

Infuzije darivateljevih limfocita i njihov utjecaj na ishod liječenja transplantacijom

Đaković, Ana-Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:105:924267>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2023-02-02**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Ana-Marija Đaković

**Infuzije darivateljevih limfocita i njihov utjecaj
na ishod liječenja transplantacijom**

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Ana-Marija Đaković

**Infuzije darivateljevih limfocita i njihov utjecaj
na ishod liječenja transplantacijom**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za hematologiju Klinike za internu medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod vodstvom doc.dr.sc. Nadire Duraković i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2019./2020.

Mentor diplomskog rada: doc.dr.sc. Nadira Duraković

POPIS I TUMAČENJE KRATICA:

AA	aplastična anemija
ALL	akutna limfoblastična leukemija
AML	akutna mijeloična leukemija
CNS	središnji živčani sustav (prema eng. <i>central nervous system</i>)
DLI	infuzija darivateljevih limfocita (prema eng. <i>donor lymphocyte infusion</i>)
EBMA	Europsko društvo za transplantaciju koštane srži (prema eng. <i>European Blood and Bone Marrow Association</i>)
GVHD	bolest transplantata protiv primatelja (prema eng. <i>graft versus host disease</i>)
GVL	reakcija transplantata protiv leukemije (prema eng. <i>graft versus leukaemia</i>)
GVT	reakcija transplantata protiv tumora (prema eng. <i>graft versus tumor</i>)
HLA	sustav antigena tkivne snošljivosti (prema engl. <i>Human Leukocyte Antigens</i>)
FAS-L	Fas ligand
IL-2	interleukin 2
KLL	kronična limfocitna leukemija
KML	kronična mijeloična leukemija
KMS	krvotvorne matične stanice
MbH	Hodgkinova bolest (prema eng. <i>Morbus Hodgkin</i>)
MDS	mijelodisplastični sindrom
MHA	sustav slabih antigena tkivne snošljivosti (prema eng. <i>minor histocompatibility antigen</i>)
BPDCN	blastična plazmocitoidna neoplazma dendritičkih stanica (prema eng. <i>blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm</i>)
NK stanice	prirodnoubilačke stanice (prema eng. <i>natural killer cells</i>)
OMF	osteomijelofibroza
PBSC	matične stanice iz periferne krvi (prema eng. <i>peripheral blood stem cell</i>)
RCC	karcinom bubrežnih stanica (prema eng. <i>renal cell carcinoma</i>)
TGFβ	transformirajući čimbenik rasta beta (prema engl. <i>transforming growth factor beta</i>)
Treg	regulatorni T-limfociti

SADRŽAJ

SAŽETAK

SUMMARY

1. UVOD	1
1.1. Mehanizam djelovanja.....	1
1.2. Primjena.....	2
1.3. Nuspojave DLI terapije	3
1.4. Novi pristupi u DLI terapiji.....	5
1.4.1. Deplecija CD8+ limfocita	5
1.4.2. Ex vivo aktivacija.....	5
1.4.3. Kombinacija DLI-a s ciljanom terapijom.....	5
1.4.4. Kombinacija DLI-a i IL-2.....	5
1.4.5. DLI s Treg deplecijom	5
1.5. Zaključak.....	6
2. HIPOTEZA	7
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	8
4. ISPITANICI I METODE	9
4.1. Ispitanici.....	9
4.2. Metode.....	11
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA	12
5.1. Srodstvo darivatelja i primatelja te izvor transplantata	12
5.2. Indikacije za primjenu DLI-a	12
5.3. Karakteristike DLI-a.....	13
5.4. Razlozi prestanka DLI terapije.....	15
5.5. Razvoj GVHD-a.....	15
5.6. Ishodi liječenja primjenom DLI-a.....	16
5.7. Preživljenje.....	18
6. RASPRAVA	21

7. ZAKLJUČAK	25
8. ZAHVALE	27
9. LITERATURA	28
10. ŽIVOTOPIS	33

SAŽETAK

Infuzije darivateljevih limfocita i njihov utjecaj na ishod liječenja transplantacijom

Ana-Marija Đaković

UVOD: Infuzija darivateljevih limfocita (DLI od eng. *donor lymphocyte infusion*) primjenjuje se u liječenju pacijenata kod kojih je došlo do relapsa hematološke bolesti nakon alogenične transplantacije krvotvornih matičnih stanica. Također, primjenjuje se i u svrhu profilakse kod pacijenata s visokorizičnom bolesti. Najznačajnija nuspojava takvog načina liječenja je razvoj GVHD-a, koji se javlja u oko 70% slučajeva. Prema dosadašnjim iskustvima DLI postiže najbolje rezultate u liječenju kronične mijeloične leukemije (KML) dok su rezultati u liječenju drugih hematoloških malignoma dosta ograničeni.

METODE: Retrospektivno su analizirani podaci 40 pacijenata koji su se u razdoblju od 2016. do 2018. godine u Klinici za hematologiju KBC-a Zagreb liječili pripravcima darivateljevih limfocita. Kao izvor podataka korišten je Bolnički informacijski sustav (BIS) KBC-a Zagreb. Prikupljeni su podaci o spolu i dobi pacijenata, osnovnoj dijagnozi, datumu i karakteristikama alogenične transplantacije KMS-a, indikaciji za primjenu DLI-a, značajkama DLI-a (broj tretmana, inicijalna doza, svježina transplantata), razlozima prestanka terapije, razvoju GVHD-a te ishodu i preživljenju pacijenata.

REZULTATI: Najveći broj pacijenata uključenih u istraživanje bolovao je od ALL-a i AML-a. Ukupno preživljenje pacijenata u istraživanju bilo je 52,5%. Medijan dobi preminulih iznosio je 48 godina, a medijan vremena proteklog od inicijalnog DLI-a do smrti bio je 497 dana. Najčešći uzroci smrti bili su neuspjeh terapije (36,8%), sepsa (31,6%) i relaps bolesti (15,8%). Preživljenje u skupini pacijenata liječenih DLI-om zbog relapsa bilo je 43,5%, u skupini liječenih zbog nepotpunog kimerizma 61,5%, a u skupini u kojoj je DLI primijenjen profilaktički 75,0%. Srednja vrijednost početne doze DLI-a iznosila je $0,51 \times 10^7$ CD3+ stanica. Kao najznačajnija nuspojava, GVHD se razvilo kod 42,5% pacijenata, no nije bio uzrokom smrti niti jednog pacijenta. Nije nađena statistički značajna razlika u preživljenju pacijenata s razvijenim GVHD-om i onih kod kojih je GVHD izostao ($p > 0,05$). Preživljenje također nije značajno ovisilo o spolu pacijenata, izvoru transplantata, niti o srodstvu darivatelja i primatelja transplantata ($p > 0,05$).

ZAKLJUČAK: Posttransplantacijski primijenjen DLI učinkovito je oruđe u terapiji i profilaksi relapsa hematološke bolesti. Postupak je praćen visokim rizikom od razvoja GVHD-a, no smrtnost prouzročena GVHD-om je rijetkost. Nešto bolji terapijski uspjeh postignut je u skupinama pacijenata koji su DLI-om liječeni profilaktički i zbog prisutnosti nepotpunog kimerizma u odnosu na skupinu pacijenata kod kojih je indikacija za primjenu darivateljevih limfocita bio relaps bolesti, no ta razlika nije se pokazala statistički značajnom ($p > 0,05$).

Ključne riječi: DLI, GVHD, relaps, profilaksa, kimerizam

SUMMARY

Donor Lymphocyte Infusions and Their Effect on Transplant Treatment Outcome

Ana-Marija Đaković

INTRODUCTION: Donor lymphocyte infusion is used in the treatment of patients with haematological disease relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplants. It is also used as a prophylaxis in patients with high-risk diseases. The most significant side effect of such a treatment is the development of GVHD, which occurs in about 70% of the cases. According to previous experience, DLI achieves the best results in the treatment of chronic myeloid leukaemia (CML), while the results in the treatment of other haematological malignancies are quite limited.

METHODS: Data of 40 patients treated during the period from 2016 to 2018 in the Clinic for Hematology of the University Hospital Center Zagreb were analyzed retrospectively. The Hospital Information System of the University Hospital Center Zagreb was used as the data source. The collected data included the gender and age of patients, their diagnoses, characteristics of allogeneic bone marrow transplants, indications for DLI use, DLI features (number of doses, initial dose, the freshness of graft), reasons for discontinuation of therapy, development of the GVHD, patient outcomes and survival.

RESULTS: The most common diagnoses among the patients in this study were AML and ALL. Overall survival was 52.5%. The age median of the deceased was 48 years, and the median time from initial DLI to death was 497 days. The most common causes of death were treatment failure (36.8%), sepsis (31.6%) and disease relapse (15.8%). The survival rate of patients treated for relapse was 43.5%, of those treated for incomplete chimerism 61.5%, and of patients treated with prophylaxis 75.0%. The median initial dose of DLI was 0.51×10^7 CD3 + cells. As the most significant side effect, GVHD developed in 42.5% of patients, but it was not the cause of death for any of them. There was no statistically significant difference in the survival of patients with developed GVHD and those in whom GVHD was absent ($p > 0.05$). Also, survival did not depend on the gender of the patient, the source transplant or the relationship between the donor and recipient transplants ($p > 0.05$).

CONCLUSION: Posttransplantation applied DLI is a useful tool in the therapy and prophylaxis of relapse of haematological diseases. Even though the procedure has a high risk of developing GVHD, mortality caused by this complication is relatively rare. The success of the therapy was slightly better if DLI was applied prophylactically and due to incomplete chimerism, compared to the application in the treatment of relapse. However, this difference in success was not statistically significant ($p > 0.05$).

Key words: DLI, GVHD, relapse, prophylaxis, chimerism

1. UVOD

Infuzija darivateljevih limfocita (DLI) jedan je od učinkovitih načina liječenja bolesnika kod kojih je došlo do relapsa hematološke bolesti nakon alogenične transplantacije krvotvornih matičnih stanica (KMS). (1) Iako je hematologija u zadnjih nekoliko desetaka godina iznimno napredovala, a primjena alogenične transplantacije matičnih stanica postala rutinska, i dalje relaps bolesti nakon transplantacije predstavlja izazov i glavni je krivac za neuspjeh alogenične transplantacije u liječenju hematoloških bolesnika. Primjena DLI-a u navedenom slučaju može rezultirati potpunom remisijom bolesti i izlječenjem pacijenta. (2)

Kolb i suradnici su prvi puta uspješno primijenili DLI 1988. godine u liječenju triju pacijenata kod kojih je došlo do hematološkog relapsa bolesti nakon alogenične transplantacije KMS-a provedene u sklopu liječenja kronične mijeloične leukemije (KML). (3) Od tada pa do danas se primjena, sigurnosti i učinkovitost DLI-a konstantno istražuju, a algoritmi i načini primjene se unaprjeđuju.

1.1. Mehanizam djelovanja

Infuzije alogeničnih limfocita primjenjuju se s ciljem pojačanja učinka transplantata protiv leukemije (GVL od eng. *graft versus leukaemia*). (2) Darivateljevi imunokompetentni limfociti sposobni su prepoznati strane antigene na površini stanica leukemije te se infuzijom tih limfocita pokreće snažna imunološka reakcija u tijelu primatelja koja je usmjerena protiv maligno promijenjenih stanica. Na taj način se stječe imunološka kontrola nad malignom bolešću.

Smatra se da najznačajniju ulogu u GVL učinku igraju T-limfociti, uključujući oba podtipa T-stanica, ubilačke CD8+ limfocite i pomagačke CD4+ limfocite. (2) Naime, na značaj T-limfocita u GVL reakciji ukazala je studija Horowitz i suradnika čiji su rezultati pokazali da je rizik od relapsa bolesti značajno viši u skupini onih bolesnika, liječenih zbog KML-a, kojima je izvršena transplantacija koštane srži s prethodno učinjenom deplecijom T-limfocita u odnosu na bolesnike koji su primili transplantat koji je sadržavao T-stanice darivatelja. (4) Smatra se da kod transplantacije od HLA-nepodudaranih i haploidentičnih darivatelja GVL učinku, osim navedenih T-limfocita, posreduju i NK stanice. (5)

Potencijalne mete djelovanja darivateljevih limfocita mogu biti antigeni čija ekspresija nije vezana isključivo uz malignu preobrazbu stanica te se nalaze i na stanicama normalnih tkiva hematopoetskog i drugih organskih sustava. Primjer su antigeni HA-1 i HA-2 iz sustava slabih antigena tkivne snošljivosti (MHA od eng. *minor histocompatibility antigen*) koji su eksprimirani

isključivo na stanicama hematopoetskog sustava te su se u istraživanjima pokazali kao ciljna mjesta djelovanja darivateljevih citotoksičnih T-limfocita. (6) S druge strane, mete djelovanja darivateljevih limfocita mogu biti i antigeni koji su izraženi isključivo u maligno promijenjenim stanicama ili je u malignim stanicama njihova ekspresija izmijenjena u odnosu na zdravo tkivo. Neki od tih pretjerano eksprimiranih antigena na malignim stanicama koji su se također pokazali kao potencijalne mete djelovanja darivateljevih limfocita su WT-1 antigen, proteinaza 3, survivin i CYPB1. (7)

Poznato je da tijekom kroničnih infekcija i malignoma može doći do „iscrpljenosti T-stanica“. (8) Taj izraz podrazumijeva disfunkciju T-stanica koja nastaje kao odgovor na dugotrajnu antigensku izloženost, a očituje se poremećajem efektorske funkcije i regulacije T-limfocita, a time i lošom imunološkom kontrolom nad infekcijom, odnosno tumorom. (9) Otkriveno je da DLI može preokrenuti opisani proces kod bolesnika s malignim hematološkim bolestima i na taj način potencirati imunološku reakciju usmjerenu protiv malignih stanica. (10)

1.2. Primjena

DLI se primjenjuje nakon alogenične transplantacije matičnih stanica profilaktički i terapijski. Profilaktički se primjenjuje kod pacijenata s visokim rizikom za relaps bolesti, kod prisutnosti minimalne rezidualne bolesti nakon transplantacije i u slučaju nepotpunog darivateljevog kimerizma. (2) Kod pacijenata kod kojih je došlo do posttransplantacijskog relapsa maligne bolesti DLI se primjenjuje terapijski. (2) Rezultati multicentrične studije Wanga i suradnika pokazali su da pacijenti kod kojih je posttransplantacijski primijenjen DLI imaju značajno niži rizik od relapsa (46%) i veće trogodišnje preživljenje u odnosu na one kod kojih je primjena DLI-a izostavljena (66%). (11) Studija Rujkijyanonta i suradnika govori o uspješnosti primjene darivateljevih limfocita u tretmanu nepotpunog kimerizma prisutnog nakon transplantacije KMS-a u pedijatrijskoj populaciji. (12) U navedenoj studiji veliki broj pacijenata, njih 86,8%, odgovorio je na primjenu DLI-a, dok je kod 79,8% pacijenata koji su odgovorili na terapiju uspostavljen stopostotni darivateljev kimerizam. (12) Preživljenje pacijenata u opisanoj studiji je bilo značajno bolje u skupini onih kod kojih je uspostavljen stopostotni darivateljev kimerizam u odnosu na skupinu u kojoj taj učinak primjenom DLI-a nije postignut. (12) Dosadašnja klinička iskustva i istraživanja sugeriraju da je uspješnost primjene DLI-a, u vidu ukupnog petogodišnjeg preživljenja, veća kod profilaktičke primjene u odnosu na terapijsku te da profilaktički DLI može značajno doprinijeti postizanju dugotrajne remisije nakon alogenične transplantacije matičnih stanica. (13,14)

Uspjeh terapije darivateljevim limfocitima značajno ovisi o vrsti hematološke bolesti od koje pacijent boluje. Dosadašnja klinička iskustva s primjenom darivateljevih limfocita pokazala su

da takav terapijski protokol postiže najbolje rezultate u liječenju pacijenata oboljelih od KML-a, kod kojih se primjenom DLI-a uspostava kompletne hematološke i citogenetičke remisije postiže u oko 70-80% slučajeva. (15) Prema jednom sistematskom pregledu, koji je obuhvatio ukupno 39 kliničkih studija, uspješnost DLI-a u postizanju kompletne remisije u liječenju ALL-a bila je 27%, MM-a 26%, NHL-a 52% i HL-a 37% te KML-a 55%. (16) Smatra se da je jedan od faktora koji su zaslužni za slabiji odgovor pacijenata s akutnim leukemijama, u pravilu, brza progresija bolesti s velikim brojem malignih stanica, budući da GVL efektu trebaju tjedni da uspostavi kontrolu nad bolesti. (17) Osim toga, u malignim stanicama leukemije zabilježene su promjene u ekspresiji površinskih antigena koje im omogućuju da se zamaskiraju i izbjegnu imunološki odgovor. (18) Postoje i brojni drugi mehanizmi, koji mogu dovesti do neuspjeha DLI terapije i nemogućnosti uspostave imunološke kontrole nad bolešću. Neki od tih mehanizama su invazija leukemijskih stanica u imunološki privilegirana područja (CNS, testisi), produkcija inhibitornih citokina (IL-10, TGF β), abnormalna ekspresija FAS i FAS-L na stanicama leukemije, poremećena sekrecija i rezistencija na proupalne citokine. (19)

DLI je našao primjenu i izvan okvira hematologije te se ispituje njegova uspješnost u terapiji tumora solidnih organa. Za sada liječnici imaju najviše iskustva s primjenom DLI-a kod pacijenata s metastatskim karcinomom bubrežnih stanica (RCC prema eng. *renal cell carcinoma*) i dojke. (20) Jedna od prvih studija koja je ukazala na potencijal reakcije transplantata protiv tumora (GVT prema eng. *graft versus tumor*) u terapiji malignoma solidnih organa je ona Childsa i suradnika iz 2000. godine. (21) Navedena studija obuhvatila je 19 pacijenata s refraktornim RCC-om, kojima je nakon nemijeloablativne kemoterapije i alogenične transplantacije KMS-a dana infuzija darivateljevih limfocita. Kod 10 pacijenata (53%) te studije došlo je do regresije metastatske bolesti, od kojih je 3 imalo potpuni, a 7 pacijenata djelomični odgovor na terapiju. (21) Iako su se dosadašnja iskustva s transplantacijom matičnih stanica i GVT efektom u bolesnika sa solidnim tumorima pokazala obećavajućima, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se ustanovile mogućnosti i ograničenja takvog modaliteta liječenja. (22)

1.3. Nuspojave DLI terapije

Najčešća nuspojava, koja ujedno kod velikog broja pacijenata ograničava daljnji nastavak liječenja DLI-om, je nastanak bolesti transplantata protiv primatelja (GVHD prema engl. *graft versus host disease*). (23) Multicentrična studija Scarisbricka i suradnika provedena u Ujedinjenom Kraljevstvu pokazala je da je nakon terapije darivateljevim limfocitima većina pacijenata, njih 71%, razvila GVHD, od kojih je 32% razvilo akutni GVHD, a 44% kronični GVHD. Usprkos velikom broju pacijenata koji su u toj studiji razvili GVHD, mortalitet kao

posljedica GVHD-a bio je nizak (6%). (24) Rezultati studije Horowitz i suradnika pokazali su da je rizik od relapsa bolesti niži kod pacijenata koji su razvili GVHD nakon primjene DLI-a u odnosu na pacijente koji nisu razvili GVHD te da navedeni učinak korelira s težinom razvijenog GVHD-a. (4) Kod pacijenata koji su razvili teži oblik GVHD-a zabilježen je manji broj relapsa u odnosu na pacijente s blažim oblikom navedene nuspojave. (4)

Studija u kojoj je istraživana povezanost između razvoja posttransplantacijskog GVHD-a i tijeka bolesti, pokazala je da je razvitak kroničnog GVHD-a nakon alogenične transplantacije KMS-a povezan s manjim rizikom od relapsa i progresije bolesti. (25) Akutni GVHD u tom istraživanju nije imao značajnu korelaciju s rizikom za relaps i progresiju bolesti, nego je štoviše, povezan s većim mortalitetom. (25)

Akutni GVHD može se javiti 1 do 4 mjeseca nakon početnog DLI-a te su reakcijom najčešće zahvaćeni koža, jetra i probavni trakt. (24) Kronični GVHD se obično razvija oko 6. mjeseca nakon početne doze DLI-a, a najčešće zahvaćeni organi su usna šupljina, jetra, oko i crijeva. (24) I kod akutnog i kod kroničnog oblika bolesti prva linija terapije i dalje je primjena topičkih i sistemnih kortikosteroida. (26)

Iako je kod većine pacijenata razvoj GVL učinka praćen razvojem GVHD-a, postoje pojedinci kod kojih primjenom DLI-a uspostavi remisija bolesti, a da pri tome ne dođe do razvoja GVHD-a. (24) To zapažanje je dalo nadu da bi se ta dva učinka DLI-a potencijalno mogla međusobno odvojiti. Kako bi se potencirao učinak GVL-a, a smanjila toksičnost GVHD-a, razvili su se novi načini primjene DLI-a. (23) Jedna od razvijenih metoda je primjena rastućih doza darivateljevih limfocita. U studiji Dazzi i suradnika u kojoj je sudjelovalo 48 pacijenata s relapsom KML-a pokazano je da se u skupni bolesnika koji su primili bolusne doze DLI-a GVHD razvio u 40 % pacijenata, dok se u skupini pacijenata koji su primali rastuće doze DLI-a kroz više mjeseci GVHD razvio u samo 10% pacijenata, s tim da su vjerojatnost postizanja citogenetičke remisije unutar 2 godine te ukupna doza transfundiranih limfocita bili jednaki u obje grupe ispitanika. (27) I druga istraživanja poduprla su teoriju da se rizik od razvoja GVHD-a može smanjiti primjenom početne doze niže od $0,2 \times 10^8$ CD3+ stanica te postupnim povećanjem doze u narednim tretmanima, a bez opasnosti da takav pristup ima negativan utjecaj na uspješnost terapije. (28)

Značajno rjeđa nuspojava DLI-a, koja se javlja u oko 20% tretiranih pacijenata, je pancitopenija. (27) Obično se javlja 1 do 5 mjeseci nakon početne infuzije limfocita. (29) Jedna od teorija koja objašnjava pancitopeniju je nesposobnost darivateljevih matičnih stanica da uspostave normalnu hematopoezu u trenutku kada darivateljevi limfociti unište preostale stanice hematološkog sustava domaćina. (27)

1.4. Novi pristupi u DLI terapiji

Osim prethodno navedene primjene manjih inicijalnih doza CD3+ stanica i nakon toga postepenog povećavanja doze, razvile su se i druge modifikacije primjene DLI terapije, a sve s ciljem povećanja učinkovitosti tretmana i smanjenjem rizika od razvoja neželjenih nuspojava, posebice GVHD-a.

1.4.1. Deplecija CD8+ limfocita

S obzirom na prethodna istraživanja čiji rezultati sugeriraju centralnu ulogu CD8+ limfocita u izazivanju GVHD-a, istražuje se učinkovitost i sigurnost DLI transfuzija u kojima je prethodno provedena deplecija CD8+ limfocita. Dosadašnja primjena navedene terapije pokazala je zadovoljavajuće rezultate uz prihvatljiv rizik od razvoja GVHD-a. (30,31)

1.4.2. Ex vivo aktivacija

Kako bi se potencirao učinak GVL reakcije pokušava se s ex vivo aktivacijom pripravka darivateljevih limfocita. Aktivacija T-limfocita postiže se kostimulacijom u kulturama s anti-CD3 i anti-CD28 protutijelima. Istraživanja primjene tako aktiviranih pripravaka DLI-a kod pacijenata sa relapsom bolesti ili kod pacijenata sa visokim rizikom od relapsa pokazala su da takav način primjene darivateljevih limfocita ne povećava rizik od razvoja teških oblika GVHD-a te da može doprinijeti liječenju bolesnika kod kojih konvencionalni DLI ne pokaže zadovoljavajuće rezultate. (32,33)

1.4.3. Kombinacija DLI-a s ciljanom terapijom

Trodnevna primjena 5-azacitidina, sintetičkog nukleozidnog analoga, koja prethodi infuziji darivateljevih limfocita pokazala se obećavajućom u tretmanu AML-a, MDS-a i KML-a. Rezultati jedne od studija u kojoj su analizirani rezultati opisanog terapijskog pristupa pokazali su da je 66% pacijenata navedene studije postiglo odgovor na takvu terapiju, s tim da je 16% pacijenata, koji prethodno nisu reagirali na standardnu DLI terapiju, postiglo kompletnu remisiju bolesti. (34)

1.4.4. Kombinacija DLI-a i IL-2

IL-2 je citokin koji potiče aktivaciju i proliferaciju T-limfocita i NK stanica te na taj način može potencirati GVL učinak posredovan tim stanicama. (35) Primjenom rekombinantnog IL-2, kod pacijenata koji nisu imali dobar odgovor na prethodnu standardnu DLI terapiju, postiglo se bolje ukupno preživljenje, a bez povećanja rizika od toksičnosti. (35)

1.4.5. DLI s Treg deplecijom

Regulatorni T-limfociti (Treg) imaju centralnu ulogu u regulaciji imunološkog odgovora na aloantigene. Dokazano je da svojim modulatornim utjecajem na aloreaktivnost mogu suprimirati intenzitet GVL i GVH reakcija. (36) Na temelju tih spoznaja se razvio modificirani

DLI tretman u kojem je pretransplantacijski provedena deplecija regulatornih T-limfocita. Terapija darivateljevim limfocitima u kojima je provedeno osiromašenje Treg limfocita pokazala se efikasnim i sigurnim pristupom kod pacijenata koji nisu pokazali zadovoljavajući odgovor na standardnu terapiju. (37) Kod pacijenata s bolešću koja je rezistentna na ovakav modalitet liječenja može se pokušati s deplecijom Treg stanica samog primatelja pomoću kemoterapije te nakon toga primjenom DLI-a s također provedenom Treg deplecijom. (37)

1.5. Zaključak

Iz svega dosad navedenog može se izvesti zaključak da su DLI i njegove modifikacije, usprkos riziku od toksičnosti i razvoja teških oblika GVHD-a, i danas jedan od osnovnih oblika adoptivne imunoterapije u liječenju hematoloških malignoma nakon alogenične transplantacije KMS-a. Nažalost, do danas nije pronađeno rješenje koje bi dovelo do značajnijeg poboljšanja učinkovitosti DLI terapije u liječenju akutnih leukemija te je DLI u tom području i dalje vrlo ograničenih mogućnosti. Ali budući da su istraživanja u području hematologije i molekularne biologije intenzivna te da se svakodnevno otkrivaju novi mehanizmi koji stoje u podlozi razvoja karcinoma i hematoloških malignoma, za očekivati je da će se u doglednoj budućnosti razviti novi terapijski protokoli i pametni lijekovi, koji će omogućiti veću učinkovitost i bolje rezultate u borbi protiv malignih bolesti.

2. HIPOTEZA

Infuzija darivateljevih limfocita učinkovit je i siguran terapijski pristup koji se primjenjuje nakon alogenične transplantacije krvotvornih matičnih stanica profilaktički, s ciljem postizanja kompletne remisije i smanjenja rizika od relapsa kod visokorizičnih oblika bolesti, ali i terapijski za liječenje relapsa bolesti ukoliko do njega dođe.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Primarni cilj ovog istraživanja bio je analizirati ishode posttransplantacijskog liječenja infuzijom darivateljevih limfocita u pacijenata liječenih u Zavodu za hematologiju pri Klinici za internu medicinu KBC-a Zagreb u tri susljedne godine, od 2016. do 2018. godine.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ispitanici

U ovom istraživanju retrospektivno su analizirani podaci o pacijentima koji su liječeni u Klinici za hematologiju KBC-a Zagreb, te su u razdoblju od 1.1.2016. do 31.12.2018. primili jednu ili više doza darivateljevih limfocita. U tom razdoblju je ukupno 40 pacijenta liječeno infuzijama darivateljevih limfocita i svi su pacijenti uključeni u istraživanje. U ispitivanju su sudjelovala 22 muškaraca i 18 žena, dobnog raspona između 5 i 65 godina. Od toga je bilo 5 djece, odnosno ispitanika mlađih od 18 godina. Najviše ispitanika imalo je postavljene dijagnoze akutne mijeloične leukemije, njih 18 (45,0%), i akutne limfoblastične leukemije, njih 9 (22,5%). Od Hodgkinove bolesti bolovala su ukupno 4 pacijenta (10,0%), od osteomijelofibroze 3 pacijenta (7,5%), kronične mijeloične leukemije 2 pacijenta (5,0%) te od aplastične anemije, kronične limfocitne leukemije, mijelodisplastičnog sindroma i blastične plazmocitoidne neoplazme dendritičkih stanica po 1 osoba (2,5%). Demografske i kliničke podatke o ispitanicima te podatke o karakteristikama primjene DLI-a pokazuje Tablica 1.

Tablica 1. Demografska i klinička obilježja ispitanika te razlozi i značajke primjene DLI-a kod pacijenata u ovom istraživanju

Ispitanici	n	%
Medijan dobi, godine (raspon)	47 (5-65)	
Muškarci	22	55,0
Žene	18	45,0
Dijagnoze		
AA	1	2,5
ALL	9	22,5
AML	18	45,0
BPDCN	1	2,5
KLL	1	2,5
KML	2	5,0
MbH	4	10,0
MDS	1	2,5
OMF	3	7,5
Razlog primjene DLI-a		
Nepotpuni kimerizam/gubitak kimerizma	13	32,5
Protokol	4	10,0
Relaps	23	57,5
Darivatelj		
Srodni	17	42,5
Nesrodni	18	45,0
Haploidentični	5	12,5
Izvor transplantata		
BM	11	27,5
PBSC	29	72,5

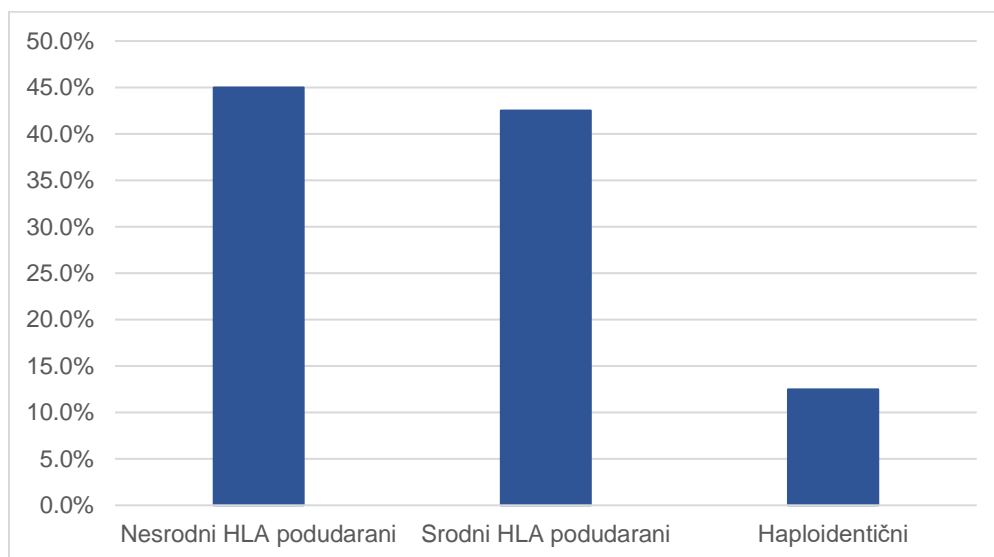
4.2. Metode

U istraživanju su korišteni podaci koji su dobiveni iz medicinske dokumentacije pohranjene u Bolničkom informacijskom sustavu (BIS-u). Na taj način prikupljeni su podaci o dobi, spolu, dijagnozi, datumu transplantacije krvotvornih matičnih stanica, izvoru transplantata, srodnosti darivatelja i primatelja transplantata, razlogu, datumu i dozi prvog DLI-a, ukupnom broju doza DLI-a, o tome jesu li infuzije limfocita bile svježije ili krioprezervirane, razlogu prestanka primjene DLI-a, uspjehu terapije, pojavi GVHD-a, preživljenju i uzroku smrti ako je do smrti došlo. Navedeni podaci retrospektivno su analizirani metodama deskriptivne statistike. Programi korišteni za obradu podataka bili su Microsoft Office Excel 2019 i IBM SPSS Statistics. Rezultati su prikazani brojčano, tablično i grafički.

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

5.1. Srodstvo darivatelja i primatelja te izvor transplantata

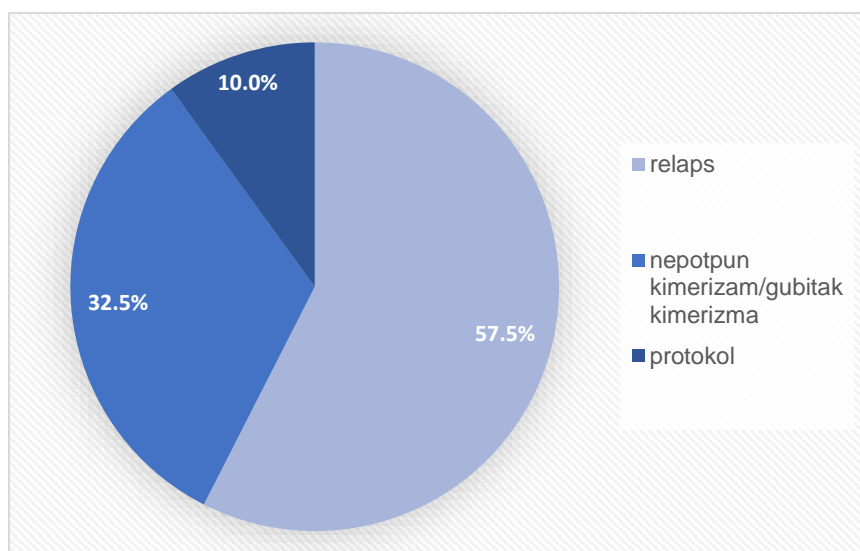
U promatranom razdoblju na Klinici za hematologiju KBC-a Zagreb infuzijom darivateljevih limfocita liječeno je ukupno 40 osoba. Kod svih ispitanika je prethodno, u sklopu liječenja hematološke bolesti, učinjena alogenična transplantacija krvotvornih matičnih stanica. Transplantacija od srodnog HLA podudaranog darivatelja primijenjena je kod 17 (42,5%) pacijenata, transplantacija od nesrodnog HLA podudaranog darivatelja kod 18 (45,0%) pacijenata, a transplantacija od HLA nepodudaranog, odnosno haploidentičnog darivatelja kod 5 (12,5%) pacijenata. Kod 29 (72,5%) pacijenata izvor transplantata bile su matične stanice iz periferne krvi (PBSC), dok je kod 11 (27,5%) pacijenata izvor bila koštana srž (BM) darivatelja.



Slika 1. Grafički prikaz srodstva između darivatelja i primatelja transplantata KMS-a

5.2. Indikacije za primjenu DLI-a

Infuzije darivateljevih limfocita primijenjene su kod većine pacijenata, njih 23 (57,5%), zbog relapsa maligne hematološke bolesti nakon transplantacije KMS-a. Kod 13 (32,5%) pacijenata razlog primjene DLI-a bila je prisutnost nepotpunog darivateljevog kimerizma, odnosno gubitak stopostotnog darivateljevog kimerizma, a kod 4 (10,0%) pacijenata DLI je primijenjen profilaktički po protokolu zbog visokorizične bolesti.



Slika 2. Grafički prikaz indikacija za primjenu DLI-a

5.3. Karakteristike DLI-a

Ukupno je u promatranom razdoblju u Klinici za hematologiju primijenjeno 114 pojedinačnih doza darivateljevih limfocita. Od ukupnog broja apliciranih doza, 53 (46,5%) doze bile su svježi pripravci darivateljevih limfocita, a ostatak, odnosno 61 (53,5%) aplicirana doza bila je prethodno krioprezervirana.

Pedeset i jedna (44,7%) doza DLI-a aplicirana je pacijentima transplantiranim od srodnog HLA podudaranog darivatelja. Jednak broj doza, 51 (44,7%), primijenjen je nakon alogenične transplantacije od nesrodnog HLA podudaranog darivatelja. Dvanaest (10,6%) doza DLI-a aplicirano je pacijentima transplantiranim od haploidentičnog darivatelja.

Osam (20,0%) pacijenata primilo je po 1 dozu darivateljevih limfocita, 11 (27,5%) pacijenata primilo je po 2 doze, 10 (20,0%) pacijenata po 3 doze, 4 (10,0%) pacijenta po 4 doze, 5 (12,5%) pacijenata po 5 doza, 1 (2,5%) pacijent 6 doza te 1 (2,5%) pacijent 7 doza darivateljevih limfocita. Medijan ukupnog broja primljenih doza DLI-a nakon srodne i nesrodne HLA podudarane transplantacije KMS-a u ovom istraživanju bio 3 doze po pacijentu. Medijan ukupnog broja doza nakon haploidentične transplantacije KMS-a iznosio je 2 doze po pacijentu.

Medijan vremena koje je proteklo od srodne HLA podudarane transplantacije KMS-a do početne infuzije darivateljevih limfocita iznosio je 177 dana, od nesrodne HLA podudarane transplantacije do prvog DLI-a iznosio je 194 dana, a medijan vremena između haploidentične transplantacije i početnog DLI-a bio je 370 dana.

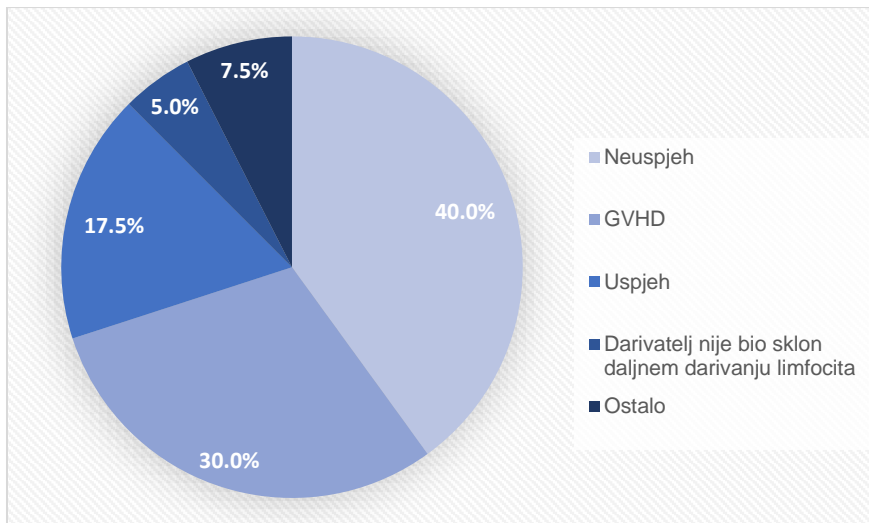
Najmanja primijenjena početna doza darivateljevih limfocita iznosila je $0,001 \times 10^7$ CD3+ stanica, dok je najveća početna doza bila 3×10^7 CD3+ stanica. Srednja vrijednost početne doze DLI-a bila je $0,51 \times 10^7$ CD3+ stanica. Značajke primijenjenih pripravaka donorskih limfocita i razlike između primijenjenog DLI-a nakon transplantacija KMS-a od srodnih, nesrodnih HLA podudaranih te haploidentičnih darivatelja pokazuje Tablica 2.

Tablica 2. Karakteristike primijenjenih infuzija darivateljevih limfocita i razlike s obzirom na vrstu alogenične transplantacije KMS-a

	Srodna HLA podudarana	Nesrodna HLA podudarana	Haploidentična	Ukupno
Ukupan broj primjenjenih doza DLI-a	51	51	12	114
Medijan ukupnog broja primljenih doza po pacijentu	3	3	2	3
Srednja vrijednost doze prvog DLI ($\times 10^7$)	0,61	0,50	0,47	0,51
Broj primjenjenih doza svježih transplantata	25	26	2	53
Broj primjenjenih doza krioprezerviranih transplantata	26	25	10	61
Broj pacijenata s razvijenim GVHD-om	8	8	1	17

5.4. Razlozi prestanka DLI terapije

Razlog obustave daljnje primjene DLI-a bio je kod većine ispitanika, njih 16 (40,0%), neuspjeh takvog modaliteta liječenja. Kod 12 (30,0%) ispitanika terapija DLI-om prekinuta je zbog pojave toksičnosti, odnosno razvoja GVHD-a. Postizanje terapijskog uspjeha bio je razlog prestanka daljnje primjene DLI-a kod 7 (17,5%) ispitanika. U 2 (5,0%) slučaja darivatelj nije bio sklon daljnjem darivanju limfocita, a kod preostala 3 ispitanika razlozi prekida terapije bili su: u jednom slučaju razvoj febriliteta netom prije planirane infuzije, u drugom razvoj infekcije koja je dovela do smrtnog ishoda ispitanika, a u trećem progresija bolesti koja je rezultirala smrtnim ishodom prije sljedećeg planiranog DLI tretmana.



Slika 3. Grafički prikaz razloga prekida daljnje primjene DLI-a

5.5. Razvoj GVHD-a

Bolest transplantata protiv primatelja, koja je ujedno i najčešća nuspojava terapije darivateljevim limfocitima, pojavila se kod značajnog broja ispitanika uključenih u ovo istraživanje. Ukupno je 17 (42,5%) ispitanika razvilo GVHD, a od toga je bilo 8 (47,1%) ispitanika ženskog spola i 9 (52,9%) ispitanika muškog spola. Kod 12 ispitanika nastavak terapije darivateljevim limfocitima bio je kontraindiciran zbog razvoja navedene komplikacije. Od 17 pacijenata transplantiranih od srodnog HLA podudaranog darivatelja ukupno je 8 (47,0%) pacijenata razvilo GVHD. U skupini od 18 pacijenata transplantiranih od nesrodnog HLA podudaranog darivatelja njih 8 (44,4%) je razvilo GVHD. Od 4 pacijenta koji su primili transplantat od haploidentičnog darivatelja samo 1 (25,0%) pacijent je razvio navedenu komplikaciju.

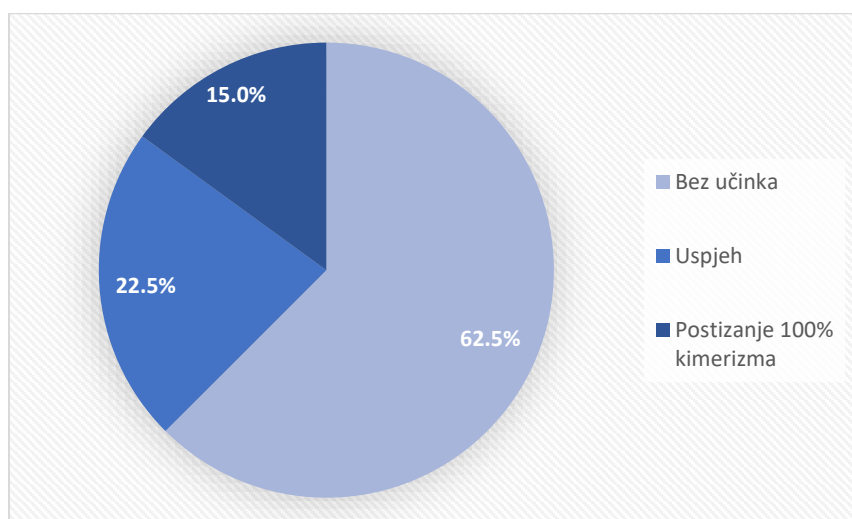
Kod pacijenata kod kojih se razvio GVHD raspon vrijednosti početnih doza DLI-a kretao se između $0,005 \times 10^7$ CD3+ stanica i 3×10^7 CD3+ stanica, a srednja vrijednosti početne doze iznosila je $0,5 \times 10^7$ CD3+ stanica.

Kod 3 (17,6%) ispitanika GVHD se razvio nakon 1 infundirane doze. Ostali ispitanici kod kojih se navedena reakcija razvila primili su više doza DLI-a i to: 4 (23,5%) ispitanika su primila po 2 doze DLI-a, 5 (29,4%) ispitanika je primilo po 3 doze, 3 (17,6%) ispitanika su primila po 4 doze, 1 (5,8%) ispitanik je primio 5 doza i 1 (5,8%) ispitanik je primio ukupno 7 doza DLI-a.

5.6. Ishodi liječenja primjenom DLI-a

Ishodi liječenja DLI-om u ovom istraživanju prikazani su kao uspjeh, postizanje stopostotnog kimerizma i bez učinka. Uspjeh DLI-a odnosi se na ispitanike kod kojih je postignuta kompletna remisija bolesti. Postizanje stopostotnog darivateljevog kimerizma odnosi se na pojedince kod kojih je uspostavljen stopostotni darivateljev kimerizam, a kod kojih je DLI primijenjen zbog ustanovljenog nepotpunog kimerizma ili gubitka prethodno uspostavljenog stopostotnog kimerizma. Ispitanici kod koji se DLI pokazao kao terapija bez učinka su oni kod kojih nije postignuta kompletna remisija bolesti, niti stopostotni kimerizam.

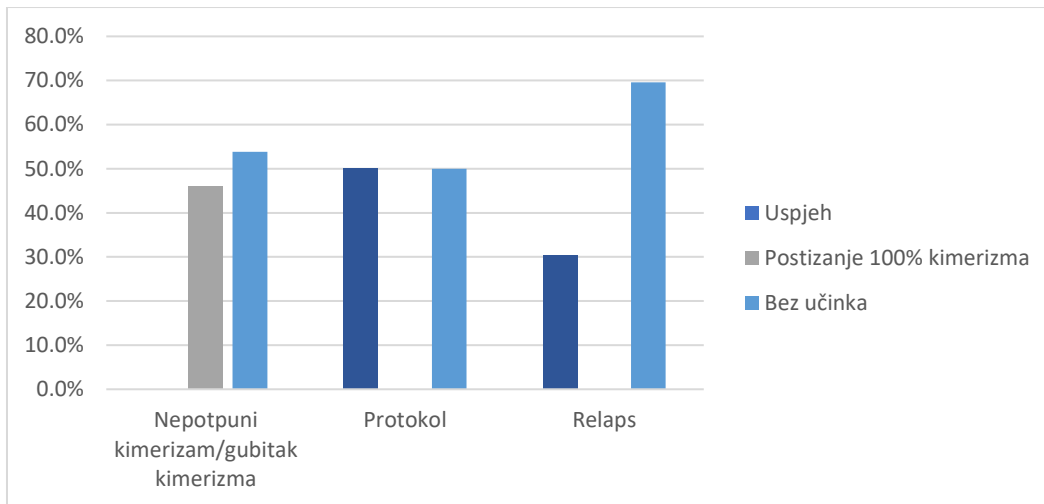
Nažalost, kod najvećeg broja ispitanika u ovom istraživanju, njih 25 (62,5%), primjenom DLI-a nije postignut željeni odgovor na terapiju. Kod 9 (22,5%) ispitanika primjenom darivateljevih limfocita postignut je uspjeh u uspostavi kompletne remisije. Stopostotni darivateljev kimerizam postignut je kod ukupno 6 (15,0%) ispitanika u ovom istraživanju.



Slika 4. Grafički prikaz ishoda liječenja DLI-om

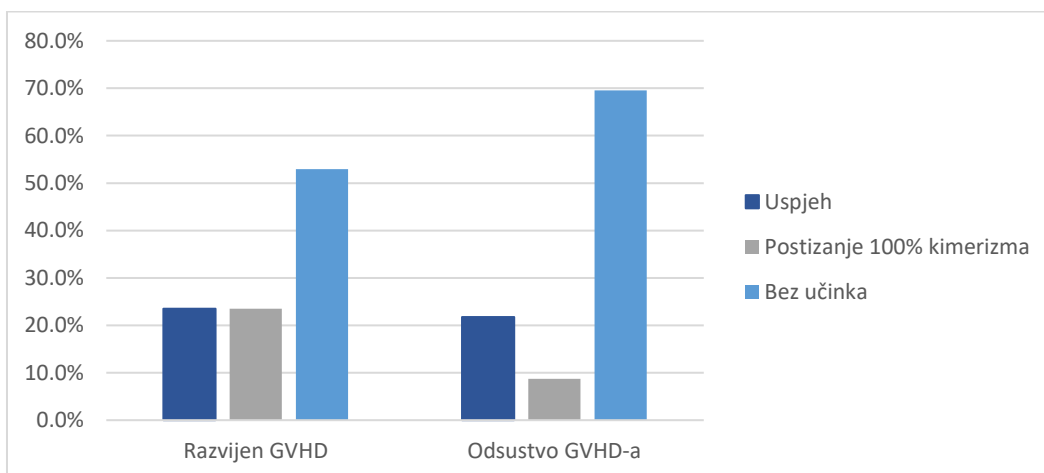
U skupini 13 pacijenata koji su primili DLI zbog nepotpunog kimerizma ili gubitka stopostotnog kimerizma, kod 6 (46,2%) pacijenata postignut je terapijski odgovor, odnosno uspostava

stopostotnog darivateljevog kimerizma, dok je kod 7 (53,8%) pacijenata odgovor bolesti na DLI izostao. U skupini 4 ispitanika kod kojih je DLI primijenjen profilaktički po protokolu, terapijski uspjeh u vidu uspostave trajne kompletne remisije postignut je kod 2 (50,0%) pacijenta, a kod preostala 2 (50,0%) pacijenta nije došlo do remisije bolesti. Od 23 pacijenta kod kojih je DLI primijenjen zbog relapsa bolesti, terapijski uspjeh postignut je kod njih 7 (30,4%), dok kod preostalih 16 (69,6%) pacijenata nije postignut željeni odgovor na terapiju.



Slika 5. Grafički prikaz ishoda kod pacijenata s različitim indikacijama za primjenu DLI-a

U skupini pacijenata s evidentiranim GVHD-om primjena DLI-a je bila uspješna kod 23,5% (4/17) pacijenata, stopostotni kimerizam postignut je kod 23,5% (4/17) pacijenata, a učinak terapije je izostao kod 53,0% (9/17) pacijenata iz te skupine. Nasuprot tome, kod pacijenata kod kojih je razvoj GVHD-a izostao, primjenom DLI-a terapijski uspjeh postignut je kod 21,8% (5/23) pacijenata. Stopostotni kimerizam uspostavljen je kod 8,7% (2/23) pacijenata u ovoj skupini, dok je kod 70,0% (16/23) pacijenata primijenjena terapija bila bez učinka.

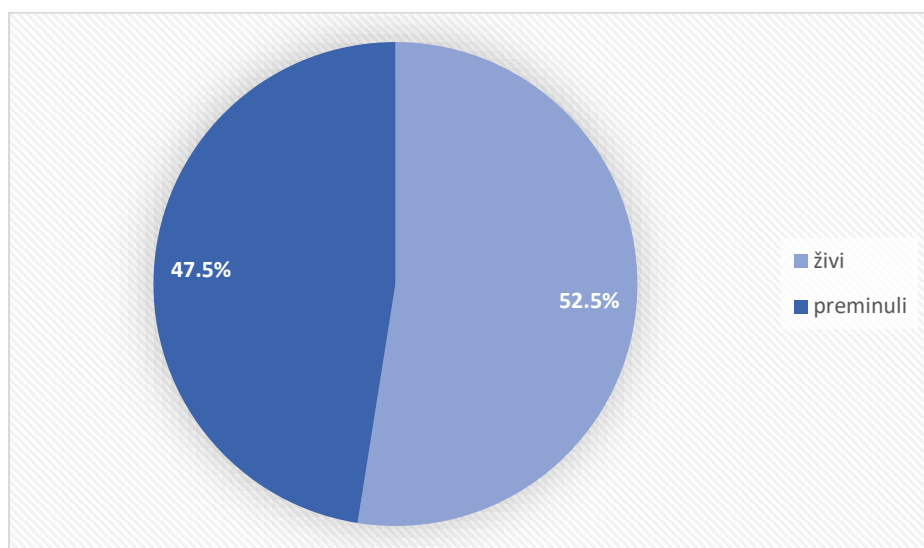


Slika 6. Grafički prikaz ishoda liječenja kod pacijenata s evidentiranim GVHD-om i pacijenata bez GVHD-a

Kod pacijenata s postavljenom dijagnozom AML-a željeni terapijski odgovor postignut je u 50,0% (9/18) slučajeva, kod onih s dijagnozom ALL-a u 11,1% (1/9) slučajeva, a kod pacijenata s dijagnozom MbH-a u 25,0% (1/4) slučajeva. Kod ostalih pacijenata postignuti su sljedeći odgovori na terapiju darivateljevima limfocitima: 100% (1/1, 1/1) pacijenata s dijagnozama MDS-a i NBPDC-a, 50,0% (1/2) pacijenata s dijagnozom KML-a, 33,3% (1/3) pacijenata s dijagnozom OMF-a te 0% (0/1, 0/1) pacijenata s dijagnozama AA i KLL-a postiglo je željeni terapijski uspjeh.

5.7. Preživljenje

Od 40 pacijenata koju su u promatranom razdoblju liječeni infuzijama darivateljevih limfocita preminulo je ukupno 19 (47,5%) pacijenata, a preživio je 21 (52,5%) pacijent. U ukupnom broju preminulih bilo je 9 (47,3%) osoba ženskog spola te 10 (52,7%) osoba muškog spola. Medijan dobi preminulih iznosio je 48 godina. Kod 16 (84,2%) preminulih izvor KMS-a za alogeničnu transplantaciju je bio PBSC, dok je kod ostalih izvor transplantata bio BM. U skupini preminulih 10 (52,6%) pacijenata bilo je transplantirano od nesrodnog HLA podudaranog darivatelja, 6 (31,6%) pacijenata od srodnog HLA podudaranog darivatelja te 3 (15,6%) pacijenta od haploidentičnog darivatelja.



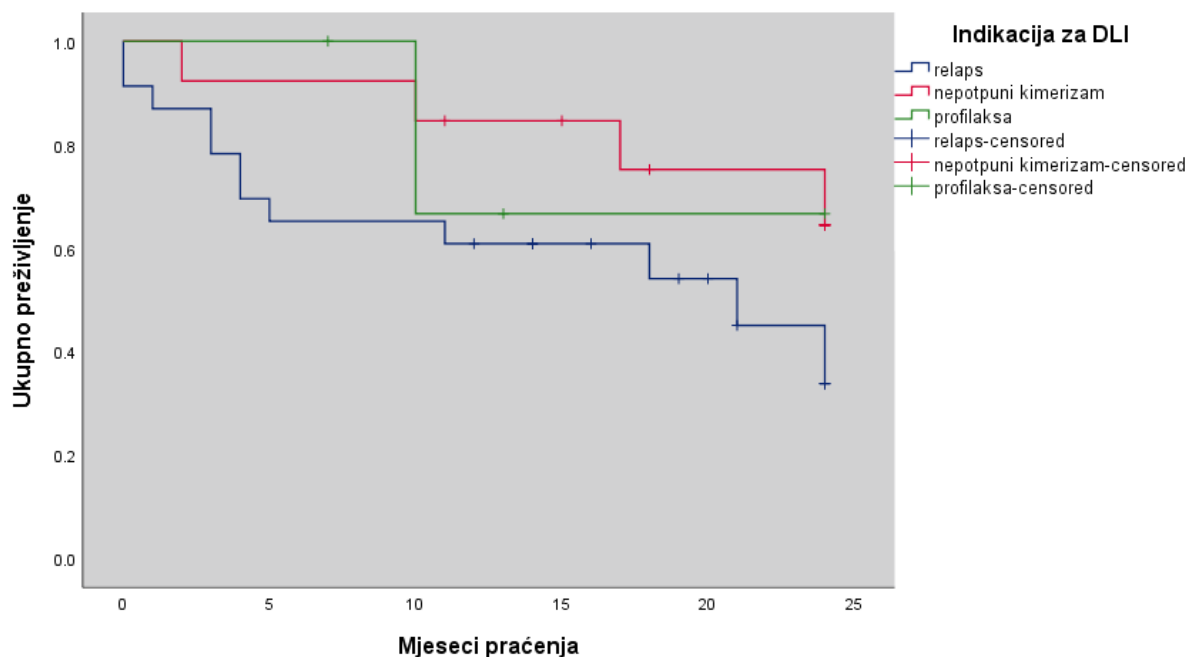
Slika 7. Grafički prikaz preživljenja pacijenata liječenih DLI-om

Medijan vremena proteklog od prve infuzije darivateljevih limfocita do smrti iznosio je 497 dana. Najčešći uzrok, koji je doveo do smrtnog ishoda kod 7 (36,8%) ispitanika, bio je neuspjeh terapije. Drugi po učestalosti uzrok smrti bila je sepsa, koja je dovela do smrtnog ishoda kod 6 (31,6%) ispitanika. Ostali uzroci smrti bili su relaps bolesti kod 3 (15,8%) ispitanika, plućna embolija kod 1 (5,3%) ispitanika, nekrotizirajući fasciitis kod 1 (5,3%) ispitanika te srčani zasto

kod 1 (5,3%) ispitanika. Najveći broj preminulih imao je postavljenu dijagnozu AML-a, ukupno 7 (36,8%) ispitanika. Šest (31,6%) preminulih osoba bolovalo je od ALL-a, 2 (10,5%) preminula od MbH-a, 2 (10,5%) preminula od OMF-a te 1 (5,3%) preminuli od KLL-a.

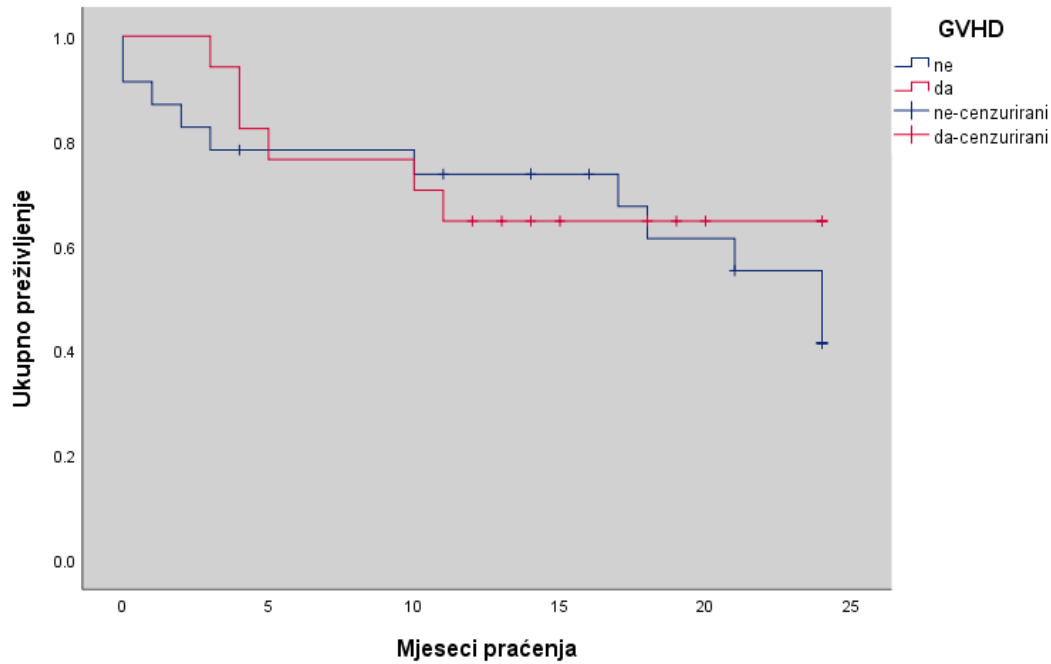
U skupini preživjelih ispitanika bilo je 9 (42,9%) ispitanika ženskog spola te 12 (57,1%) ispitanika muškog spola. Medijan praćenja preživjelih ispitanika bio je 665 dana od transplantacije KMS-a, odnosno 471 dan od prve infuzije darivateljevih limfocita. U skupini preživjelih kod njih 13 (61,9%) izvor transplantata bio je PBSC, a kod 8 (38,1%) pacijenata izvor je bio BM. Najveći broj preživjelih transplantiran je od srodnog HLA podudaranog darivatelja, njih 11 (52,4%), 8 (38,1%) preživjelih transplantirano je od nesrodnog HLA podudaranog darivatelja te 2 (9,5%) od haploidentičnog darivatelja. Statistička analiza pokazala je da preživljenje nije značajno ovisilo o spolu pacijenata, izvoru transplantata, niti o srodstvu darivatelja i primatelja transplantata ($p>0,05$).

Kod pacijenata liječenih DLI-om zbog relapsa preživljenje je iznosilo 43,5% (10/23), u onih liječenih zbog nepotpunog kimerizma i gubitka kimerizma 61,5% (8/12), a kod pacijenata kod kojih je DLI primijenjen profilaktički po protokolu preživljenje je bilo 75,0% (3/4). No, ta se razlika u preživljenju nije pokazala statistički značajnom (Log Rank: $\chi^2=3,755$, $p=0,153$).



Slika 8. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja pacijenata s različitim indikacijama za primjenu DLI-a u prvih 24 mjeseci nakon prve primijenjene doze darivateljevih limfocita

Skupina pacijenata kod kojih je terapija darivateljevima limfocitima bila praćena razvojem GVHD-a imala je ukupno preživljenje od 64,7% (11/17), a u skupini pacijenata kod kojih je razvoj GVHD-a izostao ukupno je preživljenje iznosilo 43,5% (10/23). Navedena razlika u ukupnom preživljenju između pacijenata kod kojih se GVHD razvio i onih kod kojih je razvoj GVHD-a izostao također se nije pokazala statistički značajnom (Log Rank: $\chi^2=0,542$, $p=0,462$).



Slika 9. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja pacijenata sa razvijenim GVHD-om i pacijenata bez navedene nuspojave u prva 24 mjeseca nakon prve doze darivateljevih limfocita

6. RASPRAVA

Alogenična transplantacija krvotvornih matičnih stanica u zadnjih nekoliko desetljeća pokazala se najdjelotvornijim terapijskim pristupom u liječenju pacijenata s refraktornim malignim hematološkim oboljenjima, koja je, usprkos potencijalnoj opasnosti od razvoja GVHD-a, omogućila brojim pacijentima dulje preživljenje pa čak i potpuno izlječenje. Relaps bolesti nakon alogenične transplantacije KMS-a i dalje ostaje glavni krivac za neuspjeh liječenja hematoloških pacijenata. Od prve uspješne primjene darivateljevih limfocita u terapiji relapsa KML-a do danas prošla su više od tri desetljeća. (3) Iako su se terapijski protokoli u hematologiji unaprjeđivali i mijenjali tijekom godina, DLI se zadržao i razvijao kao jedna od najznačajnijih metoda adoptivne imunoterapije nakon alogenične transplantacije KMS-a.

U Klinici za hematologiju KBC-a Zagreb u razdoblju od 2016. do 2018. godine terapijom darivateljevih limfocita liječeno je ukupno 40 pacijenata. Udio mlađih od 18 godina među pacijentima bio je 12,5%. Najviše pacijenata liječenih navedenim postupkom imalo je postavljene dijagnoze AML-a (45,0%) i ALL-a (22,5%). Ujedno su AML i ALL, prema analizi EBMA za 2018. godinu, bile 2 najzastupljenije dijagnoze kod pacijenata liječenih alogeničnom transplantacijom KMS-a u Europi, s udjelima 38% i 16% u ukupnom broju provedenih alogeničnih transplantacija. (38) Najveći udio pacijenata liječenih darivateljevim limfocitima u KBC-u Zagreb bio je transplantiran od nesrodnog HLA podudaranog darivatelja (45,0%), a neznatno manji broj od srodnog HLA darivatelja (42,5%). Najčešći izvor KMS-a za transplantaciju u našem istraživanju bile su matične stanice iz periferne krvi (72,5%), što je u skladu s trenutnim europskim trendovima u transplantaciji KMS-a. (38)

U ovom istraživanju indikacija za primjenu DLI-a kod 57,5% pacijenata bio je relaps osnovne bolesti, dok je prisutnost nepotpunog kimerizma bila indikacija za liječenje u 32,5% slučajeva. U najmanjem postotku slučajeva DLI je primijenjen profilaktički (10,0%). Sličan je udio pojedinih indikacija za DLI bio i u drugim europskim hematološkim centrima u 2018. godini. (38)

Većina (53,5%) doza darivateljevih limfocita koje su aplicirane analiziranim pacijentima bile su prethodno krioprezervirane. Studija grupe znanstvenika iz Philadelphije pokazala je da nema razlike u ishodima liječenja pacijenata koji su primili transfuzije prethodno krioprezerviranih pripravaka darivateljevih limfocita u odnosu na pacijente kojima su transfundirani svježi pripravci darivateljevih limfocita. (39) Sukladno navedenoj studiji, analizom pacijenata liječenih u KBC-u Zagreb nije nađena statistički značajna razlika u preživljenju između skupine pacijenata koja je primila krioprezervirane limfocite i skupine koja je primila svježe limfocite (Log Rank: $\chi^2=0,498$, $p=0,480$).

Medijan vremena proteklog između transplantacije KMS-a i inicijalnog tretmana darivateljevim limfocitima iznosio je 211,5 dana (raspon 0-2275 dana). Usprkos velikom broju provedenih istraživanja, za sada nije poznato koliki je vremenski interval između transplantacije KMS-a i početnog DLI-a optimalan za postizanje najboljih rezultata u liječenju hematoloških bolesnika. (16)

Srednja vrijednost početnih doza darivateljevih limfocita, koje su aplicirane pacijentima u ovom istraživanju, iznosila je $0,51 \times 10^7$ CD3+ stanica, a raspon primijenjenih početnih doza bio je između $0,001 \times 10^7$ i 3×10^7 CD3+ stanica. Još uvijek nije postignuto suglasje u tome koja bi početna doza CD3+ stanica bila optimalna. (16) Ipak, jedno od istraživanja u kojem je analiziran učinak doze darivateljevih limfocita na uspjeh terapije DLI-om pokazalo je da je kod ispitanika liječenih DLI-om zbog relapsa maligne bolesti ukupno preživljenje lošije ukoliko je inicijalna doza apliciranih darivateljevih limfocita veća od 10×10^7 CD3+ stanica. (40) Što se tiče korelacije između iznosa doze DLI-a i razvoja GVHD-a, Warlick i suradnici u svom su radu opisali višu incidenciju razvoja GVHD-a gradusa II-IV u skupini onih pacijenata koju su primili više doze DLI-a (1×10^8 CD3+/kg) u odnosu na skupinu koja je primila reduciranu dozu ($0,5 \times 10^8$ CD3+/kg). (41) U skladu s navedenim opažanjima da visoke doze CD3+ stanica koreliraju sa slabijim preživljenjem i većim rizikom od ekstenzivnog GVHD-a, niti jedan pacijent liječen darivateljevim limfocitima u KBC-u Zagreb nije primio početnu dozu jednaku ili višu od 10×10^7 CD3+ stanica.

Raspon ukupnog broja doza DLI-a koje su bile aplicirane pacijentima promatranima u ovom istraživanju kretao se od samo 1 doze pa do 7 doza po pacijentu. Medijan broja primijenjenih doza po pacijentu bio je 3 doze. Terapijski neuspjeh i razvoj GVHD-a bili su glavni čimbenici koji su, kod pacijenata u našem istraživanju, ograničili nastavak primjene darivateljevih limfocita. Sistematski pregled El-Jurdija i suradnika iz 2011. godine u kojem je provedena analiza 39 studija o primjeni DLI-a, pokazao je da su se pacijenti uključeni u analizirane studije značajno razlikovali po broju doza DLI-a koje su primili, tako da su u nekim studijama pacijenti dobili samo po 1 dozu darivateljevih limfocita, dok je u drugim studijama broj primijenjenih tretmana DLI-a po osobi dosezao 7. (16) Navedenim sistematskim pregledom nije se došlo do konačnog zaključka koliki bi ukupni broj tretmana darivateljevim limfocitima bio najprimjereniji za postizanje optimalnih rezultata. (16)

Liječenje darivateljevim limfocitima popraćeno je visokim rizikom od razvoja GVHD-a. Dosadašnja istraživanja pokazala su kako se akutni GVHD javlja kod 43-60% ispitanika tretiranih darivateljevim limfocitima, a kronični oblik bolesti kod 46-60% ispitanika. (42,43) Kod pacijenata analiziranih u ovim istraživanju DLI je bio popraćen razvojem GVHD-a kod 42,5% pacijenata, što je u skladu sa navedenim podacima iz literature. U našem istraživanju GVHD

nije bio uzrokom smrti niti jednog liječenog pacijenta, što je u skladu sa dosadašnjim studijama koje su pokazale kako je unatoč visokoj incidenciji GVHD-a koji nastaje kao posljedica terapije darivateljevim limfocitima, mortalitet od samog GVHD-a kod tih pacijenata nizak. (23) Rezultati studije van Rhee i suradnika sugeriraju da pacijenti transplantirani od nesrodnog HLA podudaranog darivatelja nemaju značajno veći rizik za razvoj ekstenzivnog kroničnog GVHD-a u odnosu na pacijente koji su primili transplantat od srodnog HLA podudaranog darivatelja. (44) Sukladno tome, niti kod pacijenata u našem istraživanju nije nađena statistički značajna razlika u pojavnosti GVHD-a kod pacijenata transplantiranih od srodnih i pacijenata transplantiranih od nesrodnih HLA podudaranih darivatelja ($\chi^2=1,208$, $p=0,547$). Iako je u dosadašnjim radovima razvoj kroničnog GVHD-a bio povezan sa boljim ishodom i preživljenjem (4,38), kod pacijenata liječenih u KBC-u Zagreb nije postojala statistički značajna razlika u preživljenju između pacijenata kod kojih se GVHD razvio i onih kod kojih je razvoj GVHD-a izostao (Log Rank: $\chi^2=0,542$, $p=0,462$).

Ukupno je 37,5% pacijenata liječenih u KBC-u Zagreb postiglo odgovor na terapiju darivateljevim limfocitima. Kod pacijenta kod kojih je DLI primijenjen zbog relapsa bolesti terapijski uspjeh postignut je kod 30,4% pacijenata, dok je u skupini onih koji su liječeni DLI-om zbog nepotpunog kimerizma ili gubitka stopostotnog kimerizma željeni terapijski odgovor postignut u 46,2% slučajeva. U skupini pacijenata kod kojih je indikacija za primjenu DLI-a bila profilaksa terapijski uspjeh postignut je kod 50,0% pacijenata. Dosadašnja istraživanja sugeriraju da je terapijski odgovor na primijenjeni DLI bolji ukoliko se takav pristup primjenjuje profilaktički, u odnosu na terapijsku primjenu kod pacijenata s evidentnim relapsom bolesti. (13) Statističkom analizom podataka u našem istraživanju, različita uspješnost u postizanju terapijskog odgovora u skupinama pacijenata s različitim indikacijama za primjenu DLI-a nije se pokazala statistički značajnom ($\chi^2=1,172$, $p=0,557$).

Dosadašnja klinička primjena pokazala je da rezultati liječenja primjenom DLI-a značajno ovise i o hematološkoj dijagnozi liječenih pacijenata. Dok se u liječenju KML-a primjena darivateljevih limfocita pokazala iznimno uspješnom metodom s postizanjem kompletne remisije kod oko 70% pacijenata, u liječenju drugih hematoloških bolesti učinak DLI-a još uvijek je dosta ograničen. (45) Pacijenti s bolestima mijeloidne loze uglavnom postižu bolji odgovor na takav oblik terapije od pacijenata oboljelih od bolesti limfoidne loze. (19) U našem istraživanju terapijski uspjeh primjenom DLI-a kod pacijenata s dijagnozom AML-a, koji su ujedno činili i najveći broj pacijenata tretiranih darivateljevim limfocitima, postignut je kod 50,0% oboljelih od AML-a, a preživljenje tih pacijenata bilo je 61,1%. Medijan praćenja pacijenata s dijagnozom AML-a iznosio je 484 dana od početnog DLI-a. U istraživanju Schmida i suradnika iz 2007. godine, ukupno dvogodišnje preživljenje pacijenata liječenih DLI-om zbog AML-a bilo je 21%. (43) Od 40 pacijenata liječenih pripravcima DLI-a u KBC-u Zagreb samo su 2 pacijenta imala

postavljene dijagnoze KML-a. Terapijski uspjeh postignut je kod jednog od njih, dok kod drugog pacijenta nije bilo odgovora na primijenjeni DLI.

Ukupno preživljenje analiziranih pacijenata KBC-a Zagreb bilo je 52,5%. Medijan praćenja preživjelih pacijenata iznosio je 471 dan od inicijalne doze DLI-a. Među preminulima bilo je nešto više osoba muškog spola (52,7%), a medijan dobi preminulih iznosio je 48 godina. Najveći broj preminulih, 52,6%, bio je transplantiran od nesrodnog HLA podudaranog darivatelja, a izvor transplantata u 84,2% preminulih bio je PBSC. Za razliku od toga, najveći udio pacijenata u skupini preživjelih bio je transplantiran od srodnog HLA podudaranog darivatelja (52,4%). Slično kao i kod preminulih, u skupini preživjelih pacijenata izvor transplantata KMS-a dominantno je bio PBSC (61,9%). Preživljenje pacijenata nije značajno ovisilo o spolu pacijenata, izvoru transplantata, niti o srodstvu darivatelja i primatelja transplantata ($p>0,05$). Dosadašnja iskustva s primjenom DLI-a također sugeriraju da srodstvo između darivatelja i primatelja transplantata nije čimbenik koji značajnije utječe na preživljenje i uspjeh liječenja darivateljevim limfocitima. (44,46) Među preminulima u našem istraživanju prevladavali su pacijenti s postavljenim dijagnozama AML-a (36,8%) i ALL-a (31,6%). Medijan vremena koje je proteklo od početnog DLI-a i smrti iznosio je 497 dana. Uzroci smrti su u najvećem broju slučajeva bili neuspjeh terapije (36,8%) i sepsa (31,6%).

U studiji Krishnamurthyja objavljenoj 2013. godine analizirano je ukupno petogodišnje preživljenje pacijenata oboljelih od AML-a i MDS-a te liječenih pripravcima darivateljevih limfocita nakon alogenične transplantacije KMS-a. (13) Skupina pacijenata kod koje je DLI primijenjen profilaktički s ciljem smanjenja rizika od relapsa bolesti i postizanja stopostotnog darivateljevog kimerizma imala je procijenjeno ukupno petogodišnje preživljenje 80%. (13) Za razliku od toga, u skupini koja je DLI primila nakon relapsa bolesti procijenjeno ukupno petogodišnje preživljenje iznosilo je 40%. (13) Kod pacijenata s relapsom, uspjeh liječenja DLI-om bio je značajno veći, a preživljenje bolje, ukoliko se relaps dogodio nakon više od 6 mjeseci od alogenične transplantacije KMS-a. (13) Kada su uspoređena preživljenja pacijenata liječenih u KBC-u Zagreb s obzirom na to koja je indikacija bila za primjenu DLI-a, najveći postotak preživljenja bio je u skupini pacijenata kod kojih je DLI primijenjen profilaktički (75,0%), zatim u skupini kod kojih je indikacija bila prisutnost nepotpunog kimerizma (61,5%), a najmanji postotak preživljenja bio je u skupini bolesnika s relapsom bolesti (43,5%). No ta razlika u preživljenju pacijenata ipak se nije pokazala statistički značajnom (Log Rank: $\chi^2=3,755$, $p=0,153$).

7. ZAKLJUČAK

U istraživanju provedenom na Klinici za hematologiju KBC-a Zagreb analizirani su ishodi hematoloških pacijenata posttransplantacijski liječenih primjenom darivateljevih limfocita. Dijagnoze pacijenata koji su se liječili opisanom tretmanom dominantno su bile akutne leukemije, AML i ALL. Iako je u literaturi opisana najuspješnija primjena DLI-a u liječenju KML-a, zanemarivo je mali broj pacijenata s tom dijagnozom bio uključen u ovo istraživanje. Rezultati istraživanja pokazali su da se terapija darivateljevim limfocitima, koja se provodi na Klinici za hematologiju KBC-a Zagreb, ne razlikuje značajno od terapije DLI-om u drugim hematološkim centrima u Europi i svijetu, kako po svojim karakteristikama tako i po postignutim rezultatima. Karakteristike hematoloških bolesti, karakteristike provedenih alogeničnih transplantacija KMS-a kao i udio indikacija za primjenu DLI-a podudaraju se s podacima iz europske statistike. Tehničke karakteristike terapijske primjene darivateljevih limfocita u KBC-u Zagreb, koje obuhvaćaju iznos početne doze CD3+ stanica i broj provedenih DLI tretmana po osobi, u skladu su s podacima iz literature. Razvoj GVHD-a kao nuspojave liječenja DLI-om bio je evidentiran kod 42,5% pacijenata što je, ako se ti podaci usporede s dosada objavljenim studijama i izvještajima, relativno nizak postotak pogođenih pacijenata. Iako se ta razlika statističkom obradom nije pokazala statistički značajnom, odgovor pacijenata na terapiju u ovom istraživanju pokazivao je tendenciju boljeg terapijskog odgovora pacijenata liječenih profilaktički i zbog prisutnosti nepotpunog kimerizma, u odnosu na one liječene zbog relapsa bolesti, koji su u manjem broju slučajeva postigli zadovoljavajući odgovor na terapiju. Iako su u dosad objavljenoj literaturi rezultati primjene DLI-a u liječenju AML-a, u usporedbi s uspjesima u liječenju KML-a, porazni, u ovom istraživanju odgovor na terapiju, pacijenata s postavljenom dijagnozom AML-a, bio je relativno visok (50,0%). Ukupno preživljenje pacijenata liječenih primjenom DLI-a u KBC-u Zagreb bilo je 52,5%. Preživljenje pacijenata nije značajno ovisilo o spolu pacijenata, niti o izvoru transplantata. Također, niti srodstvo darivatelja i primatelja transplantata nije bio čimbenik koji je značajnije utjecao na ishod liječenja DLI-om i preživljenje, što je u skladu sa rezultatima dosadašnjih istraživanjima u ovom području. Iako su dosadašnje studije pokazale da je uspjeh liječenja DLI povezan sa većom učestalošću razvoja GVHD-a, u ovom istraživanju nije postojala značajna korelacija između GVHD-a i uspjeha terapije i preživljenja. Zaključno, rezultati ovog istraživanja još jednom su pokazali da je primjena darivateljevih limfocita učinkovit terapijski protokol čijom se profilaktičkom primjenom nakon alogenične transplantacije KMS-a poboljšava preživljenje pacijenata sa visokorizičnim oblicima hematoloških malignoma i smanjuje rizik od relapsa. Isto tako, terapijska primjena DLI-a kod pacijenata s potvrđenim posttransplantacijskim relapsom bolesti pruža značajnom broju, donedavno neizlječivih pacijenata, šansu za postizanje kontrole

nad bolešću, duže preživljenje i u konačnici, kod određenog broja pacijenata, i izlječenje. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se otkrili, te detaljnije opisali, čimbenici koji utječu na uspjeh terapije pomoću kojih bi se mogli procijeniti rizici i predvidjeti terapijski odgovori pojedinih pacijenata, kao i načini za smanjivanje opasnosti od GVHD-a, čiji razvoj kod velikog broja pacijenata ograničava daljnju primjenu DLI-a. Također, potrebno je uložiti dodatne napore u standardizaciju postupka, odnosno odrediti optimalan režim doziranja i frekvenciju primjene darivateljevih stanica, kako bi se što više potencirao terapijski učinak i postigli bolji rezultati u preživljenju i kvaliteti života, a izbjegle neželjene nuspojave ovakvog oblika liječenja.

8. ZAHVALE

Ponajprije, zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Nadiri Duraković na usmjeravanju, ažurnosti te ukazanom razumijevanju i pruženoj pomoći prilikom pisanja ovog diplomskog rada. Također, zahvaljujem na znatnom trudu uloženom u podučavanje i rad sa studentima.

Zahvaljujem svim prijateljima koji su mi neopisivo uljepšali godine studiranja, s kojima sam, kroz zajednička iskustva, u proteklih šest godina zajedno rasla i koji su me motivirali da se razvijam i unaprijedim kao osoba.

I na kraju, najviše zahvaljujem svojim roditeljima i sestrama koji su uvijek vjerovali u mene i bez čije bezuvjetne ljubavi i podrške ništa od ovoga ne bi bilo moguće postići.

9. LITERATURA

1. Chang X, Zang X, Xia CQ. New strategies of DLI in the management of relapse of hematological malignancies after allogeneic hematopoietic SCT. Vol. 51, Bone Marrow Transplantation. 2016. p. 324–32.
2. Nikiforow S, Alyea EP. Maximizing GVL in allogeneic transplantation: Role of donor lymphocyte infusions. Hematology. 2014th ed. 2014;2014(1):570–5.
3. Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. Blood. 1990;76(12):2462–5.
4. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. Blood. 1990;75(3):555–62.
5. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. Science (80-). 2002 Mar 15;295(5562):2097–100.
6. Marijt WAE, Heemskerk MHM, Kloosterboer FM, Goulmy E, Kester MGD, Van der Hoorn MAWG, et al. Hematopoiesis-restricted minor histocompatibility antigens HA-1- or HA-2-specific T cells can induce complete remissions of relapsed leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(5):2742–7.
7. Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. Vol. 4, Nature Reviews Cancer. 2004. p. 371–80.
8. Blank CU, Haining WN, Held W, Hogan PG, Kallies A, Lugli E, et al. Defining 'T cell exhaustion.' Nat Rev Immunol. 2019 Nov 1;19(11):665–74.
9. Wherry EJ. T cell exhaustion. Vol. 12, Nature Immunology. Nature Publishing Group; 2011. p. 492–9.
10. Bachireddy P, Hainz U, Rooney M, Pozdnyakova O, Aldridge J, Zhang W, et al. Reversal of in situ T-cell exhaustion during effective human antileukemia responses to donor lymphocyte infusion. Blood. 2014 Feb 27;123(9):1412–21.
11. Wang Y, Liu DH, Fan ZP, Sun J, Wu XJ, Ma X, et al. Prevention of relapse using DLI can increase survival following HLA-identical transplantation in patients with advanced-stage acute leukemia: A multi-center study. Clin Transplant. 2012 Jul

- 1;26(4):635–43.
12. Rujkijyanont P, Morris C, Kang G, Gan K, Hartford C, Triplett B, et al. Risk-adapted donor lymphocyte infusion based on chimerism and donor source in pediatric leukemia. *Blood Cancer J.* 2013;3(8):e137–e137.
 13. Krishnamurthy P, Potter VT, Barber LD, Kulasekararaj AG, Lim ZY, Pearce RM, et al. Outcome of Donor Lymphocyte Infusion after T Cell-depleted Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013;19(4):562–8.
 14. Schmid C, Schleuning M, Schwerdtfeger R, Hertenstein B, Mischak-Weissinger E, Bunjes D, et al. Long-term survival in refractory acute myeloid leukemia after sequential treatment with chemotherapy and reduced-intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2006 Aug 1;108(3):1092–9.
 15. Chang YJ, Huang XJ. Donor lymphocyte infusions for relapse after allogeneic transplantation. When, if and for whom? *Blood Rev.* 2013 Jan;27(1):55–62.
 16. El-Jurdi N, Reljic T, Kumar A, Pidala J, Bazarbachi A, Djulbegovic B, et al. Efficacy of adoptive immunotherapy with donor lymphocyte infusion in relapsed lymphoid malignancies. *Immunotherapy.* 2013;5(5):457–66.
 17. Choi SJ, Lee JH, Kim S, Seol M, Lee YS, Lee JS, et al. Treatment of relapsed acute myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplantation with chemotherapy followed by G-CSF-primed donor leukocyte infusion: A high incidence of isolated extramedullary relapse. *Leukemia.* 2004;18(11):1789–97.
 18. Dermime S, Mavroudis D, Jiang YZ, Hensel N, Molldrem J, Barrett AJ. Immune escape from a graft-versus-leukemia effect may play a role in the relapse of myeloid leukemias following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1997 May 2;19(10):989–99.
 19. Kolb HJ. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood.* 2008;112(12):4371–83.
 20. Slavin S, Morecki S, Weiss L, Or R. Donor lymphocyte infusion: The use of alloreactive and tumor-reactive lymphocytes for immunotherapy of malignant and nonmalignant diseases in conjunction with allogeneic stem cell transplantation. Vol. 11, *Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research.* 2002. p. 265–76.
 21. Childs R, Chernoff A, Contentin N, Bahceci E, Schrupp D, Leitman S, et al. Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic

- peripheral-blood stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2000 Sep 14;343(11):750–8.
22. Demirer T, Barkholt L, Blaise D, Pedrazzoli P, Aglietta M, Carella AM, et al. Transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells: An emerging treatment modality for solid tumors. Vol. 5, *Nature Clinical Practice Oncology*. Nature Publishing Group; 2008. p. 256–67.
 23. Frey N V, Porter DL. Graft-versus-host disease after donor leukocyte infusions: presentation and management. Vol. 21, *Best Practice and Research: Clinical Haematology*. 2008. p. 205–22.
 24. Scarisbrick JJ, Dignan FL, Tulpule S, Gupta ED, Kolade S, Shaw B, et al. A multicentre UK study of GVHD following DLI: Rates of GVHD are high but mortality from GVHD is infrequent. *Bone Marrow Transplant*. 2015;50(1):62–7.
 25. Baron F, Maris MB, Sandmaier BM, Storer BE, Sorrow M, Diaconescu R, et al. Graft-Versus-Tumor Effects After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation With Nonmyeloablative Conditioning. *J Clin Oncol*. 2005 Mar 20;23(9):1993–2003.
 26. Flowers MED, Martin PJ. How I Treat How we treat chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2015;125(4):606–15.
 27. Dazzi F, Szydlo RM, Craddock C, Cross NCP, Kaeda J, Chase A, et al. Comparison of single-dose and escalating-dose regimens of donor lymphocyte infusion for relapse after allografting for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000 Jan 1;95(1):67–71.
 28. Guglielmi C, Arcese W, Dazzi F, Brand R, Bunjes D, Verdonck LF, et al. Donor lymphocyte infusion for relapsed chronic myelogenous leukemia: Prognostic relevance of the initial cell dose. *Blood*. 2002 Jul 15;100(2):397–405.
 29. Giralt S, Hester J, Huh Y, Hirsch-Ginsberg C, Rondon G, Seong D, et al. CD8-depleted donor lymphocyte infusion as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 1995;86(11):4337–43.
 30. Soiffer RJ, Gonin R, Murray C, Robertson MJ, Cochran K, Chartier S, et al. Prediction of graft-versus-host disease by phenotypic analysis of early immune reconstitution after CD6-depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 1993;82(7):2216–23.
 31. Alyea EP, Soiffer RJ, Canning C, Neuberg D, Schlossman R, Pickett C, et al. Toxicity and efficacy of defined doses of CD4+ donor lymphocytes for treatment of relapse after allogeneic bone marrow transplant. *Blood*. 1998 May 15;91(10):3671–80.

32. Porter DL, Levine BL, Bunin N, Stadtmauer EA, Luger SM, Goldstein S, et al. A phase 1 trial of donor lymphocyte infusions expanded and activated ex vivo via CD3/CD28 costimulation. *Blood*. 2006 Feb 15;107(4):1325–31.
33. Kumar AJ, Hexner EO, Frey N V., Luger SM, Loren AW, Reshef R, et al. Pilot Study of Prophylactic ExVivo Costimulated Donor Leukocyte Infusion After Reduced-Intensity Conditioned Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013 Jul 1;19(7):1094–101.
34. Lübbert M, Bertz H, Wäsch R, Marks R, Rüter B, Claus R, et al. Efficacy of a 3-day, low-dose treatment with 5-azacytidine followed by donor lymphocyte infusions in older patients with acute myeloid leukemia or chronic myelomonocytic leukemia relapsed after allografting. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45(4):627–32.
35. Nadal E, Fowler A, Kanfer E, Apperley J, Goldman J, Dazzi F. Adjuvant interleukin-2 therapy for patients refractory to donor lymphocyte infusions. *Exp Hematol*. 2004;32(2):218–23.
36. Cohen JL, Trenado A, Vasey D, Klatzmann D, Salomon BL. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: New therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp Med*. 2002 Aug 5;196(3):401–6.
37. Maury S, Lemoine FM, Hicheri Y, Rosenzweig M, Badoual C, Cheraï M, et al. CD4+CD25+ regulatory T cell depletion improves the graft-versus-tumor effect of donor lymphocytes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Sci Transl Med*. 2010 Jul 21;2(41):41ra52-41ra52.
38. Passweg JR, Baldomero H, Chabannon C, Basak GW, Corbacioglu S, Duarte R, et al. The EBMT activity survey on hematopoietic-cell transplantation and cellular therapy 2018: CAR-T's come into focus. *Bone Marrow Transplant*. 2020;
39. Hossain NM, Klumpp T, Ulicny J, Garner M, Kropf PL, Mangan KF, et al. Donor Lymphocyte Infusion in Hematologic Malignancies - Good to be Fresh? *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk*. 2016 Feb 1;16(2):111–5.
40. Bar M, Storer B, Bruno B, Hari P, Chauncey T, Inamoto Y, et al. Donor Lymphocyte Infusion for Relapsed Hematological Malignancies After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Prognostic Relevance of the Initial CD3+ T Cell Dose. *Blood*. 2012 Nov 16;120(21):354–354.
41. Warlick ED, DeFor T, Blazar BR, Burns L, Verneris MR, Ustun C, et al. Successful Remission Rates and Survival after Lymphodepleting Chemotherapy and Donor

- Lymphocyte Infusion for Relapsed Hematologic Malignancies Postallogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012 Mar 1;18(3):480–6.
42. Collins RH, Shpilberg O, Drobyski WR, Porter DL, Giral S, Champlin R, et al. Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol*. 1997 Feb;15(2):433–44.
 43. Schmid C, Labopin M, Nagler A, Bornhäuser M, Finke J, Fassas A, et al. Donor lymphocyte infusion in the treatment of first hematological relapse after allogeneic stem-cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia: A retrospective risk factors analysis and comparison with other strategies by the EBMT acute leukem. *J Clin Oncol*. 2007 Nov 1;25(31):4938–45.
 44. Van Rhee F, Savage D, Blackwell J, Orchard K, Dazzi F, Lin F, et al. Adoptive immunotherapy for relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplant: Equal efficacy of lymphocytes from sibling and matched unrelated donors. *Bone Marrow Transplant*. 1998 May 2;21(10):1055–61.
 45. Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood*. 1995;86(5):2041–50.
 46. Dazzi F, Szydlo RM, Cross NCP, Craddock CC, Kaeda J, Kanfer E, et al. Durability of responses following donor lymphocyte infusions for patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000 Oct 15;96(8):2712–6.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

- Ime i prezime: Ana-Marija Đaković
- Datum rođenja: 18.12.1995.
- Mjesto rođenja: Moskva, Ruska Federacija

ŠKOLOVANJE

- 2014.-2020. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- 2010.-2014. Gimnazija Matije Mesića Slavonski Brod, opći smjer
- 2002.-2010. Osnovna škola Bogoslava Šuleka Bukovlje

NAGRADE

- Dekanova nagrada za najbolju studenticu prve godine studija medicine u akademskoj godini 2014./2015.

IZVANNASTAVNE AKTIVNOSTI

- 2016.-2020. članica CroMSIC-a (Croatian Medical Students' International Committee)
- 2018.-2020. održavanje radionica o HPV-u i cijepljenju u osnovnim i srednjim školama u sklopu projekta mRAK
- 2019. polaznica Ljetne škole otočne medicine na Šolti
- Demonstrator na Katedri za medicinsku kemiju i biokemiju
- Demonstrator na Katedri za histologiju i embriologiju
- Demonstrator na Katedri za kliničku propedeutiku
- Demonstrator na Katedri za pedijatriju

VJEŠTINE

- Aktivna uporaba engleskog jezika
- Poznavanje osnova njemačkog jezika