

Vpliv polimorfizma in rekombinacij v regiji HLA na izbiro darovalca krvotvornih matičnih celic za presaditev

The influence of HLA polymorphism and recombination events on the selection of a donor for hematopoietic stem cell transplantation

Irena Kemperle,¹ Sendi Montanič,¹ Janez Jazbec,² Jože Pretnar,³ Blanka Vidan-Jeras¹

¹ Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Center za tipizacijo tkiv, Štajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

² Služba za onkologijo in hematologijo, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center, Bohoričeva 20, 1000 Ljubljana

³ Klinični oddelek za hematologijo, Univerzitetni klinični center, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

Korespondenca/

Correspondence:

dr. Blanka Vidan-Jeras, mag. farm., spec.
mail: blanka.vidan-jeras@ztm.si

Ključne besede:

tkivni antigeni HLA, presajanje krvotvornih matičnih celic, rekombinacija, polimorfizem, izbira darovalca

Izvelek

Izhodišča: Neujemanje v tkivnih antigenih HLA med darovalcem in prejemnikom KMC odločilno vpliva na uspeh presaditve. Iskanje skladnega darovalca pričnemo v bolnikovi družini, najdlujemo pa v registrih nesorodnih darovalcev. Namen naše raziskave je bil ugotoviti, v kolikšnem odstotku za slovenske bolnike najdemo sorodnega darovalca ter opredeliti vpliv osnovne tipizacije in polimorfizma HLA na izbiro nesorodnega darovalca.

Bolniki in metode: Analizirali smo 744 družin bolnikov, ki smo jim določili tip HLA-A, B, DR z metodo PCR-SSP. Določili smo genotipe ter pri 17 družinah mesta rekombinacije. Izračunali smo povprečno število otrok ter odstotek sorodnih darovalcev na leto.

Pri 162 parih bolnik/nesorodni darovalec smo tip HLA-A, B, C, DR, DQ določili s PCR-SSP ter s sekvencioniranjem. Primerjali smo skladnost bolnika in darovalca po osnovni in končni tipizaciji ter za določitev vpliva statusa osnovne tipizacije na izbiro darovalca uporabili Fischerjev eksaktni test.

Na vzorcu slovenske populacije (77 oseb) smo alele HLA-C tipizirali s sekvencno specifičnimi oligonukleotidnimi sondami ter PCR-SSP. Frekvence smo določili z neposrednim štetjem.

Rezultati: Od leta 1996 do 2011 je bilo v družinah povprečno 27,9 % tkivno skladnih sorojencev. Rekombinacijo smo opazili v 2,28 % družin. Od vseh po osnovni tipizaciji skladnih parov bolnik/

nesorodni darovalec je bilo po končni tipizaciji skladnih samo še 49,4 %. Vzrok je bilo največkrat neujemanje v HLA-C (38 %).

Zaključki: Na nižje število možnih sorodnih darovalcev vpliva manjše število otrok ter rekombinacije v družinah. Neskladja v HLA-C so posledica njegovega polimorfizma ter osnovne tipizacije, ki ga velikokrat ni vsebovala. Z dodatkom HLA-C k osnovni tipizaciji bolnika in darovalca lahko skrajšamo čas iskanja, kar je velikokrat ključnega pomena za preživetje bolnika. Tipizacija HLA-C bi bila zato smotrna tudi pri darovalcih iz slovenskega registra.

Abstract

Background: HSC transplantation outcome is associated with the level of HLA matching between donor and recipient. A search for HSC donor starts in the patient's family. In the absence of related donor, HLA matched unrelated donors are searched in registries. In the present study we sought to determine the number of donors found in Slovenian families and the influence of initial typing and HLA polymorphism on the selection of unrelated donors.

Patients and methods: We set up genotypes in 744 families that were typed for HLA-A, B, DR with PCR-SSP. Recombination events were located in 17 of them. Average number of children and percentages of possible related donors per year were calculated. SBT of HLA-A, B, C, DR, DQ alleles was performed for 162 patient/unrelated donor pairs. An influence of initial typing

Key words:

human leukocyte antigens HLA, hematopoietic stem cell transplantation, recombination, polymorphism, donor selection

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2012; 81 supl 2: II-361-72

Prispelo: 17. apr. 2012,
Sprejeto: 11. okt. 2012

level on the selection of the donor was defined using Fischer's exact test. A Slovenian population sample consisting of 77 unrelated individuals was typed for HLA-C using PCR-SSO and PCR-SSP methods. Phenotype frequencies were determined by direct counting.

Results: Recombination was observed in 2.28 % of families. Among all patient/donor pairs matched after the initial phase, only 49.4 % remained HLA compatible after confirmatory typing. In particular, 38 % of the pairs were mismatched only owing to disparity at HLA-C.

Conclusions: Lower percentage of related HLA identical donors is a consequence of decreasing number of children and occurrence of recombination events in families. Disparities at HLA-C were observed as a result of high level of polymorphism and initial typing not including this locus. This leads to the conclusion that the addition of HLA-C to the initial typing would contribute to faster and more efficient identification of well-matched stem cell donors, which is in most cases crucial for patient survival.

Uvod

Vsaka oseba nosi na celičnih površinah vrsto različnih tkivnih antigenov HLA (Human Leucocyte Antigen): HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP. Genski zapisi zanje so na ločenih mestih na 6. kromosomu, imenovanih lokusi. Na vsakem lokusu najdemo veliko število genskih različic (alelov). Kadar poznamo tipe HLA staršev in potomcev, lahko ugotovimo vzorec dedovanja, tako da določimo gene HLA, ki jih je posameznik podedoval od matere (prvi haplotip) in od očeta (drugi haplotip). V primeru, da vzorec dedovanja kaže na rekombinacijo, novonastali haplotip prepoznamo kot rekombinanten in določimo točko rekombinacije. Med rekombinacijami na regiji HLA je pogosto prekrižanje kromosomov. Mesto rekombinacije je teoretično lahko med katerima koli lokusoma. Verjetnost rekombinacije pa z oddaljenostjo med lokusoma raste.

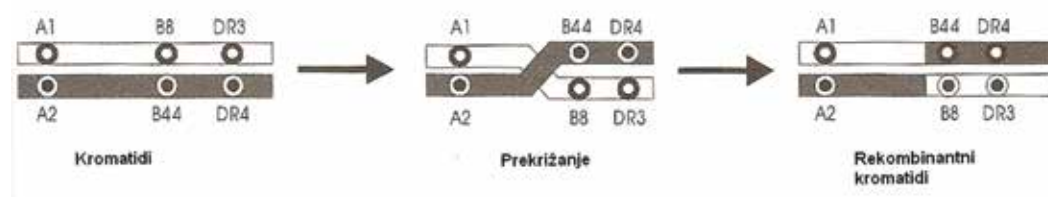
Zaradi kodominantnega dedovanja genov HLA ima vsak po dva antigena vsakega lokusa, torej 10 antigenov, ki jih pri presaditvi krvotvornih matičnih celic (KMC) upoštevamo ($2x_A + 2x_B + 2x_C + 2x_{DR} + 2x_{DQ}$). K raznolikosti tipov HLA prispevajo številne možne kombinacije alelov ter

rekombinacije dedne snovi. Med ključnimi razlogi za raziskovanje raznolikosti tkivnih antigenov in genov med posamezniki, etničnimi skupinami, narodnostmi in rasami je želja in potreba po novem znanju o vplivu skladnosti glede na tkivne antigene (tkivne skladnosti) med darovalcem in prejemnikom tkiva ali celic na izid presaditve.¹

Danes vemo, da neujemanja v tkivnih antigenih HLA med darovalcem in prejemnikom KMC odločilno vplivajo na pojav bolezni presadka proti gostitelju (GvHD) ter na preživetje bolnika po presaditvi.² Idealni darovalec je z ozirom na HLA in druge gene identični monozigotni dvojček, temu sledi bolniku HLA identični sorojenec, naslednja izbira je nesorodni darovalec.

Glede na vrsto darovalca KMC se odločamo za način določanja (tipizacije) genov HLA. Tako gene HLA lahko določimo na nizki stopnji ločljivosti, kar pomeni, da določimo skupino sorodnih genskih različic, npr. HLA-A*02. Lahko pa jih določimo na visoki stopnji ločljivosti, kar pomeni, da natančno določimo gensko različico oziroma alel, npr. HLA-A*02:01.

V slovenskem transplantacijskem programu, tako kot tudi drugje v svetu, bolniku najprej iščemo ustreznega darovalca v



Slika 1: Primer rekombinacije v regiji HLA.

njegovi ožji oz., če je smiselno, tudi v širši družini. Teoretično lahko identičnega sorojenca pričakujemo v 25 % družin z dvema otrokoma. Med družinskimi člani iščemo tkivno skladnega darovalca tako, da gene HLA določamo na nizki stopnji ločljivosti. V idealnem primeru pričakujemo ujemanje v 6 od 6 antigenov (2xA + 2xB + 2xDR). Pri potrditveni tipizaciji bolnika in sorodnega darovalca določitev ponovimo, da bi potrdili izsledke prve tipizacije.

Študije v zgodnjih devetdesetih letih so pokazale na povezavo med tkivnimi antigeni HLA-A, HLA-B in HLA-DR ter uspehom presaditve KMC nesorodnega darovalca, tako z ozirom na pojav bolezni presadka proti gostitelju in relaps bolezni kot tudi na preživetje bolnika.³⁻⁵ Na podlagi teh in kasnejših študij, ki so ta dognanja potrdile, je delovna skupina pri World Marrow Donor Association (WMDA) oblikovala priporočila za strategijo ugotavljanja tkivne skladnosti pred presaditvijo KMC nesorodnega

darovalca.⁶⁻⁸ Ta priporočila so bila podlaga za določitev Minimalnih zahtev tkivne skladnosti sovenskega registra prostovoljnih nesorodnih darovalcev kostnega mozga Slovenija-Donor, ki narekujejo gensko tipizacijo HLA-A in HLA-B vsaj na nizki stopnji ločljivosti in HLA-DR (HLA-DRB₁) na visoki stopnji ločljivosti. Vedno pa je bila odprta možnost usklajevanja po strožjih merilih, kar vključuje upoštevanje lokusov HLA-DQ (DQB₁), HLA-C in HLA-DP.⁹

Delovna skupina WMDA je za vpis nesorodnega darovalca v register priporočala tipizacijo HLA-A, HLA-B in HLA-DRB₁ na ravni DNK.⁶⁻⁸ Večina darovalcev v svetovnem registru Bone Marrow Donors Worldwide (BMDW), vključno s člani registra Slovenija-Donor, ima na ta način določene antigene HLA.

V našem transplantacijskem programu smo pri bolniku, ki smo mu želeli poiskati možnega nesorodnega darovalca, tipizirali HLA-A ter HLA-B na nizki stopnji ločljivo-

Tabela 1: Odstotek družin, v katerih smo našli tkivno skladnega darovalca.

Leto	Št. družin	Delež bolnikov s sorodnim darovalcem (%)	Povprečno št. otrok	Št. rekombinacij
1996	26	28,0	1,65	1
1997	37	13,5	1,10	0
1998	55	43,6	1,69	1
1999	45	26,7	1,22	2
2000	33	24,2	1,45	2
2001	41	29,2	1,24	1
2002	45	24,4	1,46	1
2003	37	35,1	1,51	1
2004	44	45,4	1,45	2
2005	39	35,9	1,51	0
2006	50	34,0	1,57	0
2007	59	28,1	1,38	3
2008	65	9,0	1,10	3
2009	53	26,4	1,46	0
2010	64	20,0	1,20	0
2011	51	23,5	1,20	0
Skupno	744			17
Povprečno	46,5	27,9	1,20	1,06

Tabela 2: Rekombinacije genske snovi v regiji HLA v družinah bolnikov.

Rekombinacija (N=744)		%
	med HLA-A in C	0,81
	med HLA-B in DR	1,47
	ni rekombinacije	97,72

sti, HLA-DRB1 in HLA-DQB1 pa na visoki stopnji ločljivosti in mu glede na te tkivne antigene v prvi fazi izbirali možnega nesorodnega darovalca.

Pri potrditveni tipizaciji bolniku in preliminarno izbranemu nesorodnemu darovalcu alele HLA določimo na visoki stopnji ločljivosti in v idealnem primeru pričakujemo ujemanje v 10 od 10 alelov.

Lokus HLA-C so prvič opisali pred približno 36 leti, ko je postalo očitno, da poleg antigenov lokusa HLA-A in HLA-B obstajajo tudi drugi produkti genov HLA I. razreda, ki vzpodbudijo aloantigenski imunski odgovor. Kmalu so s študijami *in vitro* dokazali, da tako kot druge produkte genov HLA I. razreda, citotoksični limfociti T prepoznajo tudi antigene HLA-C. Molekule HLA-C

Tabela 3: Rodovniki družin z rekombinacijami med lokusoma HLA-A in C.

Družina	Mati	Oče	Sorojenec	Bolnik
1 nSD	a:A1,B8,DR17 b:A2, B7,Cw7,DR15	c:A10,B22,Cw3,DR11 d:A3,B35,Cw12,DR14	a/b:A1, B7,Cw7,DR15 d:A3,B35,Cw12,DR14	a:A1,B8,DR17 c:A10,B22,Cw3,DR11
2 SD	*a:A23,B44,Cw5,DR13 *b:A3,B7,Cw7,DR4	c:A3,B7,Cw7,DR11 d:A11, B35,Cw4,DR1	c/d:A3, B35,Cw4,DR1 a:A23,B44,Cw5,DR13	d:A11,B35,Cw4,DR1 a:A23,B44,Cw5,DR13
3 SD	a:A3,B27,DR12 b:A32, B61,Cw2,DR16	c:A1,B8,DR3 d:A3,B7,Cw7,DR15	d:A3,B7,Cw7,DR15 b:A32,B61,Cw2,DR16	d:A3,B7,Cw7,DR15 a/b:A3, B61,Cw2,DR16
4 nSD	a:A11,B41,Cw17,DR16 b:A26,B38,DR1	c:A26,B16,Cw7,DR13 d:A24, B52,Cw12,DR15	c:A26,B16,Cw7,DR13 a:A11,B41,Cw17,DR16	c/d:A26 B52,Cw12,DR15 b:A26,B38,DR1
5 nSD	a:A31,B44,DR7 b:A26,B56,Cw1,DR4	*c:A3,B8,Cw7,DR3 *d:A2, B35,Cw12,DR14	b:A26,B56,Cw1,DR4 c/d:A3 B35,Cw12,DR14	a:A31,B44,DR7 c:A3,B8,Cw7,DR3
6 SD	a:A2, B51,Cw2,DR4 b:A26,B38,Cw12,DR14	c:A2,B18,Cw7,DR11 d:A31,B38,DR11	c:A2,B18,Cw7,DR11 b:A26,B38,Cw12,DR14	c:A2,B18,Cw7,DR11 b/a:A26 B51,Cw2,DR4

Legenda: * – hipotetični haplotip; SD – potencialni sorodni darovalec; nSD – ni sorodni darovalec

imajo tako kot vse ostale molekule HLA nalogo predstavljanja antigenih peptidov limfocitom T. Zaradi nenatančnosti serološke tipizacije HLA, ki je bila dolgo edina metoda določitve antigenov HLA-C, je bilo v preteklosti težko ovrednotiti biološki vpliv antigenov HLA-C pri presaditvah KMC. Pomemben vpliv teh antigenov na izid presaditve KMC pa so pokazale študije, pri katerih so za določanje HLA-C uporabili metode, ki so temeljile na analizi DNK.¹⁰⁻¹²

Namen naše raziskave je bil ugotoviti, v kolikšnem odstotku lahko za slovenske bolnike najdemo sorodnega darovalca znotraj družin ter opredeliti vpliv statusa osnovne tipizacije in polimorfizma HLA na izbiro nesorodnega darovalca.

Material in metode

Družine bolnikov

V študijo smo vključili anonimizirane podatke 744 družin, ki smo jih v času od leta 1996 do julija 2011 tipizirali v Centru za tipizacijo tkiv. Vsem družinskim članom smo določili skupine alelov HLA-A, B, DR z genetsko tipizacijo s sekvenčno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi (PCR-SSP) na nizki stopnji ločljivosti.

Določitev haplotipov in točk rekombinacije

S pomočjo družinskih analiz smo določili haplotipe HLA in jih označili z malimi črkami a, b, c, d itd. V petih primerih smo haplotipe določili hipotetično, ker nismo imeli na voljo zadostnega števila družinskih članov, da bi zanesljivo določili vzorec dedovanja.

Tabela 4: Rodovniki družin z rekombinacijami med lokusoma HLA-B in DR.

Družina	Mati	Oče	Sorojenec	Bolnik
1 SD	a:A68,B51,DR1 b:A3,B8,DR15	c:A2,B64,Cw8,DR7 d:A24,B50,Cw6,DR13	d:A24,B50,Cw6,DR13 a:A68,B51,DR1	d:A24,B50,Cw6,DR13 a/b:A68,B51,DR15
2 nSD	a:A1,B8,DR3 b:A3,B51,DR4	c:A11,B35,DR11 d:A2,B38,DR11	c/d:A11,B35,DR11 b:A3,B51,DR4	c:A11,B35,DR11 a:A1,B8,DR3
3 SD	a:A1,B8,Cw7,DR3 b:A2,B44,Cw5,DR4	c:A2,B39,Cw7,DR1 d:A_,B7,DR14	c:A2,B39,Cw7,DR1 b/a:A2,B44,Cw5,DR3	c:A2,B39,Cw7,DR1 a:A1,B8,Cw7,DR3
4 nSD	a:A31,B44,DR7 b:A26,B56,Cw1,DR4	*c:A3,B8,Cw7,DR3 *d:A2,B35,DR14	a/b:A31,B44,Cw6,DR4 d:A2,B35,DR14	a:A31,B44,DR7 c:A3,B8,Cw7,DR3
5 SD	a:A68,B35,DR15 b:A2,B51,Cw14,DR15	c:A2,B35,Cw12,DR14 d:A3,B18,Cw15,DR16	d:A3,B18,Cw15,DR16 b:A2,B51,Cw14,DR15	c/d:A2,B35,Cw12,DR16 b:A2,B51,Cw14,DR15
6 SD	a:A1,B35,Cw4,DR7 b:A2,B13,DR7	*c:A3,B49,DR11:04 *d:A2,B18,Cw7,DR11:03	a:A1,B35,Cw4,DR7 d:A2,B18,Cw7,DR11:03	a:A1,B35,Cw4,DR7 c/d:A2,B18,Cw7,DR11:04
7 nSD	a:A3,B7,DR103 b:A1,B57,DR7	c:A2,B51,DR1 d:A_,B_,DR4	c:A2,B51,DR1 a:A3,B7,DR103	c/d:A2,B51,DR4 b:A1,B57,DR7
8 nSD	a:A2,B27,DR1 b:A26,B38,DR16	c:A11,B35,DR4 d:A11,B27,DR11	c:A11,B35,DR4 b/a:A26,B38,DR1	d:A11,B27,DR11 a:A2,B27,DR1
9 SD	a:A24,B39,DR15 b:A32,B35,DR11	c:A2,B27,DR13 d:A3,B7,DR7	c:A2,B27,DR13 a:A24,B39,DR15	c:A2,B27,DR13 a/b:A24,B39,DR11
10 nSD	*a:A2,B44,Cw4,DR7 *b:A2,B61,Cw2,DR15	c:A24,B35,Cw4,DR14 d:A68,B44,Cw7,DR1	b:A2,B61,Cw2,DR15 d:A68,B44,Cw7,DR1	c:A24,B35,Cw4,DR14 a/b:A2,B44,Cw4,DR15
11 SD	*a:A1,B8,Cw7,DR4 *b:A_,B51,DR9	c:A2,B37,DR7 d:A3,B35,Cw4,DR10	a:A1,B8,Cw7,DR4 d:A3,B35,Cw4,DR10	a:A1,B8,Cw7,DR4 c/d:A3,B35,Cw4,DR7

Legenda: * – hipotetični haplotip; SD – potencialni sorodni darovalec; nSD – ni sorodni darovalec

Upoštevali smo dobro poznano vezavno neravnovesje med lokusi HLA in frekvence najpogostejših haplotipov v slovenski populaciji. V primeru, da je družinska analiza kazala na prekrivanje kromosomov, smo z namenom, da bi izključili tehnično napako, tipizacijo HLA-A, B, DR potomca z rekombinantnim haplotipom in tipizaciji njegovih staršev ponovili. Da bi natančno določili mesto rekombinacije, smo pri rekombinacijah med lokusoma A in B dodatno tipizirali tudi lokus HLA-C z metodo PCR-SSP na nizki stopnji ločljivosti.

Haplotip, ki smo ga potrdili kot produkt rekombinacije haplotipov a in b, smo označili kot a/b, produkt rekombinacije haplotipov c in d pa kot c/d.

Pari bolnik/nesorodni darovalec

V Centru za tipizacijo tkiv smo v obdobju med leti 2001 in 2008 obravnavali 82 bolnikov in 162 možnih darovalcev, ki so tvorili 162 parov bolnik/darovalec. Tkivno skladnost smo ugotavljali s pomočjo tipizacije z metodo PCR-SSP ter metode, ki temelji na sekvencioniranju (SBT).

Osnovna tipizacija bolnika je vedno vsebovala HLA-A in HLA-B na nizki stopnji ločljivosti in HLA-DR in HLA-DQ na visoki stopnji ločljivosti.

Kot osnovno tipizacijo darovalca smo upoštevali tip HLA darovalca, ki ga je laboratoriju Centra za tipizacijo tkiv posredoval register Slovenija-Donor pred potrditveno tipizacijo.

Končna tipizacija je pri bolniku in pri darovalcu obsegala lokuse HLA-A, B, C, DR in DQ na visoki stopnji ločljivosti. Anonimizirane podatke smo uporabili v študiji.

Statistična analiza vpliva osnovne tipizacije HLA-C na izbiro nesorodnega darovalca

Statistično analizo, s katero smo primerjali vpliv statusa osnovne tipizacije HLA-C na izbiro nesorodnega darovalca, smo izvedli s pomočjo Fischerjevega eksaktnega testa. Kot mejo statistične značilnosti smo upoštevali $p = 0.05$.

Vzorec slovenske populacije

Z namenom, da bi določili skupine alelov in alele HLA-C v slovenski populaciji, smo naključno izbrali 77 nesorodnih Slovencev. Pridobili smo njihovo soglasje za sodelovanje in pri tem upoštevali priporočila Ovičedske konvencije. Soglasje k analizi lokusov HLA in populacijski študiji je dala tudi Komisija za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravje (št. 09/02/98). Osebe, ki smo jih vključili v populacijsko študijo, so izpolnile vprašalnik o svojem poreklu in narodnosti. Vključili smo tiste, ki so se izrekli za Slovence tako kot njihovi starši. Tipe HLA-C smo določili na visoki stopnji ločljivosti z uporabo sekvenčno specifičnih oligonukleotidnih sond in hibridizacije (PCR-SSO) ter PCR-SSP.

Izračun pogostosti pojavljanja alelov

Pogostnost pojavljanja (frekvenco) skupin alelov, ki kodirajo isti antigen, in posameznih alelov HLA-C, smo določili z neposrednim štetjem. Pogostnost izbranega alela smo izrazili tako, da smo prešteli osebe, pri katerih smo alel določili, ne glede na to, ali smo ga našli v homozigotni ali heterozigotni obliki in to število delili s številom vseh oseb v preiskovanem vzorcu.

Tabela 5: Primerjava tkivne skladnosti med bolnikom in potencialnim nesorodnim darovalcem KMC po osnovni in končni tipizaciji HLA.

	Št. (%) skladnih parov bolnik/darovalec	Št. (%) neskladnih parov bolnik/darovalec
Osnovna tipizacija	162 (100 %)	0 (0 %)
Končna tipizacija	80 (49,4 %)	82 (50,6 %)

Rezultati

1. Tkivno skladni darovalci znotraj družine:

Število družin, ki smo jih preiskovali v letih od 1996 do 2011 smo prikazali v Tabeli 1. V njej smo podali tudi odstotek bolnikov, ki so imeli tkivno skladnega darovalca znotraj družine. Ta je odvisen tako od števila otrok v družini kot tudi od pojavljanja rekombinacij. Tako lahko zasledimo, da je bil leta 1998, ko je bilo povprečno število otrok v obravnavanih družinah najvišje (1.69), odstotek sorodnih darovalcev ravno tako najvišji (43,6 %). Tega leta smo opazili eno samo rekombinacijo. Nasprotno pa je bil leta 2008, ko je bilo povprečno število otrok v obravnavanih družinah najnižje (1.10) in smo opazili dve rekombinaciji, tudi odstotek sorodnih darovalcev najnižji (9 %).

2. Pogostost pojavljanja rekombinacij znotraj družin

Pri 17 (2,28 %) družinah smo opazili rekombinacijo bodisi med lokusoma HLA-A in C ali med lokusoma HLA-B in DR. Od tega je bilo 35 % rekombinacij med lokusoma HLA-A in C ter 65 % rekombinacij med lokusoma HLA-B in DRB1 (Tabela 2).

V Tabelah 3 in 4 so prikazani tipi HLA družin, pri katerih smo opazili rekombinacije. Prikazana so tudi mesta rekombinacije.

3. Tkivno skladni nesorodni darovalci

Tabela 5 prikazuje 162 parov bolnik/darovalec, za katere je po osnovni tipizaciji kazalo, da so tkivno skladni, po končni tipizaciji pa se je izkazalo, da je skladnih samo 80, torej 49,4 %.

Vrsto neujemanj in njihovo pogostnost pojavljanja kaže Tabela 6, v kateri vidimo, da kar v 38 % primerov s končno tipizacijo razkrijemo neujemanja v antigenih HLA-C, ko so tkivni antigeni na vseh ostalih lokusih skladni. Celotni odstotek neujemanj v HLA-C, pri katerem upoštevamo primere, ko so neskladni antigeni tako na lokusu HLA-C kot tudi aleli na drugih lokusih, se poveča na 51,0 %.

Veliko manjši je odstotek neujemanja v HLA-B (11 %), kadar so vsi drugi lokusi skladni. Podobno velja za HLA-A (12 %) ter za HLA-DR in DQ skupaj (12 %). Celotni odstotek neujemanj v HLA-B je 28 % in v HLA-A 26 %.

Ker so bila neujemanja na lokusu HLA-C najpogostejši vzrok za izločitev darovalca, smo ta neujemanja natančneje opredelili. V

Tabela 6: Neujemanja v alelih HLA po končni tipizaciji nesorodnih parov bolnik/darovalec KMC.

Vrsta neujemanja	Število parov bolnik / darovalec (N=82)	Pogostost pojavljanja neujemanja (%)
Samo HLA-A	10	12
Samo HLA-B	9	11
Samo HLA-C	31	38
HLA-A in B	0	0
HLA-A in C	8	10
HLA-B in C	11	13
HLA-C + A + B	3	4
Samo HLA-DR in/ali DQ	10	12
Vsa, ki vključujejo HLA-A	21	26
Vsa, ki vključujejo HLA-B	23	28
Vsa, ki vključujejo HLA-C	42	51

Tabeli 7 smo prikazali vpliv statusa osnovne tipizacije HLA-C na izbiro nesorodnega darovalca. Statistično značilno več darovalcev ($p=0.019$), ki pri osnovni tipizaciji niso imeli določenih antigenov HLA-C, je bilo izločenih (67,7 %) kot izbranih (41,3 %). Še bolj statistično značilna ($p=0.00069$) pa je bila razlika med izločenimi (19,3 %) in izbranimi (55,0 %) darovalci, ki so imeli HLA-C določen na ravni DNK.

4. Pogostost pojavljanja HLA-C pri Slovencih

Pogostost pojavljanja skupin alelov, ki kodirajo isti antigen, in posameznih alelov v slovenski populaciji smo prikazali v Tabeli 8. Najpogostejša skupina alelov/antigenov v slovenski populaciji je C*07 (54,5 %), sledijo ji C*04, C*12 in C*03.

V Tabeli 9 smo prikazali primerjavo frekvenc alelov HLA-C v slovenski populaciji z drugimi evropskimi populacijami. Najpogostejši alel v slovenski populaciji je C*04:01 (31 %), ki mu sledijo C*07:02 (26 %), C*07:01 (25 %), C*12:03 (18 %), C*06:02 (17 %). Alel C*04:01 je najpogostejši tudi v severnoitalijanski populaciji, medtem ko je v nemški populaciji, od koder prihaja večina tujih darovalcev za naše bolnike, najpogostejši alel C*07:01. Enako ima alel C*07:01 najvišjo frekenco tudi v francoski in angleški populaciji. V nasprotju s C*04:01, ko sta si frekvenci v severnoitalijanski in slovenski populaciji podobni, sta frekvenci C*07:02 v istih populacijah zelo različni, kar kaže na raznolikost frekvenc alelov HLA-C v različnih populacijah.¹³

Razpravljanje

V slovenskem transplantacijskem programu bolniku najprej poskusimo poiskati ustreznega darovalca v njegovi ožji družini. Teoretično lahko identičnega sorojenca pričakujemo v 25 % družin z dvema otrokoma. Z našo študijo smo najprej želeli ugotoviti, v kolikšnem odstotku lahko za slovenske bolnike najdemo tkivno skladnega sorodnega darovalca. Analizirali smo 744 družin, ki smo jih v Centru za tipizacijo tkiv obravnavali v letih od 1996 do 2011 (Tabela 1). Največ sorodnih darovalcev (43,6 %) smo za naše bolnike našli v letu 1998, najmanj pa leta 2008 (9 %). Razlog za to razliko lahko iščemo v povprečnem številu otrok v slovenskih družinah. Predvsem trend zadnjih petih let kaže na upadanje števila otrok. K nižjemu odstotku sorodnih darovalcev prispeva tudi rekombinacije genske snovi v regiji HLA. Pri 97,72 % vseh obravnavanih družin rekombinacije nismo opazili. Pojavila se je v 17 družinah, od tega je bilo 35 % rekombinacij med lokusoma HLA-A in C ter 65 % med lokusoma HLA-B in DRB1 (Tabela 2). Menimo, da je do rekombinacije ravno med temi lokusi prišlo zaradi lege genov HLA na 6. kromosomu. Geni lokusa HLA-B in geni lokusa HLA-DRB1 ter geni lokusa HLA-A in geni lokusa HLA-C so med seboj oddaljeni, zato je verjetnost, da rekombinacija nastane na teh mestih, precej večja kot med geni, ki ležijo bolj skupaj. Tako med lokusoma HLA-B in HLA-C, ki ležita tesno skupaj, rekombinacije nismo opazili. Devet možnih sorodnih darovalcev je z rekombinacijo postalo tkivno neskladnih z bolnikom. Pet bolnikov pa je zaradi rekombinacije izgubilo tkivno skladnega darovalca znotraj družine. Rekombinacijo smo opazili pri skupaj 10 bolnikih. Novonastali rekombinantni haplotipi

Tabela 7: Vpliv statusa osnovne tipizacije HLA-C na izbiro nesorodnega darovalca.

Status osnovne tipizacije HLA-C	Št. (%) darovalcev, izločenih na osnovni končnega tipa HLA-C (N=31)	Št. (%) darovalcev, izbranih na osnovni končnega tipa HLA (N=80)	Razlika med izločenimi in izbranimi darovalci Fischerjev test p
Ni tipizacije	21 (67,7 %)	33 (41,3 %)	0.019
Serološka določitev	4 (13,0 %)	3 (3,7 %)	0.093
Določitev na ravni DNK	6 (19,3 %)	44 (55,0 %)	0.00069

HLA so tako v slovenski kot tudi v drugih svetovnih populacijah redki. Na ta način je postalo za bolnike z rekombinantnim haplotipom tudi iskanje nesorodnega darovalca v svetovnem registru BMDW težavno. Glede na mesto rekombinacije so razlike med izhodiščnimi pogostimi in rekombinantnimi haplotipi različne. V primeru rekombinacije med lokusoma HLA-A in HLA-C, ko rekombinantni haplotip vsebuje drugačen alel HLA-A lahko pričakujemo le eno neujemanje med bolnikom in možnim sorodnim darovalcem, kar dopušča možnost, da v primeru, ko ne moremo najti bolj skladnega nesorodnega darovalca, izberemo sorodnega darovalca z enim neujemanjem v HLA-A. V primeru rekombinacije med lokusoma HLA-A in HLA-C, ko rekombinantni haplotip vsebuje drugačne alele HLA-C, B, DR in DQ, pa lahko pričakujemo kar štiri neujemanja med bolnikom in možnim sorodnim darovalcem, kar izključuje izbiro takšnega sorodnega darovalca. Pri rekombi-

naciji med lokusoma HLA-B in HLA-DR na način, da rekombinantni haplotip vsebuje drugačen alel HLA-DR, lahko vedno pričakujemo dve novi neujemanji med bolnikom in potencialnim sorodnim darovalcem, ker se skupaj z lokusom DR prekriža tudi bližnji lokus HLA-DQ, kar izključuje izbiro takšnega sorodnega darovalca. Lokusa HLA-DQ v študiji nismo analizirali. Z ozirom na močno vezavno neravnovesje med HLA-DR in HLA-DQ pa nanj z veliko verjetnostjo sklepamo. V primeru rekombinacije med lokusoma HLA-B in HLA-DR, ko rekombinantni haplotip vsebuje drugačne antigene/alele HLA-A, B in C, lahko pričakujemo tri neujemanja med bolnikom in možnim sorodnim darovalcem, kar izključuje izbiro takšnega sorodnega darovalca. Z družinskimi analizami smo ugotovili, da na izbiro sorodnega darovalca znotraj slovenskih družin vplivata upadanje povprečnega števila otrok ter v manjši meri število rekombinacij na regiji HLA. Z ozirom na to, da kot odsev do-

Tabela 8: Frekvence skupin alelov in alelov HLA-C.

Skupina alelov HLA-C	Alel	Frekvenca (%)	Skupina alelov HLA-C	Aleli	Frekvenca (%)
C*01	01:02	6,5 6,5	C*08		1,3
C*02	02:02	10,4 10,4	C*12	12:03 12:04	20,8 18,2 2,6
C*03	03:02 03:03 03:04	18,2 2,6 9,1 6,5	C*14	14:03	1,3 1,3
C*04	04:01 04:07	32,5 31,2 1,3	C*15		5,2
C*05	05:01 05:03	10,4 7,8 2,6	C*16	16:01 16:02 16:04	6,5 1,3 2,6 2,6
C*06	06:02	16,9 16,9	C*17		2,6
C*07	07:01 07:02 07:04	54,5 24,7 25,9 3,9	C*18		0

gajanja v zahodni Evropi lahko pričakujemo nadaljnje upadanje števila otrok v slovenskih družinah, bo zelo verjetno vedno več pomena dobivala presaditev KMC nesorodnih darovalcev.

Da bi ugotovili vpliv statusa osnovne tipizacije HLA in posredno polimorfizma HLA na izbiro nesorodnih darovalcev, smo analizirali 162 parov bolnik/darovalec, za katere je po osnovni tipizaciji kazalo, da so tkivno skladni. Po končni tipizaciji pa se je izkazalo, da je skladnih samo še 80 parov, torej 49,4 %. Pri tem je bila osnovna tipizacija bolnika vedno enaka in je vsebovala HLA-A in HLA-B na nizki stopnji ločljivosti ter HLA-DR in HLA-DQ na visoki stopnji ločljivosti. Kot osnovno tipizacijo darovalca pa smo upoštevali tip HLA, ki ga je posredoval register Slovenija-Donor. Osnovni tipi HLA darovalcev so bili različni, velikokrat pa niso vsebovali podatkov za lokus HLA-C. Naša študija je pokazala, da so ravno neujemanja v HLA-C največkrat prispevala k tkivni neskladnosti med bolnikom in možnim darovalcem. To se je izkazalo tako v primeru, ko smo opazovali vpliv posameznih lokusov (38 % neujemanj), a tudi pri kombiniranem vplivu več lokusov (Tabela 6). Razlog za močan vpliv lokusa HLA-C na izid izbire lahko iščemo tako v statusu osnovne tipizacije kot tudi v polimorfizmu genskih različic na lokusu HLA-C. V Tabeli 7 smo pokazali, da je bilo značilno več ($p=0.019$) darovalcev, ki pri osnovni tipizaciji niso imeli določenega HLA-C izločenih (67,7 %) kot izbranih (41,3 %). Še bolj statistično značilna ($p=0.00069$) pa je bila razlika med izločenimi (19,3 %) in izbranimi (55,0 %) darovalci, ki so imeli HLA-C določen na nizki stopnji ločljivosti z metodo, ki temelji na pomnože-

vanju DNK. Z drugimi besedami, darovalci z osnovno gensko tipizacijo, ki je vsebovala HLA-C, so bili signifikantno večkrat izbrani kot izločeni. Šest izmed darovalcev, ki so imeli pri osnovni tipizaciji že določen HLA-C na nizki stopnji ločljivosti, smo po končni tipizaciji izločili zaradi neujemanj na ravni alelov (podatkov nismo prikazali v tabeli). Izločitev na ravni alela je posledica prisotnosti velikega števila genskih različic HLA-C, ki se v pogostnosti pojavljanja med različnimi populacijami razlikujejo. Kljub temu, da je skupina alelov, ki jo določimo na nizki stopnji ločljivosti, C*07 (54,5 %) v slovenski populaciji najbolj zastopana, je najbolj zastopan alel v naši populaciji C*04:01 (31,2 %) (Tabela 8). V nemški populaciji, od koder prihaja največ nesorodnih darovalcev za naše bolnike, pa je frekvenca istega alela znatno nižja (23,2 %) (Tabela 9). Največkrat pa se med populacijami ne razlikujejo samo frekvence posameznih alelov, različne so tudi njihove kombinacije.¹⁴

Izsledki zadnje mednarodne študije potrjujejo vpliv lokusa HLA-C na uspeh presaditve KMC.¹⁵ Nova priporočila WMDA za strategijo iskanja tkivno skladnega darovalca za določenega bolnika predlagajo rangiranje, ki vključuje tudi lokus HLA-C.¹⁶ Ne smemo pozabiti dejstva, da mnogi bolniki ne dočakajo presaditve KMC. Pri tem je bolj kot pomanjkanje števila darovalcev odločilen čas, ki ga porabimo za iskanje skladnega darovalca. Heemskerck in sodelavci so pokazali, da bi z izbiro darovalcev, ki so vnaprej tipizirani na visoki stopnji ločljivosti za vseh pet lokusov HLA-A, B, C, DR in DQ, skrajšali čas izbire na manj kot tri tedne. Povprečni čas iskanja za bolnika iz severozahodne Evrope so ocenili na 4,4

Tabela 9: Frekvence najpogostejših alelov HLA-C v slovenski in nekaterih drugih evropskih populacijah.

	Frekvenca (%)				
	C*04:01	C*07:02	C*07:01	C*12:03	C*06:02
Slovenija	31,2	25,9	24,7	18,2	16,9
Italija (S)	33,3	12	28,8	30	18,4
Nemčija	23,2	30,4	30	10	18,6
Francija (JV)	16,9	13,8	31,5	10,8	20
Anglija (SZ)	11	27,9	35,2	9,4	16,4

mesece.¹⁷ Zaključimo lahko, da z dodatkom lokusa HLA-C k osnovni tipizaciji HLA, tako bolnika kot darovalca, znatno izboljšamo učinkovitost postopka iskanja bolniku primerne darovalca. Krog ustreznih darovalcev se na ta način zmanjša v zgodnji fazi iskanja. To skrajša čas in zniža stroške, ki jih prinesejo tipizacije številnih potencialnih nesorodnih darovalcev. V zadnjem času smo lokus HLA-C vključili v osnovno tipizacijo slovenskih bolnikov. Največji nacionalni registri nesorodnih darovalcev KMC, kot sta nemški Zentrales Knochenmarkspender-Register für die Bundesrepublik Deutschland (ZKRD) in ameriški National Marrow Donor Program (NMDP) pa vključujejo tudi vedno večje število darovalcev s tipizacijo lokusa HLA-C. Ta bi bila smotrna tudi pri darovalcih, ki so že vključeni ali jih vključujemo v register Slovenija-Donor.

Zaključki

Z družinskimi analizami smo ugotovili, da na nižje število sorodnih darovalcev znotraj slovenskih družin vplivata upadanje povprečnega števila otrok ter v manjši meri število rekombinacij na regiji HLA. Z ozirom na to, da lahko pričakujemo nadaljnje upadanje števila otrok v slovenskih družinah, bo zelo verjetno vedno bolj pridobivala na pomenu presaditev KMC od nesorodnega darovalca. Z našo študijo smo pokazali, da so k tkivni neskladnosti med bolnikom in možnim darovalcem največkrat prispevala neujemanja v HLA-C. Razlog za močan vpliv tega lokusa na izid izbire lahko iščemo tako v statusu osnovne tipizacije, ki velikokrat ni vsebovala HLA-C, kot tudi v polimorfizmu genskih različic na tem lokusu. Upoštevajoč izsledke študij, ki potrjujejo vpliv skladnosti v HLA-C na uspeh presaditve KMC,¹⁴ lahko zaključimo, da z dodatkom lokusa HLA-C k osnovni tipizaciji HLA, tako bolnika kot darovalca, znatno izboljšamo učinkovitost postopka iskanja bolniku primerne darovalca. Tipizacija HLA-C na nizki stopnji ločljivosti bi bila zato smotrna tudi pri darovalcih registra Slovenija-Donor.

Literatura

1. Bohinjec M, Imunogenetske osnove tkivne skladnosti, Merila pri izbiri dvojice dajalec in sprejemalec pri klinični transplantaciji. *Zdrav Vestn* 1996; 199–207.
2. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood* 2007; 110: 4576–83.
3. Szydlo R, Goldman JM, Klein JP, Gale RP, Ash RC, Bach FH, et al. Results of allogeneic bone marrow transplants for leukemia using donors other than HLA-identical siblings. *J Clin Oncol* 1997; 15: 1767–77.
4. Prasad VK, Kernan NA, Heller G, O'Reilly RJ, Yang SY. HLA-C disparity between patients and unrelated donors matched for HLA-A and -B loci. *Biol Blood Marrow Transplant* 1999; 5: 77–85.
5. Anasetti C, Beatty PG, Storb R, Martin PJ, Mori M, Sanders JE, et al. Effect of HLA incompatibility on graft-versus-host disease, relapse, and survival after marrow transplantation for patients with leukemia or lymphoma. *Hum Immunol.* 1990; 29: 79–91.
6. Hurley CK, Wade JA, Oudshoorn M, Middleton D, Kukuruga D, Navarrete C, et al. A special report: histocompatibility testing guidelines for hematopoietic stem cell transplantation using volunteer donors. *Tissue Antigens* 1999; 53: 394–406.
7. Hurley CK, Wade JA, Oudshoorn M, Middleton D, Kukuruga D, Navarrete, et al. A special report: histocompatibility testing guidelines for hematopoietic stem cell transplantation using volunteer donors. *Hum Immunol.* 1999; 60: 347–60.
8. Hurley CK, Wade JA, Oudshoorn M, Middleton D, Kukuruga D, Navarrete C et al. Histocompatibility testing guidelines for hematopoietic stem cell transplantation using volunteer donors: report from The World Marrow Donor Association. Quality Assurance and Donor Registries Working Groups of the World Marrow Donor Association. *Bone Marrow Transplant.* 1999; 24: 199–21.
9. Tonejc M, Jeras M. Slovenija-Donor, Pravilnik delovanja. Ljubljana: Zavod RS za transfuzijsko medicino; 2005.
10. Sasazuki T, Juji T, Morishima Y, Kinukawa N, Kashiwabara H, Inoko H et al. Effect of matching of class I HLA alleles on clinical outcome after transplantation of hematopoietic stem cells from an unrelated donor. *Japan Marrow Donor Program.* *N Engl J Med.* 1998; 339: 1177–85.
11. Petersdorf E, Anasetti C, Martin PJ, Gooley T, Radich J, Malkki M, et al. Limits of HLA mismatching in unrelated hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2004; 104: 2976–2980.
12. Van Rood J. HLA-C alleles can no longer be ignored in bone marrow donor selection. *Blood* 2004; 104: 1912–1913.
13. Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D and Jones AR. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acid Research* 2011; 39: D913–D919.
14. Vidan-Jeras B, Tiercy JM. HLA-B44 allele frequencies and haplotypic associations in three European populations. *Eur J Immunogenet.* 1997; 24: 335–43.
15. Woolfrey A, Klein JP, Haagenson M, Spellman S, Petersdorf E, Oudshoorn M et al. HLA-C antigen mismatch is associated with worse outcome in unrelated donor peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011; 17: 885–92.
16. Bochtler W, Maiers M, Bakker JN, Oudshoorn M, Marsh SG, Baier D et al. World marrow Donor association framework for the implementation of HLA matching programs in hematopoietic stem cell donor registries and cord blood bank. *Bone Marrow Transplant.* 2011; 46(1): 338–43.
17. Heemskerk MBA, Van Walraven SM, Cornelissen JJ, Barge RMY, Bredius RGM, Egeler RM, et al. How to improve the search for an unrelated hematopoietic stem cell donor. *Faster is better than more!* *Bone Marrow Transplant.* 2005; 35: 645–652.