinisanih eritrocita kroz kolonu – bile su prikazane populacije eritrocita sa prisutnim/odsutnim antigenom na različitim nivoima duž kolone (eritrociti sa različitom ekspresijom antigena), dok se na dnu nalazila populacija neaglutinisanih eritrocita. Za svaki takav nalaz dato je kvalitativno i kvantitativno tumačenje, i to za parove donor-recipient, odnosno za posebne bolesnike pre i posle trasplantacije.

### **Statistička obrada podataka**

Vrednosti obeležja posmatranja ispitivanja – rezultati dobijeni tokom prekliničkih laboratorijskih testiranja i klinička istraživanja – prikazane su kao apsolutni i relativni brojevi, odnosno izraženi su u vidu srednjih vrednosti sa standardnom devijacijom – zavisno od karakteristike ovih parametara.

Analiza i statistička obrada dobijenih podataka kliničkih, hematoloških, biohemijskih, citološka i imunohematološka ispitivanja ovog istraživanja su izvedena kompjuterski, korišćenjem odgovarajućeg statističkog softverskog programa (Origin i Statgraft). Ispitivane grupe bolesnika su upoređivane analizom Mann-Whitney-ovim i Student-ovim t-testom, odnosno primenom neparametrijskih testova – ANOVA. Razlike su označavane kao statistički značajne pri vrednosti  $p \leq 0,05$ .

## Rezultati

Osnovni cilj eksperimentalnih istraživanja prekliničkih ispitivanja bio je uvođenje i usavršavanje sopstvenih afereznih procedura za: 1) pre-transplantacijsku pripremu primalaca ABO-inkompatibilnih MĆ i 2) originalnih protokola za prikupljanje dovoljnog broja vijabilnih ćelija (mononukleusne ćelija – MNC, CD34<sup>+</sup> ćelije i njeni subtipovi) za transplantaciju. Tako, poseban značaj je dat proceni: a) efikasnosti aferezne imunomodulacije primaoca (redukcija titra aloantitela anti-A/B terapijskom izmenom plazme) i b) stepena deplecije ABO-inkompatibilnih donorskih eritrocita (procesiranje aspirata po potrebi).

Tome shodno, uz kratke komentare, tabelarno i/ili grafički su prikazani bolesnici i oboljenja tretirana transplantacijom, pozitivni klinički efekti i potencijalne komplikacije ovog modaliteta lečenja, sa posebnim osvrtom na dijagnostički i prognostički (prediktivni) značaj imunohematoloških istraživanja. Takođe je analizirana međusobna povezanost ovih laboratorijskih i kliničkih parametara sa stepenom opšteg oporavka bolesnika i krajnjim ishodom terapije.

### **Eksperimentalna i preklinička istraživanja**

Tokom proteklih decenija, u Institutu za transfuziologiju i hemobiologiju VMA razvijeni su originalni protokoli afereznog prikupljanja MĆ primenom separatora krvnih ćelija najnovije generacije – Cobe-Spectra i Spectra-Optia (Terumo BCT, USA). Korišćene su dve osnovne procedure prikupljanja ćelija – afereza velikog volumena (LVL) i konvencionalna afereza (RCA). Uz to, biće prikazani efekti primene *in vivo* aferezne imunomodulacije (pomoću izmena plazme). Rezultati ovih prekliničkih ispitivanja – podaci

o davaocima i bolesnicima, zatim afereznim protokolima i kvantifikacije ćelija – biće prikazani u narednom delu teksta.

## Optimizacija, kontrola i održavanje kvaliteta afereznih protokola

Tabela 6. pokazuje osnovne karakteristike afereznog prikupljanja MNC (sa prisutnim MĆ). Preciznije, dati su podaci o apsolutnom broju, polu i uzrastu davalaca, vrsti oboljenja, zatim broju bolesnika koji su tretirani transplantacijom, uz poseban osvrt na specifične aferezne parametre (volumen procesirane krvi/harvesta i rezultati kvantifikacije ćelija).

Tabela 6.

### Prikupljanje matičnih ćelija – karakteristike procedura LVL i RCA

Vrsta afereza		LVL*	RCA**
Ukupan broj davalaca		80	45
Struktura davalaca MĆ	Pol		
	Muški	46	29
	Ženski	34	16
Uzrast (opseg)		14–58	9–58
Bolesti i bolesnici lečeni MĆ prikupljenih primenom LVL* ili RCA** [broj bolesnika]	AML	[21]	[27]
	ALL	[4]	[8]
	CML	[2]	[1]
	MM	[26]	[38]
	HD	[19]	[2]
	non-Hodgkin	[22]	[32]
Broj afereza (prosek ± SD)	Broj tretmana MĆ	1	2.4 ± 0.5
Volumen procesirane krvi [L]	Jedan tretman	25,3 ± 5,2	7,9 ± 1,4
	Opseg	12,7 – 37,8	6,4 – 14,9
	Ukupno	/	21,3 ± 3,2
Volumen harvesta [mL]	Cobe Spectra	267,6 ± 55,3	350,6 ± 64,2
	Spectra Optia	261,7 ± 45,3	420,0 ± 64,2
Prinos MNC [x10 <sup>8</sup> /kgm]	Po jednom tretmanu		7,9 ± 1,4
	Ukupno	8,3 ± 3,5	8,2 ± 7,0
Prinos CD34 <sup>+</sup> [x10 <sup>6</sup> /kgm]	Po jednom tretmanu		4,0 ± 1,6 <sup>ψ</sup>
	Ukupno	7,8 ± 4,8 <sup>ψ,ξ</sup>	10,8 ± 3,9 <sup>ξ</sup>

\*LVL = afereza velikog volumena (Large Volume Apheresis);

\*\*RCA = ponavljana konvencionalna afereza (Repetitive Conventional Apheresis);

<sup>ψ</sup>p < 0,05; <sup>ξ</sup>p = 0,068.

Uočeno je da su praćeni parametri o davaocima, primaocima i izvedenim procedurama bili slični kod oba protokola afereze. Međutim, utvrđene su statistički značajne razlike između LVL i RCA procedura na osnovu prinosa CD34<sup>+</sup> ćelija u harvestu ( $p < 0,05$ ).

Vrednosti za pojedine parametre posmatranja – koji se odnose na davaoce (srodne i nesrodne), volumen aspirata/harvesta, izvor i prinos ćelija – kumulativno su prikazane (kao srednje vrednosti – SV i standardna devijacija – SD) u tabeli 7.

Tabela 7.

### Vrste alogenih transplantacija MĆ – izvori i prinos CD34<sup>+</sup> ćelija

IZVOR I VRSTA TRANSPLANTACIJE		Aspirat / harvest [mL]		Broj [ $\times 10^6$ /kgtm]	
		SV $\pm$ SD	Opseg	SV $\pm$ SD	Opseg
<b>PERIFERNA KRV</b>	Srodni donor	220,5 $\pm$ 42,6*	(100 – 350)	8,32 $\pm$ 3,8**	(4,9 – 12,5)
	MUD	288,6 $\pm$ 68,3*	(115 – 570)	7,45 $\pm$ 2,1**	(4,0 – 20,0)
<b>KOSTNA SRŽ</b>	Srodni donor	1 112 $\pm$ 180**	(950 – 1 650)	3,6 $\pm$ 2,5**	(1,2 – 4,3)
	MUD	1 161 $\pm$ 236**	(708 – 1 450)	4,09 $\pm$ 2,9**	(1,3 – 8,3)

MUD = nesrodni davaoci (Matched Unrelated Donor);

\*  $p < 0,05$  (Origin t-test); \*\* nesignifikantna razlika.

Jasno se vidi da je volumen harvesta (sa zadovoljavajućim prinosom CD34<sup>+</sup> ćelija) bio statistički signifikantno manji u grupi alogenih transplantacija od srodnog davaoca (prikupljanje je izvedeno po originalnom protokolu u Odeljenju za aferezno lečenje i hemoterapiju našeg Instituta) u poređenju sa ćelijskom suspenzijom u okviru MUD transplantacija. Međutim, nije bilo značajnih međugrupnih razlika u pokazateljima kvaliteta afereznog produkta na osnovu poređenja rezultata kvantifikacije CD34<sup>+</sup> ćelija, niti u pogledu volumena aspirata.

Kod primene konvencionalnih afereznih procedura (RCA), neposredno po prikupljanju, ćelije su ispitivane na broj i funkcionalnu očuvanost (vijabilnost). Rezultati procentualne zastupljenosti CD34<sup>+</sup> ćelija i njihovih podtipova su vidljivi u tabeli 8.

Tabela 8.

**Distribucija CD34<sup>+</sup> ćelija prikupljenih iz periferne krvi**

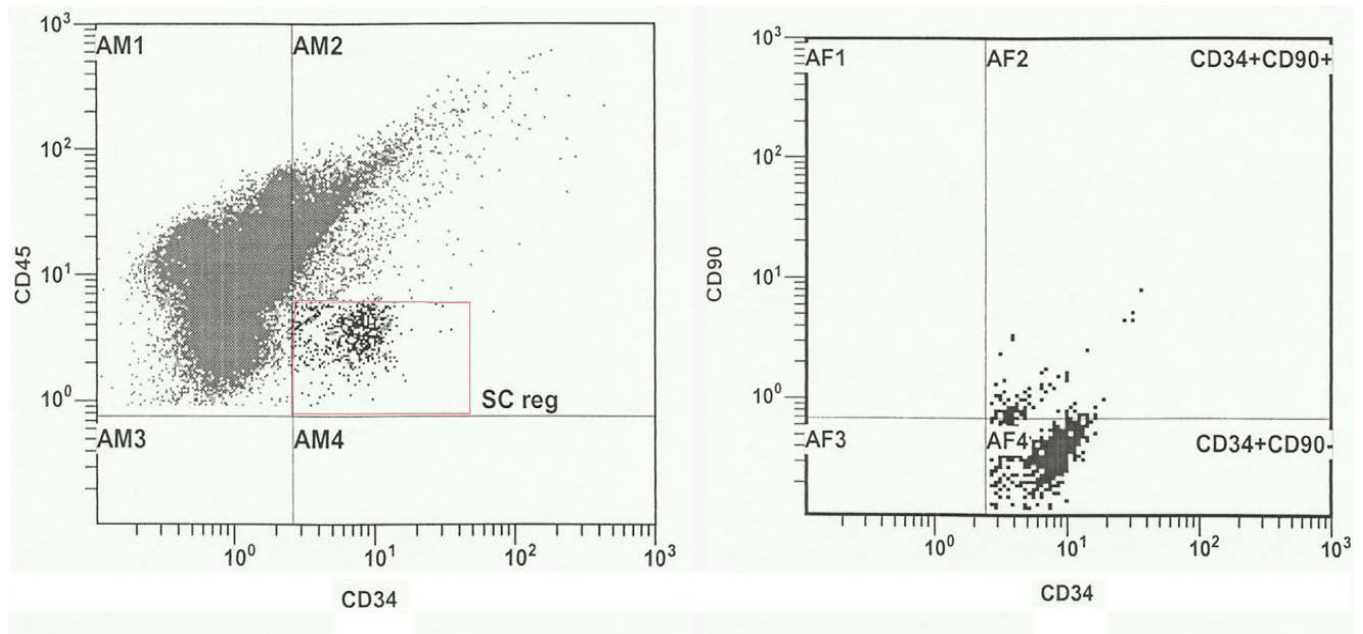
CD fenotipovi (jednostruko i duplo bojenje)	PERIFERNA KRV			HARVESTS		
	Proporcija [%]		SV±SD	Proporcija [%]		SV±SD
	1. dan	2. dan		1. dan	2. dan	
<b>CD34<sup>+</sup></b>	2.4	3.2	2.8±0.57	1.0	0.8	0.9±0.14
<b>CD33<sup>+</sup></b>	11.4	2.4	6.9±6.36	36.7	24.5	30.6±8.63
<b>CD38<sup>+</sup></b>	9.1	1.8	5.4±5.16	22.8	12.5	17.6±7.28
<b>HLA-DR<sup>+</sup></b>	7.5	2.7	5.1±3.39	15.5	11	13.2±3.18
<b>CD90<sup>+</sup></b>	1.4	0.7	1.1±0.49	0.5	0.2	0.35±0.21
<b>CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup></b>	1.7 <sup>§</sup>	0.9 <sup>§</sup>	1.3±0.57	0.7 <sup>§</sup>	1.1 <sup>§</sup>	0.9±0.28
<b>CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup></b>	1.2 <sup>§</sup>	0.6 <sup>§</sup>	0.9±0.42	0.8 <sup>§</sup>	0.8 <sup>§</sup>	0.6±0.28
<b>CD34<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup></b>	1.3 <sup>§</sup>	0.7 <sup>§</sup>	1.0±0.42	0.2 <sup>§</sup>	0.8 <sup>§</sup>	0.5±0.42
<b>CD34<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup></b>	1.2 <sup>§</sup>	0.7 <sup>§</sup>	0.9±0.35	0.8 <sup>§</sup>	0.2 <sup>§</sup>	0.3±0.15

<sup>§</sup>signifikantna razlika između vrednosti CD34 subsetova – dvostruko bojenje ( $p < 0,05$ ).

Iz rezultata prikazanih u tabeli 8. vidi se da prinosi pojedinih populacija i subsetova ćelija u perifernoj krvi i harvestu nisu bili isti u funkciji vremena ("timing"). Naime, prinos primitivnijih MĆ (fenotipa CD34<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup>) bio je bolji prvog dana u odnosu na drugi dan prikupljanja (peti i šesti dan od početka aplikacije rHuG-CSF).

Statističkom obradom dobijenih rezultata utvrđena je značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između procentualne zastupljenosti navedenih ćelija u perifernoj krvi, kao i u ćelijskom harvestu u korist prvog dana prikupljanja. Sve to govorilo je u prilog opravdanosti uvođenja LVL-procedure (jedno aferezno prikupljanje petog dana od početka aplikacije rHuG-CSF) i njene primene tokom proteklih godina.

Rezultati ispitivanja CD45<sup>+</sup>/34<sup>+</sup>/90<sup>+</sup> pomoću protočne citometrija (primenom tehnike trostrukog bojenja) ilustrovani su u slici 11.



**Slika 11.** Zastupljenost  $CD90^+$  ćelija unutar tzv. regiona matičnih ćelija (SC reg)

Histogram 1. nedvosmisleno potvrđuje da postoji uočljiva populacija manje zrelih (po fenotipu  $CD34^+/90^+$ ) ćelija u alogenom harvestu (videti kvadrat AF2).

### Imunohematološka testiranja

U delu rada koji se odnosi na imunohematologiju, prikazani su rezultati ispitivanja kompletnog (raspoloživog) fenotipa krvnogrupnih sistema eritrocita u neposrednom pre-transplantacijskom periodu (primaoci i davaoci) i posle transplantacije (primaoci). Tako, kod primalaca izvedeno je periodično ispitivanje krvnogrupnih antigena počev od oko +30. dana radi imunohematološke procene prihvatanja kalema (konverzija hemofenotipa).

Kod bolesnika, takođe je obavljeno ispitivanje prisustva iregularnih antieritrocitnih antitela – slobodnih u plazmi/serumu (IAT) i vezanih za eritrocitnu membranu (DAT). Ova ispitivanja (DAT i IAT) izvedena su neposredno po transplantaciji (posle dva i 24 sata), odnosno periodično u celom post-transplantacijskom toku.

Konačni zaključak o prihvatanju alokalema koristeći imunohematološke analize bilo je moguće doneti na osnovu: a) pojavljivanja novog, donor-specifičnog antigena na eritrocitima (DSE); b) nestanka dotadašnjeg recipijent-specifičnog antigena (a u skladu sa fenotipom

davaoca) i c) promena u plazmatskom sadržaju odgovarajućih prirodno-prisutnih (ponekad iregularnih) antitela sistema ABO.

Potrebno je istaći da prilikom ispitivanja kompletnog eritrocitnog fenotipa preduslov je bio negativan nalaz DAT. Ukoliko je rezultat DAT bio pozitivan, pre testiranja bilo je potrebno pristupiti eluciji antitela sa eritrocita nekom od raspoloživih metoda koja ne oštećuje ćelijsku membranu, tj. dozvoljavaju sledstvenu hemofenotipizaciju.

U cilju boljeg sagledavanja fenotipske distribucije krvnogrupnog sistema ABO u kontrolnoj grupi (ABO-kompatibilne transplantacije), formirana je tabela 9.

Tabela 9.

### Bolesnici lečeni ABO-kompatibilnim transplantacijama

Krvna grupa (P i D*)	Apsolutni broj bolesnika	Procentualna zastupljenost [%]
<b>O</b>	51/140	36,4
<b>A<sub>1</sub></b>	60/140	42,8
<b>A<sub>2</sub></b>	7/140	5,0
<b>B</b>	15/140	10,8
<b>A<sub>1</sub>B</b>	7/140	5,0

\*P i D = primalac i davalac.

U tabeli 9. prikazani su osnovni fenotipovi parova donor/recipient (podudarne krvne grupe), s tim da je fenotip A podeljen u A<sub>1</sub> i A<sub>2</sub>, jer se radi o podgrupama sa specifičnim karakteristikama (kao što su, nejednaka ekspresija antigenskih determinanti po eritrocitnoj membrani, moguće prisustvo prirodnih iregularnih antitela). U kontrolnoj grupi nije bilo parova sa fenotipom A<sub>2</sub>B.

Kod ABO-inkompatibilnih parova, posebno su svrstane i tabelarno prikazane transplantacije kod kojih je postojala major, minor ili bidirekcijska nepodudarnost između davaoca i primaoca u krvnogrupnom sistemu ABO.

Tabela 10. pokazuje apsolutne brojeve i procentualnu zastupljenost za te parove, tačnije za one primaoce kojima su transplantirane major ABO-inkompatibilne MČ.



Tabela 10.

**Bolesnici lečeni major ABO-inkompatibilnim transplantacijama**

<b>Krvna grupa (P/D*)</b>	<b>Apsolutni broj bolesnika</b>	<b>Procentualna zastupljenost [%]</b>
<b>O/A<sub>1</sub></b>	11/23	48,1
<b>O/A<sub>2</sub></b>	1/23	4,3
<b>O/B</b>	5/23	21,7
<b>A<sub>1</sub>/A<sub>1</sub>B</b>	1/23	4,3
<b>A<sub>1</sub>/A<sub>2</sub>B</b>	1/23	4,3
<b>B/A<sub>1</sub>B</b>	3/23	13,0
<b>B/A<sub>2</sub>B</b>	1/23	4,3

\*P/D = primalac/davalac.

Minor ABO-inkompatibilnost postojala je kod ukupno 30 bolesnika – to je približno odgovaralo polovini od svih nepodudarnosti u sistemu ABO. Ti rezultati (uključujući podgrupe fenotipova A i AB (A<sub>1</sub>B/O, A<sub>1</sub>B/A<sub>1</sub> i A<sub>2</sub>B/A<sub>1</sub>) su prikazani u tabeli 11.

Tabela 11.

**Bolesnici lečeni minor ABO-inkompatibilnim transplantacijama**

<b>Krvna grupa (P/D*)</b>	<b>Apsolutni broj bolesnika</b>	<b>Procentualna zastupljenost [%]</b>
<b>A<sub>1</sub>/O</b>	21/30	70,0
<b>A<sub>2</sub>/O</b>	2/30	6,7
<b>B/O</b>	3/30	10,0
<b>A<sub>1</sub>B/O</b>	2/30	6,7
<b>A<sub>1</sub>B/A<sub>1</sub></b>	1/30	3,3
<b>A<sub>2</sub>B/A<sub>1</sub></b>	1/30	3,3

\*P/D = primalac/davalac

U cilju ilustracije postojanja ili nepostojanja razlika u prognostičkoj vrednosti, odnosno za predviđanje uspeha lečenja primenom MĆ u situaciji major/minor, tj. bidirekcijske

ABO-inkompatibilnosti – naspram ABO-kompatibilnim transplantacijama – formirana je posebna grupa ispitanika od 9 bolesnika (videti tabelu 12).

Tabela 12.

**Bolesnici lečeni bidirekcijskom ABO-inkompatibilnom transplantacijom**

<b>Krvna grupa (P/D*)</b>	<b>Apsolutni broj bolesnika</b>	<b>Procentualna zastupljenost [%]</b>
<b>A<sub>1</sub>/B</b>	4/9	44,5
<b>A<sub>2</sub>/B</b>	1/9	11,1
<b>B/A<sub>1</sub></b>	3/9	33,3
<b>B/A<sub>2</sub></b>	1/9	11,1

\*P/D = primalac/davalac

Najzad, u delu istraživanju koji se odnosi na prikupljanje podataka o efikasnosti izmene plazme u kombinaciji sa primenom imunosupresivnih lekova – u sklopu sprovedenog pre-kondicionog tretmana – u *in vivo* (kliničkim) uslovima, pre transplantacije utvrđene su vrednosti plazmatskog sadržaja aloantitela specifičnosti ABO (date su u vidu titra antitela anti-A/B) za grupu bolesnika, primalaca MĆ od major i major/minor ABO-inkompatibilnog davaoca.

Iako ima i drugih mišljenja, stav našeg Centra za transplantaciju MĆ je da titar antitela anti-A/B trebalo bi da bude  $\leq 16$ . Izvođenjem jedne do tri procedure izmene plazme kod svih bolesnika koji su imali titar antitela anti-A/B  $\geq 16$  došlo je do statistički visoko značajne redukcije titra donor-specifičnih aloantitela sistema ABO klase IgG i IgM ( $p < 0.05$ ).

Nasuprot opisanim imunohematološkim činiocima i/ili "akterima" krvnogrupnog sistema ABO (antigeni i antitela, uz sadejstvo komponenti sistema komplementa i drugih plazmatskih sistema), nepodudarnost u ostalim (retkim) krvnogrupnim sistemima eritrocita je od manjeg kliničkog značaja. Međutim, ukoliko postoje iregularna (prvenstveno imunska) antitela u visokom titru, njihov uticaj potencijalno je komparabilan sa efektima antitela anti-A/B (klase IgG) na tok i ishod transplantacija MĆ. Pored toga, konverzija ekspresije eritrocitnih antigena ovih krvnogrupnih sistema ima dijagnostički (dokaz o prihvatanju alokalema), a time i prognostički značaj.

Ispitivani su sistemi Rhesus, Kell, Kidd, P, MNS, Duffy kod parova donor/recipient, a rezultati ovih testiranja su i prikazani u tabelama 13–17.

Tabela 13.

**Ispitivani antigeni sistema Rhesus kod ABO-kompatibilnih transplantacija – 1**

<b>Konverzija ekspresije pojedinačnih antigena</b>	<b>Apsolutni i relativni broj bolesnika [%]</b>
<b>D</b>	2/140 [1,4]
<b>E</b>	8/140 [5,7]
<b>C</b>	7/140 [5,0]
<b>c</b>	11/140 [7,9]
<b>e</b>	1/140 [0,7]
<b>C<sup>w</sup></b>	3/140 [2,1]
<b>UKUPNO</b>	32/140 [22,8]

Kao što je to u tabeli 13 vidljivo, kod ABO-kompatibilnih transplantacija neusklađenost u jednom od antigena sistema Rhesus je bila retka pojava (manje od 10%) za sve ispitivane fenotipove, tzv. glavne antigene sistema Rhesus.

Tabela 14.

**Ispitivani antigeni sistema Rhesus kod ABO-kompatibilnih transplantacija – 2**

<b>Konverzija ekspresije multiplih antigena</b>	<b>Apsolutni i relativni broj bolesnika [%]</b>
<b>2</b>	26/140 [18,6]
<b>3</b>	6/140 [4,3]
<b>4</b>	2/140 [1,4]
<b>UKUPNO</b>	34/140 [24,3]

Tabela 14 pokazuje da je do konverzije multiplih antigenskih determinanti usled neusklađenosti pre transplantacije došlo ukoliko su dva antigena bila neistovetna (broj takvih transplantacija iznosio je 26, odnosno približno 20%).

Tabela 15.

**Ispitivani antigeni sistema Rhesus kod ABO-inkompatibilnih transplantacija – 1**

<b>Konverzija ekspresije pojedinačnih antigena</b>	<b>Apsolutni i relativni broj bolesnika [%]</b>
<b>D</b>	1/62 [1,6]
<b>E</b>	10/62 [16,1]
<b>C</b>	6/62 [9,7]
<b>c</b>	13/62 [21,0]
<b>e</b>	1/62 [1,6]
<b>C<sup>w</sup></b>	0/62 [0,0]
<b>UKUPNO</b>	31/62 [50,0]

U tabeli 13 vidljivo je da kod ABO-kompatibilnih transplantacija postojala češća pojava neusklađenosti na osnovu jednog antigena sistema Rhesus, pri čemu se u oko 20% radilo o antigenu "c".

To je praktično duplo veća učestalost neusklađenosti u poređenju sa ABO-kompatibilnim transplantacijama MĆ. Ipak, u ovoj grupi bolesnika nisu uočeni bilo kakvi sporedni efekti ili komplikacije ovih razlika prouzrokovani različitim antigenima sistema Rhesus.

Tabela 16.

**Ispitivani antigeni sistema Rhesus kod ABO-inkompatibilnih transplantacija – B**

<b>Konverzija ekspresije multiplih antigena</b>	<b>Apsolutni i relativni broj bolesnika [%]</b>
<b>2</b>	14/62 [22,6]
<b>3</b>	4/62 [6,4]
<b>4</b>	1/62 [1,6]
<b>UKUPNO</b>	19/62 [30,6]

Što se tiče pojave konverzije multiplih antigenskih determinanti u grupi primalaca ABO-inkompatibilnih MĆ (prikazano je u tabeli 16), učestalost Rhesus neusklađenosti bila je približno ista (najčešće na osnovu dva antigena, u oko 23%).

Kao što je već rečeno, nepodudarnost u ostalim ili retkim krvnogrpnim sistemima eritrocita (pored ABO i Rhesus) je praktično od zanemarljivog kliničkog značaja u pogledu uticaja na krajnji ishod tretmana primenom MĆ. Međutim, konverzija ekspresije antigena ovih krvnogrpnih sistema ima neosporan dijagnostički (prihvatanje alokalema), kao i prognostički značaj (moguća predikcija prihvatanja i/ili odbacivanja alokalema).

Rezultati vezani za ispitivanje gore spomenutog imunohematološkog fenomena biće detaljno ilustrovani i komentarisani na osnovu prikaza odabranih ABO-inkompatibilnih transplantacija (kako primarnih, tako i sekundarnih) u daljem delu teksta (tabele 19 i 20, odnosno slike 12 do 14).

Tabela 17 sadrži podatke o apsolutnom i relativnom broju (učestalosti – izraženo u procentima) neusklađenosti na osnovu pojedinačnih antigenskih determinanti sistema Rhesus, Kell, Kidd, P, MNS i Duffy – koji su utvrđeni za obe grupe ispitanika, tj za ABO-kompatibilne i ABO-inkompatibilne transplantacije (n = 202).

Tabela 17.

**Apsolutni i relativni broj antigena sistema Kell, Kidd, P, MNS i Duffy posle transplantacija**

ABO-kompatibilne transplantacije		ABO-inkompatibilne transplantacije	
Ispitivani nepodudarni markeri	Apsolutni i relativni broj bolesnika [%]	Ispitivani antigeni	Apsolutni i relativni broj bolesnika [%]
<b>K</b>	9/140 [6,4]	<b>K</b>	5/62 [8,1]
<b>k</b>	1/140 [0,7]	<b>k</b>	0/62 [0,0]
<b>Jk<sup>a</sup></b>	24/140 [17,1]	<b>Jk<sup>a</sup></b>	17/62 [27,4]*
<b>Jk<sup>b</sup></b>	20/140 [14,3]	<b>Jk<sup>b</sup></b>	15/62 [24,2]*
<b>P1</b>	34/140 [24,3]	<b>P1</b>	19/62 [30,6]
<b>M</b>	16/140 [11,4]	<b>M</b>	15/62 [24,2]*
<b>N</b>	27/140 [19,3]	<b>N</b>	18/62 [29,0]*
<b>S</b>	35/140 [25,0]	<b>S</b>	18/62 [29,0]
<b>s</b>	22/140 [15,7]	<b>s</b>	8/62 [12,9]
<b>Fy<sup>a</sup></b>	31/140 [22,1]	<b>Fy<sup>a</sup></b>	22/62 [35,5]*
<b>Fy<sup>b</sup></b>	23/140 [16,4]	<b>Fy<sup>b</sup></b>	15/62 [24,2]*

\*  $p < 0,05$  (Origin t-test).

U tabeli 18 su vidljivi podaci o apsolutnom broju i učestalosti neusklađenosti na osnovu multiplih antigena sistema Kell, Kidd, P, MNS i Duffy – koji su ispitivani i prikazani za obe grupe ispitanika, tj za ABO-inkompatibilne transplantacije i kontrolu.

Tabela 18.

**Apsolutni i relativni broj antigena Rhesus i ostalih\* krvnogrupnih sistema posle transplantacija**

<b>ABO-kompatibilne transplantacije</b>		<b>ABO-inkompatibilne transplantacije</b>	
<b>Ispitivani nepodudarni multipli antigeni**</b>	<b>Apsolutni i relativni broj bolesnika [%]</b>	<b>Ispitivani nepodudarni multipli antigeni**</b>	<b>Apsolutni i relativni broj bolesnika [%]</b>
<b>1 antigen</b>	17/140 [12,1]	<b>1 antigen</b>	11/62 [17,7]
<b>2 antigena</b>	8/140 [5,7]	<b>2 antigena</b>	13/62 [21]*
<b>3 antigena</b>	21/140 [15]	<b>3 antigena</b>	10/62 [16,1]
<b>4 antigena</b>	28/140 [20]	<b>4 antigena</b>	12/62 [19,3]
<b>5 antigena</b>	30/140 [21,4]	<b>5 antigena</b>	10/62 [16,1]
<b>6 antigena</b>	21/140 [15,0]	<b>6 antigena</b>	2/62 [3,2]*
<b>7 antigena</b>	11/140 [7,9]	<b>7 antigena</b>	3/62 [4,8]
<b>8 antigena</b>	1/140 [0,7]	<b>8 antigena</b>	0/62 [0,0]
<b>9 antigena</b>	2/140 [1,4]	<b>9 antigena</b>	1/62 [1,6]
<b>10 antigena</b>	1/140 [0,7]	<b>10 antigena</b>	0/62 [0,0]

\*  $p < 0,05$  (Origin t-test).

\*\* Antigeni iz sistema Kell, Kidd, P, MNS i Duffy

Kao što je u tabela 17 i 18 moguće zapaziti, postoje statistički značajne razlike u neslaganju parova donor/recipijent na osnovu ostalih (retkih) krvnogrupnih sistema (pojedinačni i multipli antigeni) između ispitanika (ABO-inkompatibilnost) i kontrole (ABO-kompatibilnost). Međutim, pokazalo se da su ove nepodudarnosti imale jedino dijagnostički (prihvatanje donor-specifičnih eritrocita), a ne i klinički značaj, tj. nisu uticale na pojavu komplikacija transplantacija.

Ispitivanje kompletnog (raspoloživog) hemofenotipa tj. antigena i antitela (uz njihovu semikvantifikaciju titrovanjem) krvnogrupnih sistema eritrocita kod primalaca i davalaca MČ izvedeno je u neposrednom pre-transplantacijskom periodu, uprkos tome što je

prilikom odabira potencijalnog kompatibilnog davaoca, predhodno već obavljeno ispitivanje antigena sistema ABO i Rhesus.

Kao što je već napomenuto, kod primalaca je izvedeno periodično ispitivanje krvnogrupnih antigena počev od oko 30. dana posle transplantacije radi otkrivanja markera prihvatanja kalema (konverzija hemofenotipa).

Kod primalaca MČ, takođe je obavljeno ispitivanje prisustva antieritrocitnih antitela: anti-A/B i ostalih iregularnih antitela koja su se nalazila u plazmi/serumu (IAT) i/ili su bila vezana za eritrocitnu membranu (DAT). Ova testiranja su izvedena neposredno po transplantaciji – dva i 24 sata po izvedenoj proceduri, a potom periodično u celom post-transplantacijskom toku praćenja bolesnika.

Zavisno od inicijalnog titra (kritični prag  $\geq 16$ ) anti-A/B – semikvantifikacija je izvedena -7 do 0 dana transplantacije – kod major i bidirekcijske ABO-inkompatibilnosti doneta je odluka o uvođenju izmene plazme. U proseku su rađene dve izmene, samo u retkim slučajevima tri afereze, a ponekad je bila dovoljna jedna izmena plazme pre transplantacije za postizanje titra aloantitela  $\leq 16$ . Venski pristup je najčešće ostvaren plasiranjem katetera u neku od centralnih vena za potrebe afereznog tretmana. Jednom izmenom plazme je otklonjeno 1–1,5 volumena bolesnikove cirkulišuće plazme, kao nadoknadna tečnost korišćen je 20% humani albumin u kombinaciji sa fiziološkim rastvorom natrijumovog hlorida. Odnos otklonjeni vs. nadoknađeni volumen je bio 1,0 – samo u izuzetnim slučajevima je izvedena korekcija intravaskulnog volumena (redukcijom ili povećavanjem zapremine nadoknadne tečnosti).

Konačni zaključak o prihvatanju alokalema koristeći imunohematološke analize bilo je moguće doneti na osnovu: a) pojavljivanja novog, donor-specifičnog antigena (DSA) na eritrocitima; b) nestanka dotadašnjeg recipijent-specifičnog antigena (u skladu sa fenotipom davaoca) i c) promena u plazmatskom sadržaju odgovarajućih prirodno-prisutnih (ponekad iregularnih) antitela sistema ABO.

Rezultati kompletnog/proširenog fenotipa eritrocitnih krvnogrupnih sistema – sa posebnim osvrtom na antigenske determinante i fenomen konverzije krvnogrupnog fenotipa – uz testiranje i nekih drugih imunohematoloških analiza (na primer, DAT i IAT) kod dva bolesnika (tretiranih primarnom i sekundarnom transplantacijom) u funkciji vremena prikazani su ilustrativno u tabelama 19 i 20.



Tabela 19.

## Kumulativni rezultati hemofenotipizacije pre i posle (primarne i sekundarne) transplantacije – 1

Krvnogrupni sistemi	ABO	Rhesus						Kell		Duffy		Kidd		P	MNS				Lewis	
Eritrocitni antigeni	A/B/O	C	C <sup>w</sup>	D	E	c	e	K	k	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	P <sub>1</sub>	M	N	S	s	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>
Primalac MČ*	A <sub>1</sub>	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+
Davalac MČ	B	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Primalac MČ**	B	+	-	+	-	∅	+	-	+	∅	+	+	∅	+	-	+	-	+	-	+
Relaps bolesti <sup>#</sup>	O/B <sup>#</sup>	-	-	-	-	+	+	-	+	∅/+	+	+	∅/+	+	-	+	-	+	-	+
Primalac MČ***	B/O <sup>ξ</sup>	+	-	+	-	∅	+	-	+	∅	+	+	∅	+	-	+	-	+	-	+

BN<sup>Ψ, ΨΨ</sup> → BB; Dg: ALL-T.

\*primalac MČ pre transplantacije; \*\*primalac MČ posle prve transplantacije; \*\*\*primalac MČ posle sekundarne transplantacije.

"-" = inicijalno odsustvo antigena (u funkciji genotipa); "∅" = konverzija ekspresije antigena iz pozitivnog u negativno.

Aloantitela primaoca (anti-B): inicijalni titar = 128 (IgM), 64 (IgG); titar nultog dana = 8 (IgM);

1. Ψ primarna transplantacija: 23.12.2005.

DAT<sub>2h i 24h</sub> = ∅, IAT<sub>2h i 24h</sub> = ∅; IAT<sub>posttranspl.</sub> = ∅;

+13.dan: DAT + (anti-IgG +, anti-IgA ∅, anti-IgM ∅, anti-C3d ∅);

+65.dan: DAT + (anti-IgG ∅, anti-IgA ∅, anti-IgM ∅, anti-C3d +);

+34. dan = 20% DSE; +65. dan = 95% DSE;

od +34. dana: antitela anti-B nisu detektabilna; prisustvo antitela anti-A nije detektovano.

# relaps bolesti: 16 meseci posle prve transplantacije= 98% O Ery (transfundovani) i 2% DSE

2. ΨΨ sekundarna transplantacija: 05.04.2007.

DAT<sub>2h i 24h</sub> = ∅, DAT<sub>posttranspl.</sub> = ∅;

ξ +39. dan = 15% DSE; +60. dan = 80% DSE; +82. dan = 98% DSE i 2% O Ery;

od +60. dana prisustvo antitela anti-B nije detektovano.

Kumulativni rezultati hemofenotipizacije pre i posle (primarne i sekundarne) transplantacije – 2

Krvnogrupalni sistem	ABO	Rhesus						Kell		Duffy		Kidd		P	MNS				Lewis		
		A/B/O	C	C <sup>w</sup>	D	E	c	e	K	k	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	P <sub>1</sub>	M	N	S	s	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>
Primalac MČ*	A <sub>1</sub>	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Davalac <sup>ψ</sup> MČ	A <sub>1</sub> B	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+
Primalac MČ**	A <sub>1</sub> B	+	-	+	+	+	+	-	+	∅	+	+	∅	+	+	+	∅	+	-	+	
Relaps bolesti <sup>#</sup>	A <sub>1</sub> B/A <sub>1</sub> <sup>#</sup>	+	-	+	+	+	+	-	+	∅/+	+/∅	+	∅/+	+	+	+	∅	+	-	+	
Davalac <sup>ψψ</sup> MČ	A <sub>2</sub> B	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
Primalac MČ***	A <sub>2</sub> B <sup>ξ</sup>	+	-	+	∅		+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	

LT<sup>ψ</sup> i LT<sup>ψψ</sup> → ŠG; Dg: AML – M2.

\*primalac MČ pre transplantacije; \*\*primalac MČ posle transplantacije, \*\*\*primalac MČ posle sekundarne transplantacije.

"-" = inicijalno odsustvo antigena (u funkciji genotipa); "∅" = konverzija ekspresije antigena iz pozitivnog u negativno.

Aloantitela primaoca (anti-B): inicijalni titar = 4/8 (IgM) i 8 (IgG);  
titar nultog dana = 2 (IgM) i 2 (IgG);

1. ψ primarna transplantacija: 18.06.2007.

DAT<sub>2h i 24h</sub> = ∅, IAT<sub>2h i 24h</sub> = ∅; DAT<sub>posttranspl.</sub> = ∅, IAT<sub>posttranspl.</sub> = ∅;

+52. dan = 90% DSE; +73. dan = 100% DSE; od +52. dana antitela anti-B nisu detektabilna.

# relaps bolesti: 2 godine i 7 meseci posle prve transplantacije = 20% A1 Ery (transfundovani) i 80% DSE.

2. ψψ sekundarna transplantacija: 04.02.2010.

DAT<sub>2h i 24h</sub> = ∅, DAT<sub>posttranspl.</sub> = ∅;

ξ +46. dan = 10-20% DSE; +57. dan = 50% DSE; +92. dan = 100% DSE.

Ispitivanje bolesnika BB pokazalo je prisustvo kompleksnog kariotipa 46, XY, del (11)(q23) [3] / 46, XY, del (11)(q23), add (10) (p15) [2] / 46, XY, del (11)(q23), del (3) (q12) [1] / 46, XY [14]. Na +181. dan postignut je kariotip sestre donorka 46, XX [15] Posle dve godine bio je verifikovan citogenetski relaps sa nalazom patološkog kariotipa 45–47 XY, +mar1, +mar2, inc(8)/>60, XXYY, inc(4) [12] u okviru sistemskog recidiva ALL–T (tabela 21).

Tabela 21.

### Rezultati ispitivanja citogenetskih markera – 1.

Bolesnici i davaoci	Bolest	Kariotip pre TMĆ [metafaze]	TMĆ*,**	Kariotip posle TMĆ [metafaze]
BB*,** Ž → M	ALL-T	46, XY, del (11)(q23) [3] / 46, XY, del (11)(q23), add (10) (p15) [2] / 46, XY, del (11)(q23), del (3) (q12) [1] / 46, XY [14]	*23.12.2005. **05.04.2007.	*TMĆ: +181. dan: 46, XX [15] 8.3.2007. 45–47 XY, +mar1, +mar2, inc(8)/>60, XXYY, inc(4) [12] **TMĆ: +17. dan: 46, XX [14] 23.1.2008. 47, XY, del(11)(q23), add(1 0)(p 15), +22(10)/>80, XXYY[2] /46,XX[1] [13]
ŠG* Ž → Ž	AML-M2	46, XX, t(8;21)(q22;q22) [8] / 46,XX [12]	*18.06.2007.	+182. dan: 46, XX [20]
ŠG** M → Ž	Relaps	46, XX, t(8;21)(q22;q22) [8] / 46,XX [12]	**04.02.2010.	+28. dan: 46, XY [20]

TMĆ = transplantacija MĆ; pol davaoca/primaoca: M = muški, Ž = ženski;  
\*primarna transplantacija; \*\*sekundarna transplantacija.

Izvedena je sekundarna transplantacija MĆ sa prihvatanjem alokalema i postizanjem kariotipa donorka na +17. dan u 14 analiziranih mitozu. Međutim, 9 meseci posle transplantacije na nastanak recidiva bolesti ukazalo je postojanje kompleksnog patološkog kariotipa 47, XY, del(11)(q23), add(1 0)(p 15), +22(10)/>80, XXYY[2] /46, XX [1] [13].

Provera donorskog himerizma bolesnice ŠG (tabela 21) sa AML-M2 i inicijalnim kariotipom 46, XX, t(8;21)(q22;q22) [8] / 46, XX [12], izvršeno je posle +6. meseci. Tada je postignuto potpuno prihvatanje alokalema donora/sestre sa kariotipom 46, XX [20] posle izvedene primarne transplantacije. Tome slično, nakon sekundarne transplantacije utvrđen je kariotip donora/brata – tačnije, kariotip: 46, XY [20].

Tabela 22. sadrži podatke o tri para donor/recipijent gde je kao marker prihvatanja alokalema služio polni hromozom. Podaci o hromozomu "Philadelphia" (Ph+) ukazali su na stepen rezidualne bolesti posle transplantacije.

Tabela 22.

**Rezultati ispitivanja citogenetskih markera – 2.**

<b>Bolesnici i davaoci</b>	<b>Bolest</b>	<b>Kariotip pre TMC</b> [metafaze]	<b>TMC</b>	<b>Kariotip posle TMC</b> [metafaze]
<b>BB</b> M → Ž	CML Ph+	46, XX, t(9;22) (q34;q11) [20]	30.10.2007.	<u>+27. dan</u> : 46, XY, inv(9)(p11;q13) [20]
<b>GO</b> M → Ž	CML Ph+	46, XX, t(9;22) (q34;q11) [20]	16.10.2007.	<u>+112. dan</u> : 46, XY [5]
<b>TB</b> M → Ž	CML Ph+	46, XX, t(9;22)(q34;q11) [20]	12.02.2003.	<u>+28. dan</u> : 46, XY [20]

TMC = transplantacija MĆ; pol davaoca/primaoca: M = muški, Ž = ženski.

Kod bolesnice BB sa CML Ph+ sa kariotipom 46, XX, t(9;22) (q34;q11) [20], analiza kariotipa na +27. dan posle transplantacije MĆ pokazala je kariotip 46, XY, inv(9) (p11;q13) [20], što je ukazalo na to da je muški donor BZ, imao prisustvo konstitutivne inverzije hromozoma 9 u svih 20 pregledanih mitozama, uz istovremenu verifikaciju postizanja kompletnog donorskog himerizma.

Kod bolesnika GO i TB sa istom dijagnozom, analiza kariotipa pokazala je prisustvo kompletnog donorskog himerizma, tj. sledstveno prihvatanje alotransplantata.

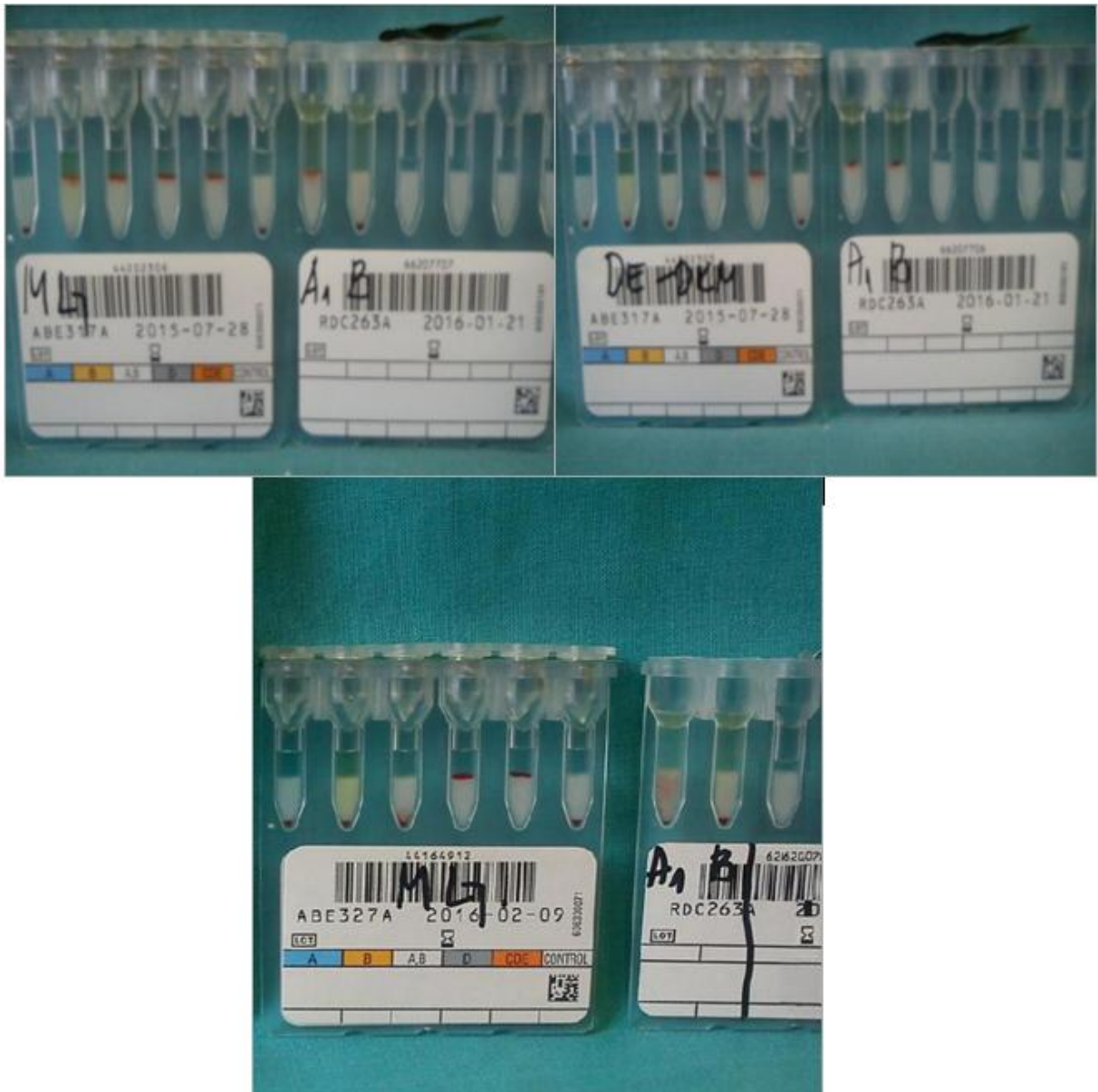
Treba istaći da kod bolesnice TB (sa dijagnozom CML Ph+), postojanje t(9;22) (q34;q11) potvrđeno je i na molekularno-genetskom nivou. Upotrebom tehnike RT-PCR, tj. "nested" RT-PCR, pokazano je prisustvo fuzionog transkripta gena BCR-ABL na prezentaciji. Bila je prisutna b3a2 forma rearanžmana (standardne tačke prekida) pri dijagnozi, a odsutna posle trasplantacije MĆ. Posle transplantacije, visokosenzitivni kvantitativni "nested" RT-PCR pri prvoj analizi donorskog himerizma na nivou praćenja nivoa produkta ekspresije BCR-ABL gena pokazao je prisustvo fuzionog traskripta kod ove bolesnice. Tek u periodu poznog praćenja i funkcionisanja alokalema – posle 5 godina od transplantacije – je došlo do potpunog gubitka molekularno-genetskog markera bolesti kod nje.

Primeri kompletnog himerizma ili konverzije specifičnih antigena eritrocitnih krvnogrupnih sistema (primena mikroaglutinacijske tehnike u karticama) posle izvedene major, odnosno minor ABO-inkompatibilnih MUD transplantacija prikazani su u slikama 12a–c i 13a–c.



**Slika 12a–c.** Hemofenotipizacija – pre i posle ABO-inkompatibilne transplantacije

Kod drugog prikazanog para donor/recipient, kao što to u slici 13a–c vidljivo, prisustvo recipient-specifičnih (grupa B) eritrocita bilo je moguće dokazati jedino upotrebom test reagensa anti-AB, ali ne i pomoću anti-B.



**Slika 13a–c.** Hemofenotipizacija – pre i posle ABO-inkompatibilne transplantacije

Slika 14a–b pokazuje pozitivan nalaz DAT po tipu mešanog polja. U eluatu nisu identifikovana imunska antitela klase IgG (negativan IAT eluata), međutim dobijen je slabo pozitivan rezultat ispitivanja eluata primenom test-eritrocita grupe B.



**Slika 14a i b.** Hemofenotipizacija – DAT, IAT i ispitivanje eluata.

### **Klinička ispitivanja – lečenje ABO-kompatibilnim vs. ABO-inkompatibilnim MĆ**

Saobrazno dizajnu istraživanja, u delu koji obuhvata kliničko ispitivanje prikupljeni i ustanovljeni i analizirani su rezultati za posebne kategorije ispitanika – tj. za bolesnike lečene alogenom transplantacijom od srodnog ili nesrodnog davaoca koji su podeljeni u dve grupe (primaoci ABO-inkompatibilnih i ABO-kompatibilnih MĆ – kontrolna grupa), kao i za pripadnike tri podgrupe (major, minor i bidirekcijske ABO-inkompatibilne transplantacije).

Tako, evaluirani su pozitivni klinički efekti, ali i najučestalija/najznačajnija sporedna dejstva i komplikacije transplantacija kod obe grupe ispitanika. Određivani i upoređivani su rezultati ispitivanja specifičnih parakliničkih parametara – vrednosti hemograma, biohemizma, imunohematoloških, citogenetskih, hemostaznih, imunskih i nekih drugih laboratorijskih testiranja – kod obe grupe bolesnika (ABO-inkompatibilne i ABO-kompatibilne transplantacije). Takođe su prikazani rezultati citometrijskih testiranja, a koja su se odnosila na kvantifikaciju nukleisanih ćelija, MNC, zatim broj i vijabilnost CD34<sup>+</sup> ćelija i njihovih subtipova.

### Ispitivanje prihvatanja alokalema i komplikacije transplantacija

Ispitivana je kinetika prihvatanja alokalema na osnovu oporavka neutrofilnih polimorfonukleara (PMN) i trombocita (Plt) kod obe grupe bolesnika – kod onih koji su lečeni ABO-kompatibilnom i tretiranih ABO-inkompatibilnom transplantacijom. Ovi rezultati su sumarno prikazani u tabeli 23.

Tabela 23.

### Markeri i dinamika oporavka hematopoeze posle transplatacije MĆ

TRANSPLANTACIJE	PMN $\geq 0,5 \times 10^9/L$ [dani]	Plt $\geq 20 \times 10^9/L$ [dani]	p
<b>ABO-kompatilne</b> (n = 140)	15.07 $\pm$ 4.2	18.76 $\pm$ 4.92	ns*
<b>ABO-inkompatilne</b> (n = 62)	15.24 $\pm$ 6.32	19.07 $\pm$ 5.28	ns*

\* ns = nesignifikantna razlika (Munn-Whitney test; t-test)

Kao što je vidljivo, ne postoji statistički značajna razlika u kinetici prihvatanja PMN i Plt među poređenim grupama (ABO-inkompatibilna vs. ABO-kompatibilna). Podaci koji se odnose na apsolutni broj i učestalost aGvHD kod obe grupe bolesnika predstavljeni su u tabeli 24.

Tabela 24.

### Komplikacija transplantacije MĆ – aGvHD kao parametar posmatranja

TRANSPLANTACIJE	Apsolutni i relativni broj pojave aGvHD		
	Ukupno [%]	Stepen: 1–2 [%]	Stepen: 3–4 [%]
<b>ABO-kompatilne</b> (n = 140)	83/140 [59,5]	73/140 [52,1]	10/140* [7,1]
<b>ABO-inkompatilne</b> (n = 62)	35/62 [56,6]	20/62 [32,1]	15/62* [24,5]

\*p < 0,05.

Iz tabele 24. se vidi da poređene grupe se nisu statistički razlikovale (Munn-Whitney test; t-test; ns) po učestalosti ukupne incidence aGvHD (83/140 ili 59,51% vs. 35/62 ili



56,6%). Međutim, kod bolesnika lečenih ABO-inkompatibilnom transplantacijom konstatovana je signifikantno ( $p < 0,05$ ) češća pojava intenzivnog stepena aGvHD (stepena 3–4), u odnosu na ABO-kompatibilnu grupu (15/62 ili 24,5% vs. 10/140 ili 7,4%).

U tabeli 25. dati su podaci koji se odnose na pojavu hGvHD; rezultati prikazani su u vidu apsolutnog broja i srednje vrednosti.

Tabela 25.

### Komplikacija transplantacije MČ – hGvHD kao parametar posmatranja

TRANSPLANTACIJE	Apsolutni i relativni broj pojave hGvHD		
	Ukupno [%]	Limitirani [%]	Ekstenzivni [%]
<b>ABO-kompatilne</b> (n = 140)	73/140 [52,1]	38/140 [27,3]	35/140 [24,8]
<b>ABO-inkompatilne</b> (n = 62)	31/62 [51,0]	18/62 [28,3]	13/62 [22,6]

Na osnovu prikazanih rezultata moguće je tvrditi da u ovoj kliničkoj studiji nisu postojale statistički značajne razlike u pogledu pojave/incidence hGvHD – i to, kako limitiranog (38/140 ili 27,3% vs. 18/62 ili 28,3%), tako i ekstenzivnog oblika (35/140 ili 24,8% vs. 13/62 – 22,6%) ove komplikacije – između dve ispitivane grupe bolesnika (Munn-Whitney test; odnosno t-test).

Podaci o apsolutnom i relativnom broju (učestalost) relapsa i srednjem preživljavanju bolesnika obe grupe su sumarno prikazani u tabeli 26.

Tabela 26.

### Incidenca relapsa i dužina preživljavanja kod transplantiranih bolesnika

TRANSPLANTACIJE	Relaps bolesti [%]	Preživljavanje [meseci]
<b>ABO-kompatilne</b> (n = 140)	29/140 [20,7]	127,25 ± 48,2*
<b>ABO-inkompatilne</b> (n = 62)	8/62 [13,2]	89,05 ± 47,3 *

\* $p < 0,05$ .

Statističkom obradom (Munn-Whitney test; t-test) dobijenih rezultata utvrđeno je značajno bolje ( $p < 0,05$ ) srednje preživljavanje kod bolesnika sa ABO-kompatibilnošću u odnosu na bolesnike lečenih ABO-inkompatibilnom transplantacijom ( $127,25 \pm 48,2$  vs.  $89,05 \pm 47,3$  meseci).

Kao što je ranije prikazano (tabela 3), u ovoj grupi ispitanika ABO-inkompatibilnom transplantacijom lečeno je 62 bolesnika. Kod dva bolesnika su konstatovani simptomi i znaci čiste eritrocitne aplazije (Pure Red Cell Aplasia – PRCA).

Prvi bolesnik (HE) sa AML-M2 je imao krvnu grupu O, Rh-(D)-neg. Davalac MĆ je bila sestra sa krvnom grupom A, Rh-(D)-neg. Izvor ABO-inkompatibilnih MĆ bila je periferna krv, bolesnik je primio adekvatnu dozu CD34<sup>+</sup> ćelija ( $5,6 \times 10^6/\text{kgtm}$ ). Post-transplantacijski period jatrogene aplazije nije bio značajnije produžen, niti komplikovan pojavom TRM.

Prvi znaci delimične rekonstitucije hematopoeze, tj. prihvatanje alogenog kalema su potvrđeni oporavkom PMN (+13. dan) i trombocita (+14. dan). Ispitivanjem citogenetike +27. dana, takođe je utvrđen normalni ženski kariotip – što je potvrdio pojavu kompletnog donorskog himerizma, bez kliničkih znakova aGvHD.

Međutim, analizom kostne srži +14. i +27. dana, uočen je deficit prekursora eritroidne loze – u lako hipocelularnoj kostnoj srži konstatovani su: dominantna granulopoeza, uz manji broj megakariocita i izuzetno retke prekursore eritroidne loze. Vrednosti retikulocita su bile veoma snižene (0,03–0,81%) čak i tri meseca posle transplantacije. Naredne kontrole su potvrdile sličan nalaz – što je govorilo u prilog održavanja anemije usled deficita eritrocitopoeze, uz ženski kariotip (citogenetika) i mogućnost komplikacije PRCA.

Uprkos primenjenoj suportivnoj i stimulacijskoj terapiji (transfuzije eritrocita i eritropoetin – EPO), anemija se održavala u narednom periodu. Imunohematološkim testiranjem pokazani su jedino primaočevi i transfundovani eritrociti krvne grupe O, Rh-(D)-neg, kao i prisustvo antitela anti-A (titar IgM = 8; titar IgG = 16), odnosno antitela anti-B u serumu.

Zbog sumnje na PRCA, uvedene su terapijske izmene plazme, uz primenu imunoglobulina. Četiri meseca nakon transplantacije stanje se održava, u mijelogramu se opisuje lako hipocelularna kostna srž, sa urednom granulopoezom, i odsutnom

eritropoezom uz slabiju produkciju megakariocita. Pet meseci posle transplantacije, započeta je terapija kortikosteroidima i antitelom anti-CD20. Mesec dana posle primene dva ciklusa antitela anti-CD20, došlo je do postepenog oporavka eritrocitne loze (Hb = 120 g/L; retikulociti = 15,26%). Potom su u cirkulaciji bolesnika – metodom semikvantitativne hemofenotipizacije u čvrstoj fazi (upotreba tehnike krvnogrupnih kartica sa mikrokulicama) – detektovani eritrociti donora (+210. dana 80% DSE). Nakon toga je verifikovana kompletna klinička (trajanje oko 6 godina) i laboratorijska remisija (Hb = 158 g/L), uz prisustvo 99% DSE.

Kod bolesnice HS (recipijent/donor = O, Rh-(D)-poz / A, Rh-(D)-poz; izvor MČ periferne krvi;  $CD34^+ = 8 \times 10^6 / \text{kg}$ ), konstatovani su klinički, laboratorijski, citogenetski i imunohematološki nalazi koji su ukazivali na mogućnost PRCA. Citogenetikom je dokazan kompletni donorski himerizam (+28. dan; 46, XY). Uočeni su markeri prihvatanja alokalema i rekonstitucije hematopoeze ( $PMN \geq 0,5 \times 10^9 / L$  +11 dana i  $Plt \geq 20 \times 10^9 / L$  +12 dana). Međutim, u kostnoj srži +14. i +28. dana, je postojao deficit prekursora eritroidne loze, uz istovremeno prisustvo anemije (Hb = 60g/L, retikulociti = 0,18%). Terapija je bila substitucijska (transfuzije) i eritrostimulacijska (EPO), uz primenu i imunosupresivnih medikamentoznih agenasa (kortikosteroidi i imunoglobulini) – ali bez izvođenja izmene plazme i upotrebe anti-CD20. Tri meseca posle transplantacije došlo je do oporavka eritrocitopoeze (Hb = 86g/L; retikulociti = 18,33%), uz imunohematološku potvrdu prihvatanja alokalema (+98. dan = 95% DSE). Posle oko 7 godina, bolesnica je u kompletnoj kliničkoj remisiji, sa kompletnim donorskim himerizmom, bez znakova hGvHD.

## Diskusija

Posle transplantacije, MĆ karakteriše sposobnost za repopulaciju kostne srži, a potom procesi samobnavljanja i difirentovanja u sve loze krvnih ćelija. Tako, njih zajedno sa alogenim limfocitima T, moguće je koristiti u lečenju mnogih malignih i nemalignih oboljenja, uključujući leukemije, limfome, mijelome, SAA, urođene genske bolesti (na primer, poremećaji metabolizma) i imunodefijenciju. Međutim, krajnji ishod i sveukupni uspeh transplantacija je, nažalost, ograničen toksičnošću koja je posledica primenjenih kondicionih režima i potencijalnih imunskih konflikata usled prepoznavanja aloantigena primaoca od strane donorskih limfocita T. Kliničku sliku aGvHD karakterišu selektivna oštećenja kože, mukoza, posebno gastrointestinalnog (GI) trakta i jetre, ali i drugih tkiva ili organa, kao što su kostna srž, timus, pluća i mozak. U toku hroničnog GvHD ne nastaju samo oštećenja spomenutih tkiva/organa, već može doći do oštećenja vezivnog tkiva i egzokrinih žlezda.

Svakako, primena alogene transplantacije MĆ hematopoeze u lečenju najrazličitijih hematoloških i nehematoloških oboljenja postala je sastavi deo svakodnevne medicinske prakse. Višedecenijsko iskustvo u transplantacionoj medicini je omogućilo sagledavanje brojnih prednosti, ali i mana ove terapijske procedure. Dosadašnji literaturni podaci o uticaju krvno-grupne nepodudarnosti primaoca i davaoca na rezultate alogene transplantacije MĆ su veoma oskudni i prilično kontradiktorni. Kada je u pitanju dinamika prihvatanja alogenog kalema, utvrđeno je da major ABO-inkompatibilnost koincidira sa odloženim prihvatanjem eritroidne loze. Međutim, slično našim rezultatima, ni drugi autori nisu potvrdili da ABO-inkompatibilnost ima uticaja na dinamiku prihvatanja alogenog kalema, mereno brojem neutrofila i trombocita (103).

Mišljenja u vezi uticaja ABO-kompatibilnosti na klinički ishod transplantacije još uvek nisu sasvim ujednačena. Teoretski, kod bolesnika lečenih transplantacijom MĆ od HLA-

identičnog alogenog davaoca, neusaglašenost u krvnogrpnom sistemu ABO (major, bidirekcijska ili minor inkompatibilnost) postoji u oko 30–40% svih izvedenih tretmana (2–4).

Opšte je poznato da kod bolesnika čije je zdravlje već narušeno – kako osnovnim poremećajem, tako i agresivnim kondicionim režimom – izvođenje ABO-inkompatibilne transplantacije (posebno bidirekcijske ili major) može biti udruženo sa teškim komplikacijama. O potencijalnim nepovoljnim efektima alogenih transplantacija, tako i o uticaju nepodudarnosti donor/recipijent u sistemu ABO na klinički tok i pojavu neposrednih i odloženih komplikacija transplantacije ima brojnih podataka (105–116). U daljem delu teksta Diskusije, neka od tih saopštenja biće ukratko protumačena i prodiskutovana.

\*

\*

\*

Na efikasnost terapije transplantacijom MĆ kod hematoloških bolesnika utiče mnogo faktora, kao što su vrsta i stadijum bolesti, uzrast, pripremni (kondicioni) režim, broj i vijabilnost MĆ, pojava, stepen i profilaksa post-transplantacijskih komplikacija. Od tih činilaca, kao i karakteristika, specifičnih za pojedine hematološke poremećaje, biće veoma sažeto prikazani i prodiskutovani samo neki osnovni podaci iz literature, pre analize rezultata dobijenih u ovom istraživanju.

Transplantacija MĆ primenjuje se u lečenju velikog broja urođenih i stečenih hematoloških i nehematoloških, benignih i malignih bolesti, kao što su SAA, hronične i akutne leukemije, limfomi, multipli mijelom, solidni tumori, teška kombinovana kongenitalna imunodeficijencija, bolesti metabolizma i neki autoimunski poremećaji, na primer, multipla skleroza. Najčešće komplikacije alogene transplantacije MĆ kod bolesnika sa SAA su neprihvatanje ili odbacivanje kalema, GvHD i infekcije (2–4).

U cilju prevazilaženja starosnog ograničenja, razvijeni su manje intenzivni režimi transplantacije MĆ hematopoeze. Oni se zasnivaju na primeni manjih doza radio-hemioterapije, pri čemu se ne eliminišu sve tumorske ćelije, već se stvaraju uslovi za prihvatanje kalema i za ispoljavanje reakcije kalema-protiv-tumora. Razvijeni režimi, nazvani su nemijeloablativnim režimima ili "mini transplantacijom". Ovaj nemijeloablativni pristup kombinuje malu dozu zračenja celog tela sa post-transplantacijskom imunosupresijom, u cilju sprečavanja odbacivanja kalema i kontrolu imunski posredovanih pojava (GvHD i GvL).

Posle inicijalnog prihvatanja alotransplantata, primalac obično ispoljava mešani himerizam, te u njegovoj krvi postoji istovremeno prisustvo ćelija domaćina i davaoca. Ako bolesnik ne razvije GvHD, mogu se naknadno infundovati donor-specifični limfociti. Svakako, težnja istraživača je bila da se izazovu efekti kalema-protiv-tumora, koji će dovesti do eradikacije ili redukcije broja tumorskih ćelija (1–7).

Potrebno je naglasiti da uzimanje davaočeve autologne krvi (radi njene primene tokom aspiracija), procesiranje i filtriranje prikupljenog aspirata kostne srži, zatim aferezne procedure, ispitivanje antigena i titra antitela krvnogrupnih sistema eritrocita, leukocita primaoca i davaoca MĆ (važnih markera za procenu uspešnosti tremana), kao i post-transplantacijska primena hemoprodukata, najčešće se sprovode u transfuziološkim centrima. Inače, nepodudarnost krvnih grupa davaoca i primaoca u sistemu ABO nije kontraindikacija za transplantaciju MĆ, ali zahteva izvođenje posebnih postupaka: a) smanjenje koncentracije aloantitela u cirkulaciji bolesnika (izmena plazme) i b) redukcija broja eritrocita iz aspirata kostne srži (procesiranje) davaoca (2–4).

Počev od sredine dvadesetog veka, otkriveno je mnoštvo krvnogrupnih sistema, a ekspanzija saznanja iz oblasti serologije, prvenstveno uvođenje pretransfuzijskih testiranja, povećala je sigurnost transfundovanja krvi. Antiglobulinski test je prvobitno opisan od Moreschia 1908. godine; međutim, on se koristi počev od 1945. godine zahvaljujući radovima Coombsa i saradnika. Za detekciju i okarakterisanje antitela uključenih u proces hemolize, odnosno nekog oboljenja u sklopu kojeg je ispoljeno imunski posredovano oštećenje eritrocita – ključni dijagnostički test je DAT dopunjen drugim imunohematološkim testovima, kojima je neophodno utvrditi da li su eritrociti obloženi molekulima imunoglobulina, komponentama komplementa ili kompleksima imunoglobulina i komplementa (2–4, 104).

Tipiziranje fenotipa ABO ili ispitivanja krvnogrupne pripadnosti u sistemu ABO je osnovni pretransfuzijski test koji se sastoji iz dve procedure – obe mogu biti izvedene u tačnoj (u epruveti) i čvrstoj fazi (primena specifičnih kartica). Prva procedura je neposredno ispitivanje eritrocita tipiziranjem antigena A i B uz pomoć specifičnih test reagenasa. Druga procedura je indirektno testiranje antigena eritrocita ispitivanjem komplementarnih antitela u serumu pomoću poznatih eritrocita krvne grupe A i B. Definitivni zaključak o krvnogrupnoj pripadnosti donosi se kada su rezultati dva spomenuta

testiranja saglasni (95). Ukoliko rezultati testova nisu podudarni, može biti teško da se utvrdi kojoj krvnoj grupi pripada ispitivana osoba. Pri testiranju eritrocita sa specifičnim reagensima anti-A i anti-B, najčešći problem je slaba aglutinacija ili njeno odsustvo usled pripadnosti osobe nekoj retkoj podgrupi A ili B ( $A_m$ ,  $A_x$ ,  $B_3$  itd.). Savremeni monoklonski test reagensi (anti-A i anti-B) efikasno otkrivaju slabe antigene A ili B, pa većina laboratorija više ne koristi test serume anti-A,B humanog porekla u rutinskom ABO tipiziranju. Monoklonski test reagensi imaju strogo specifičan sadržaj jer nikada ne sadrže “dodatna ili rezidualna nespecifična” antitela (kao što su anti-T ili anti-Tn) karakteristična za test serume humanog porekla (2–4, 95, 104).

Veliki izazov za svaku transfuziološku ustanovu predstavlja iznalaženje najpogodnijih metoda za izvođenje imunohematoloških ispitivanja u fazi pripreme i kasnijeg praćenja sve većeg broja bolesnika koji se podvrgavaju transplantaciji MĆ, kao i odabiru najpogodnijih davalaca. Ovo se naročito odnosi na testiranje ABO (grupa i podgrupa) i Rh tipiziranje, određivanje eritrocitnog fenotipa po svim klinički relevantnim krvnogrupnim sistemima, skrining na iregularna antieritrocitna antitela kao i DAT i IAT, određivanje titra prirodno-prisutnih izohemaglutinina anti-A/B ili imunskih antieritrocitnih antitela u serumu bolesnika (ukoliko je njihovo prisustvo inkompatibilno sa krvnom grupom ili korespondirajućim antigenom donora) i sledstveno praćenje pada tog titra posle terapijskih izmena plazme u cilju njihovog smanjenja, kao i eventualno njihovo određivanje u produktu MĆ, a sve to u cilju sprečavanja hemolizne reakcije. Kada treba transfundovati te bolesnike, potrebno je hemofenotipizacijom odabrati najpogodnije eritrocite koji će se moći pratiti u cirkulaciji bolesnika prema nekom određenom obeležju (markeru – antigenu koji može biti iz bilo kojeg krvnogrupnog sistema a ne samo ABO) i razlikovati od eritrocita domaćina kao i od novostvorene populacije eritrocita fenotipski specifične za donora MĆ (7, 95).

Tehnologija aglutinacije u kolonama je novi pristup u imunohematologiji, baziran na istim principima kao i dobro poznata rutinska metoda za testiranje uzoraka krvi u tečnoj fazi, ali specifičnija, sa većom senzitivnošću, standardizovanim uslovima u kojima se izvodi i značajnim skraćenjem vremena izvođenja. Kontrolisanje svake etape procesa pojedinačnog imunohematološkog ispitivanja, u skladu sa standardnim operativnim protokolom garantuje dobru laboratorijsku praksu i isključivanje mogućnosti svake tehničke greške.

Prostor na vrhu svake kolone u kartici (tzv. reakciona komora) koristi se samo za ukapavanje nepoznatih eritrocita ili za inkubiranje test eritrocita i ispitivanog seruma/plazme u sredini niske jonske jačine što podrazumeva dodavanje slanog rastvora niskojonskog napona (LISS, odnosno u Sistemu Bio-Vue tzv. BLISS). Testiranja koja se izvode u karticama zasnivaju se na sledećem principu: kartice (u prostoru sa gelom ili mikro-kuglicama, zavisno od vrste kartica) imaju svojstvo da razdvoje različite populacije eritrocita, zadržavanjem aglutiniranih ćelija u medijumu na različitoj udaljenosti od vrha, a zavisno od veličine aglutinata "pređeni put" kroz kolonu tokom centrifugovanja je različite dužine, dok neaglutinirani eritrociti dospevaju na dno kolone (4, 7, 95).

Veća osetljivost kao i mogućnost procene količine eritrocita više zastupljene populacije (semi-kvantifikacija mešanog himerizma) su nezamenljiva prednost ove metode zbog koje je ona vrlo korisna i sve zastupljenija u odnosu na klasične, konvencionalne metode ispitivanja aglutinacije u tečnoj fazi, tj. u epruvetama (104).

Na ovaj način moguće je rano detektovati pojavu eritrocita sa donorskim antigenima i pratiti dinamiku njihovog stvaranja tj. stepen mešanog himerizma – što označava kvalitet transplantacije MĆ kao metode lečenja, odnosno uspešnost prihvatanja alokalema. U skladu sa ovim mogućnostima, uz praćenje količine bolesnikovih ćelija u poređenju sa količinom donorovih i transfundovanih ćelija, kao i praćenje prisutnih antitela u serumu/plazmi, moguće je u određenom vremenskom periodu izabrati najprikladniju, tj. adekvatnu krvnu grupu ABO za izbor ne samo eritrocita, nego i trombocita za transfuziju, da bi se obezbedilo optimalno preživljavanje trombocita u cirkulaciji (95, 104).

Pored standardnih kartica, u nekim karticama specifični test reagensi ili proteini mogu biti integralni deo medijuma (gela ili mikro-kuglica) same kolone; tada će eritrociti sa prisutnim antigenom biti aglutinirani i selektivno zarobljeni prolazeći kroz medijum. Kada kolona sadrži antihuman-globulinski reagens koji specifično vezuje imunoglobuline na površini eritrocita, selektivno će biti zadržane ćelije koje su senzitivne imunoglobulinima, ali neaglutinirane prethodno (104).

Što se senzitivnosti metode sa karticama tiče, treba istaći sledeću činjenicu: da bi imali pozitivnu antigen-antitelo reakciju u rutinskom antiglobulinskom testiranju izvedenom u epruveti, treba da bude prisutno najmanje oko 100 molekula IgG po jednom eritrocitu koji ih senzitišu (oblažu). Nasuprot tome, prilikom primene metode u kolonama dovoljno je



prisustvo samo 8 molekula IgG po eritrocitu za dobijanje pozitivne reakcije. Ispiranje eritrocita u fiziološkom rastvoru pre izvođenja antiglobulinskog testa nije potrebno (95).

U vezi osetljivosti testiranja treba napomenuti da u imunohematološkim ispitivanjima izvedenim na karticama gradacija (ocenjivanje jačine reakcije) aglutinacije je dizajnirano skalom po kojoj se intenzitet reakcije antigen-antitelo označava znacima plus (+). Razlika u jačini između dve metode pri izvođenju testa (standardni u epruveti i testiranje na kartici) je oko jedan do dva stepena intenziteta aglutinacije u korist metoda na karticama (95).

To potvrđuju naši prvi rezultati (104), kao i oni dobijeni u ovom istraživanju, posebno pri titriranju antitela na kartici kada je uočen neretko veći titar za oko jedan stepen, odnosno jednu diluciju (razblaženje) ili ređe isti kao u epruvetama.

Poznata je prednost u radu u karticama u odnosu na epruvete kada uzorci krvi pokazuju pseudoaglutinaciju (rouleaux formacije), što je specifično kod limfoma, paraproteinemija ili kod primanja većih količina visokomolekulskog dekstrana (7, 95, 104). Prednosti rada u karticama (aglutinacijske tehnologije u kolonama) su: stabilnost finalne faze reakcije, skraćanje i optimizacija vremena inkubacije, redukcija broja manipulacija za svaki uzorak, mogućnost ponovljenog očitavanja rezultata od strane više osoba više puta i mogućnost dokumentovanja rezultata skeniranjem ili fotografisanjem.

Krvnogrupsna neusaglašenost u sistemu ABO kod transplantacija između HLA-kompatibilnih, srodnih ili nesrodnih osoba, je jedan od najvećih transfuzioloških izazova. Prouzrokovano nezavisnim nasleđivanjem gena ABO i HLA, ABO-inkompatibilnost ne predstavlja kontraindikaciju za transplantacije, štaviše takva situacija je relativno zastupljena ili čak uobičajena u transplantacijskim okvirima.

S obzirom na to da se krvnogrupsni sistemi ABO i HLA nasleđuju nezavisno, približno jedna trećina svih transplantacija MĆ se izvodi preko barijere ABO krvne grupe (4, 103, 104).

Krvnogrupsna inkompatibilnost je klasifikovana na osnovu specifičnih aloantitela (prirodno-prisutnih i/ili imunskih) protiv odgovarajućih eritrocitnih antigena bolesnika, odnosno davaoca. O major inkompatibilnosti je reč kada bolesnik ima antitela protiv davaoćevih eritrocitnih antigena (na primer, primalac grupe O i davalac A, B ili AB). Minor inkompatibilnost je situacija kada davalac ima aloantitela protiv bolesnikovih eritrocitnih antigena (na primer, primalac A, B ili AB, a davalac O). Pri tome, ta antitela ne moraju da se ograniče samo na

krvnoGrupni sistem ABO, nego mogu biti antitela (iregularna) iz drugih eritrocitnih sistema (95). Najzad, major/minor, dvosmerna ili bidirekcijska inkompatibilnost je ta u kojoj oboje, i bolesnik i donor imaju aloantitela protiv eritrocitnih antigena druge osobe iz transplantacijskog para (na primer, primalac A, davalac B). Dvosmerna ili bidirekcijska inkompatibilnost je svojstvo krvnogrupnog sistema ABO (4, 95, 103, 104).

Major inkompatibilnost može biti udružena ponekad i sa po život bolesnika opasnim imunskim posledicama, čije zdravlje je već narušeno – kako osnovnim poremećajem, tako agresivnim kondicionim tretmanom. Od tih komplikacija treba spomenuti, na primer, tešku intravaskulnu hemoliznu reakciju koja se manifestuje neposredno po infuziji MĆ, kada primaočeva aloantitela reaguju sa unetim eritrocitima iz suspenzije MĆ. Zbog toga, većina autora smatra da kada je titar aloantitela u primaočevoj cirkulaciji  $\geq 16$  (IgM i/ili IgG), redukcija broja eritrocita u suspenziji MĆ, ali i plazmatskog sadržaja aloantitela kod primaoca je indikovana. Inače, količina eritrocita u suspenziji MĆ prikupljenih iz periferne krvi ili u procesiranoj suspenziji MĆ iz kostne srži iznosi oko 10-15 mL (2–4). Ponekad se hemoliza javlja kasnije u post-transplantacijskom periodu, naročito kada je titar aloantitela redukovan izmenama plazme, a kasnije dolazi do ponovnog porasta njihovog plazmatskog sadržaja (4, 104).

Bolesnici lečeni minor ABO-inkompatibilnom transplantacijom mogu imati odloženu (između 10. i 17. dana posle transplantacije) imunsku hemoliznu reakciju, posredovanu aloantitelima iz plazme i antitelima produkovanim od strane donorskih limfocita B, odnosno plazma ćelija. Ovaj tip hemolize može biti i težeg stepena, ali je po pravilu slabog intenziteta i od manjeg kliničkog značaja. Svakako, količina plazme i titar aloantitela u transplantu su od značaja za stepen očekivane hemolize. U praktičnom radu, redukciju volumena plazme bi trebalo izvesti samo u slučajevima kada je titar aloantitela specifičnosti ABO (klase IgG i/ili IgM)  $\geq 128$  (7, 95, 104). Masivna i ponekad čak fatalna imunska hemoliza, nastala zbog produkcije aloantitela od strane donorskih limfocita B se opisuje pri minor ili bidirekcijskoj ABO-inkompatibilnosti. Pošto antigeni ABO/H nisu ekspresivani jedino na eritrocitima, već se nalaze na mnogim tkivima, produkcija anti-A/B usmerenih protiv antigena primaoca (minor ili bidirekcijska ABO-inkompatibilnost) mogu se vezati, na primer, za endotelske ćelije i oštetiti ih – što može potencijalno biti okidač za razvoj GvHD (4, 103, 104).

Pored ABO-inkompatibilnosti, ima podataka o transplantaciji MĆ sa neusaglašenim statusom davaoca i primaoca u krvnogrupnim sistemima Rhesus, Kell, Kidd i MNS. Reč je

o transplantacijama kada u cirkulaciji bolesnika postoji iregularno imunsko antitelo usmereno protiv antigena spomenutih krvnogrupnih sistema davaoca (2, 4). Učestalost imunske hemolize, prouzrokovane ovakvom vrstom inkompatibilnosti je veoma mala – oko 1-2% (4, 7, 95). Takođe je potrebno istaći da inkompatibilnost u krvnogrupnim sistemima eritrocita ne bi trebalo da usporava generalni oporavak hematopoeze, tj. oporavak leukocita i trombocita, niti je udružen sa povećanim rizikom od odbacivanja alokalema, ali takvo stanje može rezultovati klinički manifestnim imunohematološkim problemima (104).

Kao što je rečeno, najteža potencijalna komplikacija major ABO-inkompatibilnosti je PRCA (4, 103). Ova komplikacija je prouzrokovana preostalim primaočevim limfocitima B, odnosno plazma ćelijama i *de novo* produkovanim antitelima, koja mogu suprimirati eritrocitopoezu. (104). Učestalija pojava reakcije GvL i sledstvena redukcija pojave relapsa bolesti je poznata činjenica pri transplantaciji MĆ prikupljenih iz periferne krvi – zbog većeg broja limfocita T u suspenziji MĆ. Međutim, nije poznato da li neusklađenost davaoca i primaoca u sistemu ABO utiče na pojavu i intenzitet GvL. Moguće je postaviti pitanje, zbog čega bi ABO-inkompatibilnost uticala na učestalost relapsa bolesti. Imunske reakcije udružene sa ABO-inkompatibilnom transplantacijom, možda bi mogle imati i neke direktne ili indirektne antitumorske efekte, kao što je reakcija GvL – i to, posredstvom oslobađanja citokina i/ili aktivacijom ćelija NK. Pretpostavlja se da do ovih manifestacija dolazi usled prisustva i delovanja specifičnih ugljenohidratnih determinanti krvnogrupnih antigena sistema ABO. Pojava relapsa (u roku 3–46 meseci) uočena je kod 4 od 43 bolesnika lečenih ABO-inkompatibilnom transplantacijom, odnosno kod njih 18 od 76 bolesnika u kontrolnoj grupi (ABO istogrupna transplantacija). Incidenca akutnog i hroničnog GvHD takođe nije bila povezana sa razlikama u krvnogrupnom sistemu ABO. Minor ABO-inkompatibilnost česće udružena sa razvojem GvHD u poređenju sa ABO-kompatibilnim, ali i major ABO-inkompatibilnim transplantacijama. Takođe je zapaženo da major ABO-inkompatibilnost ima post-transplantacijski ishod koji više liči kliničkom toku pri minor ABO-inkompatibilnosti, nego stanju posle ABO-kompatibilne transplantacije (2–4, 103).

Kod minor ABO-inkompatibilnih transplantacija, učestalost i intenzitet hemolizne reakcije direktno su povezani sa brojem limfocita u alokalemu (organ ili suspenzija MĆ). Utvrđeno je da kada je izvor MĆ periferna krv, sadržaj CD3<sup>+</sup> limfocita T je oko 16 puta, a broj CD19<sup>+</sup> limfocita B veći oko 11 puta u poređenju sa njihovim sadržajem u aspiratu

kostne srži. Inače, odložena imunska hemoliza, usled *de novo* produkcije antitela pokrenuta je od strane "passenger" limfocita (unetih alokalemom), a javlja se u oko 10-15% transplantacija. Rizik od ove hemolizne reakcije je još veći ukoliko je donor nesrodna osoba i pri korišćenju samo ciklosporina A za prevenciju GvHD (4, 103, 104).

Kao što je to ranije prikazano (104), naši bolesnici sa hemolizom imali su svi pozitivan DAT, sa reaktivnošću eluata (IgG i IgM) protiv primaočevih ABO antigena. Ispostavilo se da ni intenzitet DAT, ni inicijalni titar aloantitela u cirkulaciji davaoca nisu bili pouzdani prediktivni faktor pojave i stepena preteće hemolize. Naime, pozitivan DAT – za ispitivanje prisustva antitela i komponenti komplekta (C3d) na eritrocitima – je detektovan i u bolesnika koji nisu razvili manifestnu hemoliznu reakciju. Takođe, nije razjašnjeno da li je češća pojava teške hemolize kod osoba krvne grupe A posledica nekog unutrašnjeg činioca eritrocita (na primer, jača reaktivnost eritrocita senzitivisanih antitelima anti-A sa komplementom) ili je posledica razlike u distribuciji grupe A i B – prva je približno četiri puta češća od druge (104). Kao korisna i efikasna mera prevencije hemolizne reakcije, preporučuje se laboratorijski monitoring tokom prve dve nedelje posle transplantacije: a) koncentracija LDH (svakodnevno); b) DAT (svakodnevno) i KKS (dva puta dnevno tokom prvih 5-12 dana); c) transfuzija eritrocita kompatibilnih sa donatorom za očuvanje Hb  $\geq$  95 g/L; d) ispitivanje IAT i eluata (ukoliko je DAT pozitivan) (2, 104).

Naše prve kliničke studije (103, 104), kao i ovo istraživanje govore u prilog tome da ABO-inkompatibilnost nije presudan faktor rizika za kinetiku prihvatanja alokalema, nastanak transplantacijom udruženog morbiditeta (na primer, GvHD), pojavu relapsa i prosečno preživljavanje bolesnika.

Smatra se da je incidenca teške hemolizne reakcije, odbacivanja kalema ili GvHD i drugih komplikacija kod ABO-inkompatibilnosti manja ukoliko se primenjuju MĆ poreklom iz kostne srži, uz sprovođenje mijeloablativno kondicionog režima (4, 105–112). Suprotno, upotrebu MĆ prikupljenih iz periferne krvi sa nemijeloablativnim kondicioniranjem karakterišu veći broj MĆ, ali i zrelih imunokompetentnih ćelija u harvestu (4, 106). Takve transplantacije karakterišu brži oporavak hematopoeze i češće ispoljavanje imunski posredovanih povoljnih (antitumorski efekat) ili neželjenih efekata.

Veća učestalost komplikacija posle bidirekcijske ABO-inkompatibilne transplantacije može biti pripisana delimično istovremenom prisustvu nepovoljnih činilaca major i minor

inkompatibilnosti – ispoljavanju sinergije pojedinačnih potencijalnih neželjenih efekata. Teoretski, major ABO-inkompatibilna transplantacija, vodeći do ćelijskih oštećenja sa sledstvenim oslobađanjem citokina neposredno, može doprineti aktivaciji donorskih limfocita, usmerenih protiv antigena primaoca. Takođe je moguće da je kraće održavanje kalema izazvano reakcijom zbog neusklađenosti minor antigena histokompatibilnosti – pri čemu, ABO-inkompatibilnost predstavlja samo neku vrstu surogatnog markera, a ne i suštinsko objašnjenje za fenomen odbacivanja.

Pored ABO-inkompatibilnosti, ima podataka o transplantaciji MĆ sa neusaglašenim statusom davaoca i primaoca u krvnogrpnim sistemima Rhesus, Kell, Kidd i MNS. Međutim, kod takvih transplantacija do hemolize može doći jedino ako u cirkulaciji bolesnika postoji iregularno imunsko antitelo (u dovoljnio visokom titru) usmereno protiv antigena eritrocitnih krvnogrpnih sistema davaoca (2, 95). Učestalost imunske hemolize, prouzrokovane ovakvom vrstom inkompatibilnosti je veoma mala – oko 1–2% (2–4). Takođe je potrebno istaći da inkompatibilnost u krvnogrpnim sistemima eritrocita ne bi trebalo da usporava generalni oporavak hematopoeze, tj. oporavak leukocita i trombocita, niti je udružen sa povećanim rizikom od odbacivanja alokalema, ali takvo stanje može rezultovati klinički manifestnim imunohematološkim problemima (2–4, 40, 95).

Pre razmatranja imunohematoloških pokazatelja, ispitivani i tabelarno su prikazani parametri afereze MNĆ. S tim u vezi, već je napomenuto da su u Institutu za transfuziologiju i hemobiologiju VMA razvijeni originalni protokoli: a) afereznog prikupljanja MĆ (primenom Cobe-Spectra i Spectra-Optia); b) *ex vivo* prečišćavanja; c) kriokonzervacije i d) kontrole i odžavanja kvaliteta MĆ. Korišćene su dve osnovne procedure prikupljanja ćelija – afereza velikog volumena (češće) i konvencionalna afereza (po potrebi). Prečišćavanje je obuhvatilo procesiranje i imunomagnetnu selekciju. Kriokonzervacija izvedena je procedurama neprogramiranog i programiranog postupka zamrzavanja (uz kompenzaciju oslobođene toplote fuzije). Kontrola aspirata/harvesta je podrazumevala kvantifikaciju TNĆ, MNĆ, CD34<sup>+</sup> ćelija i njenih podtipova.

Najpre su izneti rezultati koji se odnose na osnovne parametre prikupljanja MĆ iz različitih izvora – kostna srž vs. periferna krv; srodne vs. MUD transplantacije (tabela 5). Do detalja analizirani podaci vezani za kolekciju MĆ aferezom (tabela 6). Tako, date su vrednosti o apsolutnom broju, polu i uzrastu davalaca, vrsti oboljenja, zatim broju

bolesnika koji su tretirani transplantacijom, uz poseban osvrt na specifične aferezne parametre – na primer, volumen procesirane krvi i/ili harvesta, kao i rezultati kvantifikacije navedenih ćelija. Vidljivo je da su vrednosti volumena harvesta ( $267,6 \pm 55,3$  mL vs.  $261,7 \pm 45,3$  mL) i prinosa CD34<sup>+</sup> ćelija ( $8,3 \pm 3,5$  vs.  $7,8 \pm 4,8$  po kg<sup>tm</sup>) slične za oba (Cobe Spectra vs. Spectra Optia) separatora krvnih ćelija. Međutim, uz sličan prinos CD34<sup>+</sup> ćelija, volumen harvesta je bio značajno ( $p < 0,05$ ) manji kod srodnih, naspram MUD transplantacijama ( $220,5 \pm 42,6$  mL vs.  $288,6 \pm 68,3$  mL).

Uočeno je da su primitivnije populacije MĆ (CD34<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup> ćelije) bile u većem procentu zastupljene u aspiratu kostne srži u poređenju sa harvestom. Veća zastupljenost CD34<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup> ćelije omogućava njihovu terapijsku primenu u regenerativnoj medicini. Zahvaljujući svojstvu intersistemske plastičnosti, upotreba MĆ opravdana je u lečenju bolesnika sa oštećenjem miokarda, jetre, pankreasa, moždanog i vaskularnog tkiva, itd. U tom kontekstu, prve kliničke studije su pokazale da ubrzavanje MĆ u neko oštećeno i/ili ishemijsko područje rezultuje njihovim prihvatanjem ("homing") i sledstvenom trans-diferencijacijom u ćelijske linije datog organa/tkiva, uključujući i genezu kolateralnih krvnih sudova – terapijska angiogeneza ili "neoangiogeneza" (4). Mehanizmi koji omogućavaju trans-diferencijaciju ili "reprogramiranje" MĆ – posredstvom spoljašnjih ("extrinsic") i/ili unutrašnjih ("intrinsic") faktora – još su uvek samo delimično razjašnjeni. Pored toga, primitivnija populacija MĆ će moći obezbediti kompletnu i dugotrajnu repopulaciju kostne srži posle konvencionalne transplantacije u lečenju hematoonkoloških bolesnika (2–4).

Od rezultata imunohematoških ispitivanja, prikazani su antigeni kompletnog (raspoloživog) fenotipa krvnogrupnih sistema eritrocita kod davalaca i primalaca (pre i posle transplantacije). Kod svih primalaca, a posebno kod ABO-inkompatibilnosti, izvedena je periodična hemofenotipizacija (počev od +30. dana) radi procene prihvatanja alokalema na osnovu konverzije hemofenotipa. Obavljeno je i ispitivanje prisustva iregularnih antieritrocitnih antitela – u plazmi/serumu (IAT) i na eritrocitima (DAT). Ova ispitivanja izvedena su neposredno (dva i 24 sata posle transplantacije), odnosno periodično u post-transplantacijskom toku. Koristeći imunohematološke analize, definitivni zaključak o prihvatanju kalema bilo je moguće doneti na osnovu: a) pojavljivanja i procenta DSE; b) nestanka recipijent-specifičnih antigena i c) promena u titru prirodno-prisutnih antitela sistema ABO.

Kod ABO-inkompatibilnih transplantacija, posebno su svrstane i tabelarno grupisani parovi donor/recipijent sa major, minor ili bidirekcijskom nepodudarnošću. Kao što je u tabeli 10. vidljivo, minor inkompatibilnost je bila najučestalija, postojala je kod oko polovine svih nepodudarnosti u sistemu ABO. To je u skladu sa objavljenim podacima iz literature (2–4, 7, 103, 104). Već je naglašeno da je stav našeg Centra za transplantaciju MČ da titar antitela anti-A/B treba da bude  $\leq 16$  neposredno pre transplantacije. Pokazano je da izvođenjem najčešće jedne, ponekad dve do tri procedure izmene plazme (kod bolesnika koji su imali veći titar antitela anti-A/B od navedenog kritičnog "praga"), uočena je statistički značajna redukcija donor-specifičnih aloantitela sistema ABO klase IgG i IgM ( $p < 0.05$ ).

Što se tiče rezultata inkompatibilnosti izuzev (osim) sistema ABO, utvrđeno je da neusklađenost parova donor/recipijent na osnovu jednog antigena bila retka pojava (10–20%; tabele 13 i 14) za ispitivane antigene sistema Rhesus kod obe grupe bolesnika. Takođe, u ovoj studiji nisu uočeni bilo kakvi sporedni efekti ili komplikacije usled razlika u antigenima sistema Rhesus.

Opšte je poznato (4, 7, 95) da nepodudarnost u ostalim (retkim) krvnogrupnim sistemima (Kell, Kidd, P, MNS i Duffy) je praktično od zanemarljivog kliničkog značaja za krajnji ishod transplantacije. Podaci u tabelama 17. i 18. potvrđuju da je i u ovoj studiji postojala statistički značajna ralika u neslaganju parova donor/recipijent u spomenutim retkim sistemima (pojedinačni i multipli antigeni) između grupe ispitanika i kontrolne grupe. Međutim, ove nepodudarnosti su imale jedino dijagnostički značaj (dokaz o prihvatanju alokalem na osnovu procenta DSE), ali ne i klinički značaj – tj. nisu uticale na pojavu komplikacija transplantacija.

Rezultati ispitivanja proširenog fenotipa eritrocitnih krvnogrupnih sistema – sa posebnim osvrtom na antigenske determinante i fenomen konverzije fenotipova – uz testiranje i nekih drugih imunohematoloških analiza (na primer, DAT i IAT) i posebno praćenja citogenetskih promena kod dva bolesnika (lečenih primarnom i sekundarnom ABO-inkompatibilnom transplantacijom) ilustrativani su tabelama 19 do 21. Tabela 22. sadrži podatke o tri para donor/recipijent (odabrani slučajnim izborom iz grupe parova donor/recipijent sa različitim polom) gde je kao marker prihvatanja alokalema služio polni hromozom.

Najzad, radi boljeg sagledavanja značaja i mogućnosti primene mikroaglutinacijske tehnike u karticama a u cilju imunohematološke potvrde kompletnog himerizma – tj. konverzije antigena eritrocitnih krvnogrupnih sistema – prikazani su rezultati dobijeni posle izvedene

jedne major, odnosno jedne minor ABO-inkompatibilne MUD transplantacije (slike 12a–c i 13a–c). Sličan rezultat je prezentovan i u radu japanskih autora, objavljen 2015. godine (101).

Već je spomenuto da je jedna od potencijalnih ranih komplikacija ABO-inkompatibilnih transplantacija, intravaskularna hemoliza. Ona se manifestuje neposredno po infuziji MĆ, kada primaočeva aloantitela reaguju sa unetim eritrocitima iz aspirata ili ređe iz harvesta. Smatra se da kada je titar aloantitela u primaočevoj cirkulaciji  $\geq 16$  (IgM i/ili IgG), deplecija broja eritrocita u aspiratu (procesiranje), odnosno redukcija plazmatskog sadržaja aloantitela (izmena plazme) su indikovane. Inače, količina eritrocita u harvestu MĆ prikupljenih iz periferne krvi ili u aspiratu posle procesiranja može da iznosi oko 10–15 mL (2–4). Ponekad se hemoliza javlja kasnije u post-transplantacijskom periodu, naročito kada je titar aloantitela redukovan izmenama plazme, a kasnije dolazi do ponovnog porasta njihovog plazmatskog sadržaja (4).

Za razliku od prethodnih grupa bolesnika, kod onih koji su lečeni minor ABO-inkompatibilnom transplantacijom može doći do pojave odložene (između 10. i 17. dana posle transplantacije) imunske hemolizne reakcije. Ona je posredovana aloantitelima iz plazme (retko) i/ili antitelima produkovanim od strane donorskih limfocita B, odnosno plazma ćelija. Ovaj tip hemolize je po pravilu slabog intenziteta i od manjeg kliničkog značaja. U praktičnom radu, redukciju volumena plazme bi trebalo izvesti samo u slučajevima kada je titar aloantitela specifičnosti ABO (klase IgG i/ili IgM)  $\geq 128$  (4, 40). Jaka imunska hemoliza, nastala usled stvaranja i delovanja aloantitela od strane donorskih limfocita B se opisuje pri minor ili bidirekcijskoj ABO-inkompatibilnosti. Poznato je da antigeni ABO/H nisu eksprimovani jedino na eritrocitima, već se nalaze na mnogim tkivima. Zbog toga, tako stvorena anti-A/B usmerenih protiv antigena primaoca (minor ili bidirekcijska ABO-inkompatibilnost) mogu se vezati, na primer, za endotelske ćelije i oštetiti ih – što može potencijalno biti okidač za razvoj GvHD (2–4, 95).

Kao što je spomenuto, akutna hemoliza je najčešće izazvana major ABO-inkompatibilnošću; ona može biti sprečena i redukcijom broja eritrocita u suspenziji MĆ i/ili izmenama plazme kod bolesnika. Dovoljno intenzivne izmene plazme su korisne jer mogu sprečiti pojavu ne samo hemolizne reakcije, nego obezbediti i normalnu (makar i tranzitorno) eritrocitopoezu. Treba reći da ova antitela ne ispoljavaju inhibišući efekat na procese granulocitopoeze i megakariocitopoeze.



Suprotno od opisane neposredne ili akutne, odložena imunska hemoliza (destrukcija primaočevih eritrocita) je rezultat minor ABO-inkompatibilnosti. Ova reakcija je jedna od potencijalnih i još uvek nedovoljno razjašnjenih komplikacija transplantacije MĆ. Veliki broj limfocita u suspenziji MĆ prikupljenih iz periferne krvi (uz prisustvo minor ABO-inkompatibilnosti) doprinosi većoj incidenci ovog imunski posredovanog fenomena (107).

Kod minor ABO-inkompatibilnih transplantacija, učestalost i intenzitet hemolizne reakcije direktno su povezani sa brojem limfocita u alokalemu (organ ili MĆ). Utvrđeno je da kada je izvor MĆ periferna krv, sadržaj CD3<sup>+</sup> limfocita T je oko 16 puta, a broj CD19<sup>+</sup> limfocita B veći oko 11 puta u poređenju sa njihovim sadržajem u aspiratu kostne srži (106). Inače, odložena imunska hemoliza, usled *de novo* produkcije antitela pokrenuta je od strane "passenger" limfocita (unetih alokalemom), a javlja se u oko 10–15% transplantacija. Rizik od ove hemolizne reakcije je još veći ukoliko je donor nesrodna osoba i pri korišćenju samo ciklosporina A za prevenciju GvHD. Nemijeloablativni kondicioni režim, uz brojne povoljne efekte (manja toksičnost), omogućava i lakše nastajanje mešanog himerizma na nivou limfocita B. Detekcija ranog (pre nestanka primaočevih eritrocita iz cirkulacije) pojavljivanja donorspecifičnih limfocita B, mogla bi biti korisna za predviđanje potencijalne hemolizne reakcije. U svakom slučaju, raspoloživi podaci ukazuju na to da je etiologija hemolize multifaktorijalna i da su serološki i klinički činioci sami po sebi nedovoljni za tačno predviđanje ili isključivanje rizika od nastanka ove reakcije (2–4, 106).

U ovoj grupi bolesnika (ispitanici sa ABO-inkompatibilnom i kontrola sa ABO-kompatibilnom transplantacijom) nije bilo teškog oblika neposredne hemolize. Razlog tome je, među ostalima, pravovremena i dovoljno intenzivna priprema bolesnika (izmenama plazme), odnosno maksimalna redukcija broja eritrocita u aspiratu. Takođe, nije uočena neposredna liza eritrocita – to potvrđuju i paraklinička testiranja: tipično negativni ili nebitno izmenjeni imunohematološki nalazi, odsustvo redukcije haptoglobina i povećanog plazmatskog sadržaja bilirubina, odnosno LDH. Međutim, kod jedne bolesnice sa PRCA, konstatovana je blaga hemolizna komponenta anemijskog sindroma (povećani LDH i snižen haptoglobin).

Saopštavano je (107) o lečenju 89 bolesnika (HLA-podudarni srodni donori) sa različitim hematološkim bolestima. Ova klinička studija uključuje 49 bolesnika lečenih pomoću ABO-kompatibilnih i 40 primenom ABO-inkompatibilnih (20 major, 15 minor i 5 bidirekcijskih) transplantacija. Autori su uočili da nije bilo značajne razlike u pogledu

kinetike prihvatanja/održavanja alokalema, niti u zahtevima za transfuzijsko (suportivno) zbrinjavanje bolesnika – pripadnika različitih grupa. Uz to, nije uočena teška imunski-posredovana hemolizna reakcija, niti PRCA. Najzad, preživljavanje bolesnika i incidenca akutnog ili hroničnog GvHD bili su slični za sve navedene grupe. Tako, ovo kliničko ispitivanje govori u prilog tome da ABO-inkompatibilnost nije faktor rizika za kinetiku prihvatanja kalema, nastanak GvHD i prosečno preživljavanje bolesnika (107).

PRCA je potencijalna komplikacija major ABO-inkompatibilnosti. Radi se o poremećaju u kome postoji inhibicija/blokada u sazrevanju ćelija eritrocitne loze. Bolesnici sa PRCA imaju obično normocitnu ili ređe makrocitnu anemiju. Eritroblasti su deficitarni u kostnoj srži, ali je produkcija leukocita i trombocita normalna – te (za razliku od SAA) ne postoji pancitopenija. Iako in vivo mehanizmi odloženog prihvatanja ćelija eritrocitne loze kod major ABO-inkompatibilnih transplantacija još uvek nisu potpuno razjašnjeni, in vitro studije ukazuju na mogućnost inhibicije donor-specifične eritrocitopoeze posredstvom primaočevih antitela specifičnosti anti-A/B (111). O ovim patogenetskim mehanizmima biće pisano detaljnije u narednim delovima teksta (2, 110).

Danas se smatra da je PRCA prouzrokovan preostalim primaočevim limfocitima B, odnosno plazma ćelijama i *de novo* produkovanim antitelima, koja mogu suprimirati eritrocitopoezu. Češće se javlja kada je korišćeno nemijeloablativno kondicioniranje i ciklosporin A za profilaksu GvHD (109–111). Međutim, etiopatogeneza PRCA još uvek nije u potpunosti razjašnjena. Tumačenje etiopatogeneze ove komplikacije čini još težim činjenica da MĆ, uključujući populaciju unipotentnih BFU-E i CFU-E, u svojoj strukturi ne sadrže antigene specifičnosti ABO/H (2–4).

Pokazano je da posle major ABO-inkompatibilne transplantacije postoji veća učestalost PRCA loze kada se ne izvode izmene plazme ili afereze sa imunoapsorpcijom u cilju otklanjanja aloantitela iz cirkulacije primaoca (108). Međutim, ima i suprotnih mišljenja da pre-transplantacijske izmene plazme neće povoljno uticati na incidencu PRCA posle ABO-inkompatibilne transplantacije sa nemijeloblativnim kondicioniranjem, zbog ponovne sinteze i porasta titra aloantitela (unutar 7–10 dana po transplantaciji), kao i dužeg održavanja većih koncentracija aloantitela anti-A/B (110). Postoji korelacija između odložene redukcije titra aloantitela usmerenih protiv donorskih antigena i početka detektabilnosti mešanog himerizma, kao i povećane incidence PRCA. To je posledica (kao

što je navedeno) opstanka većeg broja funkcionalno očuvanih limfocita i plazma ćelija bolesnika posle nemijeloablativnog kondicioniranja. Teoretski, eliminacija primaočevih limfocita B i plazma ćelija bi mogla rezultovati ranijim kompletnim himerizmom (109). Na kraju treba reći da terapija egzogenim eritropoetinom nije bila i ne može biti efikasna u tretmanu bolesnika sa PRCA, ukazujući na ulogu i suštinu imunskih faktora i mehanizama u etiopatogenezi ove komplikacije (110). Takođe je opisano da, uprkos odloženoj rekonstituciji donor-specifične eritrocitopoeze, u bolesnika sa PRCA nema kliničkih simptoma i detektabilnih laboratorijskih znakova hemolize. Ova činjenica govori u prilog tome da antitela sistema ABO deluju i na one progenitore/prekurzore eritrocitopoeze koji još nemaju u svojoj strukturi ugrađeni molekul hemoglobina (2–4, 111).

Ispitivanja su pokazala da se odloženo prihvatanje donor-specifičnih eritrocita javlja u oko 10% bolesnika lečenih major ABO-inkompatibilnom transplantacijom (111). Od mogućih faktora rizika odloženog prihvatanja donorskih eritrocita kod major ABO-inkompatibilne transplantacije treba spomenuti: 1) visoki inicijalni titar antitela anti-A/B u cirkulaciji primaoca; 2) krvnogrupnu pripadnost donora i 3) vrstu kondicionog režima i posttransplantacijske imunosupresije za profilaksu GvHD (110). Takođe je rečeno da bolesnici podvrgnuti major ABO-inkompatibilnoj transplantaciji MĆ sa nemijeloablativnim kondicionim režimom, mogu imati češće odloženu hemoliznu reakciju zbog dužeg opstanka primaočevih aloantitela – *de novo* produkcija od strane preostalih i funkcionalno bolje očuvanih plazmocita – usmerenih protiv davaočevih eritrocitnih antigena (111).

Prema tome, faktori rizika za nastanak PRCA uključuju primenu ciklosporina A (za profilaksu GvHD), visok inicijalni ili perzistentno povišeni titar primaočevih antitela usmerenih protiv antigena davaoca i major ABO-inkompatibiliju, uz krvnogrupnu pripadnost A kod donora (110). Sumarno, duži opstanak antitela anti-A/B u cirkulaciji primaoca može rezultovati manje efikasnom eritrocitopoezom kod oko 10% bolesnika lečenih major ABO-inkompatibilnom transplantacijom. Od izuzetnog je značaja da se naglasi da nedovoljno efikasna eritrocitopoeze ne znači i generalno slabije prihvatanje svih populacija (toti/multi/pluripotentnih) alogenih MĆ (111).

Treba istaći da u istraživanju izvedenom u okviru ove disertacije pojava PRCA uočena je kod dva bolesnika iz ABO-inkompatibilne grupe. Kod jednog je obustavljena prevencija

GvHD ciklosporinom A, a kod drugog bolesnika primenjene su izmene plazme, uz anti-CD20 (Mabtera) u post-transplantacijskom periodu.

Kao što je to u delu teksta Rezultati detaljno opisano, u ovoj kliničkoj studiji bilo je dva bolesnika sa pojavom PRCA, kao komplikacijom major ABO-inkompatibilne transplantacije. Kod prvog para recipijent/donor inicijalno su postojale krvne grupe O, Rh-(D)-neg / A, Rh-(D)-neg, dok kod drugog para je bila prisutna kombinacija O, Rh-(D)-poz / A, Rh-(D)-poz. Izvor MĆ je u oba slučaja bila periferna krv, sa adekvatnim prinosom vijabilnih CD34<sup>+</sup> ćelija.

Prihvatanje alokalema potvrđeno je rano kod oba bolesnika na osnovu oporavka PMN (+13. i +11. dana) i trombocita (+14. i +12. dana). Međutim, prihvatanje transplantata je bilo parcijalno zbog izuzetno retkih prekuzora eritroidne loze u hipocelularnoj kostnoj srži. Naredne kontrole su potvrdile sličan nalaz – što je govorilo u prilog održavanja anemije usled poremećaja eritrocitopoeze, ukazujući na mogućnost PRCA.

U skladu sa podacima iz literature (2–4, 115, 116), bilo je opravdano uvođenje raznih pristupa imunomodulacijskog tretmana – primenjene su procedure izmene plazme, uz davanje imunoglobulina, kortikosteroida, ali i antitela anti-CD20 kod jednog bolesnika. Nakon toga došlo je do oporavka eritrocitopoeze kod oba bolesnika, uz imunoematološku potvrdu prihvatanja alokalema (prisustvo oko 95% DSE u cirkulaciji primaoca). Posle oko 6, odnosno 7 godina, bolesnici su u punoj kliničkoj remisiji, sa kompletnim donorskim himerizmom, bez znakova hGvHD.

Poznato je da je odbacivanje alokalema posle transplantacije MĆ posredovano donorskim limfocitima T ili NK ćelijama (112). Naime, duže održavanje bolesnikovih anti-donorskih antitela u cirkulaciji posle transplantacije može favorizovati odbacivanje kalema sledećim mehanizmima: a) antitelo-zavisnom ćelijama-posredovanom citotoksičnošću (ADCC) ili b) komplementom–posredovanom citotoksičnošću. Kada postoji nepodudarnost u antigenima klase I sistema HLA između davaoca i primaoca, sve ćelije donora ekspresuju ciljni antigen. Tada, prisustvo aloantitela (označena kao antitela  $\alpha$ -donor) u primaoca će dovesti do odbacivanja kalema, često sa smrtnim ishodom (112). Kod ABO-inkompatibilnosti, prisustvo spomenutih antitela  $\alpha$ -donor će rezultovati smanjenom/odloženom eritrocitopoezom ili PRCA. Za razliku od većine drugih autora (2–4, 111), po mišljenju ovih istraživača (112), antitela anti-A/B mogu da utiču i na zrelije populacije progenitora eritrocitopoeze (CFU-E). Naime,

prikazali su da je kod bolesnika utvrđeno prisustvo progenitora BFU–E, dok zreliji CFU–E nisu bili detektabilni.

Učestalija pojava reakcije GvL i sledstvena redukcija pojave relapsa bolesti je poznata činjenica pri transplantaciji MĆ prikupljenih iz periferne krvi – zbog većeg broja limfocita T u suspenziji MĆ. Međutim, nije poznato da li neusklađenost davaoca i primaoca u sistemu ABO utiče na pojavu i intenzitet GvL. Moguće je postaviti pitanje, zbog čega bi ABO-inkompatibilnost uticala na učestalost relapsa bolesti. Imunske reakcije udružene sa ABO-inkompatibilnom transplantacijom, možda bi mogle imati i neke direktne ili indirektne antitumorske efekte, kao što je reakcija GvL – i to, posredstvom oslobađanja citokina i/ili aktivacijom ćelija NK. Pretpostavlja se da do ovih manifestacija dolazi usled prisustva i delovanja specifičnih ugljenohidratnih determinanti krvnogrupnih antigena sistema ABO (105).

Već je spomenuto da ima autora koji smatraju da ABO-inkompatibilnost može uticati i na učestalost relapsa bolesti, a time na prosečno preživljavanje bolesnika posle alogene transplantacije (105–112). S tim u vezi, ispitivana je grupa bolesnika sa ANLL koji su podvrgnuti transplantaciji MĆ bez deplecije limfocita T od HLA identičnih srodnih davalaca. Kod ovih bolesnika profilaksa GvHD sastojala se od primene ciklosporina A i metotreksata. Pojava relapsa (u roku 3–46 meseci) uočena je kod 4 od 43 bolesnika lečenih ABO-inkompatibilnom transplantacijom, odnosno kod njih 18 od 76 bolesnika u kontrolnoj grupi (ABO istogrupna transplantacija). Sveukupna incidenca akutnog i hroničnog GvHD takođe nije bila povezana sa razlikama u krvnogrupnom sistemu ABO. Heterogenost stadijuma bolesti i kondicionog tretmana mogli su uticati pri proceni efekata ABO-inkompatibilnosti na učestalost relapsa, ali ne i na pojavu komplikacija posle transplantacije. Ovo ispitivanje pokazuje da ABO-inkompatibilnost ne bi trebalo da predstavlja faktor rizika za porast učestalosti komplikacija ili mortaliteta posle transplantacije MĆ (105).

Radi sagledavanja uticaja GvHD na tok i ishod ABO-inkompatibilnih transplantacija, najpre je potrebno ukratko razjasniti osnovne mehanizme etiopatogeneze ove komplikacije alogene transplantacije – što će biti predmet daljeg razmatranja u delu teksta koji sledi.

Krajnje pojednostavljeno, patogeneza GvHD se odvija u tri faze. U prvoj fazi, kondicioni režim oštećuje tkivo što dovodi do proizvodnje signala "opasnosti" ("danger signals") i proinflamacijskih citokina, kao što su TNF- $\alpha$ , interleukin 1 (IL-1), IL-6. Vrhunac ovih događaja je

"citokinska oluja", koja aktivira antigen-prezentujuće ćelije (APĆ) domaćina i donorske limfocite T. Druga faza obuhvata proliferaciju i diferencijaciju donorskih limfocita T u odgovoru na APĆ domaćina, što rezultuje rapidnom biohemijskom kaskadom, koja se indukuje stvaranjem potpomažućih T 1 ćelija ("T-helper" – TH1), TH17 (za CD4 limfocite T), citotoksičnih T 1 ćelija ("T-cytotoxic" – TC1) i TC17 ćelija (za CD8 limfocite T), koje luče različite citokine, poput interferona  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-2, IL-17 i TNF- $\alpha$ . Poslednja, treća faza predstavlja kompleksnu kaskadu ćelijskih medijatora i solubilnih proinflamacijskih molekula koji deluju zajedno i dovode do pojačanja lokalne povrede tkiva. GvHD se takođe karakteriše disbalansom između efektorskih limfocita T i regulatornih limfocita T (Tregs). U svim navedenim fazama, proinflamacijska kaskada i različiti oblici tkivnog oštećenja dovode do oslobađanja biomarkera GvHD u cirkulaciju, koji se potom mogu otkriti testiranjem krvi (113–116).

Nastanak aGvHD predstavlja potencijalno letalnu komplikaciju, čak i kod HLA usaglašenih parova donor/recipient. Patofiziologija GvHD zavisi od aspekata prilagodljivosti imuniteta i interakcija između donorskih limfocita T i domaćinovih dendritskih ćelija (DĆ), ali i drugih imunskih i endotelskih ćelija i komponenti prirodnog imunskog odgovora. Oštećenje tkiva uzrokovano kondicionim režimom vodi do otpuštanja egzogenih i endogenih "signala opasnosti", označenih kao "molekulski obrasci patogena" i endogeni neinfektivnih molekula poznatih kao "molekulski obrasci oštećenja" (DAMPs) koji su odgovorni za započinjanje ili amplifikaciju aGvHD povećanjem sazrevanja DĆ i odgovora aloreaktivnih limfocita T (115).

Identifikovana su tri preduslova za razvitak GvHD: a) graft mora da sadrži imunski kompetentne ćelije; b) primalac mora biti nesposoban za odbacivanje donorskih ćelija; i c) primalac mora ekspresovati tkivne antigene koji nisu prisutni u davaoca. Zreli davaočevi limfociti T su identifikovani kao osnovni ćelijski medijatori GvHD i da su domaćinove i donorske APĆ, naročito dendritske ćelije (DĆ) kritične za indukciju GvHD. Pored limfocita T i DĆ, nekoliko drugih ćelijskih subsetova (B limfociti, makrofagi, NK ćelije i NKT ćelije), je uključeno u patogenezu GvHD. Kondicioni režim koji uključuje ozračenje celog tela (Total Body Irradiation – TBI) i/ili hemioterapiju, oštećuje tkiva domaćina. Oštećene ili umiruće ćelije otpuštaju egzogene i endogene signale "opasnosti" (113–115).

Od posebnog su značaja ovi signalni proteini "opasnosti" (oslobođeni iz oštećenog tkiva) prate transplantaciju MĆ – a upravljaju mezenhimskim, epitelijalnim i imunskim

ćelijskim komunikacijama u pokušaju da se održi homeostaza. Ovi signali "opasnosti" indukuju brze promene u redoks-senzitivnim proteinima, što dovodi do aktivacije nuklearnih faktora transkripcije, uključujući nuklearni faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), faktor odgovora ranog rasta (Egr1) i aktivacioni protein 1 (AP1), koji su velikim delom uključeni u proizvodnju proinflamacijskih citokina. TBI i/ili hemoterapija i proinflamacijski citokini dovode do stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i reaktivnih azotnih vrsta (RNS), kao što su superoksid, azot oksid, hidroksilni radikali, peroksinitrit i njihovi proizvodi. Uz to, proinflamacijski citokini poput onih iz IL-1 familije i TNF- $\alpha$  zahtevaju ROS za svoju aktivaciju. S druge strane, anti-inflamacijski citokini (na primer, faktor transformacije rasta  $\beta$  ili TGF- $\beta$ , IL-10 i IL-4) inhibišu dejstva ROS/RNS i predstavljaju antioksidativnu zaštitu. Stoga, proinflamacijski i anti-inflamacijski citokini deluju jedni na druge putem stvaranja ROS/RNS. Tako, nedavno je pokazano da miševi koji imaju povećanu ekspresiju ROS razvijaju mnogo teži oblik autoimunskog encefalomijelitisa u eksperimentalnom modelu, dok miševi kod kojih nedostaje ROS pokazuju manju infiltraciju neutrofila u ileumu i manja oštećenja tkiva, što vodi blažem obliku GvHD (113–116).

Posle primenjenog kondicionog režima, zbog oštećenja tkiva u gastrointestinalnom (GI) traktu omogućen je prodor bakterija. Za detektovanje egzogenih bakterijskih komponenti, imunski sistem domaćina identifikuje strukture označene kao "molekulski obrasci patogena" (PAMP) koji se nalaze u mikroorganizmima. Većina ćelija urođenog imuniteta iskazuje obrazac receptora (PRR) putem kojeg prepoznaju PAMP. Vezivanje struktura PAMP preko PRRs na APC aktivira odgovor urođenog imuniteta, koji indukuje ushodnu regulaciju citokina i kostimulišućih molekula MHC klase II i ubrzavaju migraciju DC do T limfocitnog prostora u limfnom čvoru (115).

Rasvetljena je ključna uloga puta "receptora sličnog Tollu" 4 (TLR4) liganda i lipopolisaharida (LPS; LPS/TLR4) u nastanku GvHD i utvrđeno da transplantacija MĆ od LPS-rezistentnog davaoca vodi do značajno manjeg GvHD u poređenju sa prihvatanjem MĆ od LPS-osetljivog davaoca i da antagonisti LPS mogu da redukuju GvHD. Pokazalo se da LPS igra ulogu u aloimunskom oštećenju pluća. Sistemsko izlaganje TLR7 agonistima, R-848, dovoljno je da se dozvoli pristup aktivisanim limfocitima T perifernih tkiva i indukuje GvHD. Davanje agonista TLR7/8, pre transplantacije imalo je za cilj smanjenje letaliteta od GvHD. Ovi rezultati pokazuju da određeni TLR može doprineti imunskoj

regulatornoj funkciji. Na primer, bakterijski flagelin, agonist TLR5, reguliše odgovor CD4 limfocita T povećanjem stvaranja regulatornih limfocita T i štiti epitelijalne ćelije od radijacijom indukovane toksičnosti. Pretransplantacijsko davanje fragelina redukuje GvHD dok čuva post-transplantacijski donor-specifični imunitet (113–115).

Strukture PAMP predstavljaju očuvane molekule mikroorganizama, koji ih oslobađaju prilikom ulaska u organizam. Oni se vezuju za "receptor koji prepoznaje obrasce patogena" (PRR), prvenstveno TLR i "receptor sa nukleotid-vezujućim domenom" (NOD), kao i "receptor bogat leucinskim reziduama" (NOD-like receptor ili NLR). Oni aktiviraju različite puteve, što dovodi do proizvodnje proinflamacijskih citokina posredstvom aktivacije NF- $\kappa$ B. Glavna veza između PRR i NF- $\kappa$ B aktivacije i produkcije citokina tokom GvHD je citoplazmatski protein primarnog odgovora mijeloidne diferencijacije 88 (MyD88) u APC. Ove ćelije, prvenstveno DC, su potentni senzori PAMP-ova, što uzrokuje njihovu aktivaciju i bolju prezentaciju kompleksa MHC limfocitima T (116). Strukture NLR su uključene u sekreciju proinflamacijskih citokina, kao što su interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) i IL-18. NOD2 prepoznaje muramyl dipeptide (MDP), komponentu bakterijskog peptidoglikana i indukuje NF- $\kappa$ B aktivaciju, dovodeći do povećanja Th1 odgovora (115).

Prema tome, endogeni neinfektivni molekuli (poznati kao DAMPs) se oslobađaju posle oštećenja tkiva idukovanog kondicionim režimom i igraju ključnu ulogu u GvHD. Iako proinflamacijski citokini ne spadaju u DAMP-strukture, oni mogu da služe kao DAMP. Povezanost između proinflamacijskih citokina i jačine GvHD je proučena na animalnom modelu. Oštećeno, aktivisano domaćinovo tkivo sekretuje citokine, kao što su TNF- $\alpha$ , IL-1 i IL-33. Posledice delovanja tih citokina je povećana ekspresija MHC antigena i adhezivnih molekula, koja regrutuju efektorske ćelije i favorizuju prepoznavanje domaćinovih aloantigena od strane donorskih T limfocita. Pored proinflamacijskih citokina, DAMP uključuje specifične intracelularne molekule, ali i neke koje su ekstracelularno locirane. Vanćelijski adeozid trifosfat (ATP) oslobođen iz "umirućih" ćelija može da služi kao signal "opasnosti" za intenziviranje GvHD. ATP se vezuje za P2X purinoreceptor 7 (P2X7R) na domaćinovima APC i indukuje veću ekspresiju kostimulišućih molekula CD80 i CD86 na APC. Ovaj receptor igra centralnu ulogu u sekreciji IL-1 $\beta$ . Heparan sulfat (HS), komponenta ekstraćelijskog matriksa, može aktivirati TLR4 na DC, što stimuliše sazrevanje DC i odgovor aloreaktivnih limfocita T. Tretman inhibitorom serin proteaze  $\alpha$ 1-antitrypsin (A1AT)



smanjuje serumski nivo HS, što rezultuje redukcijom intenziteta GvHD. Utvrđeno je da posle alogene transplantacije MĆ, nivo serumskog HS je bio povećan i korelirao je sa jačinom GvHD. Tretman sa A1AT neposredno po transplantaciji redukovao je ekspanziju aloreaktivnih limfocita T, ali povećava oporavak Tregs i smanjuje intenzitet i letalitet od GvHD, što može biti efikasna strategija za prevenciju GvHD (113–116).

Kod alogene transplantacije MĆ, aGvHD je jedan od najčešćih uzroka post-transplantacijskog morbiditeta i mortaliteta. Nema opšteprihvaćenog, standardnog i efikasnog tretmana GvHD za one bolesnike koji su refraktorni na steroide. Većina pristupa prevencije i tretmana aGvHD podrazumeva modulaciju donorskih limfocita T. Blokada DAMPs signala uključujući ATP, HS, UA i HMGB1 može biti strategija za prevenciju aGvHD putem redukcije sazrevanja DC i odgovora aloreaktivnih limfocita T. Pored ćelija prirodnog imuniteta, disfunkcija endotelne ćelije može voditi do refraktornog tretmana GvHD. Otkriveno je da porast nivoa solubilnog TM, markera endotelijalnog oštećenja, udružen sa steroid-refraktornim GvHD, sugeriše da njihova patogeneza uključuje progresivnu mikroangiopatiju. Od nedavno se zna da strukture DAMP, kao i ekstracelularna DNK, histoni i S100A8/A9 uzrokuju trombotsku mikroangiopatiju. Preciznije razjašnjenje uloge kompleksa PAMP/DAMP u etiopatogenezi GvHD, kao i mikroangiopatije – mogu ponuditi nove terapijske pristupe za "steroid-refraktorne" forme GvHD (115, 116).

Generalno, uočeno je da je minor ABO-inkompatibilnost češće udružena sa razvojem aGvHD u poređenju sa ABO-kompatibilnim, ali i sa major ABO-inkompatibilnim transplantacijama. Takođe zapaženo je da major ABO-inkompatibilnost ima post-transplantacijski ishod koji više liči kliničkom toku pri minor ABO-inkompatibilnosti, nego stanju posle ABO-kompatibilne transplantacije. Oporavak eritrocitne loze je češće odložen kod major ABO-inkompatibilne transplantacije. Učestalost relapsa bolesti nije povezana za status ABO-kompatibilnosti. Prema tome, pokazano je da ABO-inkompatibilnost predstavlja faktor rizika ne samo za hemoliznu reakciju, nego i za preživljavanje bolesnika i pojavu GvHD posle transplantacije MĆ (2–4, 105,108).

U ovoj kliničkoj studiji, do relapsa bolesti i uopšte do smanjenog srednjeg preživljavanja došlo je kod određenog broja bolesnika, posebno kod onih lečenih ABO-inkompatibilnom transplantacijom. To potvrđuju i veoma ilustrativni primeri relapsa u tabelama 19. i 21. kod dva bolesnika, kod kojih je bilo potrebno izvesti sekundarne transplantacije. Ipak, najčešći razlog smanjenog preživljavanja bila je pojava intenzivnog

stepena aGvHD. Naime, ABO-inkompatibilnost je značajno ( $p < 0,05$ ) smanjila preživljavanje bolesnika u odnosu na kontrolnu grupu bolesnika lečenih ABO-kompatibilnom transplantacijom ( $89,05 \pm 47,3$  vs.  $127,25 \pm 48,2$  meseci) kao što se to vidi u tabeli 26. Kod bolesnika lečenih ABO-inkompatibilnom transplantacijom konstatovana je signifikantno ( $p < 0,05$ ) češća pojava aGvHD (stepena 3–4) u odnosu na kontrolnu grupu.

Iako rezultati ovog istraživanja nesporno ukazuju na značajno češću pojavu aGvHD većeg stepena u grupi bolesnika sa ABO-inkompatibilnom transplantacijom MĆ – zbog nehomogenosti grupa (prema izvoru MĆ hematopoeze, prirodi i stadijumu osnovnog oboljenja, kondicionom režimu, životnoj dobi) nije bilo moguće analizirati uticaj pojedinih oblika ABO-inkompatibilnosti na učestalost i jačinu GvHD.

Pokazano je (103) da bolesnici sa ABO-inkompatibilnošću pri alogenoj transplantaciji MĆ imaju bolje "preživljavanje bez bolesti" (Disease Free Survival – DFS) i manju incidencu relapsa u odnosu na ABO-kompatibilne transplantacije. Moguće je da imunološka reakcija koja nastaje pri ABO-nepodudarnoj transplantaciji MĆ može favorizovati GvL – posredovan citokinima ili aktivacijom NK ćelija.

U ovoj seriji bolesnika nije dokazan uticaj ABO-inkompatibilnosti na incidencu relapsa bolesti. Imajući u vidu heterogenost grupe prema prirodi osnovne bolesti, izvoru MĆ hematopoeze i kondicionom režimu, ovakvi rezultati moraju biti prihvaćeni sa rezervom. Zapaženo je da je ABO-inkompatibilija mogući uzrok/prediktor kraćeg preživljavanja bolesnika posle alogene transplantacije MĆ hematopoeze, zbog većeg stepena rizika od post-transplantacijskog morbiditeta i mortaliteta (103). Kao što je rečeno, slično je potvrdila analiza i ovog istraživanja – a uzrok ovakvim rezultatima je utvrđena češća pojava potencijalno fatalnog aGvHD stepena 3–4.

\*

\*

\*

Sumarno posmatrano i pojednostavljeno, GvHD je jedna od najčešćih komplikacija alogene transplantacije MĆ. Može da se javi uprkos primenjenoj sveobuhvatnoj (višestrukoj) imunosupresivnoj profilaksi i odabranog (HLA-podudarnog) srodnog ili MUD

davaoca. U etiopatogenezi GvHD ključnu ulogu imaju davaočevi limfociti T u sadejstvu sa drugim imunokompetentnim efektorskim ćelijama i proinflamacijskim medijatorima. Nastanku ove komplikacije svakako može doprineti deficit funkcije (kombinovani) imunskog sistema primaoca, najviše hipofunkcija limfocita B, što povlači za sobom neefikasnost u eliminisanju donor-specifičnih antigena, a prema mišljenju nekih postoji i deficit funkcije timusa – što potvrđuje učestalija pojava GvHD kod starijih primalaca.

U sklopu patofiziološkog supstrata u razvoju aGvHD (čine ga tri faze) najpre dominira štetno dejstvo kondicionog režima što (uz osnovnu bolest i dejstvo prethodnih agresivnih terapija) dovodi do oštećenja tkiva i sinteze proinflamacijskih citokina  $\text{TNF-}\alpha$  i  $\text{IL-1}$  koji pojačavaju aktivaciju APC domaćina. Prodor lipopolisaharida kroz oštećenu crevnu mukozu/barijeru rezultuje aktivacijom imunskog sistema, uz delovanje egzogenih i endogenih signala "opasnosti" i pokretanje kaskadne citokinske reakcije. Fazu koja sledi, uglavnom odlikuje interakcija "naivnih limfocita T" davaoca sa APC domaćina – uz oslobađanje  $\text{IFN-}\gamma$ ,  $\text{IL-2}$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ , dovodeći tako do ekspanzije limfocita T. Poslednja ili treća faza predstavlja kompleksnu kaskadu multiplih efektorskih mehanizama, uključujući citotoksične efektorske limfocite, ćelije NK i specifične limfocite (Large Granular Lymphocytes – LGL).

Sve to dovodi do citokinske oluje – tj. sinteze  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}$ , kao i azot oksida. Na kraju, interakcija LGL i aloreaktivnih limfocita T dovodi do brojnih oštećenja tkiva i organa.

## Zaključci

Optimizacija i kontrola kvaliteta protokola prikupljanja MĆ su se pokazali kao bitan činilac i preduslov za uspješno lečenje primenom svih modaliteta transplantacija, tako i ABO-inkompatibilnih. Izvesno je da ABO-inkompatibilnost primaoca i davaoca, iako ne predstavlja apsolutnu kontraindikaciju, može uticati na tok i ishod alogene transplantacija u odnosu na kinetiku prihvatanja pojedinih krvnih loza (posebno eritrocita), incidencu komplikacija (aGvHD intenzivnijeg stepena) i stvaranje imenskog osnova za potencijalni GvL efekat.

Na osnovu rezultata ovog kombinovanog retrospektivno-prospektivnog kliničko-laboratorijskog istraživanja, moguće je tvrditi da:

- Primenjeni mobilizacijski protokoli u ovom istraživanju su se pokazali kao efikasni (kod oko 80% ispitanika prikupljeno je  $\geq 5 \times 10^6/\text{kg}$  CD34<sup>+</sup> ćelija). Utvrđena je korelacija između prinosa CD34<sup>+</sup> ćelija – nezavisno od vrste afereznog prikupljanja – i kinetike repopulacije kostne srži, sa sledstvenim rekonstituciju hematopoeze.
- Izvođenjem LVL, zastupljenost primitivnijih CD34<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup> ćelija bila je veća. Njihov veći broj ( $\geq 1 \times 10^6/\text{kg}$ ) uticao je na kinetiku rekonstitucije hematopoeze i dugotrajno održavanje alokalema.
- Imunohematološkim ispitivanjem antigena eritrocita bilo je moguće dobiti pouzdani dokaz o prihvatanju alokalema. Pojava novih donor-specifičnih antigena u fenotipu primaoca i nestajanje ranije prisutnog recipijent-specifičnog antigena imali su podjednak značaj za dokazivanje himerizma. Promene aloantitela anti-A/B, u odnosu na konverziju fenotipa eritrocita, manje su pouzdani markeri prihvatanja alokalema.

- Vreme dokazivanja prisustva novog donor-specifičnog antigena (DSE = 95–100%), odnosno nestajanja recipijent-specifičnog antigena posle transplantacije MĆ u proseku bilo je  $87,9 \pm 36,2$  dana. Citogenetska ispitivanja dala su veoma pouzdan, a u odnosu na hemofenotipizaciju raniji (u proseku +28. dan) podatak o prihvatanju alokalema.
- U ovoj seriji bolesnika zapaženo je kraće preživljavanje bolesnika posle ABO-inkompatibilne transplantacije zbog većeg rizika od potencijalno fatalnog aGvHD stepena 3–4. Tome suprotno, nije dokazan uticaj ABO-inkompatibilnosti na incidencu relapsa bolesti. Imajući u vidu heterogenost grupe prema prirodi osnovne bolesti, izvoru MĆ i kondicionom režimu, ovakvi rezultati moraju biti prihvaćeni sa rezervom.
- Buduća klinička ispitivanja, treba da budu usmerena na egzaktniju procenu uticaja ABO-inkompatibilnosti na efekte i komplikacije alogene transplantacije u precizno definisanim homogenim grupama bolesnika – prewashodno prema prirodi osnovne bolesti, izvoru MĆ, obliku kondicionog režima i drugim relevantnim parametrima.

## Literatura

1. Balint B, Radović M. Neki aspekti transplantacije ćelija kostne srži. *Anest Reanim Transf* 1987; 17: 111–5.
2. Balint B, Stamatović D, Andrić Z. Transplantacija matičnih ćelija hematopoeze. In: Balint B, editor. *Transfuziologija*. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 2004. p. 525–47.
3. Pavlovic M, Balint B. *Stem cells and tissue engineering*. New York: Springer; 2014.
4. Balint B, Vucetic D, Ostojic G, Ljubenov M. *Osnovi transfuziologije sa hemobiologijom*. Beograd: Medicinski fakultet VMA – Medija centar Odbrana; 2015.
5. Pavlovic M, Balint B. *Bioengineering and cancer stem cell concept*. New York: Springer. In press 2016.
6. Balint B. Stem and progenitor cell harvesting, extracorporeal "graft engineering" and clinical use – initial expansion vs. current dilemmas. *Clin Appl Immunol* 2006; 5: 518–27.
7. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. *Blood transfusion in clinical medicine*, 10<sup>th</sup> edition. Oxford: Blacwell Scientific Publications; 1997.
8. Soiffer RJ. *Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. Totowa: Humana Press; 2008.
9. Smith A. A glossary for stem-cell biology. *Nature* 2006; 441: 1060.
10. Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002; 297: 2256–9.
11. Martin–Rendon E, Watt SM. Exploitation of stem cell plasticity. *Transfusion Medicine* 2003; 13: 325–49.
12. Hassink RJ, de la Rivere AB, Mummery CL, Doevendans PA. Transplantation of cells for cardiac repair. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 771–7.
13. Obradovic S, Rusovic S, Balint B, Ristic–Anđelkov A, Romanovic R, Baskot B, et al. Autologous bone marrow–derived progenitor cell transplantation for myocardial regeneration after acute infarction. *Vojnosanit Pregl* 2004; 61: 519–29.

14. Balint B. Stem cells – unselected or selected, unfrozen or cryopreserved: marrow repopulation capacity and plasticity potential in experimental and clinical settings. *Maked Med Pregl* 2004; 58 (Suppl 63): 22–4.
15. Balint B, Stamatovic D, Todorovic M, Jevtic M, Ostojic G, Pavlovic M, et al. Stem cells in the arrangement of bone marrow repopulation and regenerative medicine. *Vojnosanit Pregl* 2007; 64: 481–4.
16. Salewski RP, Eftekharpour E, Fehlings MG. Are induced pluripotent stem cells the future of cell-based regenerative therapies for spinal cord injury? *J Cell Physiol* 2009; 222: 515–21.
17. Krause K, Jaquet K, Schneider C, Haupt S, Lioznov MV, Otte K–M, Kuck K–H. Percutaneous intramyocardial stem cell injection in patients with acute myocardial infarction: first-in-man study. *Heart* 2009; 95: 1145–52.
18. Obradovic S, Balint B, Romanovic R, Trifunovic Z, Rusovic S, Baskot B, et al. Intracoronary injections of bone-marrow derived mononuclear cells in a subacute phase of large myocardial infarction reduce the infarction size without significant improvement of left ventricle ejection fraction: quantum of initial necrosis is the key for outcome. *Vojnosanit Pregl* 2009; 66: 998–1004.
19. Balint B, Kanjuh V, Ostojić M, Obradović S, Todorović M, Rafajlovski S. Matične ćelije – biologija i primena u regenerativnoj medicini kod bolesti srca. In: Ostojić M, Kanjuh V, Nedeljković S. *Kardiologija*. Beograd: Medicinski fakultet; 2011.
20. Balint B, Obradovic S, Todorovic M, Pavlovic M, Mihaljevic B. Stem cell-based (auto)grafting: from innovative research toward clinical use in regenerative medicine. In: Alimoghaddam K. (Ed). *Stem Cell Biology in Normal Life and Diseases*. Rijeka: InTech. 2013. p. 111–35.
21. Balint B, Pavlović M, Todorović M, Obradović S. Strategies vs. challenges in stem cell-based grafting: research and clinical practice. *Bilt Transfusiol* 2011; 56: 9–25.
22. Menichella G, Pierelli L, Vittori M, Paoloni A, Foddai ML, Serafini R, et al. Rationale for large scale bone marrow hemopoietic stem cell manipulation. *Haematologica* 1991; 76 Suppl 1: 3–6.
23. Daniele N, Scerpa MC, Rossi C, Lanti A, Adorno G, Isacchi G, et al. The processing of stem cell concentrates from the bone marrow in ABO-incompatible transplants: how and when. *Blood Transfus* 2014; 12: 150–8.
24. Rabitsch W, Knobl P, Greinix H, Prinz E, Kalhs P, Horl WH, et al. Removal of persisting isohaemagglutinins with Ig-Therasorb immunoadsorption after major ABO-incompatible non-myeloablative allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 2405–8.
25. Dellacasa CM, D'Ardia S, Allione B, Aydin S, Tassi V, Francisci T, et al. Efficacy of plasmapheresis for the treatment of pure red blood cell aplasia after allogeneic stem cell transplantation. *Transfusion* 2015 Sep 24. doi: 10.1111/trf.13269.
26. Franchini M, Gandini G and Aprili G. Non-ABO red blood cell alloantibodies following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: 1169–72.

27. Thomas ED, Lochte HLJr, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 1957; 257: 491–6.
28. Mathe G, Jammet H. Transfusions et greffes de moelle osseuse homologue chez des humaines irradiées à haute dose accidentellement. *Rev Fr Etud Clin Biol* 1959; 4: 226–38.
29. Thomas ED, Lochte HLJr, Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest* 1959; 38: 1709–16.
30. Lasky LC, Ash RC, Kersey JH. Collection of pluripotential hematopoietic cells by cytopheresis. *Blood* 1982; 59: 822–7.
31. Korbling M, Champlin R. Peripheral blood progenitor cell transplantation: a replacement for marrow auto- or allografts. *Stem Cells* 1996; 14: 185–95.
32. Hopman RK, Dipersio JF. Advances in stem cell mobilization. *Blood Rev* 2014; 28(1): 31–40.
33. Balint B, Ljubenov M, Stamatović D, Todorović M, Pavlović M, Ostojić G, et al. Stem cell harvesting protocol research in autologous transplantation setting: large volume vs. conventional cytopheresis *Vojnosanit Preg* 2008; 65: 545–51.
34. Balint B, Stamatovic D, Todorovic M, Elez M, Vojvodic D, Pavlovic M, Cucuz–Jokic M. Autologous transplant in aplastic anemia: quantity of CD34<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup> subset as the predictor of clinical outcome. *Transf Apher Sci* 2011; 45: 137–41.
35. Gluckman E, Devergié A, Bourdeau–Esperou H, Thierry D, Traineau R, Auerbach A et al. Transplantation of umbilical cord blood in Fanconi’s anemia. *Nouv Rev Fr Hematol* 1990; 32: 423–5.
36. Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, Adamson JW, Migliaccio G, Migliaccio AR et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 10119–22.
37. Gluckman E, Rocha V, Boyer–Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R et al. Outcome of cord–blood transplantation from related and unrelated donors. *N Engl J Med* 1997; 337: 373–81.
38. Skoric D, Balint B, Petakov M, Sindjic M, Rodic P. Collection strategies and cryopreservation of umbilical cord blood. *Transfusion Medicine* 2007; 17: 107–13.
39. Gorin NC. Collection, manipulation and freezing of haemopoietic stem cells. *Clin Haematol* 1986; 15: 19–48.
40. Rowley SD. Secondary processing, cryopreservation, and reinfusion of the collected product. In: Kessinger A, McMannis JD, editors. *Practical considerations of apheresis in peripheral blood stem cell transplantation*. Lakewood: Cobe BCT Inc; 1994. p. 53–62.
41. Meryman HT. Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion* 2007; 47: 935–45.



42. Balint B, Ivanovic Z, Petakov M, Taseski J, Jovcic G, Stojanovic N, et al. The cryopreservation protocol optimal for progenitor recovery is not optimal for preservation of MRA. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 613–9.
43. Balint B. Coexistent cryopreservation strategies: microprocessor–restricted vs. uncontrolled–rate freezing of the "blood–derived" progenitors/cells. *Blood Banking Transf Med* 2004; 2: 62–71.
44. Balint B. Peripereal blood stem cell harvesting, purification and cryopreservation. *Bilt Transf* 2005; 51: 7–12.
45. Balint B. Competitive operating freezing systems in the stem and progenitor cell cryopractice: an overview. *Bilt Transf* 2004; 50: 45–50.
46. Minegishi M, Itoh T, Fukawa N, Kitaura T, Miura J, Takahashi H, et al. Quality of umbilical cord blood CD34+ cells in a double-compartment freezing bag cryopreserved without a rate-controlled programmed freezer. *Int J Hematol* 2007; 85: 78–84.
47. Beck C, Nguyen XD, Kluter H, Eichler H. Effect of recombinant human deoxyribonuclease on the expression of cell adhesion molecules of thawed and processed cord blood hematopoietic progenitors. *Eur J Haematol* 2003; 70: 136–42.
48. Passweg J, Tyndall A. Autologous stem cell transplantation in autoimmune diseases. *Semin Hematol* 2007; 44: 278–85.
49. Obradovic D, Balint B, Dincic E, Raicevic R, Obradovic S, Toncev G et al. Stem cells use in the treatment of neurologic disorders – Has the future already arrived? *Vojnosanit Pregl* 2008; 65: 473–80.
50. Krasulova E, Trneny M, Kozak T, Vackova B, Pohlreich D, Kemlink D, et al. High–dose immunoablation with autologous haematopoietic stem cell transplantation in aggressive multiple sclerosis: a single centre 10–year experience. *Mult Scler* 2010; 16: 685–93.
51. Ramadan A and Paczesny S. Various forms of tissue damage and danger signals following hematopoietic stem cell transplantation. *Front Immunol* 2015; 6: 14.
52. Locatelli F, Lucarelli B and Merli P. Current and future approaches to treat graft failure after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Opin Pharmacother* 2014; 15: 23–36.
53. Vlachou PA and O'Malley ME. Imaging of abdominal complications associated with hematopoietic stem cell transplantation. *Can Assoc Radiol J* 2014; 65: 35–41.
54. Sawinski D. The kidney effects of hematopoietic stem cell transplantation. *Adv Chronic Kidney Dis* 2014; 21: 96–105.
55. Ugai T, Hamamoto K, Kimura SI, Akahoshi Y, Nakano H, Harada N, et al. A retrospective analysis of computed tomography findings in patients with pulmonary complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Radiol* 2015;

56. Labrador J, Lopez-Corral L, Vazquez L, Sanchez-Guijo F, Guerrero C, Sanchez-Barba M, et al. Incidence and risk factors for life-threatening bleeding after allogeneic stem cell transplant. *Br J Haematol* 2015; 169: 719–25.
57. Kang JM, Kim YJ, Kim JY, Cho EJ, Lee JH, Lee MH, et al. Neurologic complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children: analysis of prognostic factors. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015; 21: 1091–8.
58. Balassa K, Andrikovics H, Remenyi P, Batai A, Bors A, Kiss KP, et al. The potential role of HLA-DRB1\*11 in the development and outcome of haematopoietic stem cell transplantation-associated thrombotic microangiopathy. *Bone Marrow Transplant* 2015; 50: 1321–5.
59. Han SB, Cho B and Kang JH. BK virus-associated hemorrhagic cystitis after pediatric stem cell transplantation. *Korean J Pediatr* 2014; 57: 514–9.
60. Schmidt S, Tramsen L, Schneider A, Balan A and Lehrnbecher T. Immunotherapeutic strategies against mucormycosis in haematopoietic stem cell transplantation. *Mycoses* 2014; 57 Suppl 3: 8–12.
61. Ariza-Heredia EJ, Neshor L and Chemaly RF. Cytomegalovirus diseases after hematopoietic stem cell transplantation: a mini-review. *Cancer Lett* 2014; 342: 1–8.
62. Travi G and Pergam SA. Cytomegalovirus pneumonia in hematopoietic stem cell recipients. *J Intensive Care Med* 2014; 29: 200–12.
63. Rouce RH, Louis CU and Heslop HE. Epstein-Barr virus lymphoproliferative disease after hematopoietic stem cell transplant. *Curr Opin Hematol* 2014; 21: 476–81.
64. Sanz J and Andreu R. Epstein-Barr virus-associated posttransplant lymphoproliferative disorder after allogeneic stem cell transplantation. *Curr Opin Oncol* 2014; 26: 677–83.
65. Heidegger S, van den Brink MR, Haas T and Poeck H. The role of pattern-recognition receptors in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Front Immunol* 2014; 5: 337.
66. Fleming S, Harrison SJ, Blombery P, Joyce T, Stokes K, Seymour JF, et al. The choice of multiple myeloma induction therapy affects the frequency and severity of oral mucositis after melphalan-based autologous stem cell transplantation. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2014; 14: 291–6.
67. Hosoba S, Jaye DL, Cohen C, Roback JD and Waller EK. Successful treatment of severe immune hemolytic anemia after allogeneic stem cell transplantation with bortezomib: report of a case and review of literature. *Transfusion* 2015; 55: 259–64.
68. Nishida M, Shigematsu A, Sato M, Kudo Y, Omotehara S, Horie T, et al. Ultrasonographic evaluation of gastrointestinal graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Transplant* 2015; 29: 697–704.
69. Pechey V, Parratt J, Vo L and Stevenson W. Successful treatment of meningeal graft-versus-host disease in a haematopoietic stem cell transplant recipient. *Int J Hematol* 2015; 101: 203–6.

70. Tomuleasa C, Fuji S, Cucuianu A, Kapp M, Pileczki V, Petrushev B, et al. MicroRNAs as biomarkers for graft-versus-host disease following allogeneic stem cell transplantation. *Ann Hematol* 2015; 94: 1081–92.
71. Weiden PL, Sullivan KM, Flournoy N, Storb R, Thomas ED. Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease. Contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *N Engl J Med* 1981; 304: 1529–33.
72. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990; 75: 555–62.
73. Balint B, Stamatović D, Taseski J, Vojvodić D, Todorčić B, Malešević M. Mononuclear cell harvesting for allogeneic peripheral blood transplantation. 2<sup>nd</sup> International Symposium on Allogeneic Peripheral Blood and Cord Blood transplantation. Oct 30 – Nov 1, 1997, Geneva. Geneva: EBMT; 1997. p. 42.
74. Petakov M, Balint B, Bugarski D, Jovcic G, Stojanovic N, Vojvodic D et al. Donor leukocyte infusion – the effect of mutual reactivity of donor's and recipient's peripheral blood mononuclear cell on hematopoietic progenitor cells growth. *Vojnosanit Pregl* 2000; 57 (5 Suppl): 89–93.
75. Stamatović D, Balint B, Tukić Lj, Tarabar O, Todorčić B, Elez M, et al. Uticaj nepodudarnosti primaoca i davaoca u krvno-grupnom ABO sistemu na rezultate alogene transplantacije matičnih ćelija hematopoeze. *Anest Reanim Transf* 2004; 32: 57–60.
76. Blin N, Traineau R, Houssin S, de Latour RP, Petropoulou A, Robin M, et al. Impact of donor-recipient major ABO mismatch on allogeneic transplantation outcome according to stem cell source. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; 16: 1315–23.
77. Heal JM, Liesveld JL, Phillips GL and Blumberg N. What would Karl Landsteiner do? The ABO blood group and stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2005; 36: 747–55.
78. Stussi G, Halter J, Schanz U and Seebach JD. ABO-histo blood group incompatibility in hematopoietic stem cell and solid organ transplantation. *Transfus Apher Sci* 2006; 35: 59–69.
79. Holbro A, Stern M, Infanti L, O'Meara A, Drexler B, Frey BM, et al. Impact of recipient ABH secretor status on outcome in minor ABO-incompatible hematopoietic stem cell transplantation. *Transfusion* 2015; 55: 64–9.
80. Basu S, Dhar S, Mishra D and Chandy M. Clinico-serologic correlation in bidirectional ABO incompatible hemopoietic stem cell transplantation. *Asian J Transfus Sci* 2015; 9: 181–4.
81. Charron D, Suberbielle-Boissel C and Al-Daccak R. Immunogenicity and allogenicity: a challenge of stem cell therapy. *J Cardiovasc Transl Res* 2009; 2: 130–8.
82. de Almeida PE, Ransohoff JD, Nahid A and Wu JC. Immunogenicity of pluripotent stem cells and their derivatives. *Circ Res* 2013; 112: 549–61.

83. Watz E, Remberger M, Ringden O, Lundahl J, Ljungman P, Mattsson J, et al. Analysis of donor and recipient ABO incompatibility and antibody-associated complications after allogeneic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014; 20: 264–71.
84. Bolan CD, Leitman SF, Griffith LM, Wesley RA, Procter JL, Stroncek DF, et al. Delayed donor red cell chimerism and pure red cell aplasia following major ABO-incompatible nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2001; 98: 1687–94.
85. Verholen F, Stalder M, Helg C and Chalandon Y. Resistant pure red cell aplasia after allogeneic stem cell transplantation with major ABO mismatch treated by escalating dose donor leukocyte infusion. *Eur J Haematol* 2004; 73: 441–6.
86. Yang MH and Hsu HC. Pure red cell aplasia after ABO-incompatible allogeneic stem cell transplantation in severe aplastic anemia with response to steroids: a case report and literature review. *Ann Hematol* 2001; 80: 299–301.
87. Khan F, Linden MA, Zantek ND and Vercellotti GM. Subcutaneous bortezomib is highly effective for pure red cell aplasia after ABO-incompatible haematopoietic stem cell transplantation. *Transfus Med* 2014; 24: 187–8.
88. Yang X and Levis M. Pulsed-high-dose dexamethasone as a treatment for pure red cell aplasia following ABO-incompatible allogeneic stem cell transplantation. *Transfus Med* 2014; 24: 246–8.
89. Sharma SK, Kumar S, Agrawal N, Mishra P, Seth T and Mahapatra M. Oral high dose dexamethasone for pure red cell aplasia following abo-mismatched allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: a case report. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2015; 31: 317–8.
90. Yazer MH and Triulzi DJ. Immune hemolysis following ABO-mismatched stem cell or solid organ transplantation. *Curr Opin Hematol* 2007; 14: 664–70.
91. Hosoba S, Jaye DL, Cohen C, Roback JD and Waller EK. Successful treatment of severe immune hemolytic anemia after allogeneic stem cell transplantation with bortezomib: report of a case and review of literature. *Transfusion* 2015; 55: 259–64.
92. Bacigalupo A, Van Lint MT, Occhini D, Margiocco M, Ferrari G, Pittaluga PA, et al. ABO compatibility and acute graft-versus-ost disease following allogeneic bone marrow transplantation. *Tranplantation* 1988; 45: 1091–4.
93. Gutierrez-Aguirre CH, Gomez-De-Leon A, Alatorre-Ricardo J, Cantu-Rodriguez OG, Gonzalez-Llano O, Jaime-Perez JC, et al. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation using reduced-intensity conditioning in an outpatient setting in ABO-incompatible patients: are survival and graft-versus-host disease different? *Transfusion* 2014; 54: 1269–77.
94. Mielcarek M, Leisenring W, Torok–Storb B, Storb R. Graft-versus-host-disease and donor-directed hemagglutinin titers after ABO-mismatched related and unrelated marrow allografts: evidence for a graft-versus-plasma cell effect. *Blood* 2000; 96: 1150–6.

95. Roback JD, Grossman BJ, Harris T, Hillyer CD. Technical Manual, 17th ed. Bethesda: AABB Press; 2011.
96. Cohn CS. Transfusion support issues in hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Control* 2015; 22: 52–9.
97. Datta SS, Basu S and Chandy M. An analysis of transfusion support in haematopoietic stem cell transplantation - report from a centre in India. *Transfus Apher Sci* 2015;
98. Friedberg RC. Transfusion therapy in the patient undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Hematol Oncol Clin North Am* 1994; 8: 1105–16.
99. Radia R and Pamphilon D. Transfusion strategies in patients undergoing stem-cell transplantation. *Expert Rev Hematol* 2011; 4: 213–20.
100. Yahng SA, Lee JW, Kim Y, Kim M, Oh EJ, Park YJ, et al. New proposed guidelines for early identification of successful myeloid and erythroid engraftment in hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Lab Anal* 2014; 28: 469–77.
101. Li MF, Liu F and Zhang M. Micro gel column technique is fit for detecting mixed fields post ABO incompatible hematopoietic stem cell transplantation. *Transfus Apher Sci* 2015; 52: 222–5.
102. Barjas-Castro ML, Vigoritto AC, Moretto FA and Castro V. Unusual erythrocyte split chimerism in pregnancy after allogeneic stem cell transplantation. *Immunohematology* 2014; 30: 135–6.
103. Stamatovic D, Balint B, Elez M, Tarabar O, Ostojić G, Andric Z et al. Uticaj krvnogrupne ABO nepodudarnosti primaoca i davaoca na rezultate alogene transplantacije matičnih ćelija hematopoeze. *Bilt Transfuziol* 2014; 60: 50–3.
104. Ljubenov M. Korelacija imunohematoloških, citogenetskih i molekulskih ispitivanja za definisanje stepena donorskog himerizma kod bolesnika sa alogenom transplantacijom matičnih ćelija [magistarski rad]. Beograd: Medicinski fakultet VMA, 2008.
105. Mehta J, Powles R, Sirohi B, Treleaven J, Kulkarni S, Saso R et al. Does donor–recipient ABO incompatibility protect against relapse after allogeneic bone marrow transplantation in first remission acute myeloid leukemia? *Bone Marrow Transplantation* 2002; 29: 853–9.
106. Bolan CD, Childs RW, Procter JL, Barrett AJ, Leitman SF. Massive immune haemolysis after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with minor ABO incompatibility. *British Journal of Haematology* 2001; 112: 787–95.
107. Kim JG, Sohn SK, Kim DH, Baek JH, Lee KB, Min WS et al. Impact of ABO incompatibility on outcome after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2005; 35: 489–95.
108. Stussi G, Muntwyler J, Passweg JR, Seebach L, Schanz U, Gmür J et al. Consequences of ABO incompatibility in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2002; 30: 87–93.

109. Peggs KS, Morris EC, Kottaridis PD, Geary J, Goldstone AH, Linch DC et al. Outcome of major ABO-incompatible nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation may be influenced by conditioning regimen. *Blood* 2002; 99: 4642–4.
110. Bolan CD, Leitman SF, Griffith LM, Wesley RA, Procter JL, Stroncek DF et al. Delayed donor red cell chimerism and pure red cell aplasia following major ABO-incompatible nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2001; 98: 1687–94.
111. Zaucha JM, Mielcarek M, Takatu A, Little MT, Gooley T, Baker J et al. Engraftment of early erythroid progenitors is not delayed after non-myeloablative major ABO-incompatible haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2002; 119: 740–50.
112. Barge AJ, Johnson G, Witherspoon R, Torok-Storb B. Antibody-mediated marrow failure after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1989; 74: 1477–80.
113. Penack O, Holler E, van den Brink MR. Graft-versus-host disease: regulation by microbe-associated molecules and innate immune receptors. *Blood* 2010; 115: 1865–72.
114. Heidegger S, van den Brink MR, Haas T, Poeck H. The role of pattern-recognition receptors in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Front Immunol* 2014; 5: 1–7.
115. Maeda Y. Pathogenesis of graft-versus-host disease: innate immunity amplifying acute alloimmune responses. *Int J Hematol* 2013; 98: 293–9.
116. Ramadan A, Paczesny S. Various forms of tissue damage and danger signals following hematopoietic stem-cell transplantation. *Front Immunol* 2015; 6: 1–20.