

Učinkovitost poslijetransplantacijskog ciklofosfamida u prevenciji bolesti darivatelja protiv primatelja nakon alogenične transplantacije krvotvornih matičnih stanica od nesrodnog nepodudarnog darivatelja

Jukić, Lea

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:438730>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Lea Jukić

**Učinkovitost poslijetransplantacijskog ciklofosfamida u prevenciji
bolesti darivatelja protiv primatelja nakon alogenične transplantacije
krvotvornih matičnih stanica od nesrodnog nepodudarnog darivatelja**

Diplomski rad



Zagreb, 2024

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za hematologiju Klinike za internu medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Nadire Duraković i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2023./2024.

POPIS KRATICA

aGVHD – akutna bolest darivatelja protiv primatelja (engl. *acute graft versus host disease*)

ALL – akutna limfocitna leukemija

alloSCT – alogenična transplantacija matičnih stanica (engl. *allogeneic stem cell transplantation*)

AML – akutna mijeloična leukemija

APC – antigen prezentirajuća stanica (engl. *antigen presenting cell*)

ATG – antitimocitni globulin

autoSCT – autologna transplantacija matičnih stanica (engl. *autologous stem cell transplantation*)

cGVHD – kronična bolest darivatelja protiv primatelja (engl. *chronic graft versus host disease*)

CLL – kronična limfocitna leukemija (engl. *chronic lymphocytic leukemia*)

CNI – inhibitor kalcineurina (engl. *calcineurin inhibitor*)

CSA – ciklosporin A

Cy – ciklofosfamid (engl. *cyclophosphamide*)

DLI – infuzija donorskih limfocita

EBMT – Europsko društvo za transplantaciju krvi i srži (engl. *European Society for Blood and Marrow Transplantation*)

Flu - fludarabin

GVHD – bolest darivatelja protiv primatelja (engl. *graft versus host disease*)

GVL – presadak protiv leukemije (engl. *graft versus leukemia*)

GVT – presadak protiv tumora (engl. *graft versus tumor*)

haploSCT – haploidentična transplantacija matičnih stanica (engl. *haploidentical stem cell transplantation*)

HLA – humani leukocitni antigen (engl. *human leukocyte antigen*)

HSC – hematopoetska matična stanica (engl. *hematopoietic stem cell*)

HSCT – transplantacija hematopoetskih matičnih stanica (engl. *hematopoietic stem cell transplantation*)

LPS – lipopolisaharid

MAC – mijeloablativno kondicioniranje (engl. *myeloablative conditioning*)

MDS – mijelodisplastični sindrom

MHC – glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex*)

mHLA – manji humani leukocitni antigen (engl. *minor human leukocyte antigen*)

MMF – mikofenolat-mofetil

MMUD – nesrodni nepodudarni darivatelj (engl. *mismatched unrelated donor*)

MPN – mijeloproliferativna neoplazma

MTX – metotreksat

MUD – nesrodni podudarni darivatelj (engl. *matched unrelated donor*)

NHL – ne-Hodgkinov limfom (engl. *non-Hodgkin lymphoma*)

NK – prirodne ubojice (engl. *natural killer*)

NMA – nemijeloablativno kondicioniranje (engl. *non-myeloablative conditioning*)

PAMP – molekularni obrazac povezan s patogenom (engl. *pathogen-associated molecular pattern*)

PTCy – poslijetransplantacijski ciklofosamid

RFS – preživljenje bez relapsa (engl. *relapse-free survival*)

RR – relativni rizik

RIC – kondicioniranje smanjenog intenziteta (engl. *reduced-intensity conditioning*)

TBI – ozračivanje čitavog tijela (engl. *total body irradiation*)

TRM – smrtnost povezana s liječenjem (engl. *treatment-related mortality*)

Sadržaj

SAŽETAK	6
I. PREGLED LITERATURE.....	9
1. 1 Uvod.....	9
1.2 Razvoj transplantacije hematopoetskih matičnih stanica: nekad i danas	10
1.3 Autologna i alogena transplantacija hematopoetskih matičnih stanica: HLA barijera.....	12
1.4 Aloreaktivnost: GVL i GVHD	17
1.5 Poslijetransplantacijski ciklofosfamid (PTCy).....	23
II. HIPOTEZA	28
III. CILJEVI RADA.....	28
IV. ISPITANICI I METODE.....	29
V. REZULTATI.....	31
VI. RASPRAVA	38
Osnovne karakteristike	38
Usporedba karakteristika GVHD-a	39
Akutni GVHD	39
Kronični GVHD	39
Broj preminulih	39
VII. ZAKLJUČCI	41
VIII. ZAHVALE.....	42
IX. LITERATURA	43
X. ŽIVOTOPIS	49

SAŽETAK

Učinkovitost poslijetransplantacijskog ciklofosfamida u prevenciji bolesti darivatelja protiv primatelja nakon alogenične transplantacije krvotvornih matičnih stanica od nesrodnog nepodudarnog darivatelja

Lea Jukić

Transplantacija hematopoetskih matičnih stanica potencijalno je kurativna metoda liječenja različitih hematoloških i nehematoloških bolesti. Za život opasna bolest darivatelja protiv primatelja jedna je od glavnih komplikacija transplantacije hematopoetskih matičnih stanica. Poslijetransplantacijski ciklofosfamid (PTCy) uspješno se koristi kao profilaksa bolesti darivatelja protiv primatelja (GVHD) nakon haploidentične transplantacije hematopoetskih matičnih stanica, a istraživanja pokazuju kako se njegovo profilaktično djelovanje očituje i u alogeničnoj transplantaciji, premošćući HLA-barijeru. U svrhu ispitivanja učinkovitosti poslijetransplantacijskog ciklofosfamida nakon alogenične transplantacije od nesrodnog nepodudarnog darivatelja provedena je retrospektivna studija primatelja alogenične transplantacije KBC-a Zagreb između siječnja 2020. te lipnja 2023. Izdvojen je 161 pacijent, od kojih je je 120 primilo transplantaciju od nesrodnog podudarnog darivatelja, a 41 od nesrodnog nepodudarnog darivatelja. 21 pacijent primio je transplantaciju od nesrodnog nepodudarnog darivatelja te PTCy. Uspoređeni su parametri GVHD-a između nepodudarne skupine koja je primila PTCy te nepodudarne (nePTCy 9/10) i podudarne (nePTCy 10/10) skupine koje nisu primile PTCy. Sveukupni udio slučajeva akutnog GVHD-a (aGVHD-a) bio je najniži u skupini pacijenata koji su primili PTCy (n=4, 19%), u odnosu na nepodudarnu (n=8, 40%) i podudarnu nePTCy skupinu (nePTCy 10/10, n=41, 34,5%). Sveukupni udio slučajeva kroničnog GVHD-a (cGVHD-a) bio je najniži u podudarnoj nePTCy skupini (n=21, 17,65%), zatim u PTCy skupini (n=4, 19%) te u nepodudarnoj nePTCy skupini (n=4, 20%). Ovim istraživanjem dobiveni su preliminarni podaci koji upućuju na potencijalno zaštitno djelovanje PTCy u profilaksi GVHD-a, međutim ne postiže se statistička značajnost ($p>0.05$) te je potrebno daljnje istraživanje s više ispitanika te detaljnija statistička analiza kako bi se potvrdili ovi nalazi.

Ključne riječi: ciklofosfamid, GVHD, transplantacija hematopoetskih matičnih stanica, nepodudarni donori

SUMMARY

Efficacy of post-transplant cyclophosphamide in the prevention of graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplant from an unrelated mismatched donor

Lea Jukić

Hematopoietic stem cell transplantation is a potentially curative treatment method for various hematologic and non-hematologic diseases. The life-threatening graft-versus-host disease is one of the main complications of hematopoietic stem cell transplantation. Post-transplantation cyclophosphamide (PTCy) is successfully used as graft-versus-host disease (GVHD) prophylaxis after haploidentical stem cell transplantation, but research shows its effect in allogeneic stem cell transplantation, crossing the HLA-barrier. To examine the efficacy of post-transplantation cyclophosphamide after allogeneic stem cell transplantation from a mismatched unrelated donor, a retrospective study was conducted on allogeneic stem cell transplantation recipients between January 2020 and June 2023 at the University Hospital Center Zagreb. 161 patients were identified, from which 120 received transplantation from a matched unrelated donor, and 41 from a mismatched unrelated donor. 21 patients received an allogeneic stem cell transplantation from a mismatched unrelated donor and also received PTCy. GVHD parameters were compared between the mismatched group that received PTCy and the mismatched (nonPTCy 9/10) and matched (nonPTCy 10/10) groups that have not received PTCy. The overall proportion of acute GVHD cases was the lowest in the group that received PTCy (n=4, 19%), in comparison to the mismatched (n=8, 40%) and matched nonPTCy groups (n=41, 34,5%). The overall proportion of chronic GVHD cases was the lowest in the matched nonPTCy group (n=21, 17,65%), followed by the PTCy group (n=4, 19%) and the mismatched nonPTCy group (n=4, 20%). This study yielded preliminary findings suggesting a potentially protective effect of PTCy as GVHD prophylaxis, but without reaching statistical significance ($p>0.05$). Further research with more subjects and more thorough statistical analysis is needed to confirm these findings.

Keywords: Cyclophosphamide, Graft vs Host Disease, Hematopoietic Stem Cell Transplantation, Unrelated Donors

I. PREGLED LITERATURE

1. 1 Uvod

Transplantacija hematopoetskih matičnih stanica (engl. hematopoietic stem cell transplantation, HSCT) danas je standardizirana metoda u liječenju hematoloških bolesti; prije svega u liječenju limfoidnih i mijeloidnih neoplazma te imunodeficijencija, a široka primjena transplantacije hematopoetskih matičnih stanica uključuje i liječenje autoimunih i urođenih metaboličkih bolesti, kao i primjenu u liječenju solidnih tumora (1). Sama transplantacija koristi hematopoetske matične stanice darivatelja u svrhu ponovne obnove hematopoetskog sustava ili u svrhu zamjene neispravno djelujućeg hematopoetskog sustava u primatelja (1). Hematopoetske matične stanice (engl. hematopoietic stem cells, HSCs) jesu multipotentne (2) samoobnavljajuće stanice koje se pronalaze u koštanoj srži, u perifernoj krvi nakon mobilizacije te u pupčanoj vrpci (3). Usprkos već širokoj kliničkoj primjeni, u transplantaciji hematopoetskih matičnih stanica i dalje slijedi stalna optimizacija protokola prijetransplantacijske pripreme i poslijetransplantacijske imunosupresije u cilju postizanja što boljih ishoda za sve pacijente.

1.2 Razvoj transplantacije hematopoetskih matičnih stanica: nekad i danas

Razvoj HSCT-a započeo je u 20. stoljeću, kada je malo tko mogao naslutiti koliko će velikih promjena uslijediti u području transplantacije u samo nekoliko idućih desetljeća. U ovom razdoblju razvoj medicine, znanosti i tehnologije općenito, bio je neodvojiv od straha i nesigurnosti čiji je izvor predstavljala primjena novootkrivenog atomskog oružja, posljedičnog zračenja i kobnih posljedica. Radioaktivno zračenje u visokim dozama uzrokuje trajnu aplaziju koštane srži te su tako istraživanja provedena u nadi za ponovnom uspostavom funkcionalne koštane srži (4). S druge strane, prva transfuzija stanica koštane srži provodi se 1939. u Oregonu, u djevojke koja je bolovala od aplastične anemije, vjerojatno uzrokovane liječenjem tuberkuloze solima zlata (5). U ovom slučaju primijenjena je koštana srž srodnika iste krvne grupe, umiješanih u krv. Ova transfuzija nije pokazala niti pretjeranu negativnu reakciju, niti se stanje pacijentice poboljšalo te je pacijentica umrla kasnije od infekcije. 1956. Barnes et al objavili su studiju na ozračenim miševima koji su bolovali od leukemije, gdje je presađak koštane srži povezan s djelovanjem na samu leukemiju (6). 1957. objavljen je rad o 6 pacijenata koji su bolovali od leukemije koji su za liječenje primili zračenje te intravensku infuziju koštane srži od zdravih darivatelja (7). U dvije osobe je postignuto prihvaćanje transplantata (engl. engraftment), no nitko nije preživio dulje od 100 dana. Intravenska primjena stanica koštane srži od zdravih darivatelja tada je predstavljala prvi model kasnije usavršene alogene transplantacije. 1958. Kurnick et al objavljuju istraživanje gdje dva pacijenta intravenski primaju vlastitu prethodno zamrznutu koštanu srž nakon postupka zračenja (8). Jedan pacijent umire, dok drugi pokazuje hematološki oporavak. Primjenjujući vlastitu koštanu srž u pacijenta, istraživanje Kurnick et al predstavlja početke autologne transplantacije. Ovo su sami začeci transplantacije hematopoetskih matičnih stanica, a kroz daljnji razvoj i ostala otkrića prije svega u području imunologije, spoznajama vezanim uz glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. major histocompatibility complex, MHC), odnosno ljudski leukocitni antigen (engl. human leukocyte antigen, HLA) te zbog otkrivanja mogućnosti prikupljanja matičnih stanica mobilizacijom u perifernoj krvi te izbora matičnih stanica u pupčanoj vrpici, transplantacija hematopoetskih matičnih stanica pretvara se iz eksperimentalne u uvriježenu metodu liječenja. Već spomenuti Edward Donnell Thomas posvetio je svoj rad istraživanju transplantacije koštane srži, postavši pionikom suvremene transplantacije hematopoetskih

matičnih stanica. Za svoj rad, odnosno zbog razvoja transplantacije koštane srži nagrađen je 1990. Nobelovom nagradom za medicinu.

Moderna transplantacija matičnih stanica počiva na državnoj i međunarodnoj usklađenosti i suradnji koja omogućava akademsko istraživanje te veći broj darivatelja. Tako je nekoliko udruga uključeno u razvoj, praćenje i promicanje transplantacije matičnih stanica, primjerice Europsko društvo za transplantaciju krvi i koštane srži (engl. European Society for Blood and Bone Marrow Transplantation, EBMT) koje vodi europski registar transplantacija i darivatelja. Hrvatski registar dobrovoljnih darivatelja krvotvornih matičnih stanica te Zaklada Ana Rukavina tako broje 65447 tipiziranih darivatelja (9) (dana 1. lipnja 2024). U Europi je 2021. godine provedeno sveukupno 43,109 transplantacija hematopoetskih matičnih stanica prijavljenih od strane 694 europskih centara (10).

1.3 Autologna i alogena transplantacija hematopoetskih matičnih stanica: HLA barijera

Ovisno o darivatelju hematopoetskih matičnih stanica razlikuje se alogena (engl. allogeneic stem cell transplantation, alloSCT), autologna (engl. autologous stem cell transplantation, autoSCT) te singenična transplantacija hematopoetskih matičnih stanica (engl. syngeneic stem cell transplantation) (1). Pri autolognoj transplantaciji presađuju se vlastite hematopoetske matične stanice pacijenta, u alogenim transplantacijama presađuju se hematopoetske matične stanice nekog drugog pojedinca, a u singeničnim transplantacijama darivatelj je identičnog genotipa kao i primatelj (1,3). Tako je u 2021. u Europi provedeno 27,606 autolognih transplantacija, odnosno 19,806 alogenih transplantacija (10). Obje vrste transplantacija omogućuju liječenje u prošlosti neizlječivih, smrtonosnih bolesti, no svaka ima svoje posebnosti i indikacije (1).

Autologne transplantacije koriste se u osnovi za obnovu hematopoetskog sustava nakon kemoterapije te zračenja visoke doze, gdje bolest ne zahvaća sam presadak, makar se ovo rijetko može u potpunosti isključiti (3). Tako je autoSCT indicirana uglavnom u liječenju relapsiranih limfoidnih neoplazmi (Hodgkinovog limfoma, difuznog velikog B-staničnog limfoma, folikularnog limfoma i drugih) te relapsiranog multiplog mijeloma (1). AutoSCT može se koristiti i u liječenju nehematoloških bolesti poput multiple skleroze (1). Glavne indikacije za autoSCT u 2021. činili su poremećaji plazma stanica te limfoidne maligne bolesti; ne-Hodgkinov limfom (NHL), Hodgkinov limfom, akutna limfoblastična leukemija (ALL) i kronična limfoblastična leukemija (CLL). K tome su poremećaji plazma stanica činili najčešću skupinu, odnosno činili su 55% svih autolognih transplantacija hematopoetskih matičnih stanica (10).

Pri alogenoj transplantaciji hematopoetskih matičnih stanica presađuju se za tijelo strane stanice te se stoga nailazi na razliku u HLA, odnosno na HLA barijeru, a posljedična imunološka reakcija predstavlja veliku prepreku za uspješnost same transplantacije (11). Pri tome MHC, odnosno HLA lokus, predstavlja najpolimorfiji genski lokus poznat u eukariota (12,13). AlloSCT je zbog navedenog povezana s više komplikacija, višom s liječenjem uzrokovanom liječenjem (engl. treatment related mortality, TRM) te potrebom za imunosupresijom poslije transplantacije kako bi se omogućilo „usađivanje“ (engl. engraftment) i spriječio aGVHD (3). Klasa I HLA jest antigen izražen na gotovo svim stanicama s jezgrom (13), kojeg su u mogućnosti prepoznati CD8+ citotoksični limfociti i NK (engl. natural killer) stanice (13). Klasu II HLA, s druge strane, čini

antigen izražen na antigen prezentirajućim stanicama kao što su B-limfociti, dendritične stanice ili makrofagi (13). Lokusi koji kodiraju za HLA nalaze se na kratkom kraku kromosoma 6 te se mogu podijeliti u dvije osnovne klase (14). Klasu I čine lokusi HLA-A, B i C, dok klasu II kodira HLA-D regija unutar koje se ističu HLA-DP, HLA-DR i HLA -DQ lokusi (14). Budući da su proizvodi ovih gena, klasa I HLA i klasa II HLA, ključni u imunološkom prepoznavanju (14), njihova prisutnost u darivatelja, odnosno primatelja određuje njihovu međusobnu podudarnost (11). Tako je danas podudarnost kojoj se teži u većini transplantacijskih centara podudarnost u HLA-A/B/C/DRB1/DQB1, odnosno 10/10 podudarnost (15). U slučaju da se za podudarnost pretražuje u HLA-A/B/C/DRB1/DQB1/DPB1 radi se o podudarnosti 12/12. Ipak, standard rezolucije u Kliničkom bolničkom centru Zagreb čini tipiziranje za 5 lokusa, odnosno HLA-A/B/C/DRB1/DQB1, gdje se za transplantaciju hematopoetskih matičnih stanica ne prihvaća podudarnost 8/10 (15).

Prilikom pretraživanja mogućih darivatelja vjerojatnost pronalaska potpune podudarnosti među braćom ili sestrama iznosi 25 (3), no samo otprilike 30% pacijenata ima ovakvog darivatelja (11). Ostalih 70% ima mogućnost tražiti HLA podudarnog nesrodnog darivatelja (engl. HLA-matched unrelated donor, MUD) ili haploidentičnog darivatelja (15). U većini europskih zemalja barem 50% pacijenata uspijeva pronaći 10/10 podudarnog nesrodnog darivatelja, a od preostalih, 20-30% uspijeva pronaći 9/10 nepodudarnog nesrodnog darivatelja (11). U nedavnoj studiji u Republici Hrvatskoj od 784 pacijenata uključenih u HSCT, 70% uspješno je pronašlo 10/10 podudarnog nesrodnog darivatelja (15), a ostalih 30% pacijenata primilo je presađak od 9/10 nesrodnog nepodudarnog darivatelja (15).

Osim posljedica aloreaktivnosti i nepodudarnosti, u alogenim transplantacijama hematopoetskih matičnih stanica prisutan je imunološki odgovor donorskih stanica na maligne stanice primatelja (3). Ovaj učinak poznat je pod nazivom „presađak protiv tumora“ (engl. graft vs. tumor, GVT) (3) ili „presađak protiv leukemije“ (engl. graft vs. leukemia, GVL) (16). GVT učinak je primijećen zbog razlike u vjerojatnosti relapsa između singeničnih i alogenih transplantacija, gdje je relaps osnovne bolesti rjeđi nakon alogene transplantacije u usporedbi sa singeničnom transplantacijom (3,17,18). Drugi dokazi uključuju da infuzija darivateljevih limfocita (DLI) može uspješno inducirati remisiju (19–21) te da je relaps osnovne bolesti češći u slučaju presađaka s odstranjenim T-limfocitima (22). GVT učinak važno je otkriće moderne imunologije na kojem se bazira

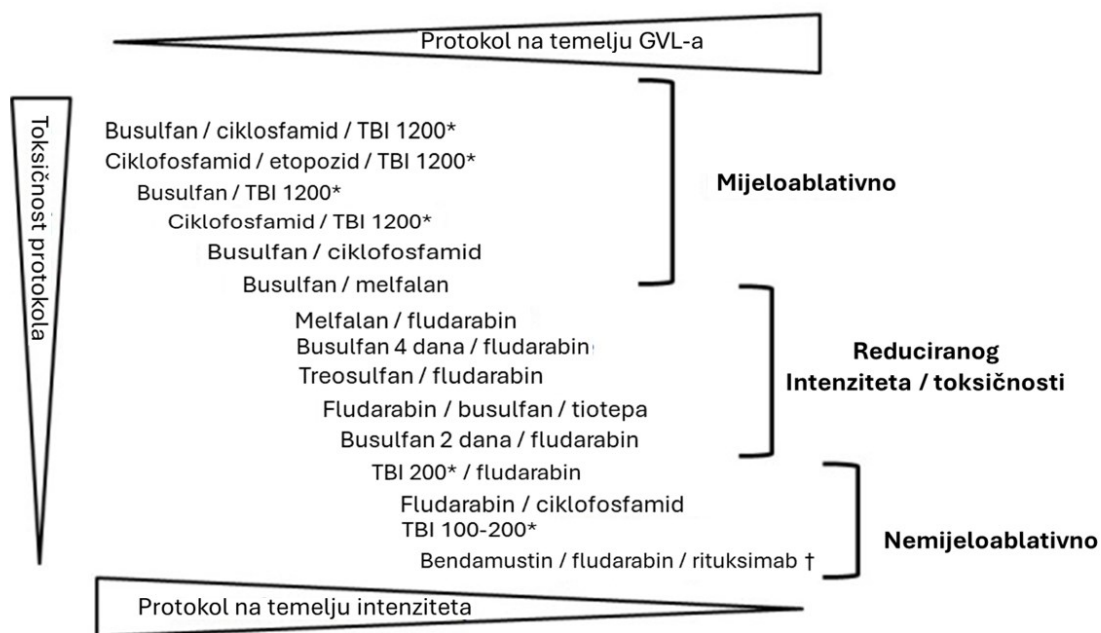
kurativna priroda alogene transplantacije hematopoetskih stanica kao metode liječenja malignih bolesti (3). Alogene transplantacije hematopoetskih matičnih stanica indicirane su u liječenju mijeloidnih neoplazma; akutne mijeloične leukemije, kronične mijeloične leukemije, mijedisplastičnog sindroma, mijeloproliferativnih neoplazma i drugih (1). Dvije najčešće indikacije za alloSCT u 2021. u Europi bile su akutna mijeloična leukemija (AML) (38%) te mijelodisplastični sindrom (13%) (10).

Kondicioniranje je ključan dio pripreme pacijenata na sam presadak prije transplantacije, a konvencionalno uključuje davanje kemoterapije i zračenja (23). Postoje različiti režimi kondicioniranja, a izbor određenog režima ovisi o samoj bolesti koja je indikacija za transplantaciju te o vrsti transplantacije (autoSCT, alloSCT), odnosno razini podudarnosti presatka (MUD, MMUD, haploSCT) (23). Ipak, odabir režima uzima u obzir i ostale specifičnosti pacijenta poput komorbiditeta, dobi, stanja pacijenta te stanja bolesti u trenutku transplantacije (23). Kondicioniranje se temelji na eliminaciji malignih stanica u malignim bolestima, postizanju dovoljne razine imunosupresije kako bi se izbjeglo odbacivanje presatka i GVHD, te stvaranju povoljnog okruženja za matične stanice u samoj koštanoj srži (23). Nadalje, kondicioniranje može zahvatiti mijeloidnu lozu te biti mijeloablativno (busulfan, BU; melfalan, MEL) ili limfoidnu lozu te biti limfoablativno (fludarabin, FLU; ciklofosfamid, CY). Tako se mijeloablativnim kondicioniranjem zahvaćaju matične stanice primatelja, a limfoablativnim primateljevi limfociti (23) kako bi se osiguralo uklanjanje malignih stanica ili oslobodio prostor za nove darivateljske matične stanice te spriječila reakcija imunološkog sustava na stanice darivatelja. Zračenje čitavog tijela (engl. total body irradiation, TBI) ima mijeloablativan i imunosupresivan učinak te djeluje na čitav organizam uključujući i krvi nedostupne organe poput mozga i testisa (3,23). Što je režim kondicioniranja agresivniji to je i toksičniji te se manje oslanja na GVL učinak u uklanjanju malignih stanica (4). Razvojem nemijeloablativnih režima (NMA), režima smanjenog intenziteta (reduced-intensity conditioning) te režima smanjene toksičnosti (engl. reduced-toxicity conditioning) uspješno se smanjila smrtnost vezana uz liječenje (engl. treatment-related mortality, TRM) te toksičnost u kondicioniranju (23). Zbog ovoga, ali i otkrićem te tumačenjem GVL učinka (4), otvorena je mogućnost kondicioniranja i transplantiranja u starijih i slabijih pacijenata (3,4,23). Naime, prije je zbog potrebe za mijeloablativnim kondicioniranjem alloSCT bila ograničena na primjenu u mlađih od 50 godina kod transplantacije od nesrodnih darivatelja,

odnosno 55 godina kod transplantacije od brata ili sestre (23). Uz razvoj RIC-a, danas je omogućena transplantacija u osoba do 70 godina (4).

Kondicioniranje u slučaju autologne transplantacije temelji se na eliminaciji malignih stanica te se stoga uglavnom primjenjuju visoke doze kemoterapije te zračenje (3). Jedan od najprimjenjivanih režima kondicioniranja u autoSCT-u se tako temelji na kombinaciji BCNU (oblik karmustina), etopozida, citarabina i melfalana („BEAM“) (23). U alogenoj transplantaciji, s druge strane, nailazi se na HLA barijeru te su povijesno alogene transplantacije s prisutnim HLA-nepodudarnostima (MMUD i haploSCT) bile praćene s visokim incidencijama TRM-a ili nezadovoljavajućim „usađivanjem“ (engl. engraftment) (23). Zbog ovog posebnog položaja alogene transplantacije, u vidu moguće HLA nepodudarnosti i GVHD-a, a s druge strane kurativnog GVT učinka osnovanog upravo na aloreaktivnosti stanica darivatelja, kondicioniranje u alloSCT nailazi na vlastite specifičnosti (3,23). Jedan od najprimjenjivanih režima kondicioniranja primjerice je mijeloablativno kondicioniranje BU/CY ili njegova modifikacija BU/FLU (3), a posebnost alogene transplantacije od nesrodnog nepodudarnog darivatelja ili u slučaju haploSCT čini dodavanje antitimocitnog globulina (ATG) (23). Za ATG je dokazano kako smanjuje incidenciju GVHD-a i TRM, a da pri tome ne narušava GVT učinak (23,24). Također, omogućena je primjena RIC režima koji su dovoljno imunosupresivni da omogućе engraftment uz niži intenzitet, gdje se eradikacija malignih stanica temelji i na imunološko posredovanom GVT-u (3).

Postoji više metoda koje se suočavaju s problematikom alogene transplantacije. One se mogu temeljiti na razlikama u prijetransplantacijskoj pripremi i kondicioniranju, primjerice spomenuti ATG, ali i na različitim poslijetransplantacijskim modifikacijama, u što spada i proučavani poslijetransplantacijski ciklofosamid.



Slika 1. Usporedba intenziteta, toksičnosti i GVL učinka u različitim režimima kondicioniranja.

Slika prikazuje različite režime koji se koriste u kondicioniranju prije transplantacije hematopoetskih matičnih stanica. Slijeva na desno režimi su razvrstani od većeg prema manjem intenzitetu, odnosno od očekivanog manjeg prema većem učinku GVL-a te odozgo prema dolje od veće prema manjoj toksičnosti. Režimi se razvrstavaju u mijeloablativne, režime smanjenog intenziteta ili toksičnosti (engl. reduced intensity conditioning, RIC; engl. reduced toxicity conditioning, RTC) te nemijeloablativne režime (engl. non-myeloablative). TBI; engl. total body irradiation; ozračenje čitavog tijela. *Radijacijske doze u radima. †Istraživanje druge faze za novo kondicioniranje u pacijenata što bolju od kronične limfocitne leukemije(25). Preuzeto i prerađeno od: Conditioning Regimen Intensity, Henig I, Zuckerman T. Hematopoietic stem cell transplantation-50 years of evolution and future perspectives (4). Rambam Maimonides Med J. 2014;5(4):e0028. Objavljeno 29. listopada 2014. doi:10.5041/RMMJ.10162 Copyright © 2014 Henig and Zuckerman. Objavljeno od Rambam Maimonides Medical Journal. Dostupno pod CC 3.0 atribucijskom unported licencom. (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

1.4 Aloreaktivnost: GVL i GVHD

Aloreaktivnost je sposobnost T-limfocita da prepoznaju ne-sebstvo, odnosno strane stanice (13) na temelju već raspravljenih razlika u HLA. Direktna aloreaktivnost polazi od prepoznavanja različitog HLA na površini za tijelo stranih stanica, dok indirektna aloreaktivnost polazi od prepoznavanja peptida nastalih proteosomalnom razgradnjom stranih HLA ili proizvoda drugih polimorfnih gena, koji su izloženi na vlastitim stanicama (13). Ovi peptidi nastali proteosomalnom razgradnjom drugih polimorfnih gena, koji su podložni aloreaktivnosti, nazivaju se manjim antigenima histokompatibilnosti (engl. minor histocompatibility antigens, mHAg) (13,26). Pri tome su mHLA jedini pokretači aloreaktivnosti prilikom transplantacije od nesrodnog darivatelja podudarnog u HLA (13). Razlike u HLA i mHLA, odnosno posljedična aloreaktivnost, glavni je razlog pokretanja i GVHD-a i GVL-a (13).

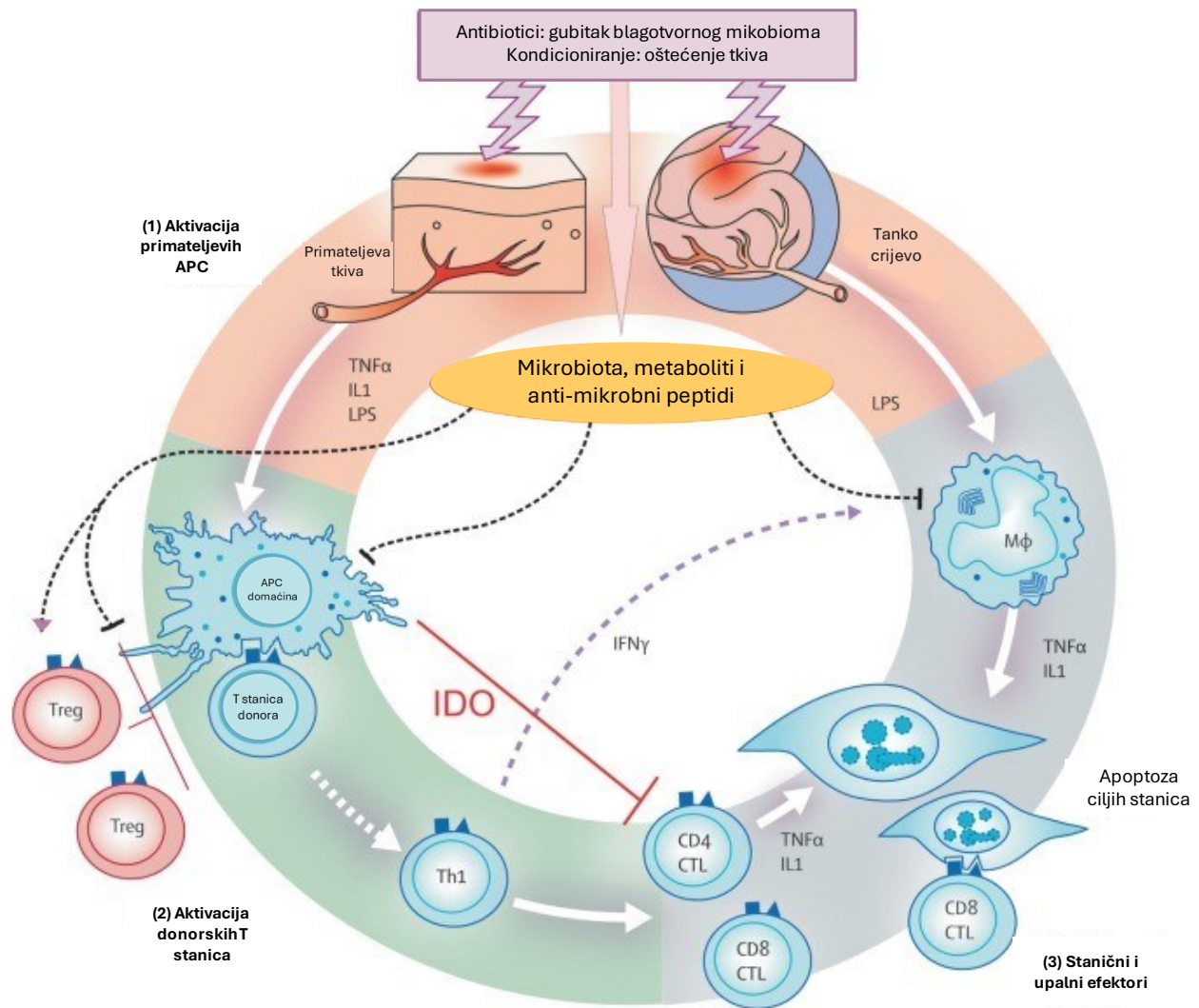
GVHD glavna je i za život najopasnija (27) komplikacija transplantacije hematopoetskih matičnih stanica koja se pojavljuje i u transplantacijama od srodnih podudarnih, nesrodnih podudarnih i nesrodnih nepodudarnih darivatelja. Postoji konvencionalna podjela GVHD-a prema vremenu pojavnosti na akutni GVHD (aGVHD) koji se pojavljuje unutar 100 dana od transplantacije te na kronični GVHD (cGVHD) koji se pojavljuje nakon više od 100 dana nakon transplantacije (28). Ipak, ova podjela nije isključiva zbog kasnije pojave simptoma aGVHD-a nakon RIC-a, ili nakon donorske infuzije limfocita (DLI) (28). National Institute of Health (NIH) klasificira GVHD kao akutni klasični GVHD koji uključuje klasičnu kliničku sliku aGVHD-a do 100 dana nakon transplantacije, perzistentni, rekurentni ili aGVHD s kasnim početkom (engl. late-onset) koji uključuju kliničku sliku aGVHD i nakon 100 dana nakon transplantacije, klasični kronični GVHD koji se prezentira klasičnom kliničkom slikom cGVHD-a nakon 100 dana nakon transplantacije te naposljetku na sindrom preklapanja (engl. overlap syndrome, (29)) koji se javlja u bilo kojem trenutku nakon transplantacije, a da pri tome klinička slika uključuje simptome i akutnog i kroničnog GVHD-a (30).

Procjenjuje se kako 30-50% pacijenata koji primaju alloSCT razviju akutni GVHD (aGVHD) (27). Makar se HLA razlike u transplantaciji od nesrodnog podudarnog darivatelja svode na razlike u mHLA, procjenjuje se kako se i ovdje aGVHD razvije u 40% slučajeva (31). Ipak, za transplantacije od HLA-nepodudarnih darivatelja navode se još i više vrijednosti (30). Zbog promjena u klasifikaciji i razlikovanju akutnog od kroničnog GVHD-a te uvođenja novih

kategorija, točnu incidenciju klasičnog kroničnog cGVHD-a teško je procijeniti (29), no smatra se da iznosi 50% (32).

U normalnim uvjetima imunološki sustav ima sposobnost odbacivanja prepoznatih stranih stanica, no posljedično kondicioniranju i imunosupresiji primatelja (33), presadak se tolerira, a aloreaktivnost od stanica donora, konkretno T-limfocita pokreće GVHD (34). Razvoj akutnog GVHD-a može se podijeliti u 3 faze; na aktivaciju antigen prezentirajućih stanica (engl. antigen-presenting cell, APC), aktivaciju, proliferaciju, diferencijaciju i migraciju donorskih T-limfocita te na fazu uništavanja ciljnog tkiva (31). Ove tri faze se mogu nazivati aferentnom, eferentom i efektorskom fazom (30) ili zadnje dvije aferentnom i eferentnom (33).

Aferentna faza započinje kad posljedično kondicioniranju dolazi do oštećenja tkiva primatelja te se oslobađa velika količina citokina te se pojačava ekspresija MHC molekula, što zauzvrat potiče prezentiranje aloantigena T-stanicama darivatelja (30,31,33). Posebno je bitno kondicioniranjem uzrokovano oštećenje gastrointestinalnog sustava jer ono omogućuje translokaciju mikrobijalnih proizvoda poput lipopolisaharida (LPS-a) i ostalih molekularnih obrazaca povezanih s patogenima (engl. pathogen-associated molecular patterns, PAMP) (35). Translociran LPS i PAMP-ovi nadalje induciraju prepoznavanje od strane APC te amplifikaciju aktivacije aloreaktivnih T-limfocita (30,31,33). Druga faza, eferentna faza (30) se temelji upravo na interakciji donorskih T-limfocita i APC stanica primatelja. Posljedična aktivacija T-limfocita potiče dodatno otpuštanje citokina (30). Naposljetku, u trećoj efektorskoj fazi, dolazi do migracije i uništavanja ciljanih tkiva od strane stanica kao što su citotoksični limfociti te NK stanice, ali i djelovanja TNF- α , IFN- γ , IL-1 te dušikovog oksida (31,36,37). Suprotno njima, regulatorna populacija T-limfocita može modulirati imunološki odgovor te čak prevenirati GVHD, prema spoznajama dobivenim na mišjim modelima (31,38).



Slika 2. Patofiziologija akutne bolesti darivatelja protiv primatelja. Slika prikazuje tri glavne faze u razvoju aGVHD-a. Djelovanjem kondicioniranja i antibiotika dolazi do oštećenja sluznice probavnog sustava te gubitka blagotvornog mikrobioma. 1) Prvo dolazi do aktivacije APC domaćina. 2) Slijedi aktivacija donorskih T-stanica. 3) Stanična i upalna efektorska aktivnost dovodi do apoptoze ciljnih stanica (33). Preuzeto i obrađeno od: Pathophysiology of acute graft versus host disease (33). Slika adoptirana i prerađena od Ferrara et al (31). Autori: Ghimire S, Weber D, Mavin E, Wang XN, Dickinson AM, Holler E. Pathophysiology of GvHD and Other HSCT-Related Major Complications. Front Immunol. 2017;8:79. Objavljeno 20. ožujka 2017. doi:10.3389/fimmu.2017.00079 Copyright © 2017 Ghimire, Weber, Mavin, Wang, Dickinson and Holler. Objavljeno pod CC atribucijskom licencom (CC BY).

Klasična klinička slika aGVHD-a uključuje zahvaćanje kože, gastrointestinalnog sustava i jetre (3,28). Akutni GVHD kože javlja se kao eritematozni i makulopapulozni osip te učestalo započinje na dlanovima i tabanima. Uz osip može se javiti i pruritus te se može proširiti i zahvatiti čitavo tijelo, a u teškim slučajevima dolazi i do razvoja bula. Kad je aGVHD-om zahvaćen gornji dio probavnog sustava dolazi do gubitka apetita, mučnine i povraćanja, a kod zahvaćanja donjeg dijela probavnog sustava javlja se vodeni proljev, koji može biti opsežan te praćen abdominalnim bolovima ili čak razvojem ileusa. U slučaju zahvaćanja jetre dolazi do povišenja bilirubina te kolestatskih enzima (28). Težina akutnog GVHD-a se procjenjuje uzimajući u obzir proširenost po organskim sustavima te samu težinu simptoma (28). Za svaki organski sustav se klinički i laboratorijski određuje stupanj težine aGVHD-a, a na temelju svih stadija svakog organskog sustava i ukupni stupanj aGVHD-a (Tablica 1).

Stadij	Koža / makulopapulozni osip	Jetra / bilirubin, μmol / L	Gastrointestinalni / proljev
+	<25% površine kože	34-50	> 500 mL
++	25%-50% površine kože	51-102	> 1000 mL
+++	Generalizirana eritroderma	103-255	> 1500mL
++++	Generalizirana eritroderma s formacijom bula ili deskvamacijom	>255	Teška abdominalna bol sa ili bez ileusa

Tablica 1. Stupnjevanje akutnog GVHD-a po Glucksbergu (39) po pojedinom zahvaćenom organskom sustavu. Stupanj aGVHD-a kože određuje se prema površini zahvaćene kože te prema prisutnosti bula ili deskvamacije (stupanj IV). aGVHD jetre se procjenjuje prema koncentraciji bilirubina. Zahvaćenost probavnog sustava određuje se prema volumenu proljeva te prema pojavi abdominalne boli sa ili bez ileusa (stupanj IV) (40). Izvor: The organ grading system for the Glucksberg acute graft-versus-host disease classification, Hatzimichael E, Tuthill M; Hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cells Cloning*. 2010;3:105-117. Objavljeno 26. kolovoza 2010. doi:10.2147/SCCAA.S6815. Objavljeno od Dove Medical Press Ltd, Dovepress Journal: *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*. Copyright © 2010 Hatzimichael and Tuthill

Stadij GVHD-a	Stupanj uključenosti organa
I	Koža + do ++
II	Koža + do +++ Crijeva i/ili jetra + Blagi pad u kliničkom stanju
III	Koža + do +++ Crijeva i/ili jetra + Blagi pad u kliničkom stanju
IV	Crijeva i/ili jetra ++ do ++++ Ekstreman pad u kliničkom stanju

Tablica 2. Određivanje sveukupnog stadija aGVHD-a po Glucksbergu (39). Nakon određivanja stadija za svaki organski sustav, ukupni stadij GVHD-a određuje se prema slici. Nove preinake ove klasifikacije isključuju procjenu kliničkog stanja (engl. clinical performance) (40). Izvor: The overall Glucksberg grading system for acute GvHD, Hatzimichael E, Tuthill M; Hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cells Cloning*. 2010;3:105-117. Objavljeno 26. kolovoza 2010. doi:10.2147/SCCAA.S6815. Objavljeno od Dove Medical Press Ltd, Dovepress Journal: Stem Cells and Cloning: Advances and Applications. Copyright © 2010 Hatzimichael and Tuthill

Neuspješno postizanje imunološke tolerancije presatka dugoročno drži se razlogom pojave cGVHD-a (32). Razvoj aGVHD-a nakon transplantacije smatra se glavnim rizičnim čimbenikom za razvoj kasnije kronične bolesti (33). Trenutno se smatra kako su timus i koštana srž ključni organi uključeni u razvoj cGVHD-a (29). Naime, drži se kako aloreaktivni limfociti T oštećuju epitelne stanice timusa, zbog čega dolazi do smanjenog otpuštanja regulatornih T-limfocita i otpuštanja autoreaktivnih limfocita (29). Nadalje, oštećenja u mikrookolišu u koštanoj srži dovode do remećenja homeostaze limfocita B (29) te je i njihova uključenost jedna od odlika cGVHD-a. cGVHD-om može biti zahvaćena koža, probavni sustav, jetra, ali i oči, oralna sluznica, pluća, genitalije te zglobovi i fascije (32). Kronični GVHD se klinički procjenjuje kao blagi, umjereni i teški (32), ovisno o zahvaćenim organima i težini kliničke slike (32).

Postoji nekoliko načina kojima se nastoji izbjeći GVHD u pojedinaca što primaju alogenu transplantaciju matičnih stanica, a one se temelje uglavnom na inhibiciji aktivacije T-limfocita (33). Današnji zlatni standard profilakse GVHD-a ovisi o režimu kondicioniranja koji prethodi samoj transplantaciji (27). Nakon mijeloablativnog kondicioniranja primjenjuje se kombinacija kalcineurinskog inhibitora (CNI) te kratkoročnog metotreksata (MTX). Kalcineurinski inhibitori imaju djelovanje na kalcineurin, citoplazmatsku fosfatazu koja je potrebna za aktivaciju transkripcijskog faktora specifičnog za T-stanice (41). Ciklosporin (CSA) peptidni je antibiotik i kalcineurinski inhibitor koji blokira diferencijaciju i aktivaciju T-limfocita te ga čini standardnom profilaksom na području Europe. Takrolimus, također inhibitor kalcineurina, makrolidni je antibiotik koji čini standard u profilaksi u SAD-u (27). MTX s druge strane, je antimetabolit, analog folne kiseline koji onemogućuje pravilnu sintezu DNA (42). Nakon kondicioniranja smanjenog intenziteta (RIC), primjenjuje se CSA sa ili bez mikofenolat-mofetila (MMF) (27). MMF derivat je mikofenolne kiseline koji najvjerojatnije inhibiranjem sinteze purina inhibira aktivnost T-limfocita i B-limfocita (41).

Drugi pristupi profilaksi GVHD-a spominju i metodu uklanjanja (delecije) darivateljevih T-limfocita ex vivo prije transplantacije (16,28). Međutim, Luznik et al predstavljaju problematiku u odstranjivanju aloreaktivnih T-limfocita na sljedeći način: ukoliko se iz presatka uklone limfociti, presađak zataji, ukoliko se na imunosuprimiranom pacijentu primijeni presađak odstranjenih limfocita, spora obnova imunološkog sustava dovodi do visoke smrtnosti uslijed infekcija i organske toksičnosti (16). Ukoliko se pak T-limfociti darivatelja ne uklone, komplikacije GVHD-a su previsoke i preopasne za primatelja (16). Nasuprot ovome, moguća je in vivo delecija T-limfocita (28,33). Na ovome se temelji i djelovanje poliklonskog protutijela, već spomenutog ATG-a, kao profilakse GVHD-a.

Još jedan mogući način izbjegavanja gore navedenog problema jest i selektivno uklanjanje aloreaktivnih T-limfocita in vivo (28,33) što čini osnovu pretpostavljenog mehanizma djelovanja poslijetransplantacijskog ciklofosfamida kao profilakse GVHD-a (16).

1.5 Poslijetransplantacijski ciklofosfamid (PTCy)

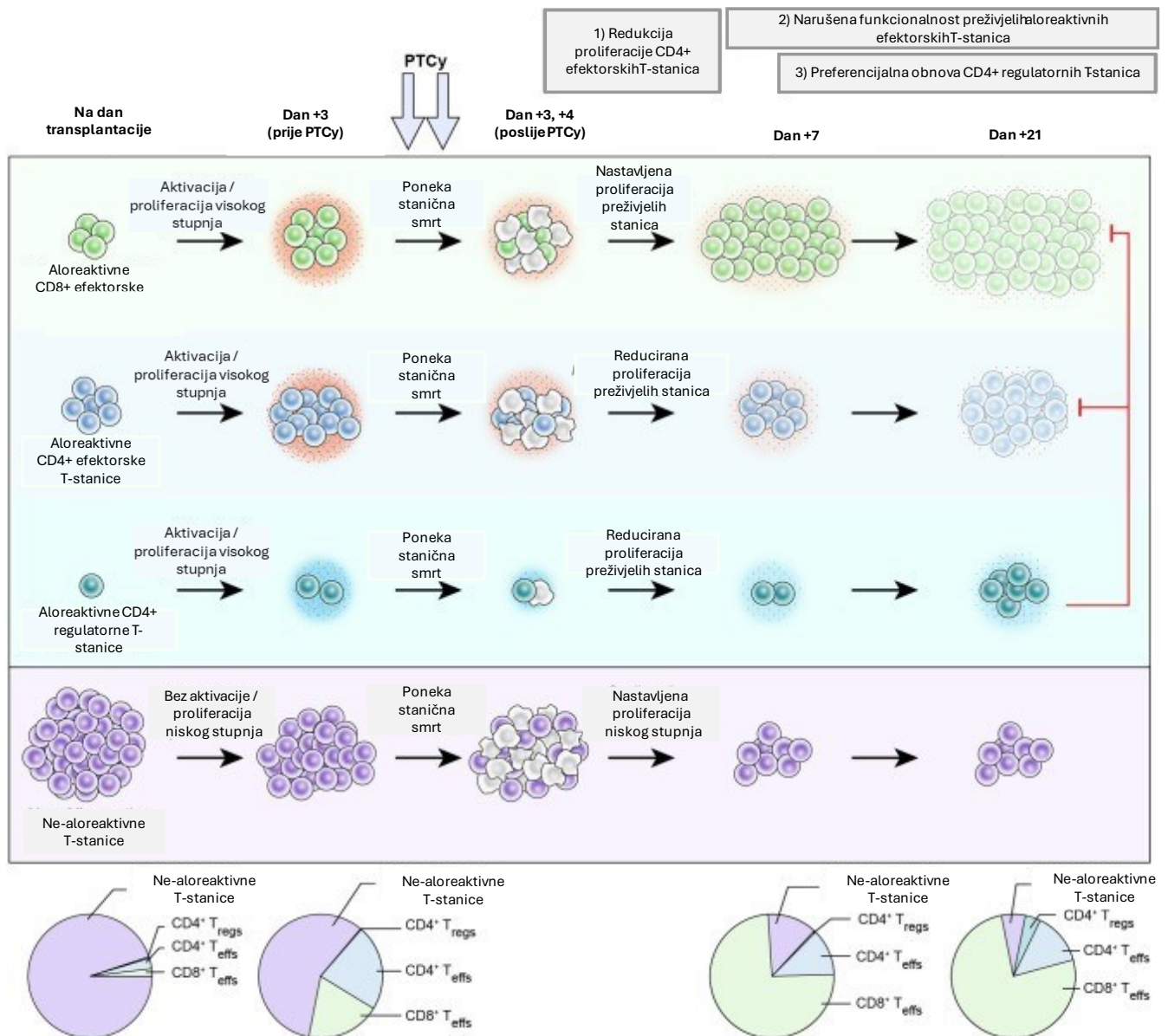
Ciklofosfamid (Cy) je citotoksični alkilirajući agens, lijek koji se primjenjuje u kemoterapiji u liječenju raka (41,42). Alkilirajući agensi su citotoksični lijekovi koji dovode do vezanja alkilnih skupina najčešće za baze DNA, a mogu stvarati unakrsne veze, te dovesti do pogrešaka u kodiranju ili lomova lanaca molekule DNA (42). Stanice u replikaciji, odnosno u kasnoj G1 i S fazi, najosjetljivije su na djelovanje alkilirajućih lijekova, pa tako i ciklofosfamida kao jednog od najprimjenjivijih alkilirajućih agensa uopće (42). Uz navedno, bitno je naglasiti kako je primjena ciklofosfamida povezana i sa specifičnim nuspojavama poput hemoragijskog cistitisa i rijetke, ali opasne kardiotoksičnosti (27).

Luznik et al pokazali su kako poslijetransplantacijska primjena ciklofosfamida omogućava induciranje tolerancije u HLA-haploidentičnoj transplantaciji koštane srži te potvrdili time novu metodu premoštenja HLA-barijere (43). Pri tome je učinak ciklofosfamida ograničen vremenom proteklom od transplantacije (44). Prvo istraživanje povezano s primjenom ciklofosfamida u kontekstu alogene transplantacije (kože), provedeno 1963. od strane Berenbauma i Browna, još je tad pokazalo kako intraperitonealno davan ciklofosfamid ima različit učinak na duljinu održavanja MHC-nepodudarnog kožnog presatka, ovisno o tome u kojem se trenutku prije, odnosno u kojem se trenutku poslije transplantacije primjenjuje. Naime, presadak kože je najdulje opstao u skupini miševa kojima je ciklofosfamid davan u periodu od 0. do 4. dana (44). Kroz ostale radove ustalila se primjena PTCy na dane +3 i +4 (16,45–47). U KBC-u Zagreb se PTCy u trenutku pisanja ovog diplomskog rada primjenjivao na dane +3 i +5.

U radu Luznika et al, objavljenom 2010. i 2012. godine, opisana je pretpostavljena imunološka pozadina selektivnog djelovanja poslijetransplantacijskog ciklofosfamida na aloreaktivne T-limfocite, odnosno ciklofosfamidom inducirane tolerancije, a temelji se na spoznajama dobivenim u mišjim modelima (16,45,48). Razvoj ciklofosfamidom inducirane tolerancije može se podijeliti na fazu indukcije, tranzicijsku fazu te fazu održavanja tolerancije (16,45,48). Kao što je raspravljeno, prilikom transplantacije dolazi do aktivacije i proliferacije određenog broja T-limfocita, koji ovisi o razini nepodudarnosti alogene transplantacije. Kako su stanice u replikaciji najosjetljivije na djelovanje ciklofosfamida, tako aktivirani T-limfociti predstavljaju glavnu zahvaćenu skupinu (16). Ovakvo, selektivno djelovanje PTCy na proliferirajuće aloreaktivne T-limfocite smatrao se dominantnim mehanizmom djelovanja PTCy (16,45,49). Druga, tranzicijska

faza, određena je omjerom preostalih aloreaktivnih limfocita, čiji broj pak ovisi o razini nepodudarnosti, i preostalih regulatornih populacija limfocita (16). Donorske ne-aloreaktivne T-stanice mogu obnašati nastradalu imunološku funkciju te štititi organizam od infekcija (16). U slučaju prisutne preostale aloreaktivnosti, u ovoj fazi moguća je aktivnost darivatelja protiv primatelja kao i primatelja protiv darivatelja, a ovakav odgovor može se kontrolirati ostalim imunosupresivnim lijekovima (16). Treća faza, faza održavanja, povezana je s razvojem dugoročne tolerancije presatka i primatelja u timusu (16). Prelaskom donorskih dendritičnih stanica u timus, pozitivnom i negativnom selekcijom, razvijaju se tolerantni limfociti-T te se razvija stabilni kimerizam, bez potrebe za imunosupresivnim lijekovima (16).

Mehanizam pretpostavljenog selektivnog djelovanja PTCy i dalje se istražuje, a nove spoznaje naglašavaju ulogu regulatornih T-limfocita (49–51). Primjerice Kanakry et al je u istraživanju pokazao kako deplecija regulatornih limfocita smanjuje zaštitni učinak PTCy u ksenogeničnom modelu. Također, u istom istraživanju je dokazano kako posljedično davanju PTCy u ljudi dolazi do smanjenja broja naivnih, potencijalno aloreaktivnih T-limfocita, dok se regulatorne T-stanice ubrzano obnavljaju (49). Istraživanje je povezalo povišenu ekspresiju aldehid dehidrogenaze u regulatornim limfocitima s rezistencijom na ciklofosfamid (49). S druge strane, istraživanje Wachsmuth et al pokazalo je kako timus nije potreban za djelovanje PTCy te da ciklofosfamid ne dovodi direktno do eliminacije aloreaktivnih T-limfocita, već do funkcionalnih oštećenja aloreaktivnih stanica i supresivnih mehanizama koji dovode do sprječavanja razvoja GVHD-a (52). Nadalje, ovakve promjene potiču ubranu obnovu upravo regulatornih T-limfocita. (52). Ovim istraživanjem je potvrđeno kako suprotno prvotnom mišljenju, učinak poslijetransplantacijskog ciklofosfamida ne polazi od eliminacije aloreaktivnih T-limfocita (52,53).



Slika 3. Predloženi novi radni model djelovanja poslijetransplantacijskog ciklofosfamida nakon alogene transplantacije hematopoetskih stanica. Slika prikazuje redukciju aloreaktivnih efektorskih CD4+ T-limfocita, funkcionalna oštećenja aloreaktivnih efektorskih T-limfocita te preferencijalnu obnovu CD4+ regulatornih T-limfocita. Prikazano je supresivno djelovanje regulatornih T-limfocita na CD4+ i CD8+ efektorske T-limfocite. Slabo proliferirajući ne-aloreaktivni T-limfociti također bivaju pogođeni djelovanjem PTCy. Promjene u aktivnosti stanica su prikazane ovisno o vremenu proteklom od transplantacije (54). Izvor: Proposed new working model of the mechanisms by which post-transplantation cyclophosphamide prevents graft-versus-

host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. Nunes NS, Kanakry CG, Mechanisms of Graft-versus-Host Disease Prevention by Post-transplantation Cyclophosphamide: An Evolving Understanding. *Front. Immunol.* Objavljeno 29. studenog 2019. doi: 10.3389/fimmu.2019.02668 Copyright © 2019 Nunes and Kanakry. Objavljeno u *Front. Immunol.* pod CC atribucijskom licencom (CC BY).

Prva klinička istraživanja poslijetransplantacijskog ciklofosfamida temeljila su se na njegovoj primjeni u haploidentičnoj transplantaciji hematopoetskih matičnih stanica (43,55). PTCy se predstavio kao uspješna, jeftina i jednostavna metoda profilakse GVHD-a (16) te razvio haploidentičnu transplantaciju uz PTCy kao uspješnu alternativnu metodu (46) u slučaju nemogućnosti pronalaska podudarnog darivatelja (Tablica 1). PTCy se primjenjivao uz MMF i TAC nakon nemijeloablativnog (43,55–58) ili nakon mijeloablativnog kondicioniranja (59). Također, uporaba PTCy u kombinaciji s ATG-om, prikazala se kao superiornija metoda u profilaksi GVHD-a u haploidentičnoj transplantaciji nad profilaksom samo s ATG-om (60). U istraživanju Wang et al, u skupini pacijenata koji su primili i ATG i PTCy, kumulativna incidencija aGVHD-a bila je znatno niža u odnosu na skupinu koja je primila isključivo ATG (60). Nadalje, u retrospektivnoj studiji Saliba et al učinak poslijetransplantacijskog ciklofosfamida je uspoređen između haploidentične i alogene transplantacije, gdje se također pokazao superiornijim u smislu profilakse GVHD-a (61). Praćeni su pacijenti između 2013.-2017., a primili su alogenu transplantaciju matičnih stanica. Pri tome su uspoređivani pacijenti koji su primili haploidentičan presadak uz PTCy, takrolimus (TAC) sa ili bez mikofenolat-mofetila (MMF) te pacijenti koji su primili 8/8 HLA-podudarni nesrodni presadak uz takrolimus, sa ili bez mikofenolat-mofetila te sa ili bez metotreksata. Istraživanje je pokazalo znatno manju prevalenciju aGVHD-a donjeg probavnog trakta stadija 3-4 (28% i 39%) te cGVHD-a probavnog trakta (21% te 31%) u skupini pacijenata koji su primili PTCy te haploidentičan presadak(61). U ovom smislu, PTCy je davao prednost haploidentičnoj transplantaciji nad alogeničnom transplantacijom čak unatoč prisutnih razlika u HLA.

Slijedeći uspješnost primjene ciklofosfamida u haploidentičnoj transplantaciji, istraživanja o PTCy počela su se provoditi i u kontekstu primjene u nesrodnoj podudarnoj (MUD) i nesrodnoj nepodudarnoj (MMUD) alogenoj transplantacije hematopoetskih matičnih stanica (46). Nakon mijeloablativnog kondicioniranja i primjene PTCy kao monoterapije u radu Luznika et al te radu

Kankary et al, prikazane niske vrijednosti incidencije cGVHD-a kod pacijenata što primaju PTCy (62,63). Međutim, PTCy se nije prikazao kao primjenjiv kao monoterapija nakon RIC ili u slučaju prikupljanja matičnih stanica iz periferne krvi (46). U tom smislu se ne primjenjuje kao monoterapija, već u kombinaciji s inhibitorom kalcineurina (CSA ili TAC) ili inhibitorima mTOR (46). Bolanos-Meade et al su u sklopu Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network (BMT CTN) objavili fazu 3 kliničkog ispitivanja u kojoj su istraživani 7/8 nesrodno nepodudarno i 8/8 nesrodno podudarno presađeni pacijenti nakon kondicioniranja smanjenog intenziteta (RIC). Nasumično su odabrani pojedinci u omjeru 1:1 koji su primili PTCy, dok su ostali kao profilaksu protiv GVHD-a primili takrolimus i metotreksat. Istraživanje je pokazalo učestalije preživljenje bez GVHD-a i bez relapsa te manje slučajeva teškog GVHD-a u skupini koja je primala PTCy. u usporedbi sa skupinom koja je primila konvencionalnu profilaksu (64). I ovim istraživanjem potvrđeno je djelovanje PTCy u profilaksi GVHD-a nakon RIC. Naposljetku, u studiji Nagler et al, objavljenoj u travnju 2024., uspoređena je učinkovitost PTCy i ATG-a kao profilakse GVHD-a. Pacijenti su se liječili od AML-a, primali hematopoetske matične stanice prikupljene iz periferne krvi, te primali ili podudaran presadak od brata ili sestre, podudaran nesrodan ili nepodudaran nesrodan presadak (9/10). Uspoređivane su dvije skupine, PTCy/TAC ili CSA/MMF skupina te ATG/TAC ili CSA/MTX skupina. Rezultati su pokazali kako nije bilo velike razlike između aGVHD-a, cGVHD-a te kako se radi o alternativnim metodama profilakse GVHD-a (65).

Uzevši sve navedeno u obzir, PTCy omogućuje efektivnu profilaksu GVHD-a, premošćući HLA-barijeru u gotovo svakom vidu haploidentične i alogenične transplantacije hematopoetskih matičnih stanica, a osim toga je kompetitivan ATG-u. Ovaj diplomski rad se temelji na istraživanju učinkovitosti ciklofosfamida u profilaksi GVHD-a u transplantacijama od nesrodnih nepodudarnih darivatelja (9/10) u KBC-u Zagreb, uspoređujući ga sa skupinom pacijenata koji su primili transplantaciju od nesrodnog nepodudarnog darivatelja s konvencionalnom profilaksom GVHD-a te skupinom pacijenata koji su primili transplantaciju od nesrodnog podudarnog darivatelja (10/10).

II. HIPOTEZA

Incidencija bolesti darivatelja protiv primatelja kod pacijenata koji su primali PTCy kao profilaksu niža je nego u pacijenata koji su primali ostalo profilaktičko liječenje, neovisno o razini podudarnosti. Kod pacijenata liječenih s PTCy niža je stopa i akutnog i kroničnog GVHD-a, što odgovara podacima u ostalim objavljenim radovima.

III. CILJEVI RADA

Glavni cilj rada bio je istražiti učinkovitost PTCy kao profilakse GVHD-a u alogenim transplantacijama od nesrodnog nepodudarnog darivatelja, odnosno smanjuje li PTCy incidenciju GVHD-a u odnosu na ostalo profilaktičko liječenje.

U tu svrhu potrebno je;

- 1) pregledati postojeću literaturu
- 2) definirati alogenu transplantaciju, HLA razlike, GVHD i PTCy
- 3) pregledati radove vezane uz primjenu PTCy
- 4) prikupiti podatke o pacijentima transplantiranim u KBC-u Zagreb
- 5) odrediti pacijente koji su primili PTCy

Na temelju cilja 5) podijeliti pacijente ovisno o tome jesu li primili PTCy ili ne. Zatim za svaku skupinu zasebno;

- 1) odrediti podatke vezane uz transplantaciju; indikaciju, HLA-podudarnost (9/10 ili 10/10), kondicioniranje, prisutnost aGVHD-a, vrijeme do pojave simptoma, prisutnost cGVHD-a, posljednje praćenje te smrt
- 2) grafički i tablično prikazati dobivene podatke
- 3) izračunati kumulativnu incidenciju GVHD
- 4) usporediti skupine međusobno, uzevši u obzir razlike u HLA-podudarnosti
- 5) usporediti s pregledanom literaturom
- 6) objasniti podatke u kontekstu prikupljenih spoznaja

IV. ISPITANICI I METODE

Retrospektivno smo obradili podatke odraslih pacijenata koji su primili alogenu transplantaciju hematopoetskih matičnih stanica radi liječenja hematoloških bolesti između siječnja 2020. i lipnja 2023. na Zavodu za hematologiju, Klinike za internu medicinu, Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Kišpatićeva 12 Zagreb.

Ispitanici su primili matične stanice iz koštane srži ili periferne krvi. Svi pacijenti su podvrgnuti tipizaciji HLA-A/B/C/DRB1/DQB1 te su primili presadak od nesrodnog podudarnog darivatelja (10/10) ili nesrodnog nepodudarnog darivatelja (9/10). Pacijenti su pripremani na transplantaciju različitim režimima kondicioniranja. Pri mijeloablativnom kondicioniranju (MAC) primjenjivan je jedan od sljedećih protokola: busulfan i ciklofosfamid (BuCy), zračenje i ciklofosfamid (TBI-Cy), tiotepa, busulfan i fludarabin (TBF, T2B2F), busulfan i fludarabin zajedno s ATG-om (FluBu4ATG, BuFluATG) te fludarabin i zračenje (FluTBI). Pri nemijeloablativnom kondicioniranju (NMA) primjenjivani su: fludarabin, ciklofosfamid i ATG (FluCyATG) te sa zračenjem (FluCyATGTBI). Prilikom kondicioniranja smanjenog intenziteta primjenjivani su: fludarabin, busulfan i ATG (FluBuATG, FluBu2ATG, FluBu3ATG), reducirano TBF (rTBF), reducirano TBI, etopozid i ciklofosfamid (rTEC). Pacijenti su primali profilaksu GVHD-a u vidu ciklosporina (CSA) i mikofenolat-mofetila (MMF) sa ili bez metotreksata (MTX). Skupina pacijenata je uz CSA i MMF za profilaksu GVHD-a primala i poslijetransplantacijski ciklofosfamid (PTCy), primijenjen na dane +3 i +5.

O pacijentima su prikupljeni osnovni demografski podaci (dob i spol). Određivani su podaci vezani uz samu transplantaciju hematopoetskih matičnih stanica; indikacija za transplantaciju, podudarnost darivatelja i primatelja (10/10, 9/10), izvor matičnih stanica (koštana srž ili periferna krv), intenzitet i režim kondicioniranja, GVHD profilaksa (PTCy ili nePTCy). Na temelju podudarnosti pacijenti su svrstani u pripadajuće skupine. Prisutnost GVHD-a je određivana na temelju pojave kliničkih simptoma.

Stadij aGVHD-a je određivan prema kriterijima navedenim u pregledu literature (prema Glucksbergu) (39). Izračunata je incidencija svih stadija aGVHD-a za svaku skupinu zasebno te potom broj aGVHD-a stadija II-IV. Potom je računata kumulativna incidencija aGVHD-a do 6 mjeseci nakon transplantacije. Kumulativna incidencija je izračunata kao omjer osoba koje su

razvile aGVHD do 6 mjeseci (182 dana) te osoba u riziku za razvoj bolesti. Nadalje, izračunat je medijan vremena proteklog od transplantacije do pojave aGVHD-a.

Za razvoj kroničnog GVHD-a izračunata je incidencija u svakoj skupini te medijan do razvoja cGVHD-a, gdje su se uzimali pojedinci koji su simptome razvili do godinu dana nakon transplantacije. Izračunata je kumulativna incidencija cGVHD-a u godinu dana od transplantacije. Time su u izračunu isključene osobe koje su cGVHD razvile nakon godinu dana.

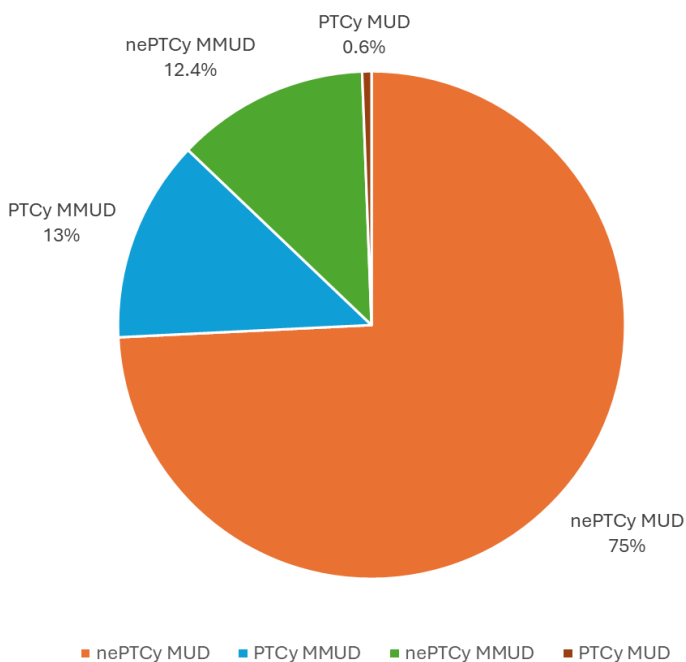
Pri tome, osobe koje su razvile bilo akutni, bilo kronični GVHD nakon DLI nisu uzete u izračun.

Naposljetku, određen je broj preminulih nakon 100 dana i godinu dana od transplantacije.

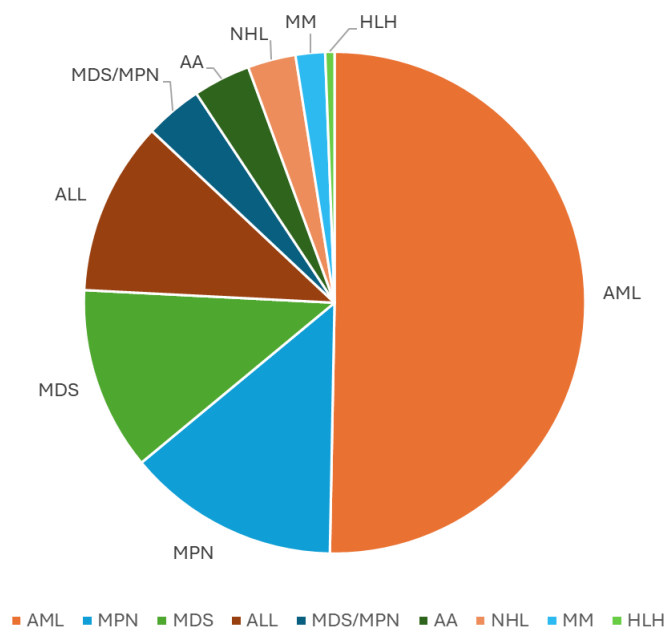
V. REZULTATI

Prikupljeni su podaci od sveukupno 161 pacijenta koji su primili alogenu transplantaciju. Opće osobine pacijenata prikazane su u tablici 1. 120 osoba primilo je matične stanice od nesrodnog podudarnog darivatelja (MUD), a 41 osoba od nesrodnog nepodudarnog darivatelja (MMUD). Medijan dobi u trenutku transplantacije iznosi 51 godinu, gdje je najmlađa transplantirana osoba imala 18 godina, a najstarija transplantirana osoba 70 godina. Transplantirano je 77 žena (47,8%) te 84 muškaraca (52,2%). Indikacije za transplantaciju su činile različite hematološke bolesti, gdje je najučestalija bila AML (n=74, 45,96%, sekundarna AML=3), druga najučestalija bolest bio je MDS (n=21, 13,04%), a nakon njega ALL (n=20, 12,42%). Pri tome se u 44 osobe provodilo mijeloablativno kondicioniranje (27,33%), u 95 osoba kondicioniranje smanjenog intenziteta (59%), a u 22 osobe nemijeloablativno kondicioniranje (13,66%). Sveukupno je 116 osoba primilo prijetransplantacijski ATG u sklopu kondicioniranja. 41 osoba primila je presadak od 9/10 podudarnog donora (MMUD) (25,47%), a 120 osoba od 10/10 podudarnog donora (MUD) (74,53%). Pri tome je izvor matičnih stanica u 146 pacijenata bila periferna krv (90,68%), a u 15 pacijenata koštana srž (9,32%).

HLA-podudarnost i GVHD profilaksa



Indikacije za alogenu transplantaciju u KBC Zagreb



Slika 4. Osnovna obilježja alogene transplantacije provedene u KBC-u Zagreb između siječnja 2020. te lipnja 2023. Prvi graf prikazuje raspodjelu MUD i MMUD alogenih transplantacija, uzimajući u obzir je li primijenjen PTCy kao profilaksa GVHD-a. Jedna osoba koja je primila matične stanice od MUD, primila je i PTCy. Drugi graf prikazuje raspodjelu bolesti čije je liječenje indiciralo aloHSCT. PTCy, poslijetransplantacijski ciklofosamid; MUD, engl. matched-unrelated donor, nesrodni podudarni darivatelj; MMUD, engl. mismatched unrelated donor, nesrodni nepodudarni darivatelj; AML, akutna mijeloična leukemija, ovdje uključena i sekundarna AM; MPN, mijeloproliferativna neoplazma; MDS, mijelodisplastični sindrom; ALL, akutna limfocitna leukemija; MDS/MPN, prijelazni oblik, ovdje uključena kronična mijelomonocitna leukemija; AA, aplastična anemija; NHL, ne-Hodgkinov limfom; MM, multipli mijelom, ovdje uključena i plazmablastična leukemija; HLH, hemofagocitna limfohistiocitoza.

Od 161 analizirane osobe, 22 (13,67%) su primile PTCy u svrhu profilakse GVHD-a. Jedna osoba je primila PTCy nakon transplantacije matičnih stanica od 10/10 nesrodnog podudarnog darivatelja, a ostalih 21 je primilo PTCy nakon transplantacije matičnih stanica od 9/10 nesrodnog nepodudarnog darivatelja. Osoba koja je primila PTCy nakon 10/10 nesrodnog nepodudarnog darivatelja nije razvila aGVHD ni cGVHD te će se nadalje pod PTCy skupinom razmatrati 21 pacijent koji je transplantiran od MMUD te primio PTCy. Nadalje, skupina pacijenata koja nije primila PTCy, a primila je presadak od MMUD smatrat će se nePTCy MMUD skupinom. Naposljetku, skupina pacijenata koja nije primila PTCy, a primila je presadak od MUD smatrat će se nePTCy MUD skupinom.

PTCy skupina

U PTCy skupini, medijan godina iznosio je 52 godine, pri čemu je najmlađe presađena osoba imala 24, a najstarija 68 godina. Među pacijentima nalazilo se 8 muškaraca te 13 žena. Darivatelj i primatelj su bili iste krvne grupe u 3 slučaja, a u 18 nisu bili iste krvne grupe. Najčešće transplantirane bolesti bile su AML, ALL, MPN i MDS. 16 osoba primilo je matične stanice iz periferne krvi, a 5 pacijenata iz koštane srži. 5 osoba kondicionirano je s MAC, 12 s RIC, a 4 NMA intenzitetom. Od 21 osobe koje su primile PTCy te presadak od MMUD, 17 osoba je primilo u kondicioniranju i ATG. Naposljetku, aGVHD se razvio u 4 osobe, od čega su 3 osobe razvile II-IV aGVHD. Medijan do aGVHD-a iznosio je 31 dan. cGVHD se razvio u 4 osobe, a medijan dana do razvoja cGVHD-a iznosio je 235,5 dana.

nePTCy MMUD skupina

U nePTCy MMUD skupini nalazi se sveukupno 20 osoba. Medijan godina u trenutku transplantacije iznosio je 55,5 godina (41-68) te je obrađeno 7 muškaraca i 13 žena. Darivatelj i primatelj bili su iste krvne grupe u 6 pojedinaca, a različite u 14 pojedinaca. U ovoj skupini je najviše pacijenata bolovalo od AML, MDS i MPN. Izvor matičnih stanica za sve transplantirane u ovoj skupini bila je periferna krv. 3 osobe su kondicionirane s MAC, 16 s RIC, a jedna osoba s NMA kondicioniranjem. U ovoj skupini 16 osoba je primilo i ATG. aGVHD se u ovoj skupini razvio u 8 pojedinaca, od toga je 5 osoba razvilo II-IV aGVHD. Medijan dana do aGVHD iznosio je 41,5 dana. cGVHD se razvio u 4 osobe, a medijan dana je iznosio 267,5 dana.

nePTCy MUD skupina

U ovoj skupini obrađivano je 119 pacijenata. Medijan godina iznosio je 49 godina (18-70) te je bilo 69 muškaraca te 50 žena. U 23 slučaja darivatelj i primatelj imali su iste krve grupe. Najčešće bolesti od kojih su bolovali pacijenti bile su AML, MPN, ALL te su transplantirani pacijenti koji su bolovali od aplastične anemije (AA) ili multiplog mijeloma (MM). Izvor matičnih stanica u ovoj skupini u 105 slučajeva bila je periferna krv, a u 14 slučajeva koštana srž. Mijeloablativno kondicioniranje provedeno je u 36 pacijenata, RIC u 66 pacijenata te NMA kondicioniranje u 17 pacijenata. U ovoj skupini 82 osobe su primile ATG. Akutni GVHD se u ovoj skupini razvio u 41 pacijentu, od čega se u 25 slučajeva radilo od stadiju II ili više (II-IV aGVHD). Medijan dana do aGVHD-a iznosio je 48 dana. cGVHD se razvio u 21 osobi, a medijan je iznosio 225 dana. Isključeni su pacijenti koji su aGVHD ili cGVHD razvili nakon primjene DLI; 3 osobe su nakon DLI razvile aGVHD, a 4 osobe cGVHD. Kumulativna incidencija cGVHD-a se računala do godinu dana poslije transplantacije, međutim nekoliko pacijenata je razvilo cGVHD nakon godinu dana (n=3) te jedan nakon 90 dana.

Usporedbu osobina skupine PTCy i nePTCy skupina nalaze se u tablici 4.

Usporedba karakteristika GVHD-a u PTCy i nePTCy skupinama nalazi se u tablici 5.

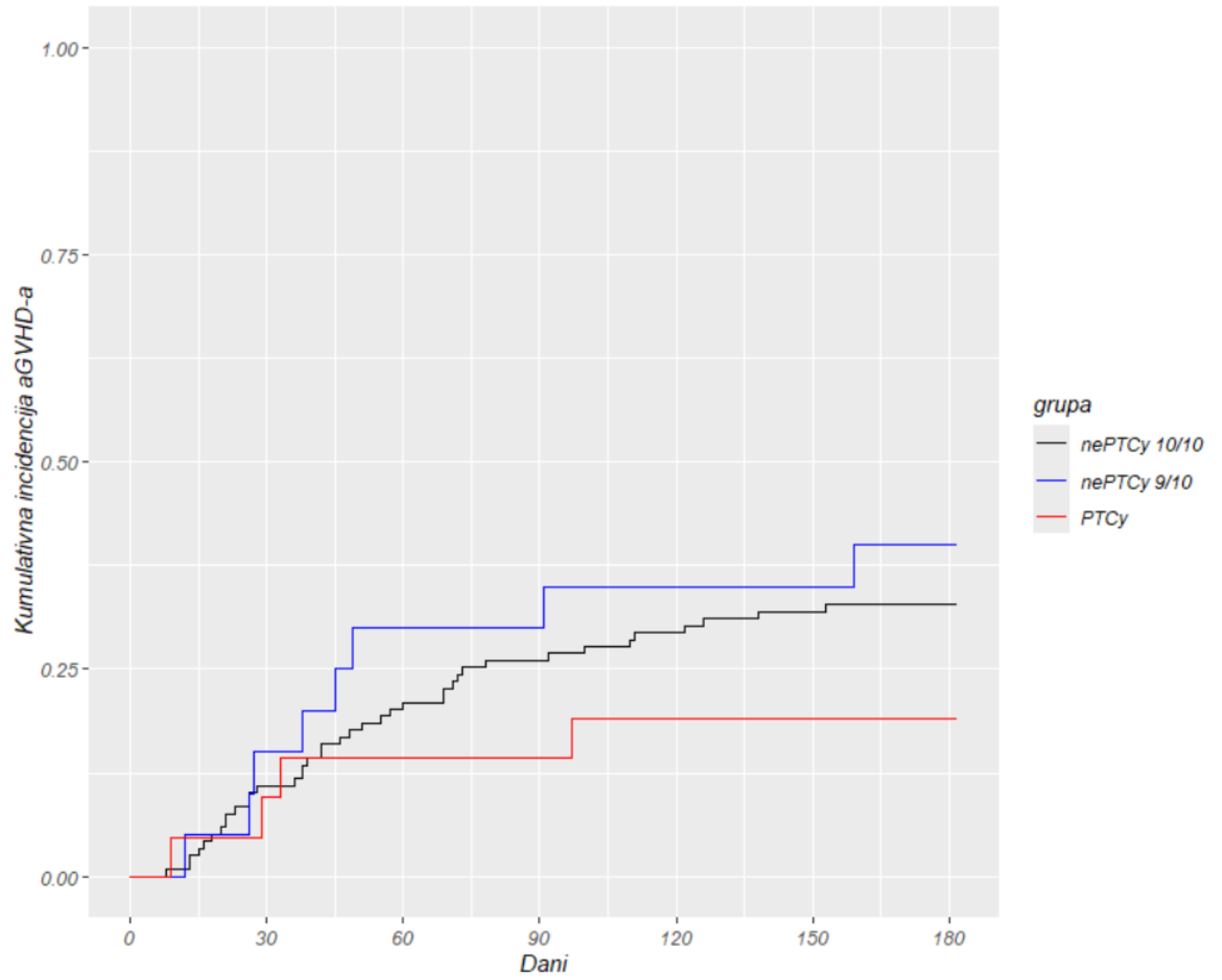
Tablica 4. Usporedba osobina PTCy i nePTCy skupina

	PTCy (n=21)	nePTCy MMUD (n=20)	nePTCy MUD (n=119)
Medijan godina:	52 (24-68)	55,5 (41-68)	49 (18-70)
Spol:			
Muško	38%	35%	58%
Žensko	62%	65%	42%
Bolest indikacija:			
AML (i sek. AML)	52%	75%	46%
MDS	10%	10%	12%
MPN	14%	5%	15%
ALL	14%	-	13%
Ostalo:	NHL 5%, HLH 5%	MDS/MPN 10%	AA 5%, MM 3%, MDS/MPN 3%, NHL 3%
Izvor matičnih stanica:			
PBSC	76%	100%	88%
BM	24%	-	12%
Kondicioniranje:			
MAC	24%	15%	30%
RIC	57%	80%	55%
NMA	19%	5%	14%
+ATG	81%	80%	69%

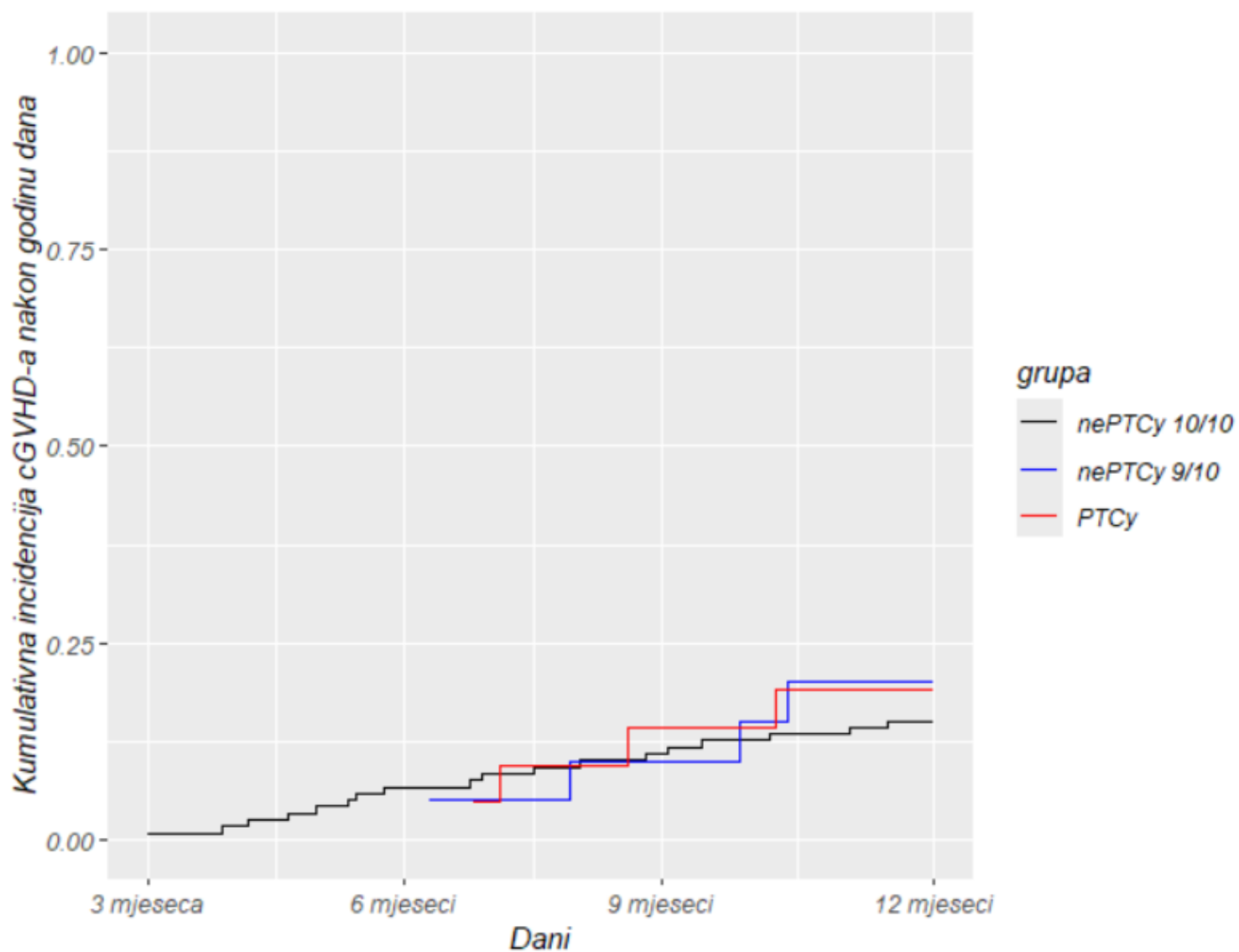
Tablica 5. Usporedba parametara GVHD-a te broja smrti PTCy i nePTCy skupina.

	PTCy (n=21)	nePTCy MMUD (n=20)	nePTCy MUD (n=119)
aGVHD (n)	4 (19%)	8 (40%)	41 (34,5%)
stadij aGVHD:			
I	1	3	16
II	2	1	11
III	1	3	9
IV	0	1	5
aGVHD II-IV:	3 (14,3%)	5 (25%)	25 (21%)
kumulativna incidencija aGVHD-a nakon 100 dana nakon transplantacije:	19%	35%	27,7%
kumulativna incidencija aGVHD-a nakon 6 mjeseci nakon transplantacije:	19%	40%	32,8%
medijan do aGVHD (dani):	31	41,5	48
cGVHD (n):	4 (19%)	4 (20%)	21 (17,65%)
kumulativna incidencija cGVHD-a nakon 1 godine:	19%	20%	15,1%
medijan do cGVHD:	235,5	267,5	225
Broj smrti nakon 100 dana (n):	1 (4,7%)	1 (5%)	6 (5%)
Broj smrti nakon 365 dana (n):	5 (23,8%)	7 (35%)	38 (31,9%)

A)



B)



Slika 5. Razlike o GVHD-u ovisno o primijenjenoj profilaksi. **A)** Kumulativna incidencija aGVHD-a nakon 6 mjeseci. **B)** Kumulativna incidencija cGVHD-a nakon godinu dana.

VI. RASPRAVA

Osnovne karakteristike

Među trima određenim skupinama primjećuje se razlika u broju pacijenata. Dok PTCy i nePTCy 9/10 skupina imaju usporediv broj pacijenata, nePTCy 10/10 skupina ima gotovo 5 puta veći broj pacijenata. Ovakva razlika u veličini samih skupina uvjetuje različitu statističku točnost te je ona točnija u većoj skupini (skupina nePTCy 10/10). S druge strane PTCy skupina i nePTCy 9/10 skupina se izdvajaju kao približno slične skupine po broju pacijenata te se također radi o skupinama pacijenata koji su primili matične stanice jednake podudarnosti.

Nadalje, iz osnovnih karakteristika pacijenata vidljivo je kako se u nePTCy 9/10 skupini nalaze nešto stariji pacijenti, nego u ostale dvije skupine (41-68 godina). Starost može utjecati na slabije kliničko stanje te veći broj komorbiditeta u odnosu na mlađe pacijente što se može odraziti u ishodima transplantacije.

AML bila je najčešća indikacija u sve tri skupine. U nePTCy 9/10 skupini druga najčešća indikacija bio je MDS. S druge strane i u PTCy skupini i u većoj nePTCy 10/10 skupini MDS je bio treća, odnosno četvrta najčešća indikacija, što nije u skladu s najčešćim indikacijama prijavljenim u većini Europe (10). U ovim skupinama su druge najčešće indikacije bile mijeloproliferativne neoplazme, u koje se ubraja i kronična mijeloična leukemija.

Prisutne su razlike u raspodjeli režima kondicioniranja. U 9/10 nePTCy skupini prisutno je najviše pacijenata koji su primili RIC ili NMA. Režimi manjeg intenziteta; RIC i NMA kondicioniranje, povezani su s manjom toksičnošću i manjim TRM-om u usporedbi s ostalim režimima kondicioniranja te ovo može utjecati na ishod transplantacije. S druge strane, PTCy i nePTCy 10/10 skupina imaju sličnu raspodjelu režima kondicioniranja, među kojima se ističe veći postotak pacijenata koji su primili mijeloablativno kondicioniranje u odnosu na 9/10 nePTCy skupinu.

Bitno je za naglasiti kako nePTCy 9/10 skupina i PTCy skupina imaju gotovo jednak omjer u primjeni ATG-a (80% i 81%) koji se koristi kao profilaksa GVHD-a. Zbog toga se može isključiti njegov utjecaj na razliku u karakteristikama GVHD-a.

Usporedba karakteristika GVHD-a

Akutni GVHD

U PTCy skupini vidljiv je najmanji broj pacijenata koji su razvili aGVHD ($n=4$) što se odražava i u kumulativnoj incidenciji aGVHD-a do 6 mjeseci nakon transplantacije (19%). Kao što je očekivano, incidencija aGVHD-a bila je manja nego u nePTCy 9/10 skupini (19% i 40%). Relativni rizik je tako iznosio 0,476, ali je prema Fisherovom egzaktnom testu $p=0,181$. Iznenadjuće, incidencija aGVHD-a bila je niža i u usporedbi s nePTCy 10/10 skupinom (19% i 32,8%) te je relativni rizik za razvoj aGVHD-a iznosio 0,553, međutim $p=0,209$. NePTCy 10/10 skupina imala je manju incidenciju GVHD-a u odnosu na nePTCy 9/10 skupinu, što odgovara pregledanoj literaturi te što je bilo za očekivati, makar i za ovo vrijedi $p=0,6226$. PTCy 9/10 skupina imala je također najmanji udio pacijenata koji su razvili više stadije aGVHD-a (II-IV aGVHD) te pri tome nije prikazala niti jednog pacijenta koji je razvio GVHD stadija IV.

Prema mjerama relativnog rizika PTCy pokazuje zaštitini učinak na razvoj aGVHD-a. Međutim, p-vrijednosti dobivene korištenjem Fisherovog egzaktnog testa pokazuju kako su promatrane skupine najvjerojatnije premale za postizanje statističke značajnosti.

Kronični GVHD

Udio osoba s cGVHD-om je također bio manji u PTCy 9/10 skupini, u usporedbi s nePTCy 9/10 skupinom ($RR=0,952$, $p=1,0$). Ipak, skupina nePTCy 10/10 imala je najmanji udio pacijenata koji su razvili kronični GVHD (17,65%, RR u PTCy skupini= 1,079, a $p=1,0$) te najnižu kumulativnu incidenciju do godinu dana nakon transplantacije (15,1%). Za očekivati je nešto viša kumulativna incidencija cGVHD-a do 2 godine nakon transplantacije u ovoj skupini, jer su određeni pacijenti ($n=3$) razvili cGVHD i nakon više od godinu dana nakon transplantacije.

Broj preminulih

Udio preminulih pacijenata do 100 dana nakon transplantacije u PTCy skupini bio je među sve tri skupine najniži. NePTCy 9/10 i nePTCy 10/10 skupina imale su jednak broj preminulih do 100 dana nakon transplantacije, no prisutna je razlika u udjelu preminulih do godinu dana nakon transplantacije. Udio preminulih do godinu dana nakon transplantacije i dalje je najniži u PTCy skupini, zatim u nePTCy 10/10 skupini te naposljetku u PTCy 9/10 skupini.

Ovakvi rezultati odgovaraju postavljenoj hipotezi, gdje je incidencija aGVHD-a u PTCy skupini niža nego u nePTCy 9/10 skupini. Na temelju relativnog rizika PTCy pokazuje zaštitini učinak na razvoj aGVHD-a. Međutim, korištenjem Fisherovog egzaktnog testa, $p > 0,05$ što nije dovoljno za postizanje statističke značajnosti.

VII. ZAKLJUČCI

Alogenična transplantacija hematopoetskih matičnih stanica kurativna je metoda liječenja hematoloških i nehematoloških bolesti. Zbog razlika u HLA ili mHAg u svim transplantacijama od nesrodnih podudarnih ili nesrodnih nepodudarnih darivatelja moguć je razvoj aloreaktivnosti. Bolest darivatelja protiv primatelja po život je opasna komplikacija alogenične transplantacije do koje dolazi zbog razvoja aloreakcije donorskih stanica na stanice primatelja. U svrhu profilakse GVHD-a primjenjuju se različiti lijekovi, a noviji pristup profilakse GVHD-a u alogeničnoj transplantaciji predstavlja primjena poslije transplantacijskog ciklofosfamida.

Poslijetransplantacijski ciklofosfamid u početku je istraživao samo u kontekstu haploidentične transplantacije hematopoetskih stanica, no u međuvremenu je njegova primjena prošla i u alogeničnu transplantaciju hematopoetskih stanica.

U Kliničkom bolničkom centru Zagreb prikupljeni su podaci od 161 alogenično transplantirane osobe od kojih je 120 osoba primilo transplantat od podudarnog nesrodnog darivatelja, a 41 od nepodudarnog nesrodnog darivatelja. Od 41 osobe koje su primile matične stanice od nepodudarnog nesrodnog darivatelja, 21 primila je poslijetransplantacijski ciklofosfamid. U skupini koja je primila poslijetransplantacijski ciklofosfamid bio je najmanji udio pacijenata koji su razvili aGVHD, te stupnjeve II-IV aGVHD. U ovoj skupini bio je najmanji udio pacijenata koji su preminuli 100 dana nakon transplantacije, odnosno godinu dana nakon transplantacije. Stopa cGVHD-a također je bila niža u PTCy skupini u odnosu na nePTCy MMUD skupinu. Ipak, najniži udio pacijenata koji su razvili cGVHD bio je prisutan u nePTCy 10/10 skupini.

Ovim istraživanjem dobiveni su preliminarni podaci koji upućuju na potencijalno zaštitno djelovanje PTCy u profilaksi GVHD-a, međutim potrebno je daljnje istraživanje te podrobija statistička analiza kako bi se potvrdili ovi nalazi.

VIII. ZAHVALE

Zahvaljujem svojoj mentorici i profesorici izv. prof. dr. sc. Nadiri Duraković na uključivanju u istraživački rad, na svom uloženom vremenu i savjetima. Ljubaznost i stručnost bile su mi veliki poticaj te su izradu rada učinile lijepim iskustvom.

Voljela bih zahvaliti Andriji i svim prijateljima koji uvijek poprave sve loše; hvala na prekrasnim uspomenama na studentske dane.

Veliko hvala Bobu Dylanu i Jimiju Hendrixu na pjesmi „*All Along the Watchtower*“ koju sam slušala nebrojeno puta tijekom ove godine.

Hvala bratu što sam zavoljela kemiju i medicinu, hvala tati na veselju i podršci te hvala mami naučila koliko je bitno ustrajati, neovisno o svemu što slijedi.

Hvala Vam na neupitnoj potpori.

IX. LITERATURA

1. Duarte RF, Labopin M, Bader P, Basak GW, Bonini C, Chabannon C, et al. Indications for haematopoietic stem cell transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2019. *Bone Marrow Transplant*. 2019 Oct 1;54(10):1525–52. doi:10.1038/s41409-019-0516-2
2. Felfly H, Haddad GG. Hematopoietic stem cells: potential new applications for translational medicine. *J Stem Cells*. 2014;9(3):163-197.
3. Rezvani AR, Negrin RS. Hematopoietic stem cell transplantation. U: Kaushansky K, Lichtman MA, Prchal JT, Levi M, Press OW, Burns LJ, Caligiuri M, urednici. Williams Hematology. 10th ed. New York: McGraw-Hill Education; 2021. Str. 439.-467.
4. Henig I, Zuckerman T. Hematopoietic Stem Cell Transplantation—50 Years of Evolution and Future Perspectives. *Rambam Maimonides Med J*. 2014 Oct 29;5(4):e0028.
5. Osgood EE, Riddle MC, Mathews TJ. APLASTIC ANEMIA TREATED WITH DAILY TRANSFUSIONS AND INTRAVENOUS MARROW; CASE REPORT. *Ann Intern Med* 1939;13:357–67.
6. Barnes DW, Corp MJ, Loutit JF, Neal FE. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *Br Med J*. 1956;2(4993):626-627. doi:10.1136/bmj.2.4993.626
7. Thomas ED, Lochte HL Jr, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med*. 1957;257(11):491-496. doi:10.1056/NEJM195709122571102
8. Kurnick NB, Montano A, Gerdes JC, Feder BH. Preliminary observations on the treatment of postirradiation hematopoietic depression in man by the infusion of stored autogenous bone marrow. *Ann Intern Med*. 1958;49(5):973-986.
9. Zaklada Ana Rukavina. Broj tipiziranih darivatelja u Hrvatskom registru [Internet]. Pristupljeno 1.6.2024. Preuzeto s: <https://zaklada-ana-rukavina.hr/>
10. Passweg JR, Baldomero H, Ciceri F, Corbacioglu S, de la Cámara R, Dolstra H, et al. Hematopoietic cell transplantation and cellular therapies in Europe 2021. The second year of the SARS-CoV-2 pandemic. A Report from the EBMT Activity Survey. *Bone Marrow Transplant*. 2023 Jun 1;58(6):647–58. doi:10.1038/s41409-023-01943-3
11. Tiercy JM. How to select the best available related or unrelated donor of hematopoietic stem cells? *Haematologica*. 2016;101(6):680-687. doi:10.3324/haematol.2015.141119.
12. Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JD, Fliccek P, Parham P, Marsh SG. The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue). doi:10.1093/nar/gku1161.

13. Spierings E, Fleischhaue K. Histocompatibility. U: The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies. Springer International Publishing; 2018. Str. 61–68.
14. Bodmer WF. The HLA system: structure and function. *J Clin Pathol*. 1987;40(9):948-958. doi:10.1136/jcp.40.9.948
15. Grubic Z, Maskalan M, Stingl Jankovic K, Burek Kamenaric M, Zunec R. An intermediate-sized donor registry experience: HLA barriers in matching procedures. *HLA*. 2024;103(1):e15348. doi:10.1111/tan.15348
16. Luznik L, O'Donnell P V., Fuchs EJ. Post-transplantation cyclophosphamide for tolerance induction in HLA-haploidentical bone marrow transplantation. *Semin Oncol*. 2012;39(6):683–93. doi:10.1053/j.seminoncol.2012.09.005
17. Gale RP, Horowitz MM, Ash RC, et al. Identical-twin bone marrow transplants for leukemia. *Ann Intern Med*. 1994;120(8):646-652. doi:10.7326/0003-4819-120-8-199404150-00004
18. Fefer A, Cheever MA, Thomas ED, et al. Bone marrow transplantation for refractory acute leukemia in 34 patients with identical twins. *Blood*. 1981;57(3):421-430.
19. Kolb HJ, Mittermüller J, Clemm C, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood*. 1990;76(12):2462-2465.
20. Drobyski WR, Keever CA, Roth MS, et al. Salvage immunotherapy using donor leukocyte infusions as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: efficacy and toxicity of a defined T-cell dose. *Blood*. 1993;82(8):2310-2318.
21. Dazzi F, Szydlo RM, Cross NC, et al. Durability of responses following donor lymphocyte infusions for patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000;96(8):2712-2716.
22. Martin PJ, Clift RA, Fisher LD, et al. HLA-identical marrow transplantation during accelerated-phase chronic myelogenous leukemia: analysis of survival and remission duration. *Blood*. 1988;72(6):1978-1984.
23. Nagler A, Shimoni A. Conditioning. U: The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies. Springer International Publishing; 2018. Str. 99–107.
24. Baron F, Mohty M, Blaise D, et al. Anti-thymocyte globulin as graft-versus-host disease prevention in the setting of allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: a review from the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Haematologica*. 2017;102(2):224-234. doi:10.3324/haematol.2016.148510

25. Khouri IF, Wei W, Korbling M, et al. BFR (bendamustine, fludarabine, and rituximab) allogeneic conditioning for chronic lymphocytic leukemia/lymphoma: reduced myelosuppression and GVHD. *Blood*. 2014;124(14):2306-2312. doi:10.1182/blood-2014-07-587519
26. Spierings E. Minor histocompatibility antigens: past, present, and future. *Tissue Antigens*. 2014;84(4):. doi:10.1111/tan.12445
27. Michonneau D, Socié G. GVHD prophylaxis (immunosuppression). U: *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Springer International Publishing; 2018. Str. 177–182.
28. Holler E, Greinix H, Zeiser R. Acute graft-versus-host disease. U: *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Springer International Publishing; 2018. Str. 323–330.
29. Socié G, Ritz J. Current issues in chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2014;124(3):374-384. doi:10.1182/blood-2014-01-514752
30. Justiz Vaillant AA, Modi P, Mohammadi O. Graft-Versus-Host Disease. [Updated 2024 Jun 7]. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538235/>
31. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet*. 2009;373(9674):1550-1561. doi:10.1016/S0140-6736(09)60237-3
32. Wolff D, Lawitschka A. Chronic graft-versus-host disease. U: *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Springer International Publishing; 2018. Str. 331–345.
33. Kernan NA, Collins NH, Juliano L, Cartagena T, Dupont B, O'Reilly RJ. Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-v-host disease. *Blood*. 1986;68(3):770-773.
34. Ghimire S, Weber D, Mavin E, Wang XN, Dickinson AM, Holler E. Pathophysiology of GvHD and Other HSCT-Related Major Complications. *Front Immunol*. 2017;8:79. Published 2017 Mar 20. doi:10.3389/fimmu.2017.00079
35. Hill GR, Crawford JM, Cooke KR, Brinson YS, Pan L, Ferrara JL. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood*. 1997;90(8):3204-3213.
36. Ferrara JL, Deeg HJ. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med*. 1991;324(10):667-674. doi:10.1056/NEJM199103073241005
37. Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:139-170. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141606

38. Cohen JL, Boyer O. The role of CD4+CD25hi regulatory T cells in the physiopathogeny of graft-versus-host disease. *Curr Opin Immunol*. 2006;18(5):580-585. doi:10.1016/j.coi.2006.07.007
39. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*. 1974;18(4):295-304. doi:10.1097/00007890-197410000-00001
40. Hatzimichael E, Tuthill M. Hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cells Cloning*. 2010;3:105-117. Published 2010 Aug 26. doi:10.2147/SCCAA.S6815
41. Lake DF, Briggs AD, Akporiaye ET. Immunopharmacology. U: Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ, editors. *Basic & Clinical Pharmacology*. 12th ed. New York: McGraw-Hill Education; 2012. Str. 977-1000.
42. Chu E, Sartorelli AC. Chapter 54: Cancer chemotherapy. U: Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ, editors. *Basic & Clinical Pharmacology*. 12th ed. New York: McGraw-Hill Education; 2012. Str. 949-977
43. Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14(6):641-650. doi:10.1016/j.bbmt.2008.03.005
44. Berenbaum MC, Brown IN. PROLONGATION OF HOMOGRAFT SURVIVAL IN MICE WITH SINGLE DOSES OF CYCLOPHOSPHAMIDE. *Nature*. 1963;200:84. doi:10.1038/200084a0
45. Mayumi H, Umesue M, Nomoto K. Cyclophosphamide-induced immunological tolerance: an overview. *Immunobiology*. 1996;195(2):129-139. doi:10.1016/S0171-2985(96)80033-7
46. Williams L, Cirrone F, Cole K, Abdul-Hay M, Luznik L, Al-Homsi AS. Post-transplantation Cyclophosphamide: From HLA-Haploidentical to Matched-Related and Matched-Unrelated Donor Blood and Marrow Transplantation. *Front Immunol*. 2020;11:636. Published 2020 Apr 9. doi:10.3389/fimmu.2020.00636
47. Mayumi H, Himeno K, Shin T, Nomoto K. Drug-induced tolerance to allografts in mice. IV. Mechanisms and kinetics of cyclophosphamide-induced tolerance. *Transplantation*. 1985;39(2):209-215. doi:10.1097/00007890-198502000-00019
48. Luznik L, Fuchs EJ. High-dose, post-transplantation cyclophosphamide to promote graft-host tolerance after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Immunol Res*. 2010;47(1-3):65-77. doi:10.1007/s12026-009-8139-0
49. Kanakry CG, Ganguly S, Zahurak M, et al. Aldehyde dehydrogenase expression drives human regulatory T cell resistance to posttransplantation cyclophosphamide. *Sci Transl Med*. 2013;5(211):211ra157. doi:10.1126/scitranslmed.3006960

50. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med*. 2002;196(3):389-399. doi:10.1084/jem.20020399
51. Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood*. 2002;99(10):3493-3499. doi:10.1182/blood.v99.10.3493
52. Wachsmuth LP, Patterson MT, Eckhaus MA, Venzon DJ, Gress RE, Kanakry CG. Post-transplantation cyclophosphamide prevents graft-versus-host disease by inducing alloreactive T cell dysfunction and suppression. *J Clin Invest*. 2019;129(6):2357-2373. Objavljeno 26. ožujka 2019. doi:10.1172/JCI124218
53. Radojčić V, Luznik L. Mechanism of action of posttransplantation cyclophosphamide: more than meets the eye. *J Clin Invest*. 2019;129(6):2189-2191. Published 2019 May 6. doi:10.1172/JCI128710
54. Nunes NS, Kanakry CG. Mechanisms of Graft-versus-Host Disease Prevention by Post-transplantation Cyclophosphamide: An Evolving Understanding. *Front Immunol*. 2019;10:2668. Published 2019 Nov 29. doi:10.3389/fimmu.2019.02668
55. O'Donnell PV, Luznik L, Jones RJ, et al. Nonmyeloablative bone marrow transplantation from partially HLA-mismatched related donors using posttransplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002;8(7):377-386. doi:10.1053/bbmt.2002.v8.pm12171484
56. Kasamon YL, Luznik L, Leffell MS, et al. Nonmyeloablative HLA-haploidentical bone marrow transplantation with high-dose posttransplantation cyclophosphamide: effect of HLA disparity on outcome. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(4):482-489. doi:10.1016/j.bbmt.2009.11.011
57. Munchel A, Kesserwan C, Symons HJ, et al. Nonmyeloablative, HLA-haploidentical bone marrow transplantation with high dose, post-transplantation cyclophosphamide. *Pediatr Rep*. 2011;3 Suppl 2(Suppl 2):e15. doi:10.4081/pr.2011.s2.e15
58. Bhamidipati PK, DiPersio JF, Stokerl-Goldstein K, et al. Haploidentical transplantation using G-CSF-mobilized T-cell replete PBSCs and post-transplantation CY after non-myeloablative conditioning is safe and is associated with favorable outcomes. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49(8):1124-1126. doi:10.1038/bmt.2014.108
59. Solomon SR, Sizemore CA, Sanacore M, et al. Haploidentical transplantation using T cell replete peripheral blood stem cells and myeloablative conditioning in patients with high-risk hematologic malignancies who lack conventional donors is well tolerated and produces excellent relapse-free survival: results of a prospective phase II trial. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(12):1859-1866. doi:10.1016/j.bbmt.2012.06.019
60. Wang Y, Wu DP, Liu QF, et al. Low-dose post-transplant cyclophosphamide and anti-thymocyte globulin as an effective strategy for GVHD prevention in haploidentical

patients. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):88. Published 2019 Sep 3. doi:10.1186/s13045-019-0781-y

61. Saliba RM, Alousi AM, Pidala J, et al. Characteristics of Graft-Versus-Host Disease (GvHD) After Post-Transplantation Cyclophosphamide Versus Conventional GvHD Prophylaxis. *Transplant Cell Ther*. 2022;28(10):681-693. doi:10.1016/j.jtct.2022.07.013
62. Luznik L, Bolaños-Meade J, Zahurak M, et al. High-dose cyclophosphamide as single-agent, short-course prophylaxis of graft-versus-host disease. *Blood*. 2010;115(16):3224-3230. doi:10.1182/blood-2009-11-251595
63. Kanakry CG, O'Donnell PV, Furlong T, et al. Multi-institutional study of post-transplantation cyclophosphamide as single-agent graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic bone marrow transplantation using myeloablative busulfan and fludarabine conditioning. *J Clin Oncol*. 2014;32(31):3497-3505. doi:10.1200/JCO.2013.54.0625
64. Bolaños-Meade J, Hamadani M, Wu J, et al. Post-Transplantation Cyclophosphamide-Based Graft-versus-Host Disease Prophylaxis. *N Engl J Med*. 2023;388(25):2338-2348. doi:10.1056/NEJMoa2215943
65. Nagler A, Labopin M, Swoboda R, et al. Post-transplant cyclophosphamide, calcineurin inhibitor, and mycophenolate mofetil compared to anti-thymocyte globulin, calcineurin inhibitor, and methotrexate combinations as graft-versus-host disease prophylaxis post allogeneic stem cell transplantation from sibling and unrelated donors in patients with acute myeloid leukemia: a study on behalf of the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant*. Published online April 13, 2024. doi:10.1038/s41409-024-02284-5

X. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 20.05.1999. u Zagrebu. Ovdje polazim Osnovnu školu Vrbani te kasnije upisujem V. gimnaziju. 2018. godine upisujem Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, a za ostvareni uspjeh na istoj akademskoj godini dobivam i Dekanovu nagradu za najbolju studenticu.

Kroz studij sam radila kao demonstrator na Katedri iz Anatomije te kratkotrajno na Katedri iz patofiziologije. Uključila sam se u rad studentske organizacije CroMSIC te jednu godinu bila članom Odbora za ljudska prava i mir (SCORP). Bila sam član Sekcije za neuroznanost te u sklopu iste sudjelovala u organizaciji i vođenju radionica. U znanstveni rad uključila sam se pišući prikaze slučajeva; sudjelovala sam na nekoliko kongresa, a na Zagreb International Medical Summit 2022. osvojila nagradu za najbolji prikaz slučaja; "*Kaposiform hemangioendothelioma with Kasabach-Meritt syndrome: life-threatening tumor treated with sirolimus*". 2022. i 2023. sudjelujem na EIT Health Inovacijskim danima; natjecanjima za inovacijske ideje u području medicine gdje timski oba puta osvajamo treće mjesto. Godinu poslije sudjelujem u inovacijskom natjecanju na temu razvoja umjetne inteligencije u području medicine te ovdje timski osvajamo sveukupno četvrto mjesto.

2023. u sklopu Damjanov Summer Research program polazim mjesec dana rotaciju (clinical elective) iz patologije na Sveučilištu u Kansasu (The University of Kansas School of Medicine) u Kansas Cityju, u SAD-u.

Velik interes su mi oduvijek bili i strani jezici. Osvojila sam dva puta prvo mjesto te jednom drugo mjesto na Državnom natjecanju iz njemačkog jezika, dvije nagrade „Oskar znanja“ Agencije za odgoj i obrazovanje, a pohađala sam i nastavu francuskog jezika. Govorim engleski, njemački, a osnovno i francuski.

Imam raznolike interese, a kroz studij i ljeto u Kansasu potvrđujem svoj interes za patologiju i hematologiju.