

# Molekularna dijagnostika u identifikaciji podrijetla tumora u pacijenata nakon transplantacije

---

Furač, Ivana

Professional thesis / Završni specijalistički

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:005122>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ivana Furač

**MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA U IDENTIFIKACIJI PODRIJETLA TUMORA U  
PACIJENATA NAKON TRANSPLANTACIJE**

Specijalistički rad

Zagreb, 2021.

Poslijediplomski specijalistički studij: Molekularna dijagnostika

Mentorica rada: prof. dr. sc. Karmela Barišić

Specijalistički rad obranjen je 29. rujna 2021. godine na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pred Povjerenstvom u sastavu:

1. doc.dr.sc. Sandra Šupraha Goreta  
Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet
2. prof.dr.sc. Karmela Barišić  
Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet
3. nasl.doc.dr.sc. Mario Štefanović  
KBC Sestre Milosrdnice

Rad ima 75 stranica.

Ovaj specijalistički rad prijavljen je na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i izrađen je pod mentorstvom prof. dr. sc. Karmele Barišić.

## **SAŽETAK**

### **Molekularna dijagnostika u identifikaciji podrijetla tumora u pacijenata nakon transplantacije**

#### **CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj ovog specijalističkog rada je prikazati pregled relevantnih saznanja i podataka o molekularnoj dijagnostici podrijetla tumora u transplantiranih pacijenata s obzirom na različite mogućnosti nastajanja tumora.

#### **MATERIJALI I METODE**

Istraživanje u okviru ovog rada je teorijskog karaktera i uključuje pregled znanstvene i stručne literature o predloženoj temi. Napravljeno je sveobuhvatno pretraživanje publikacija u zadnjih dvadeset godina prema ključnim riječima u bazi Medline (preko sučelja PubMed). Pretraga je upotpunjena provjerom liste referenci u identificiranoj relevantnoj literaturi kao i pretraživanjem drugih dostupnih bibliografskih baza podataka. Pretraživanje je obuhvatilo pregledne i originalne znanstvene radove te stručne radove koji daju pregledni prikaz i/ili analizu tumorskog podrijetla u transplantiranih pacijenata.

#### **REZULTATI I RASPRAVA**

Maligni tumor je treći najčešći uzrok smrti u bolesnika nakon transplantacije. Postoje četiri vrste tumora koji se mogu razviti u primateljima nakon transplantacije. S obzirom na različite mogućnosti nastajanja tumora to su: (1) rekurentni tumor, (2) tumor nastao prijenosom od donora transplantiranog organa na primatelja, (3) tumor proizašao od donora ili (4) tumor nastao *de novo*. Utvrđivanje podrijetla tumora, bilo da je od donora ili od primatelja, ima važne kliničke posljedice i može pomoći u razvijanju protokola prevencije i

ranog otkrivanja te učinkovitog upravljanja liječenjem tumora uključujući revidiranje imunosupresivne terapije i/ili retransplantacije, a također ima implikacije i na druge primatelje donatorskih organa. Identifikacija podrijetla tumora obično podrazumijeva primjenu fluorescentne *in situ* hibridizacije (engl. *Fluorescence in situ hybridisation*, FISH) ako su transplantati različitog spola te analizu mikrosatelitskih biljega DNA. Prikupljeni podatci su proučeni i sistematično prikazani. U publikacijama u zadnjih dvadeset godina molekularna dijagnostika podrijetla tumora u transplantiranih pacijenata nakon transplantacije organa primijenjena je u relativno malom broju slučajeva koji su prikazani uglavnom kao prikaz pojedinačnoga slučaja (engl. *case report*), znanstveni rad koji opisuje po jedan konkretni slučaj. Također, tehnike i metode analize korištene u objavljenim radovima odraz su korištenja dostupnih metoda iz već postojećih resursa. Analiza DNA je izrazito moćna metoda za utvrđivanje identiteta tkiva zbog visoke specifičnosti i osjetljivosti, brzine i pouzdanosti te posjeduje velik potencijal za rutinsku primjenu u dijagnostici podrijetla tumora u pacijenata s transplantiranim čvrstim organom. Takav slučaj je nedavno obrađen i kod nas u Hrvatskoj. Ovo istraživanje pruža izvor informacija i usporedbu nekoliko različitih dijagnostičkih alata sa sličnom primjenom.

## **ZAKLJUČAK**

Provedena istraživanja pružaju znanstvenu potvrdu neophodnosti primjene molekularne dijagnostike u identifikaciji podrijetla tumora koji se pojave kod pacijenata nakon transplantacije. To je od iznimne važnosti za daljnji tretman i liječenje pacijenta. Najznačajniju ulogu u tome ima analiza DNA korištenjem mikrosatelitskih polimorfni lokusa (genotipizacija) jer je visokospecifična, iznimno osjetljiva, brza i pouzdana. Tom metodom se, neovisno o spolu davatelja i primatelja organa, može identificirati i individualizirati uzorak odnosno točno utvrditi podrijetlo. Ako se za tumor utvrdi da potječe od donora moguće je osmisliti daljnje upravljanje antitumorskom terapijom s ciljem izliječenja, produženja života i poboljšanja kvalitete života pacijenta. Također moguće je napraviti i retransplantaciju organa ako se tumor pojavio na transplantiranom organu.

## **SUMMARY**

### **Molecular diagnostics in tumor origin identification in patients after transplantation**

#### **OBJECTIVES**

The aim of this research is to present an overview of the relevant contemporary knowledge and data on molecular diagnostics of tumor origin in transplanted patients regarding different possibilities of tumor formation.

#### **MATERIALS AND METHODS**

This is a review of the available literature to provide a summary of current knowledge and previous research on a topic. A comprehensive search of publications for the last twenty years was conducted using Medline database (PubMed interface) and previously defined keywords. The search was completed by checking the list of references in the identified relevant literature as well as searching other available bibliographic databases. Reviews, original scientific papers and specialized articles that give an overview and/or analysis of tumor origin in transplant patients were included.

#### **RESULTS AND DISCUSSION**

Malignant tumor is the third most common cause of death in patients after transplantation. There are four types of tumors that can develop in recipients after transplantation: (1) recurrent, (2) donor-transmitted tumor (3) donor-derived and (4) *de novo* tumor. Determining the origin of tumor, whether from donor or recipient, has important clinical implications and can help develop prevention and early detection protocols and the effective management of tumor treatment including revision of immunosuppressive therapy and/or retransplantation. Also, it has tremendous implication for other organ

recipients of the same donor. Identification of tumor origin is usually done by chromosome FISH analysis (in sex-mismatched allografts) and DNA fingerprinting (microsatellite marker analysis). The collected data were studied in detail and systematically presented. According to the publications from the last twenty years, molecular diagnostics of tumor origin in transplanted patients after solid organ transplantation has been applied in a moderate number of cases. They are usually presented as "case report" articles describing one specific case. Also, the techniques and methods of analysis used were the available methods from already existing resources. DNA analysis is an extremely powerful method for establishing tissue identity due to its high specificity and sensitivity, speed and reliability. It has great potential for routine use in the diagnosis of tumor origin in patients with solid organ transplantation. Such a case of tumor identification was recently done in Croatia as well. This research provides a source of information and comparison of several different diagnostic tools with similar application.

#### **CONCLUSION**

The conducted research provides scientific evidence and confirmation of the necessity of molecular diagnostics application to the identification of the origin of tumors in patients after transplantation. This is extremely important for further treatment of the patient. Here, DNA analysis plays the most important role using microsatellite polymorphic loci (genotyping) because it is highly specific, extremely sensitive, fast and reliable. Using this method, regardless of the sex of the organ donor and recipient, one can identify and individualize the sample and determine the exact origin. If the tumor is found to originate from a donor, it is possible to devise further management of antitumor therapy with the aim of healing, prolonging life and improving the patient's life quality. Also, if a tumor appeared in the transplanted organ it is possible to retransplant the organ.



## SADRŽAJ

1. Uvod i pregled područja istraživanja	
1.1. Transplantacija organa	1
1.1.1. Komplikacije nakon transplantacije	3
1.2. Tumori	4
1.2.1. Tumori kod pacijenata s transplantiranim čvrstim organom	7
1.2.2. Klasifikacija tumora nastalih nakon transplantacije	8
1.2.3. Etiologija i patogeneza posttransplantacijskih tumora	10
1.3. Identifikacija podrijetla tumora - molekularna dijagnostika	11
1.3.1. Fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija (FISH)	14
1.3.2. Analiza DNA - DNA fingerprinting	17
2. Cilj istraživanja	20
3. Materijali i metode	21
4. Rezultati i rasprava	22
4.1. Tumori kod pacijenata s transplantiranim čvrstim organom	22
4.2. Molekularna dijagnostika podrijetla tumora	23
4.2.1. Pregled publikacija u periodu od 2000. do 2019. godine	23
4.2.2. Primjena analize DNA	24
4.2.3. Prikaz rezultata analize DNA	25
4.2.4. Identifikacija podrijetla posttransplantacijskog tumora u Hrvatskoj	46
4.2.5. Problemi u identifikaciji podrijetla tumora	49
4.3. Daljnje smjernice u upravljanju tumorskom bolešću	50
5. Zaključak	52
6. Literatura	54
7. Životopis	59

**Uvod i pregled područja istraživanja**

One donor transmitted malignancy is one too many and measures need to be taken to avoid such complications.

Hassanain M, 2014.(1)

### 1.1. Transplantacija organa

Širom svijeta u posljednjih pedeset godina transplantacija ili presađivanje organa postala je uhodana i uspješna metoda liječenja bolesnika kod kojih je došlo do nepovratnog gubitka funkcije vitalnih organa. To je najisplativiji tretman kod npr. zatajenja bubrega dok je kod zadnje faze zatajenja organa kao što su jetra, pluća i srce to jedino dostupno liječenje (2). Na taj se način neizmjereno pomaže stotinama tisuća pacijenata. Ipak, to je kompleksni i tehnički jedan od najkompliciranijih postupaka liječenja te transplantacija organa može biti praćena brojnim komplikacijama iako mnogi bolesnici imaju uredan poslijeoperacijski tijek.

Transplantacija organa danas je prihvaćena i katkad jedina terapijska opcija za liječenje akutnog ili kroničnog zatajenja organa. Uspješna transplantacija omogućava novi život, ali i bolju kvalitetu života. Republika Hrvatska je od 2007. godine dio Eurotransplanta, neprofitne međunarodne mreže za poticanje, razmjenu i koordinaciju transplantacije organa u zemljama Europe što omogućuje i veću dostupnost transplantacija (3).

No, transplantacijska medicina sve više postaje žrtvom vlastitoga uspjeha zbog konstantnoga nedostatka organa za presađivanje kao i zbog starenja populacije u koju spadaju donori organa.

Najčešće se transplantiraju čvrsti organi:

- o bubreg,
- o jetra,
- o pluća,
- o srce,
- o gušterača.

Transplantacija tkiva odnosi se na:

- o kožu,
- o srčane valvule ili krvne žile,
- o rožnicu,
- o kosti.

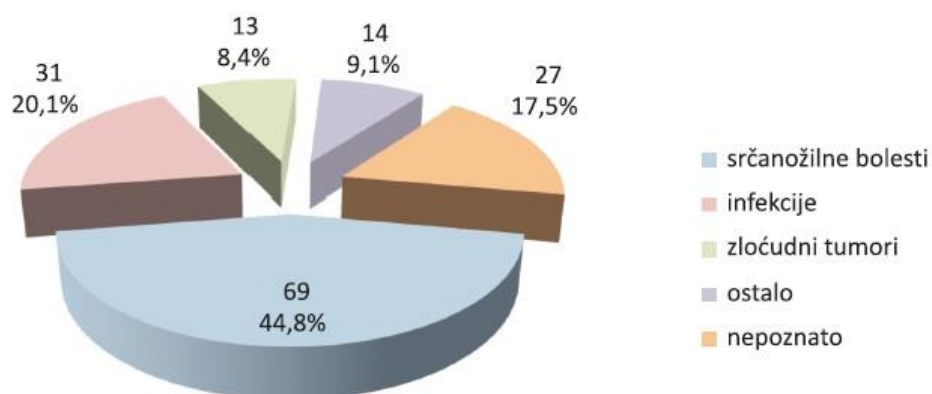
Transplantacije se mogu izvoditi s mrtvoga darivatelja (moždano mrtva osoba) ili donori mogu biti i žive osobe (dio jetre, bubreg). Hrvatska ima zakon tzv. pretpostavljenoga pristanka što znači da su svi građani Republike Hrvatske mogući darivatelji ako se za života nisu tome protivili. U svim europskim državama darivanje i presađivanje organa zakonski je regulirano pa tako i u Republici Hrvatskoj(3). Transplantacijski postupak jasno je definiran i provode ga samo visokospecijalizirani medicinski timovi u ovlaštenim bolnicama odnosno akreditiranim transplantacijskim centrima. Dodjela organa obavlja se prema bodovnom sustavu i medicinskim kriterijima dogovorno utvrđenima između država članica Eurotransplanta (4).

Također, gotovo sve religije podržavaju darivanje organa kao plemeniti čin te iskaz humanosti i solidarnosti. Tako je i papa Ivana Pavao II ostao zapamćen i po izjavi: "Sve što može poslužiti živomu grijeh je pokopati." (4).

Prava era transplantacije u svijetu započinje pedesetih godina dvadesetoga stoljeća s prvom transplantacijom bubrega (J. Murray) i koštane srži (D. Thomas), a kasnije i transplantacijom drugih organa (3). Ta dvojica znanstvenika i pionira transplantacijske medicine dobitnici su Nobelove nagrade za medicinu tek 1990. godine, nakon što je presađivanje dokazano kao učinkovita metoda na tisućama uspješno liječenih bolesnika. U Republici Hrvatskoj 1971. godine napravljena je prva transplantacija bubrega u Klinici za kirurgiju KBC-a Rijeka (3).

### 1.1.1. Komplikacije nakon transplantacije

Transplantacija odnosno presađivanje organa najbolje je nadomjesno liječenje kod zatajenja organa za većinu bolesnika, ali često može biti povezano i s razvojem komplikacija. Najčešći uzroci smrti bolesnika nakon transplantacije su srčanožilne bolesti, infekcije i zloćudni tumori kako u svijetu tako i u Hrvatskoj. Tome idu u prilog i objavljeni podatci KBC Rijeka sakupljeni tijekom razdoblja od 25 godina za pacijente s transplantiranim bubregom (Slika 1) (5).



**Slika 1.** Uzroci smrti u primatelja bubrežnog presađka u KBC Rijeka od 1985. do 2009. godine (5)

Nažalost, još je 1960-ih godina uočena pojava tumora kod pacijenata nakon transplantacije (6). Prijenos karcinogenih stanica s transplantiranim organom jedna je od vrlo ozbiljnih komplikacija transplantacije. U posljednjih dvadesetak godina malignost je postala treći najčešći uzrok smrti u bolesnika nakon transplantacije i ima tendenciju rasta. Učestalost smrti uzrokovane kardiovaskularnim bolestima ili infekcijama značajno se smanjuje zbog kombinacije probira, profilakse te upravljanja agresivnim faktorima rizika i intervencijskih terapija. Kod pacijenata nakon transplantacije sveukupni rizik od malignih tumora povećan je dva do tri puta u usporedbi s općom populacijom istog spola i dobi (7). Pacijenti nakon transplantacije pojedinih organa, npr. bubrega i jetre, imaju sličan rizik za razvoj tumora zbog imunosupresije, ali različit s obzirom na to da postoje razlike u primarnim bolestima kao i različitim ponašanjima tumora koje je svojstveno pojedinim tkivima. Zbog produljenja ljudskoga životnog vijeka dolazi i do starenja grupe darivatelja organa te se povećava rizik od prijenosa neuočenoga, subkliničkog tumora od donora na primatelja transplantata (8, 9).

Preživljavanje primatelja s tumorom (naročito zloćudnim tumorom) relativno je loše i mogućnosti liječenja su ograničene, ali rano otkrivanje prisustva tumora omogućuje pravovremeni tretman pacijenata i time smanjenje pobola i smrtnosti.

## 1.2. Tumori

Tumor je promjena u staničnim procesima koja uzrokuje nekontrolirani rast stanica ili tkiva. Maligna je bolest s mnogobrojnim molekularnim

uzrocima i konstantnom evolucijom. To je također iznimno heterogena bolest čak i kod pojedinca.

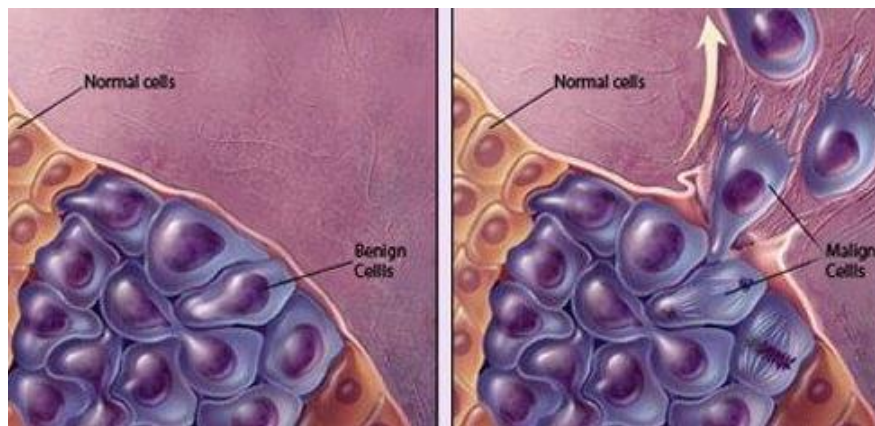
Pojedini geni kontroliraju životni ciklus stanica - rast, funkciju, diobu i smrt stanice. Ako su ti geni oštećeni izgubi se ravnoteža između rasta i smrti normalnih stanica. Nastanak tumorskih stanica uzrokuje oštećenje DNA što ima za posljedicu nekontrolirani rast stanica, a takve stanice mogu i napasti ostala tkiva.

Postoji velik broj čimbenika koji mogu uzrokovati oštećenje DNA i povećati rizik za razvoj tumora kao što su:

- o genske mutacije (npr. mutacije gena *BRCA1* i *BRCA2*),
- o okolišni čimbenici (npr. UV zračenje),
- o različiti mikrobi (bakterije kao npr. *Helicobacter pylori* ili virusi kao što su Epstein-Barr, HPV, hepatitis B i C),
- o način života i prehrane (nedostatak fizičke aktivnosti, pušenje, pretilost, konzumacija alkohola itd.) i
- o vjerojatno brojni drugi čimbenici kojima još nije dokazana takva povezanost (10, 11).

Većinom su stanice same sposobne detektirati i popraviti oštećenje DNA. Ako je stanica jako oštećena i ne može se samostalno popraviti obično se događa apoptoza, takozvana programirana smrt stanice. Tumor se pojavljuje kada oštećene stanice rastu, dijele se i abnormalno šire umjesto da se samouništavaju kao što bi trebale.

Tumor je abnormalna količina stanica i može biti benigni ili maligni tumor (Slika 2) (12).



**Slika 2.** Benigni (lijevo) vs. maligni tumori (desno) (12)

Benigni tumori rastu lokalno, ne šire se i ne smatraju se rakom iako mogu biti opasni posebice ako vrše pritisak na vitalne poput mozga. Maligni tumori imaju sposobnost širenja i napadanja drugih tkiva u organizmu. Taj proces se naziva metastaziranje i glavno je svojstvo raka. Stanice raka iz originalnoga, primarnog, tumora mogu se proširiti na druga mjesta kao što su pluća, kosti, jetra, mozak i druga područja preko limfnog sustava, krvotoka ili lokalnom infiltracijom te mogu zahvatiti i više organa. Ti metastatski tumori su "sekundarni rak" jer nastaju iz primarnoga tumora i zadržavaju ime primarnoga raka. Postoje brojni različiti tipovi malignosti ovisno o tome odakle tumor potječe. Metastaziranje je značajno iz razloga što pomaže određivanju stadija raka te njegova liječenja. Neki tipovi metastaziranoga raka su izlječivi, ali većina nažalost nije (11).



### 1.2.1. Tumori kod pacijenata s transplantiranim čvrstim organom

Iako se u većini znanstvenih radova navodi da je pojavnost tumora u pacijenata nakon transplantacije uglavnom rijetka, posljednjih godina frekvencija raste zbog sve većega broja transplantacija kao i zbog napretka tehnologija za identifikaciju i detekciju tumora.

Prema dostupnim podacima smatra se da je pojavnost tumora u transplantiranih pacijenata između 4 % i 18 %, a onog koji potječe od donora između 0,02 % i 0,2 % (13, 14). Znanstvena literatura navodi informacije o prijenosu od donora na primatelja raznovrsnih malignih bolesti kao što su melanom, koriokarcinom, neuroendokrini tumori, adenokarcinomi pluća, kolorektalni karcinom, karcinomi prostate, bubrega i gušterače itd. (7). Rizik za rak je dva do četiri puta veći u transplantiranih pacijenata nego kod osoba sličnoga geografskog podrijetla uparenih po godinama, spolu i rasi. Ne samo što su tumori česti već su i puno agresivniji te povećavaju smrtnost transplantiranih pacijenata u usporedbi s općom populacijom. Relativni rizik se mijenja s godinama odnosno smanjuje se što je osoba starija. Također, u nekoliko slučajeva utvrđen je prijenos tumora od donora na nekoliko primatelja različitih organa istoga donora (15, 16, 17, 18). Tijekom godina životni vijek primatelja čvrstih organa kao i stopa preživljenja pacijenata s transplantiranim organom značajno je produljen i poboljšan zahvaljujući naprednoj imunosupresivnoj terapiji. Međutim, kronična uporaba tih lijekova dovela je i do toga da je malignost koja se može pojaviti nakon transplantacije postala jedan od vodećih uzroka pobola (10).

### 1.2.2. Klasifikacija tumora nastalih nakon transplantacije

Pacijenti s transplantiranim organom u usporedbi s općom populacijom imaju povećani rizik za razvoj širokoga spektra tumora (neovisnih ili povezanih s infekcijama), a problem je što se tumori obično ispoljavaju u uznapredovalom stadiju. Kod različitih tipova tumora koji se pojavljuju kod pacijenata nakon transplantacije iznimno je važno razumijevanje različitih situacija koje definiraju tipove rizika za razvoj tumora. Za posttransplacijski se tumor smatra da ovisno o podrijetlu i patogenezi može nastati na četiri različita načina(8):

- Rekurentni tumor primatelja

Rekurentni tumor u slučaju pacijenata nakon npr. transplantacije jetre obično uključuje kolangiokarcinom, hepatocelularni karcinom i vanjetrenih karcinom koji su prethodno postojali kod pacijenta odnosno primatelja organa i bili indikacija i razlog transplantaciji jetre.

- Tumor prenesen od davatelja organa

To je tumor koji je prisutan u organu donora prilikom transplantacije i koji usprkos velikoj pažnji može promaknuti tijekom probira davatelja. To se može vrlo učinkovito izbjeći s pomoću programa kojima se kvalitetno pridaje pažnja povijesti bolesti, ispitivanjima i istraživanjima tako da je pojavnost takvoga tumora općenito niska (npr. u SAD-u rizik je do 1 %).

- Tumor koji potječe od donora

Kod transplantiranih pacijenata tumor se razvija nakon transplantacije i može se dokazati da tumorske stanice potječu od davatelja organa.

- *De novo* tumor

*De novo* tumori pojavljuju se u većini slučajeva kojima je posljedično uzrok smrti karcinom kod svih vrsta transplantacije i razvijaju se pod utjecajem imunosupresije, a obično su izazvani virusima.

Klasifikacija tumora nakon transplantacije čvrstoga organa prema podrijetlu i patogenezi prikazana je u Tablici 1 (19).

**Tablica 1.** Klasifikacija tumora nakon transplantacije čvrstog organa prema podrijetlu i patogenezi (19)

**De novo (novi tumor nevezano uz transplantirani organ)**

Nemelanomski rak kože i maligni melanom

Kaposijev sarkom

PTLD (Posttransplantacijski limfoproliferativni poremećaj)

Anogenitalni rak

Rak pluća

**Tumor koji potječe od donora (prethodno postojeći kod donora ili de novo nastao u donorskom tkivu)**

Karcinom renalnih stanica

Adenokarcinom pankreasa

Maligni melanom

Koriokarcinom

**Rekurentni ili prethodno postojeći tumor u primatelja**

Hepatocelularni karcinom

Kolangiokarcinom

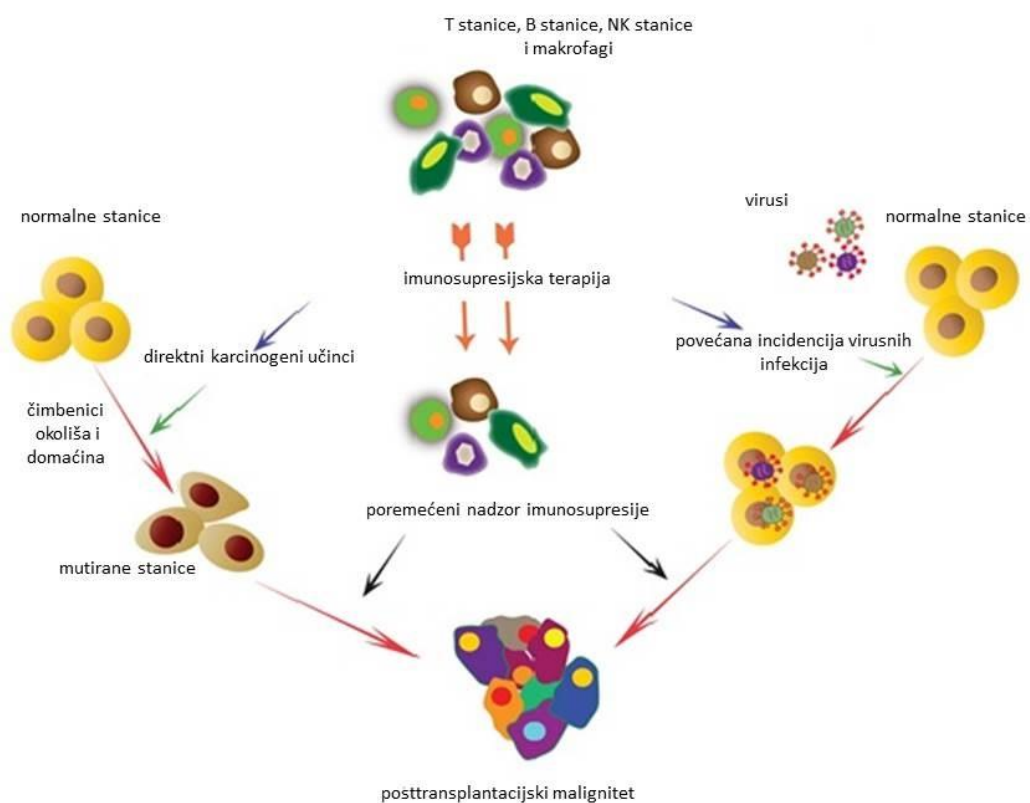
Neuroendokrine metastaze

Maligni melanom

Angiosarkom srca

### 1.2.3. Etiologija i patogeneza posttransplantacijskih tumora

Razlozi povećanoga rizika pojave tumora nakon transplantacije vjerojatno su i rezultat međudjelovanja različitih čimbenika kao što su: transplantirani organ, izloženost virusnim infekcijama, ukupna količina i trajanje imunosupresijske terapije, kao i možebitna specifična komponenta imunosupresijske terapije i slično (7). Dugotrajna uporaba imunosupresivne terapije koja rezultira oslabljenim imunskim nadzorom tumorskih stanica, izravnim karcinogenim učinkom i nekontroliranom proliferacijom stanica inficiranih onkogenim virusima ima značajnu ulogu u patogenezi posttransplantacijskih tumora (Slika 3) (19).



**Slika 3.** Grafički prikaz etiologije i patogeneze tumora nakon transplantacije čvrstih organa (19)

### 1.3. Identifikacija podrijetla tumora - molekularna dijagnostika

Molekularna dijagnostika predstavlja skup tehnika koje se koriste za analizu bioloških biljega u genomu i proteomu primjenom metoda molekularne biologije u medicinskim testiranjima. Različite tehnike se koriste za dijagnozu i praćenje bolesti, detekciju rizika te određivanje individualizirane terapije u pacijenata.

Uloga molekularne dijagnostike u modernoj medicini značajno raste zadnjih nekoliko desetljeća i povećava se njena primjena u brojnim područjima, a naročito u onkologiji, farmakogenomici te kod infektivnih bolesti (20, 21, 22).

U slučajevima kad se pojavi tumor u pacijenta nakon transplantacije organa naročito je važno poznavanje vrste i podrijetla tumora jer to može pomoći u razvijanju protokola prevencije i ranog otkrivanja te učinkovitoga liječenja kako bi se smanjila smrtnost uzrokovana malignom bolešću. Ako postoji sumnja da tumor potječe od donora, potrebno je što brže napraviti dijagnostiku (23, 24).

U prošlim vremenima, dijagnostika podrijetla tumora rađena je histološkom usporedbom. U sedamdesetim godinama prošloga stoljeća uvedena je citogenetička metoda u svrhu kariotipizacije i identifikacije za slučajeve u kojima su davatelj i primatelj organa bili različitoga spola. Također, ako su u uzorcima tumora postojale kromosomske nepravilnosti one su bile vrlo korisna informacija. U novije vrijeme korištena je metoda fluorescentne *in situ* hibridizacije (engl. *Fluorescent in situ hybridization*; FISH) ili druge suvremenije molekularne metode. FISH je popularna metoda jer koristi izravnu vizualizaciju specifičnih sonda pomoću fluorescentnog mikroskopa. Na

taj su način identificirani tumori ako su primatelj i davatelj organa različitoga spola (XX ili XY) (26, 27).

Značajnim razvojem tehnologije i primjenom znanstvenih postignuća i druge molekularne metode temeljene na analizi nukleinskih kiselina uvedene su radi unaprjeđenja dijagnostike. Tako se prvo počela primjenjivati RFLP tehnika (engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*). RFLP koristi restrikcijske enzime za dobivanje karakterističnih fragmenta DNA koji se zatim razdvajaju elektorforezom ili detektiraju hibridizacijskom metodom. Iako je RFLP osjetljiva metoda, ona je dugotrajna, prilično naporna i zahtjeva relativno velike količine DNA u usporedbi s modernim metodama analize DNA koje su uslijedile. Puno osjetljivija i bolja metoda za dijagnostiku, neovisno o spolu darivatelja i primatelja organa, jest analiza mikrosatelitskih biljega DNA poznatija kao "DNA fingerprinting" (28, 29).

Ono što je nekada bilo predstavljeno kao dijagnostički izazov u današnje vrijeme s izraženim razvojem tehnologije i primjenom modernih molekularno-genetskih analiza postalo je relativno jednostavno i sve je veći broj publikacija koje uključuju molekularnu dijagnostiku u identifikaciji tumora u pacijenata nakon transplantacije (23, 30-32). Molekularno dijagnostički testovi znatno se razlikuju po osjetljivosti, vremenu potrebnom za analizu, cijeni, specifičnosti i regulativi primjene.

Za potrebe istraživanja tumora razvijene su mnoge tehnologije za detekciju varijacija u sekvenci koje se mogu klasificirati u tri skupine ovisno o pristupu: lančana reakcija polimeraze (PCR), hibridizacija i masivno paralelno sekvenciranje koje je nekad poznatije pod nazivom sekvenciranje novih generacija (engl. Next-

*generation sequencing*; NGS). Značajna primjena nove tehnologije sekvenciranja će tek uslijediti u kliničkoj dijagnostici. U budućnosti će se dijagnostika tumora najvjerojatnije fokusirati na sekvenciranje zbog mogućnosti dobivanja velike količine korisnih informacija i detekciju rijetkih varijacija sekvence u genima povezanim s tumorom u kratkom vremenu i za relativno prihvatljivu cijenu. Ta se metoda također može koristiti i kao sredstvo za procjenu rizika. S obzirom na to da je karcinom vremenski dugoročna bolest s različitim stupnjevima progresije i nema uvijek jasnu sliku i simptome, molekularna dijagnostika može se koristiti za prognozu napredovanja i razvoja tumora (33, 34).

Još su 1992. godine Wilson i suradnici objavili rad u kojem je prvi put korištena analiza DNA za identifikaciju malignih stanica melanoma nakon transplantacije bubrega (35). Slijedio je rad Beckingham i suradnika iz 1994. godine u kojem je prikazana postmortalna identifikacija podrijetla metastatskog tumora tipizacijom DNA nakon transplantacije bubrega (36). Također, uspješna uporaba forenzičke analize DNA radi razjašnjenja podrijetla zloćudnog tumora napravljena je 1998. godine na Institutu za sudsku medicinu u Kölnu. U oba analizirana slučaja pojavio se metastatski maligni melanom nakon transplantacije bubrega od istog donora. Utvrđeno je da se tumor genetski razlikuje od primatelja, ali se podudara s donorom (37).

S obzirom na to da je analizom DNA moguće pouzdano utvrditi potječe li tumor od donora transplantiranog organa ili od primatelja temeljem tih rezultata moguće je osmisliti daljnje upravljanje antitumorskom terapijom s ciljem izlječenja, produljenja života i poboljšanja kvalitete života pacijenta. Utvrđivanje podrijetla tumora ima važne kliničke posljedice, uključujući ukidanje imunosupresijske terapije

i/ili retransplantaciju organa, a također ima implikacije i na druge primatelje organa istoga donora (6, 13, 23).

Možda najveći izazov u identifikaciji podrijetla tumora predstavlja sam uzorak jer se obično radi o tkivu fiksiranom formalinom i uklopljenom u parafinski blok (engl. *Formalin Fixed Paraffin Embedded Tissue*; FFPE). Takvi uzorci predstavljaju lako dostupni izvor za proučavanje različitih biljega (38). Budući da ispitivanje molekularne onkologije postaje sve važnije za donošenje prognostičkih i terapijskih odluka, a uzorci tkiva postaju sve manji (zbog sve ranijeg otkrivanja sumnjivih lezija i uporabe metoda aspiracije tankim iglama) postaje sve teže dobiti pouzdane rezultate ispitivanja pa su razvijene naprednije metode izolacije DNA (39). Ohrabruje i potvrda da nema značajne razlike između makromolekula (DNA, RNA i proteini) izoliranih iz blokova pohranjenih tijekom 11-12 godina, 5-7 godina ili 1-2 godine u odnosu na blokove tekuće godine (40).

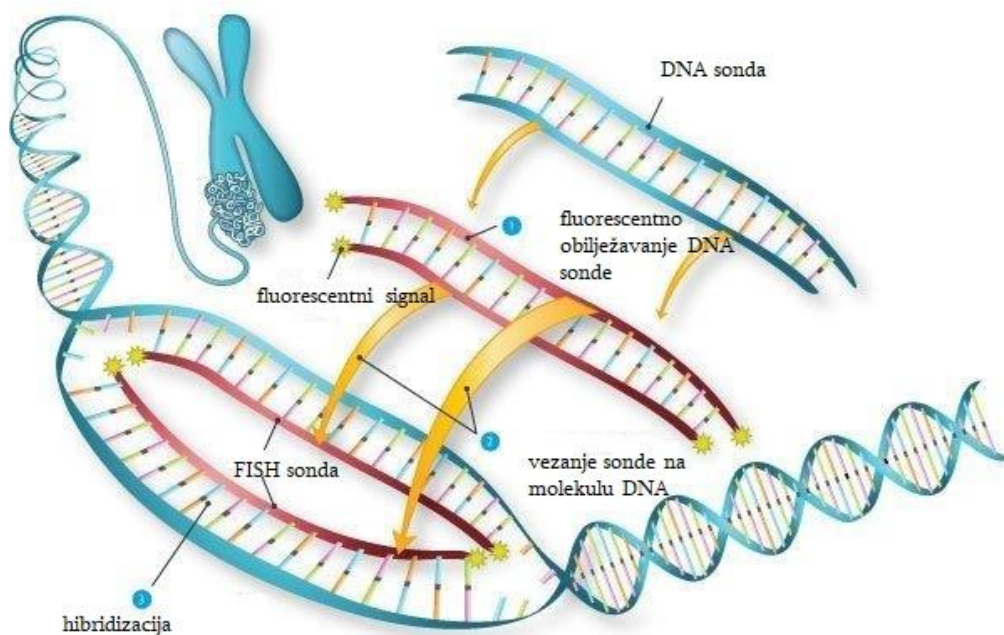
#### 1.3.1. Fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH)

FISH je metoda analize koja omogućava detekciju specifičnih ciljnih sekvenci unutar stanice uz istovremeno očuvanje stanične i tkivne morfologije. Osnova metode je princip komplementarnosti. Denaturirana oligonukleotidna sonda se hibridizira točno na komplementarnu ciljnu sekvencu nukleinske kiseline. Ciljna regija može biti dio gena, gen, specifična kromosomska regija ili cijeli kromosom. S obzirom na to da se hibridizacija odvija unutar stanice gdje se ciljne molekule DNA ili RNA normalno nalaze, naziva se *in situ* odnosno "na uobičajenom mjestu". Detekcija i vizualizacija rezultata izvodi se pomoću

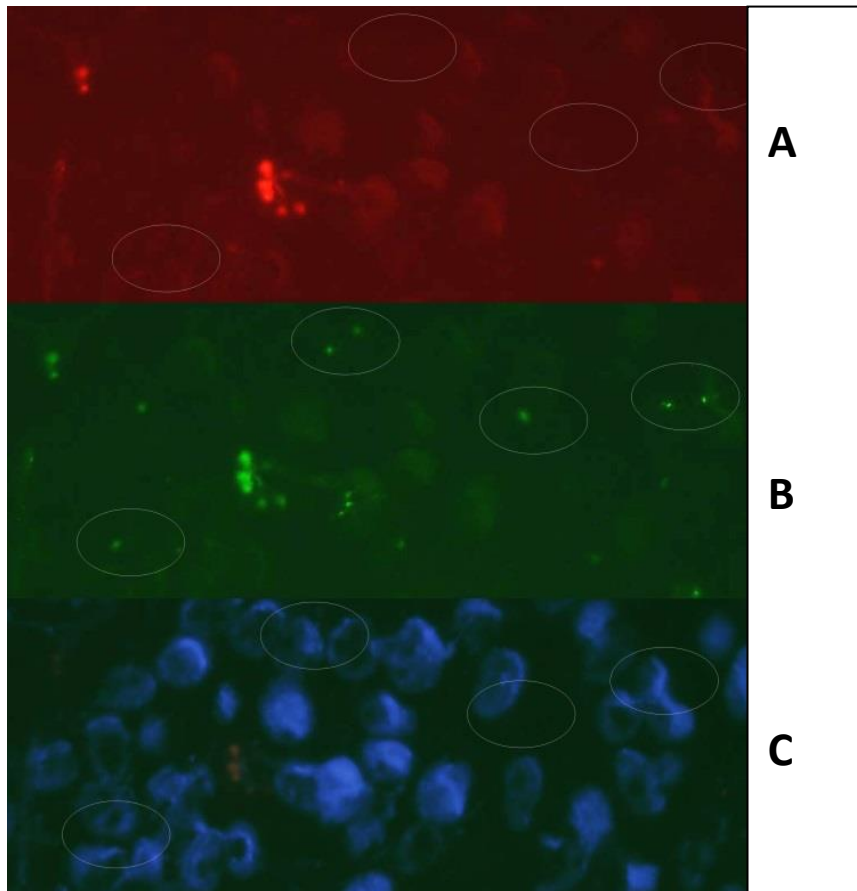


fluorescentnoga mikroskopa (41). Postoji veliki broj različitih tipova FISH sonde koje se upotrebljavaju kao npr. centromerne sonde, sonde za jedinstvene sekvence kromosoma, telomerne sonde, sonde za bojenje cijelih kromosoma, multipleks sonde za dobivanje višebojnog kariotipa itd. FISH tehnika ima vrlo široku primjenu u dijagnostici, a koristi se i za detekciju tumorskih stanica (42,43).

Velika prednost ove metode je što se može primjeniti za analizu različitih vrsta uzoraka. Uzorci mogu biti svježi, svježe smrznuti, arhivski citološki razmazi ili tkiva fiksirana formalinom i uklopljena u parafinski blok. Shematski prikaz ove metode nalazi se na Slici 4 (44), a primjer rezultata na Slici 5 (45).



**Slika 4.** Shematski prikaz FISH tehnike. DNA sonda je obilježena fluorescentnim biljekom. Sonda i ciljna DNA se denaturiraju i sonda se veže na ciljnu DNA odnosno dolazi do hibridizacije. Fluorescentni biljekom se zatim detektira fluorescentnim mikroskopom (44)



**Slika 5.** Primjer rezultata analize FISH metodom (45)

A - kromosom Y, B - kromosom X i C - bojanje fluorescentnom bojom DAPI (4',6-diamidin-2'-fenil-indol dihidroklorid) za detekciju dvolančane DNA pri čemu nastaju specifični čvrsti fluorescentni DNA-DAPI kompleksi

FISH tehnika također ima svoja ograničenja uključujući osjetljivost, hibridizacijske probleme te pojavu različitih artefakata, kao i gubitak spolnih kromosoma kod leukemijskih klonova. Najveći nedostatak je što ne može razlučiti podrijetlo tumora ako su primatelj i davatelj istoga spola.

### 1.3.2. Analiza DNA - DNA fingerprinting

Analiza DNA izrazito je moćna metoda za utvrđivanje identiteta tkiva kao i mnogih drugih različitih uzoraka zbog visoke osjetljivosti, brzine i pouzdanosti. U slijedu nukleotida u DNA postoje polimorfizmi koji se zasnivaju na supstitucijama, delecijama i insercijama baza i polimorfizmi varijabilnoga broja tandemskih ponavljanja (engl. *Variable Number of Tandem Repeats*; VNTR). U svakom lancu DNA postoje identične sekvence koje se tandemski ponavljaju. Osamdesetih je godina prošloga stoljeća Sir Alec Jeffreys otkrio da broj tih ponavljajućih sekvenci varira kod pojedinaca te zaključio da se takva tandemski ponavljanja mogu iskoristiti kao polimorfne oznake, to jest kao DNA biljezi i koristiti kao identifikacijsko sredstvo (28, 29, 46). Ono što je do tog vremena u sudskoj medicini i kriminalistici bio klasični otisak prsta sada je zamijenio genotip odnosno "otisak DNA" (engl. *DNA fingerprinting*) (Slika 6) (45).



**Slika 6.** DNA predstavlja moderni otisak prsta (45)

Genotipizacijom DNA moguće je identificirati porijeklo bilo kojega biološkog uzorka. Također, moguće ga je i individualizirati što znači točno odrediti od koje osobe/jedinke potječe te izračunati biostatističku vjerojatnost. Materijal za analizu može biti bilo kakav uzorak koji sadrži DNA kao na primjer krv, slina, tkiva, kosti, dlake, zubi, različite vrste briseva, mrlja, forenzičkih ili medicinskih preparata, čak i muzejski eksponati.

U primjeni analize DNA u forenzici i kliničkoj genetici najviše se koriste STR (engl. *Short Tandem Repeat*) polimorfni lokusi koji sadrže kratke ponavljajuće sekvence uobičajene duljine ponavljajuće jedinice od dva do šest parova baza (47). Takve sekvence nazivaju se još i mikrosateliti. Mikrosateliti su raspodjeljeni jednakomjerno po cijelom genomu i gotovo na svakih 300 do 500 kb može se pronaći jedan polimorfni STR lokus (47, 48).

Analizom STR lokusa moguće je odrediti genotip uzorka tumora i na taj način identificirati njegovo podrijetlo. To podrazumijeva primjenu nekoliko metoda, a započinje izolacijom DNA iz uzorka tumora (tkivo, tkivo uklopljeno u parafinski blok, histološki preparat) kao i iz nespornih uzoraka darivatelja i primatelja transplantiranog organa. Izoliranu DNA potrebno je kvantificirati te umnožiti STR polimorfne lokuse korištenjem metode lančane reakcije polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR). PCR je metoda kojom se kalup DNA umnožava u termobloku korištenjem sintetiziranih početnica, enzima DNA-polimeraze i dNTP-a. Reakcijska smjesa se umnožava u nekoliko ciklusa (obično 25 do 30) koji se odvijaju pri tri različite temperature pri kojima se događaju denaturacija, prijanjanje početnica i elongacija. U svakom se ciklusu količina ciljne sekvence udvostručuje. Za PCR je potrebna mala količina DNA (oko 50-100 pg). S

obzirom na to da su i umnoženi fragmenti duljine oko 100-400 parova baza analiza STR lokusa može se primjeniti i na djelomično degradiranu DNA (49). Amplificirani fragmenti DNA razdvoje se elektroforezom nakon čega slijedi interpretacija dobivenih rezultata. Sredinom devedesetih godina prošlog stoljeća počela je primjena fluorescento obilježenih biljega i automatska analiza što je poboljšalo preciznost, točnost i osjetljivost metode (50).

Korištenjem novih kompleta za kvantifikaciju DNA pomoću lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *Real-Time PCR*) moguće je odrediti omjer muške i ženske frakcije u uzorku što je iznimno korisno ako su donor i primatelj organa različitoga spola.

**Cilj istraživanja**

Cilj ovoga specijalističkog rada jest prikupiti i sveobuhvatno prikazati relevantne literaturne podatke i spoznaje te dosadašnja saznanja o molekularnoj dijagnostici u identifikaciji podrijetla tumora u pacijenata nakon transplantacije.

Također, s obzirom na različite mogućnosti nastajanja tumora u transplantiranih pacijenata (prijenosom od donora transplantiranoga organa na primatelja, tumora proizašloga od donora, rekurentnoga tumora ili tumora nastalog *de novo*), cilj je istraživanja opisati važnost i svrhovitost identifikacije podrijetla tumora jer omogućuje bolje upravljanje liječenjem te značajno doprinosi poboljšanju kvalitete i produljenju života pacijenata.

**Materijali i metode**



Napravljeno je sveobuhvatno pretraživanje publikacija u bazi Medline (preko sučelja PubMed) u zadnjih dvadeset godina (razdoblje od 2000. do kraja 2019.) prema ključnim riječima: *solid organ transplantation, donor derived malignancy, tumor transmission, tumor origin, DNA analysis, microsatellite analysis i DNA fingerprinting* te njihovom kombinacijom kao i različitim varijantama pisanja riječi na engleskom jeziku (engl. *spelling*). Pretraga je upotpunjena provjerom liste referenci u identificiranoj relevantnoj literaturi što je znatno doprinjelo ukupnoj kvaliteti izbora radova. U obzir su uzeti radovi na engleskom i hrvatskom jeziku koji su besplatno dostupni u cjelosti. Pretraživanje je obuhvatilo pregledne i originalne znanstvene radove te stručne radove koji daju pregledni prikaz i/ili analizu tumorskoga podrijetla u transplantiranih pacijenata te terapijski pristup u navedenim slučajevima kao i smjernice u upravljanju tumorskom bolešću kod pacijenata nakon transplantacije.

Rezultati i rasprava

#### 4.1. Tumori kod pacijenata s transplantiranim čvrstim organom

Najčešći tumori koji se pojavljuju nakon transplantacije su: limfoproliferativni poremećaj nakon transplantacije - PTLD (engl. *Post-transplantation lymphoproliferative disorder*), tumor pluća, hepatocelularni i renalni, a statistika pojavnosti u SAD-u prikazana je u Tablici 2 (10).

**Tablica 2.** Najčešći tumori i njihova pojavnost nakon transplatnacije u Sjedinjenim Američkim Državama (10)

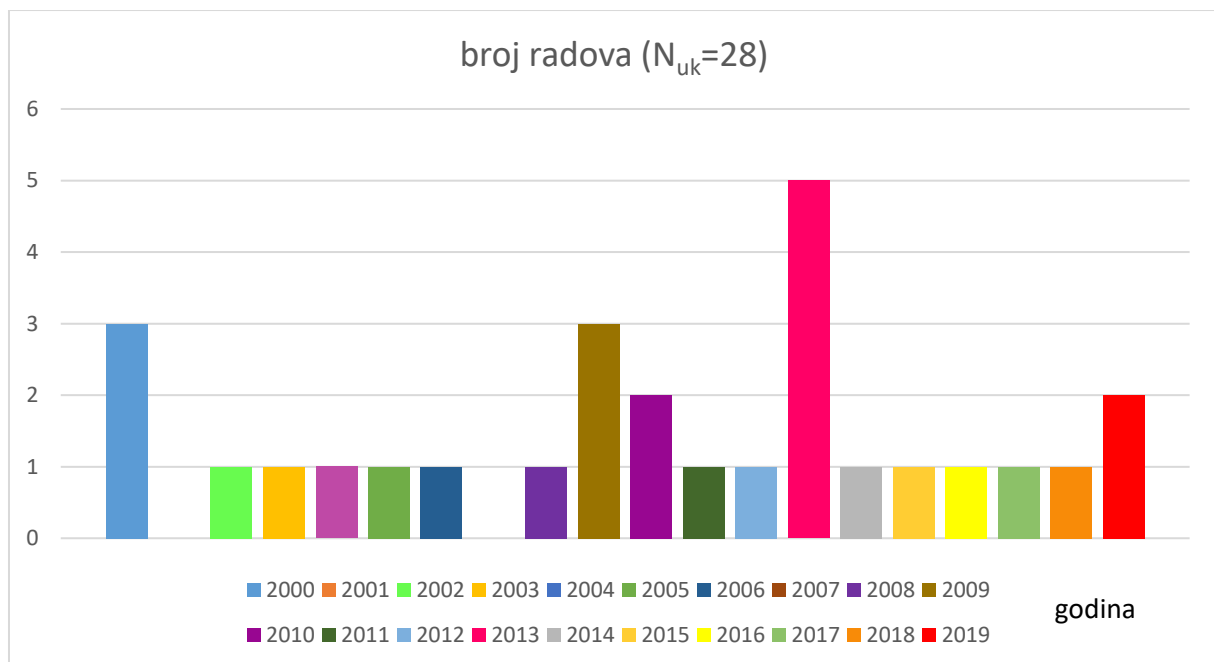
tip tumora	pojavnost na 10.000 ljudi godišnje
Rak kože	23,7
Kaposijev sarkom	15,5
PTLD	194,0
Pluća	173,4
Jetra	120,0
Bubreg	97,0

Patogeni mehanizmi koji se najvjerojatnije odvijaju u donora još uvijek su nedovoljno poznati i razjašnjeni, ali je predloženo nekoliko hipoteza koje obuhvaćaju moguće okolišne čimbenike, prijenos onkogenoga materijala kao i virusne infekcije uzrokovane npr. Epstein Barr virusom (10,19).

## 4.2. Molekularna dijagnostika podrijetla tumora

### 4.2.1. Pregled publikacija u razdoblju od 2000. do 2019. godine

Nakon temeljitog i sveobuhvatnog pretraživanja publikacija u bazi Medline (preko sučelja PubMed), čitanja i pregleda publikacija te provjerom liste referenci u identificiranoj relevantnoj literaturi, odabrano je ukupno 28 radova koji su zadovoljavali postavljene kriterije. Distribucija objavljenih radova prema godinama objavljivanja prikazana je na Slici 7.



**Slika 7.** Distribucija radova dobivenih pretraživanjem prema godini publikacije

Tijekom pretraživanja nađeno je nekoliko članaka zanimljivih naslova i tematike, ali nisu bili dostupni u cjelosti, pristup im je bio ograničen ili je bilo neophodno plaćanje pa stoga nisu uzeti u obzir za potrebe ovoga rada. Osim toga, obrađeni su isključivo radovi u kojima pojavi tumora prethodi transplantacija čvrstog organa (jetra, bubreg i sl.). Najveći broj radova objavljenih u jednoj godini je pet i to 2013. godine dok za 2001. i 2007. godinu nisu nađene publikacije koje bi zadovoljavale kriterije pretraživanja.

#### 4.2.2. Primjena analize DNA

U zadnjih dvadesetak godina analiza DNA sve više se primjenjuje u raznim područjima, a posebno u medicini pa je sukladno tome i očekivan porast broja publikacija u kojima se predstavlja identifikacija porijekla tumora korištenjem analize DNA. Ali, čini se da to nije slučaj. Molekularna dijagnostika podrijetla tumora u transplantiranih pacijenata nakon transplantacije organa primijenjena je u relativno malom broju slučajeva koji su u literaturi prikazani uglavnom kao *case report* članci odnosno opisuju po jedan konkretni slučaj. Također, tehnike i metode analize DNA korištene u objavljenim radovima čini se da su odraz korištenja dostupnih metoda iz već postojećih resursa. Nije uočena poveznica između godine kada je objavljeno najviše radova (2013. godine) i eventualnoga događaja kao npr. pojava nekoga osjetljivijeg ili jeftinijeg komercijalno dostupnog kompleta i/ili razvoja tehnologije.

#### 4.2.3. Prikaz rezultata analize DNA

U 71 % radova (20) prikazani su i rezultati analize DNA i to na različite načine - tablicom koja prikazuje genotipove, priloženi su original elektroferogrami, slike gela na kojem su elektroforezom razdvojeni dobiveni aleli (9, 13, 14, 16, 18, 23, 30-32, 51-54). U nekoliko radova metoda je opisana površno i rezultati su prikazani parcijalno, ali su navedeni (26, 56-60).

U radovima u kojima je dobro opisana metodologija uočen je širok spektar i raznolikost primijenjenih metoda kao što su:

1. radioaktivno obilježavanje i detekcija na filmu nakon elektroforeze (30),
2. vizualizacija bojanjem srebrnim nitratom nakon razdvajanja fragmenata DNA elektroforezom na poliakrilamidnom gelu (14,18),
3. korištenje komercijalnih kompleta s fluorescentno obilježenim početnicama te razdvajanje i detekcija alela pomoću automatskog sekvencera i CCD kamere (engl. *Charge Coupled Device*) te obrada podataka prigodnim softverom (9,16,23,32, 51-54)
4. metoda analize krivulje taljenja DNA (55).

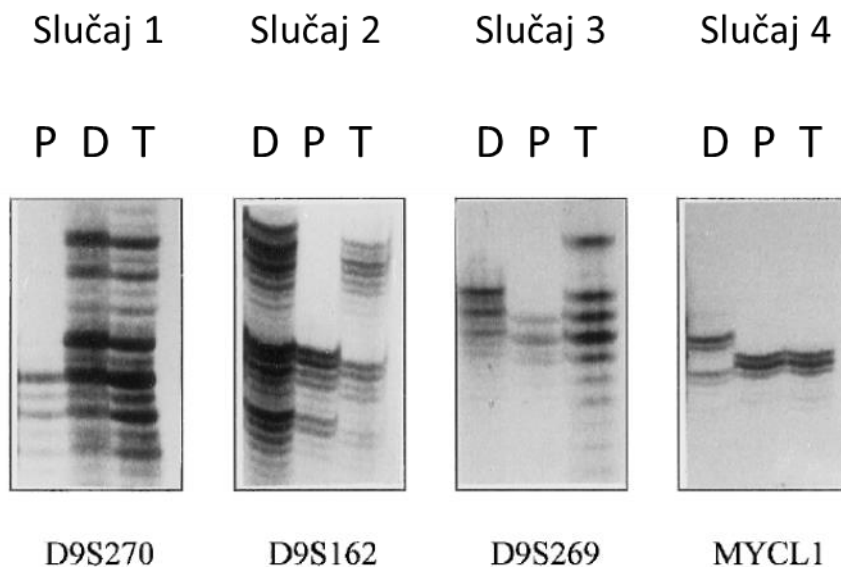
FISH tehnika ovdje nije posebno navedena s obzirom na to da nije univerzalno pogodna i primjenjiva za identifikaciju odnosno individualizaciju porijekla tumora zbog ograničenja njene primjene

isključivo na slučajeve u kojima su donor i primatelj organa osobe različitoga spola.

U 29 % obrađenih radova (8) nisu prikazani rezultati, a u nekima nema niti objašnjenja metode i postupka (9, 17, 61-66). U njima je analiza DNA obično spomenuta u jednoj rečenici kao dokaz da tumor potječe od donora organa u stilu "proven by DNA microsatellite" ili "polymerase chain reaction amplification: 79 % of cells of donor origin" (17, 65).

Iz prikupljenih radova može se vidjeti kronološki razvoj i napredak tehnologije kao i osjetljivost pojedinih primijenjenih metoda. Tako je u radu Ng i suradnika iz 2000. godine primijenjena starija metoda analize DNA u kojoj je korišteno obilježavanje početnica s radioaktivnim fosforom [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P] što je tih godina bila već pomalo napuštena metoda zbog štetnosti zračenja (30). Obrađena su četiri slučaja limfoproliferativnih poremećaja nakon transplantacije (PTLD) koji su se razvili nakon transplantacije čvrstoga organa. To je skupina heterogenih bolesti koje se javljaju u oko 2 do 3 % pacijenata nakon transplantacije solidnih organa. Korištena je analiza mikrosatelitnih visokopolimorfni biljega na uzorcima tkiva uklopljenoga u parafin i uspješno je određeno podrijetlo tumorskih stanica za sve analizirane uzorke. Ukupno je analizirano osam polimorfni lokusa smještenih na kromosomima 1 i 9 koji sadrže dinukleotidna i tetranukleotidna ponavljanja s visokim postotkom heterozigotnosti (Slika 8). U tri od četiri slučaja utvrđeno je da tumorske stanice potječu od donora organa dok je u jednom slučaju PTLD potjecao od primatelja. Budući da

primatelji presadka imaju i limfocite donora i primatelja, PTLD potencijalno može nastati iz limfoidnoga tkiva donora ili primatelja.



**Slika 8.** Rezultati analize mikrosatelitskih biljega za četiri slučaja

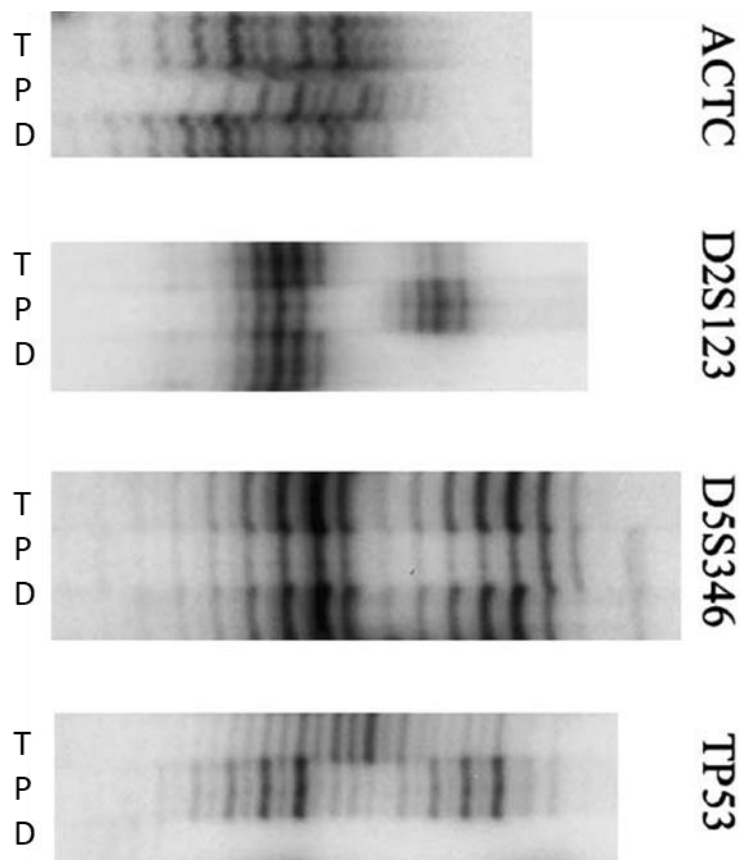
Oznake: P-primatelj organa; D-donor organa; T-tumor (30)

U slučajevima 1, 2 i 3 rezultati analize DNA uzorka tumora podudaraju se odnosno odgovaraju (engl. *matched*) rezultatima dobivenim za donora organa dok u slučaju 4 odgovaraju primatelju organa.

Također, napravljen je i literaturni pregled do tada objavljenih radova u kojima su prikazani slučajevi PTLD, a za koje je korištena analiza mikrosatelita radi određivanja podrijetla tumora. Nađeno je ukupno 27 slučajeva i za 16 slučajeva (59 %) je utvrđeno da je podrijetlo tumorskih stanica od primatelja, a za 11 (41 %) da potječu od donora organa. Određivanje podrijetla tumorskih stanica ne omogućava samo rješenja njihovoga mogućeg patogenetskog mehanizma nego i daje prognostičke smjernice u kliničkom vođenju bolesnika.



Iste je godine objavljena slična metoda, a za razdvajanje umnoženih fragmenata korištena je gel-elektroforeza (18). Vizualizacija je napravljena bojanjem srebrnim nitratom što je tada bila često korištena metoda jer je jednostavna i ekonomična iako vremenski zahtjevna. Iz rezultata prikazanih na Slici 9 vidljivo je da je određivanje dobivenih genotipova bilo prilično zahtjevno, ali izvedivo. Idući rezultat je dobiven za uzorke tumora i donora, a različit za primatelja organa.



**Slika 9.** Rezultati za četiri analizirana mikrosatelitska biljega  
Oznake: P-primatelj organa; D-donor organa; T-tumor (18)

Iz 2003. godine datira rad Lipshutza i suradnika na prilično neobičnom slučaju (51). Nakon izvršene transplantacije jetre, prilikom obdukcije kod donora jetre te histološkim pregledom, utvrđen je adenokarcinom pluća nakon čega je napravljena hitna retransplantacija unutar tjedan dana. Nažalost, primatelj je unatoč brznoj retransplantaciji razvio metastaze plućnog adenokarcinoma koje su otkrivene 11 mjeseci kasnije. Analiza STR lokusa za uzorke primatelja, donora dvije jetre i posttransplantacijskoga tumora potvrdila je da tumorske stanice potječu od prvoga donora. Analiza DNA napravljena je korištenjem komercijalnog PowerPlex 16 System kompleta koji obuhvaća analizu 15 polimorfnih autosomalnih lokusa plus amelogenin, biljeg kojim je moguće odrediti spol. Američki znanstvenici u svom su radu koristili automatski sekvencer za razdvajanje umnoženih fragmenata DNA na poliakrilamidnom gelu. Detekcija dobivenih alela obilježenih fluorescentnim bojama automatizirana je i upotrebljava CCD kameru ugrađenu u sekvencer. Analizirani su uzorci tumora (T1 i T2), uzorci donora prve (D1) i retransplantirane jetre (D2) (Tablica 3 i Slika 10). Zanimljiva je pozadina slučaja i korištene su recentne metode, ali je vrlo nejasna prezentacija rezultata (Tablica 3) s obzirom na to da nisu prikazani kompletni genotipovi nego prilično diskutabilni brojevi o informativnosti pojedinih lokusa za određene uzorke. Takav je prikaz vrlo neuobičajen. Zaključeno je da tumorske stanice potječu od prvog donora jer "niti jedan od sedam informativnih alela za donora 2 nisu detektirani". Iako je zaključak vjerojatno točan, prezentacija i objašnjenje rezultata nisu bili koherentni.

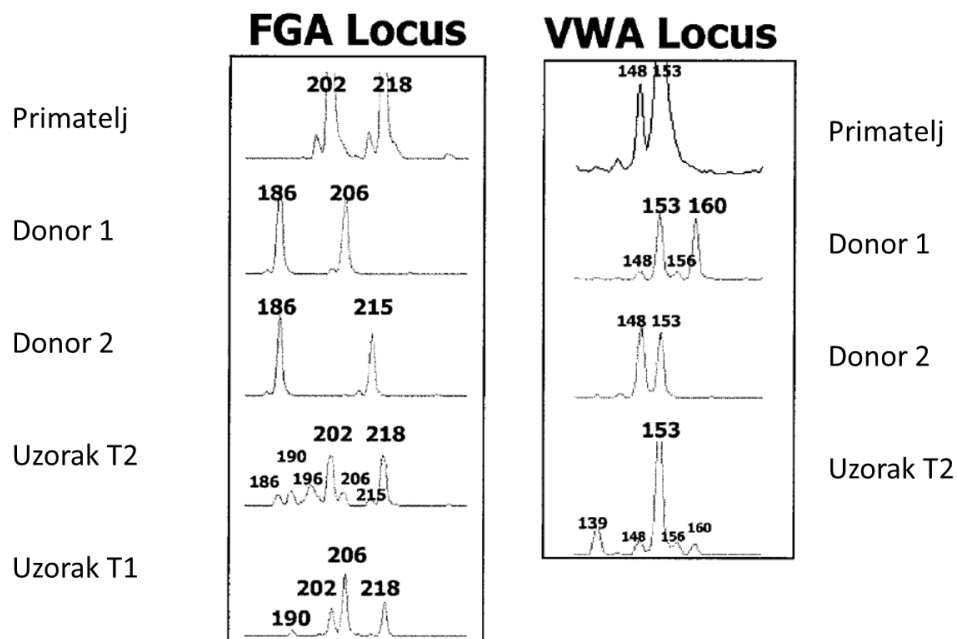
**Tablica 3.** Rezultati multipleks PCR-a korištenjem DNA izolirane iz stanica tumora primatelja (51)

Lokus*	D5S818	D13S317	D7S820	CSF1PO	Penta D	D3S1358	D18S51	Penta E	Total
Primatelj	1/1	1/2	1/1	†	†	2/2	1/1	1/1	7/8
Donor 1	2/2	1/1	0	1/1	1/1	1/1	0/1	†	6/7
Donor2	†	0/1	0/1	†	0/1	0/2	0/1	0/1	0/7

\*Za svaki lokus koji je uspješno umnožen (8 od 15 lokusa) prikazan je broj detektiranih informativnih alela (brojnik) u odnosu na broj mogućih informativnih alela (nazivnik).

† Lokus je bio neinformativan za određeni uzorak

Osim toga, još više zbunjujuća, dodana je Slika 5 koja prikazuje analizirane uzorke tumora (T1 i T2), uzorak donora prve (D1) i donora retransplantirane jetre (D2). Prikazani su rezultati za dva STR lokusa (FGA i vWA) i dobiveni rezultati pripisani su mikrosatelitskoj nestabilnosti.



**Slika 10.** Rezultati analize dva STR lokusa (FGA i vWA) za uzorke primatelja, donora 1, donora 2 te dva uzorka tumorskih stanica (T2 i T1) (51)

No, to je prvi slučaj u literaturi o prijenosu tumora od donora organa unatoč brznoj eksplantaciji i retransplantaciji odmah po identifikaciji maligne bolesti donora, a prije identifikacije prijenosa tumora u primatelju.

Jedinstven i vrlo zanimljiv je slučaj istoga autora iz 2009. godine, a radi se o slučaju muškog pacijenta koji je razvio metastaze tumora jajnika nakon transplantacije bubrega (67). Osim primjene suvremenih nuklearnomedicinskih dijagnostičkih metoda, napravljena je analiza tumorskih biljega u tkivu kao i citogenetska FISH analiza. Naravno, bilo je dovoljno dokaza i nije bilo dvojbe da kariotipski normalan muškarac razvije metastaze tumora jajnika prijenosom od davateljice organa iako prilikom transplantacije tumor jajnika nije bio dijagnosticiran. S obzirom na specifičnost slučaja nije bila potrebna dodatna genetska analiza podrijetla tumorskih stanica.

Cankovic i suradnici (2005) koristili su za mikrosatelitsku analizu AmpFLSTR Profiler Plus Kit proizvođača Applied Biosystems, jedan od prvih kompleta za multipleks PCR koji se pojavio na tržištu te razdvajanje alela na poliakrilamidnom gelu i automatskom sekvenceru ABI 377 istog proizvođača (32). Kompletom je analizirano devet polimorfnih lokusa i amelogenin, a korištena je fluorescentna višebojna tehnologija za obilježavanje početnica koja omogućava istovremeno analiziranje više lokusa u jednom uzorku. To uključuje i lokuse kojima se preklapaju veličine alela jer prema korištenim različitim bojama mogu dobro razdvojiti ampliconi elektroforezom u jednoj traci ili jednom injektiranju kapilare. Rezultati su prikazani u Tablici 4.

**Tablica 4.** Prikaz rezultata mikrosatelitske analize za uzorke tumora jetre primatelja, jetre donora te novonastali melanom (32)

Biljeg	Tumor jetre primatelja	Melanom	Jetra donora
<i>D3S1358</i>	15, 16	16, 18	16, 18
<i>vWA</i>	16, 17	14, 16	14, 16
<i>FGA</i>	19, 20	ND	19, 24
<i>D8S1179</i>	23.2	18, 24.2	18, 24.2
<i>D21S11</i>	34.2, 37.2	ND	33.2, 36.2
<i>D5S818</i>	10, 11	11, 13	11, 13
<i>D13S317</i>	12	ND	11, 12
X and Y chromosomes	X, Y	X, Y	X, Y

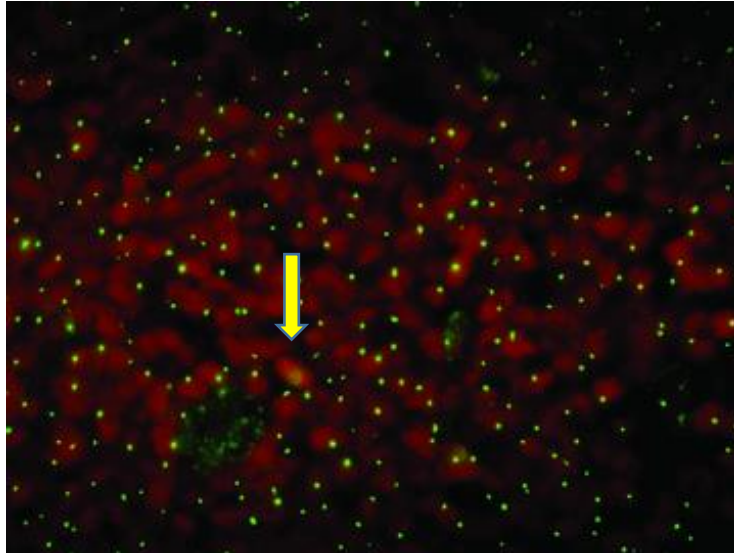
ND- nije detektirano

U radu su komentirani dobiveni rezultati prikazani u Tablici 4 i navedeno je postojanje tehničkoga problema koji je onemogućio amplifikaciju tri lokusa u uzorku melanoma što je objašnjeno fragmentiranošću DNA kao posljedicom procesa fiksacije formalinom i uklapanja tkiva u parafinom, a to je otežavalo amplifikaciju alela duljih od 200 parova baza. Ipak, prema autorima, umnožen je dovoljan broj alela za pouzdanu usporedbu. Kod dobivenih rezultata došlo je do potpunoga podudaranja između uzorka melanoma i donorskoga tkiva, što ukazuje da su ova dva uzorka identičnoga podrijetla. Uzorak jetre primatelja sadržavao je sedam jedinstvenih alela koji su se izrazito razlikovali od alela donora čime je utvrđeno da su uzorak primatelja i uzorak melanoma nepovezani, a to je dodatno potvrdilo da tumor nije potjecao iz tkiva primatelja. Neobično je što se u navedenom korištenom kompletu AmpFLSTR Profiler Plus Kit nalaze i polimorfni lokusi D18S51 i D7S820 za koje nisu navedeni rezultati niti objašnjenje nego su jednostavno izostavljeni.

Kuriozitet među odabranim radovima je slučaj opisan u radu Bajaja (2010) u kojem je stariji muškarac podvrgnut transplantaciji pluća i godinu dana kasnije u uzorku endobronhijalne biopsije dijagnosticirane

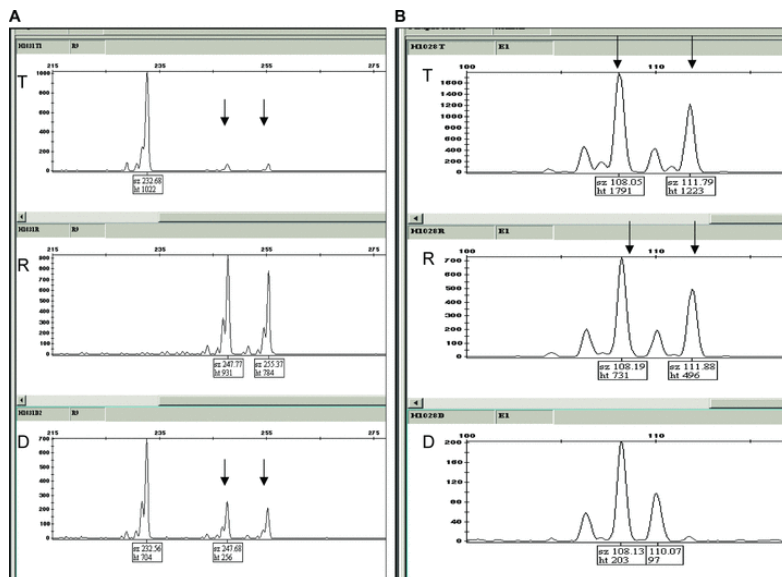
su mu lezije konzistentne s melanomom, zloćudnim tumorom kože (62). Donor organa bila je žena koja je preminula uslijed traumatske ozljede mozga. Iako je u njenoj povijesti bolesti bila zabilježena ekscizija melanoma 32 godine prije smrti, transplantacijski tim nije dobio tu informaciju. Radi utvrđivanja podrijetla tumorskih stanica napravljena je analiza DNA uzoraka krvi primatelja, slezene donorice i uzorka endobronhijalne biopsije na 12 STR lokusa. Temeljem dobivenih rezultata zaključeno je da tumor potječe od donorice organa. Rezultati analize nažalost nisu prikazani niti u obliku tablice niti elektroferograma što je zaista šteta. No, ovo je dokaz da tumorske stanice mogu biti dugi niz godina u stanju mirovanja. U ovom slučaju čak više od trideset godina.

Godine 2011. objavljeni su rezultati najopširnije studije koju je napravila grupa znanstvenika na čelu s Olagne i Caillard. Oni su analizirali 43 uzorka s dijagnozom PTLD-a u 43 primatelja nakon transplantacije bubrega sakupljenih iz francuskih centara za transplantaciju (27). Kriterij uključivanja uzorka u istraživanje bio je dostupnost smrznutoga tumorskog tkiva ili tkiva uklopljenog u parafinski blok kao i kontrolnoga tkiva donora ili primatelja ili oboje. Iako je u prethodnim studijama zabilježeno da većina PTLD-a potječe od stanica primatelja, zabilježeni su neki slučajevi izvedeni iz limfocita donora. Kako bi pružili bolji opis značajki i ishoda PTLD-a prema podrijetlu limfoma, provedene su histološke i molekularne analize. To je obuhvatilo histokemiju, fluorescentnu hibridizaciju Y kromosoma (Slika 11) i analizu STR lokusa (Slika 12).



**Slika 11.** Primjer fluorescentne *in situ* hibridizacije Y kromosoma koja pokazuje stanice tumora koje potječu od muškarca (žuto obojene točke u crvenim stanicama) u uzorku bubrega primateljice (27)

Ovisno o slučaju, za analizu DNA korišteno je između 9 i 24 lokusa koja sadrže STR polimorfizme. Dva primjera rezultata STR analize prikazana su na Slici 12.



**Slika 12.** Rezultati STR analize. A - Primjer u kojem je genotip uzorka tumora (T) identičan genotipu donora (D) i razlikuje se od primatelja (R); B - Primjer u kojem je genotip tumora (T) isti kao i genotip primatelja (R) i različit od donora (D) (27)

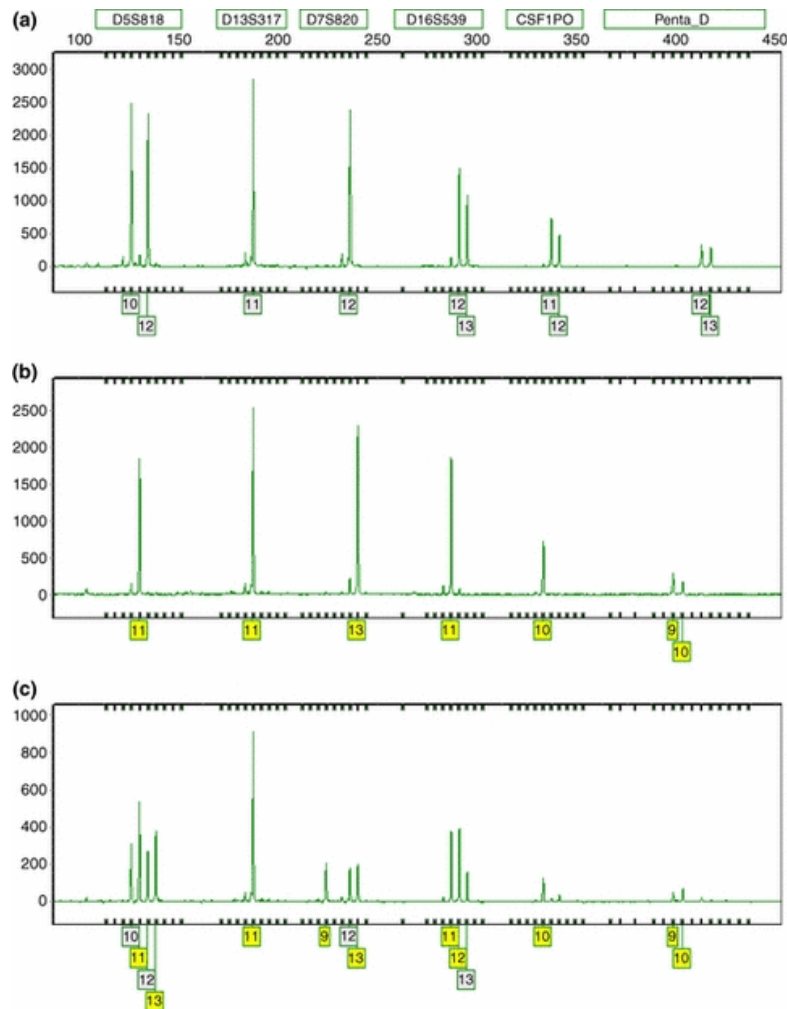
Sveukupni rezultati pokazali su da 16 tumora potječe od donora, a 27 od primatelja transplantiranoga bubrega. Zanimljivo je da je vrijeme do pojave tumora bilo kraće u pacijenata s tumorom koji potječe od donora. Desetogodišnje preživljavanje pacijenata bilo je slično među pacijentima bez obzira na podrijetlo tumora, no kada je analizirana smrtnost, postojao je trend boljega preživljavanja u pacijenata s donorskim limfomima.

Korištenje tehnika kojima se analizira spolni kromosom zahtijeva donora i primatelja različitoga spola. U takvom slučaju postoji mogućnost, iako neznatna, da X ili Y kromosom u stanicama tumora potječe od prethodne transfuzije krvi, a ne iz organa donora. Osim toga, većina analiza zahtijeva svježije tkivo što isključuje njihovu primjenu ako su dostupna samo parafinski blokovi odnosno tkiva fiksirana formalinom i uklopljena u parafin. Stoga analiza polimorfnih lokusa koji sadrže mikrosatelite ima značajnu prednost. Zbog svoje osjetljivosti analiza DNA je primjenjiva za različite vrste uzoraka pa tako i za arhivske uzorke i može se napraviti brzo i zahtijeva malu količinu uzorka.

Zelinkova i suradnici (2011) dokazali su da metastaze kolorektalnoga karcinoma potječu od donora jetre, transplantiranoga organa. Dijagnostika je uključivala histopatološku analizu, kromosomsku FISH tehniku te STR genotipizaciju korištenjem kompleta PowerPlex16 proizvođača Promega (16). Priloženi su elektroferogrami i rezultati su dobro prezentirani i objašnjeni (Slika 13). Uzorak transplantirane jetre (c) pokazuje kombinaciju donorskih (žuto) i primateljevih alela. Svi aleli u tumorskom tkivu (b) prisutni su u uzorku transplantirane jetre (osim na lokusu D13S317), ali ne i u uzorku eksplantirane jetre što upućuje da tumorske stanice potječu od donora. Nekoliko donorskih



alela nije prisutno u tumorskom tkivu što je objašnjeno gubitkom DNA u neoplastičnim stanicama (lokusi D5S818, D7S820 i D16S539).



**Slika 13.** STR profili šest analiziranih biljega (D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, PentaD) za eksplantiranu jetru (a), tumorsko tkivo (b) i transplantiranu jetru (c) (16)

Razmatranje mogućnosti da su tumorske stanice vezane uz donore, praćeno molekularnom analizom presudno je za pravilnu terapijsku odluku. Uzimajući u obzir porast starostne dobi donora i velike prevalencije kolorektalnoga karcinoma zbog takvih slučajeva se postavlja pitanje kvalitete probira donora i naglašava poteba za kompletnom obdukcijom. Zanimljiva je napomena u radu da kod pacijenta

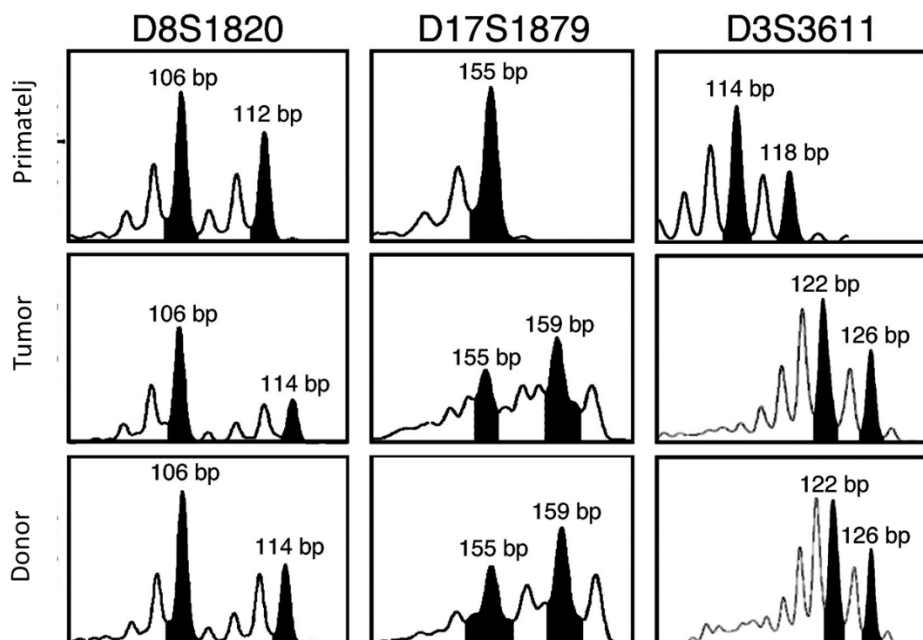
s transplantiranim bubregom istoga donora nije uočena pojava tumora ni metastaza što i nije iznenađujuće s obzirom na specifičnost obrasca nastajanja metastaza kolorektalnoga karcinoma.

Godine 2013. godine Bilal i suradnici prikazali su slučaj pacijenta kojem je također transplantirana jetra, a nakon transplantacije pojavio se metastatski melanom koji potječu od davatelja organa (23). Dokaz podrijetla tumorskih stanica napravljen je primjenom analize DNA. Kao i u prethodnom radu, također je korišten komercijalni komplet PowerPlex16 Kit koji sadrži 15 polimorfnih biljega i amelogenin, biljeg za određivanje spola. Analizirani su uzorci native jetre primatelja, presadka jetre, biopsije tumora kao i referentni uzorak donora. Rezultati genotipizacije prikazani su u Tablici 5. Iako je za uzorak tumora očito dobiven parcijalni profil DNA, vidljivo je da genotip tumorskih stanica ne odgovara genotipu primateljeve native jetre već da tumor potječe od donora. Presadak jetre pokazuje miješani genotip davatelja i primatelja jer su limfociti primatelja prisutni u alotransplantatu. Nažalost, rezultati nisu statistički obrađeni.

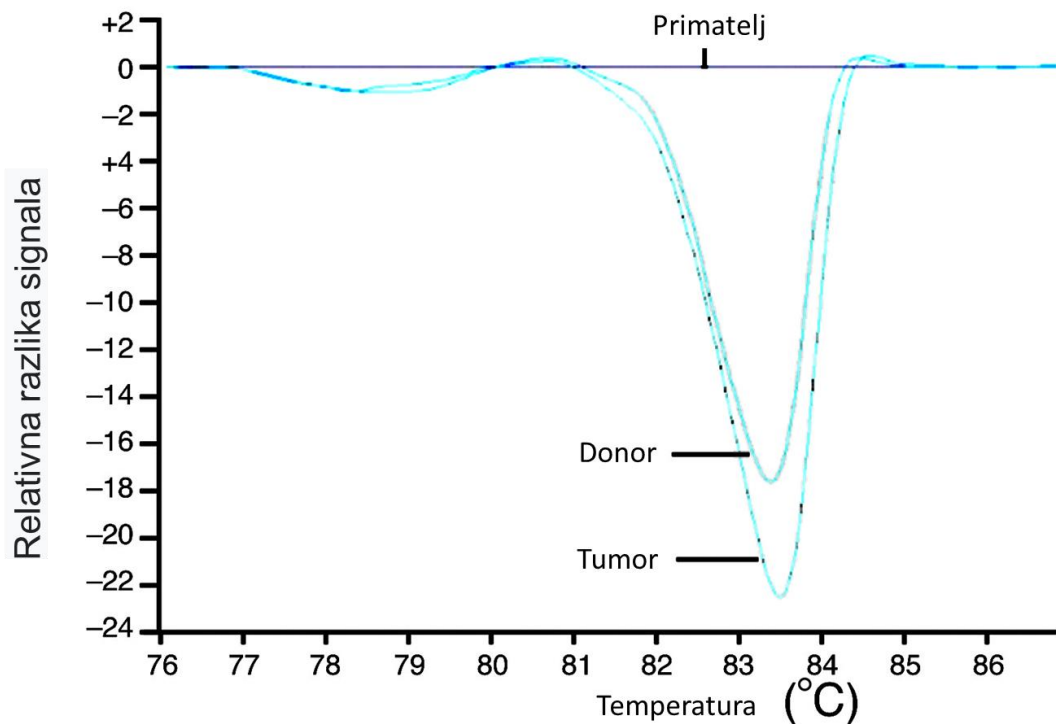
**Tablica 5.** Rezultati analize DNA za navedene lokuse za četiri uzorka: 1. nativna jetra primatelja; 2. uzorak donora (žučni mjehur); 3. presadak jetre i 4. tumor (melanom) (23)

Lokus	Nativna jetra	Uzorak donora	Presadak jetre	Tumor
D3S1358	17	16	16,17	16
TH01	7,8	7,9	7,8,9	7,9
D21S11	30,32,2	24,2,29	24,2,29,30,32,2	29
D18S51	15,18	14,17	14,15,17,18	14
PENTA E	5,7	12,17	5,12,17	12,17
D5S818	11,13	11,12	11,12,13	11,12
D13S317	12	11,12	11,12	11,12
D7S820	9,10	10,11	9,10,11	10,11
D16S539	11	8,11	8,11	8,11
CSF1	9,12	11,12	9,11,12	11,12
PENTA D	8,9	7,13	7,8,9,13	13
VWA	17,19	18	17,18,19	18
D8S1179	10,15	13	10,13,15	13
TPOX	8,11	8,11	8,11	8,11
FGA	22,26	20,22	20,22,26	20,22
Amelogenin	XY	XY	XY	XY

Metastatski melanom koji potječe od donora jest rijetki tumor s najvećom stopom prijenosa i smrtnosti što zahtijeva znatno bolje prepoznavanje te brzu i pravovremenu dijagnostiku podrijetla tumora. U identifikaciji tumora nakon transplantacije bubrega Verneuil i suradnici (2013) koristili su analizu sedam polimorfnih mikrosatelitskih biljega i visokorezolucijsku analizu krivulje taljenja mitohondrijske DNA (mtDNA-HRM) (55). To je jedna zanimljiva metoda koja nije baš uobičajena, a izvodi se na instrumentu za PCR u realnom vremenu (engl. *Real-Time PCR*). Rezultati mikrosatelitske analize prikazani su na Slici 14, a graf krivulje taljenja na Slici 15. Tumorske stanice i stanice donora pokazuju sličan profil. Primijenjena tehnika mtDNA-HRM ipak nije toliko jednoznačna i informativna kao što je STR analiza, ali je izvrsna komplementarna metoda. Tumorske stanice identificirane u raku kože pokazale su genotip donora transplantiranoga organa.



**Slika 14.** Profili DNA za lokuse D8S1820, D17S1879 i D3S3611 (55)



**Slika 15.** Krivulja taljenja mtDNA (mtDNA-HRM) tumorskih stanica, uzorka primatelja i donora. Tumorske stanice i stanice donora pokazuju sličan profil (55)

U sveučilišnoj bolnici u Parizu od 2000. do 2007. godine karcinom pločastih stanica kože (engl. *Skin Squamous Cell Carcinoma*; SCC) dijagnosticiran je kod 21 pacijenta s transplantiranim bubregom i ti su uzorci dodatno obrađeni, ali nisu prikazani rezultati za sve. Prema očekivanjima, kod transplantiranih pacijenata SCC se pojavljuje nakon dugoga razdoblja primjene imunosupresijske terapije, između tri i 21 godine i u područjima izloženim sunčevim zrakama.

Od publikacija novijega datuma vrijedno je izdvojiti rad Venture i suradnika (2013) zbog iznimno dobrog pristupa rješavanju pitanja porijekla tumora (53). Taj tim znanstvenika koji se bavi forenzikom dizajnirao je rješavanje slučaja vrlo precizno, minimizirajući mogućnost pogreške.

S obzirom na to da mnogi i različiti tragovi kojima se bavi forenzika sadrže stanice i DNA više od jedne jedinke što dovodi do miješanih genotipova i kasnije poteškoće u tumačenju rezultata, nastoje se unaprijediti i poboljšati metode razdvajanja stanica iz mješovitih uzoraka ne bi li se olakšala tipizacija DNA i identifikacija. U tom smislu laserska mikrodisekcija (engl. *Laser Capture Microdissection*; LCM) je iznimno korisna metoda za razdvajanje specifičnih stanica.

Dobro je poznato da nakon transplantacije čvrstoga organa, leukociti davatelja migriraju iz organa doprinoseći kimernoj populaciji krvnih stanica što se naziva periferni mikrokimerizam. Istodobno, leukociti i pluripotentne prekursorske stanice primatelja migriraju u organe stvarajući tzv. *in situ* mikrokimerizam. Primjena LCM metode omogućuje promatranje tkiva koje je smrznuto ili uklopljeno u parafinski blok te identifikaciju i odabir. Korištenjem laserske zrake moguće je uhvatiti i mikropodručja i pojedinačne stanice koje se potom analiziraju različitim tehnikama molekularne biologije. Korištenjem ovakvog pristupa, moguće je identificirati diferencirane parenhimske stanice primatelja u transplantiranom čvrstom organu. Te stanice najvjerojatnije potječu od cirkulirajućih prekursorskih stanica iz koštane srži.

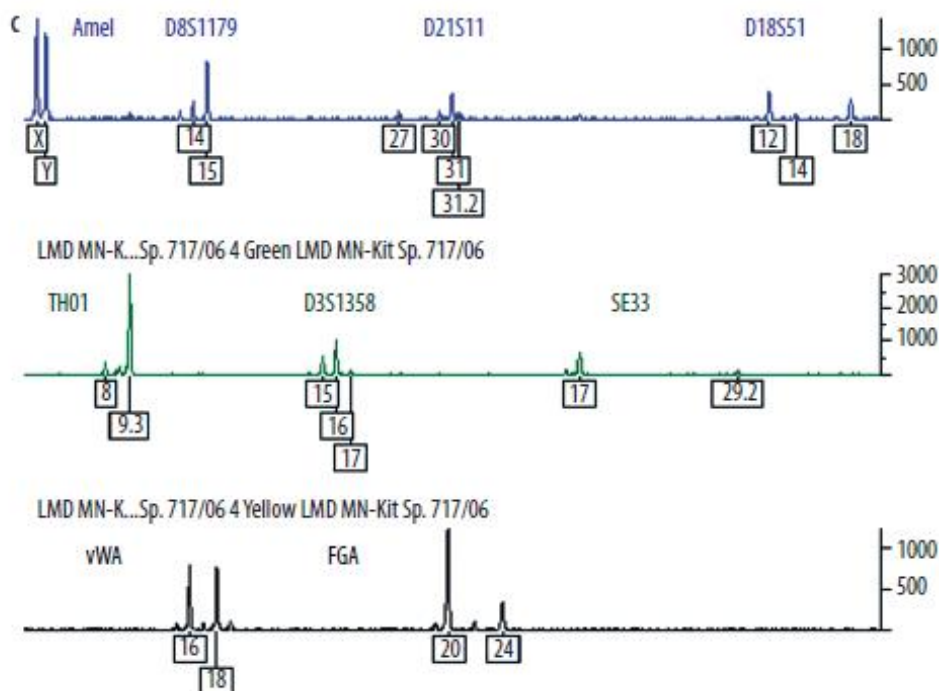
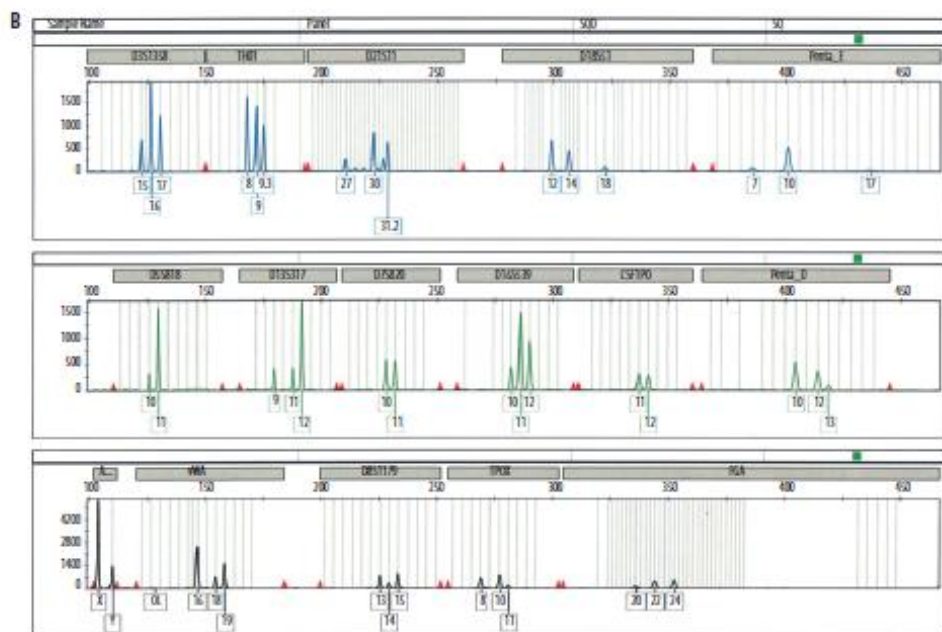
U ovom slučaju manualna disekcija nije se pokazala dobrom za dobivanje jedinstvenog profila jer je tipizacija mješovitog profila objašnjena mogućim uključivanjem vezivnoga tkiva i krvnih žila u uzorak. Laserska mikrodisekcija značajno je smanjila ovu pojavu, omogućujući pouzdanije rezultate kojima je identificirano porijeklo raka jetre kod primatelja.

Naročito je uočljivo da je u elektroferogramu dobivenom iz LCM neoplastičnih uzoraka jetre amelogenin, biljeg koji definira spol,

sastavljen od dobro uravnoteženih X i Y alela (Slika 16C), sugerirajući da uzorak potječe od muške osobe. Prethodno je ručnom disekcijom isti biljeg dao dvosmislen rezultat koji pokazuje da je X komponenta u neravnoteži s manje zastupljenim alelom Y što može pridonijeti pogrešnoj interpretaciji donorske ženske komponente kao one koja prevladava (Slika 16B; Tablica 6).

Utvrđeno je da je LCM vrlo bitan alat za utvrđivanje pripadaju li hepatske lezije davatelju ili pacijentu. Polazeći od prikazanoga slučaja, naglašeno je da može postojati niz situacija u kojima se utvrđuje je li neoplazma koja se razvija u transplantiranoj jetri od donora ili primatelja.

Osim korištenja LCM tehnike, napravljena je i kvantifikacija DNA što je u objavljenim radovima prava rijetkost, a može biti vrlo korisno i informativno.



**Slika 16.** B-profil DNA za uzorak dobiven manualnom disekcijom; C-genetski profil neoplastičnoga uzorka jetre dobivenoga laserskom mikrodisekcijom (53)

Rezultati genotipizacije prikazani su i u tabličnom obliku (Tablica 6) te je uočljiva razlika između kvalitete uzoraka dobivenih manualnom

i laserskom disekcijom. Naime, manualno se obično ne može dobiti isključivo uzorak tumora pa su tako i rezultati dobiveni za mješoviti uzorak dok se laserskom mikrodisekcijom može izuzeti konkretni nekontaminirani uzorak tumorskih stanica.

**Tablica 6.** Rezultati i usporedba manualne mikrodisekcije i laserske mikrodisekcije (53)

Biljeg	Primatelj	Donor	Manualna disekcija	Laserska mikrodisekcija
Amel	XY	XX	XY	XY
D8S1179	14 15	13 15	13 14 15	14 15
D21S11	27 31	30 31.2	27 30 31.2	27 30 31 31.2
D18S51	12 18	11	12 14 18	12 14 18
TH01	9.3 9.3	8 8	8 9 9.3	8 9.3
D3S1358	15 16	16 17	15 16 17	15 16 17
SE33	17 17	16 17	17	17 29.2
vWA	16 18	16 17	16 18 19	16 18
FGA	20 24	22 24	20 22 24	20 24
Penta E	7 17	7 10	7 10 17	7 10 17
TPOX	10 11	8 10	8 10 11	8 10 11
Penta D	10 13	10 12	10 12 13	10 13
CSF1PO	11 12	11 12	11 12	11 12
D16S539	10 11	11 12	10 11 12	10 11 12
D7S820	10 11	10 11	10 11	10 11
D13S317	9 11	12 12	9 11 12	9 11 12
D5S818	10 11	11 11	10 11	10 11

Iz ovoga je rada vidljivo da je uređaj za LCM iznimno koristan alat, unaprjeđuje kvalitetu uzorka uzetog za analizu, a time i dobivenih rezultata te u konačnici olakšava donošenje zaključka. Naravno, to je izvrsno rješenje ako ga je moguće ostvariti.

Možda je ipak najzanimljiviji prikaz slučaja iz 2017. godine u kojem su nizozemski znanstvenici opisali transmisiju raka dojke od jednoga

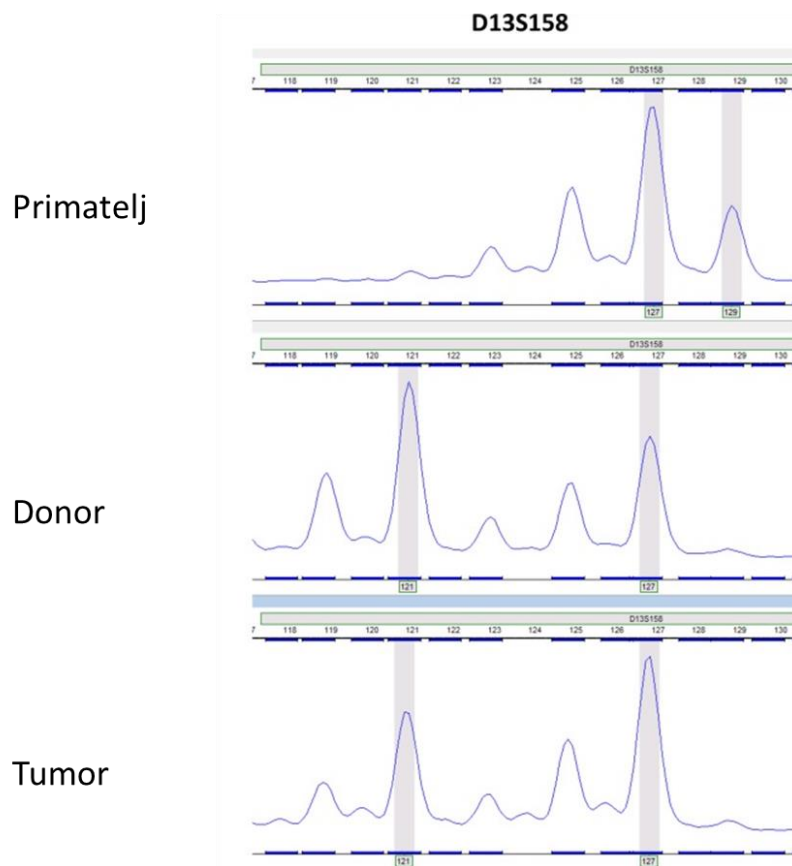


darivatelja organa na četiri transplantirana pacijenta (17). Dijagnoza raka dojke nije bila poznata u vrijeme donacije. Donorica organa u svojoj anamnezi nije imala prethodnih značajnih bolesti niti su nađeni znakovi maligniteta od strane Eurotransplanta pa su donirani bubrezi, pluća, jetra i srce. Svi su primatelji razvili histološki sličan tumor unutar šest godina nakon transplantacije. Troje od četvero primatelja organa je umrlo što je bila posljedica metastaza. Jedan je primatelj preživio nakon nefrektomije transplantata praćene imunosupresivnim liječenjem i kemoterapijom. Ovaj slučaj ukazuje na često fatalne posljedice tumora koji potječe od donora i predlaže se uklanjanje donorskoga organa te obnova imunosti što može potaknuti potpunu remisiju. Pacijentica koja je imala presadak jetre i kod koje je najprije dijagnosticiran tumor, samo 16 mjeseci nakon transplantacije, umrla je godinu dana poslije dijagnoze. Primjenom analize DNA odnosno pet mikrostatelitskih biljega utvrđeno je da tumor dojke potječe od donora organa. Nažalost, u radu nisu prikazani rezultati analize DNA nego je sve svedeno na zaključno jednu rečenicu.

Poznato je da se transmisija tumora može dogoditi kod transplantacije čvrstih organa i rizik za transmisiju je između 0,01 i 0,05 % (17, 68). Tako male brojke upućuju na to da je sadašnja važeća procedura trijaže donora učinkovita što se tiče maligniteta. Međutim, ovo je prvi prikaz transmisije tumora dojke s jednoga donora na četiri primatelja. Osim toga, u ovom slučaju je i iznimno dug interval između transplantacije i kliničke manifestacije tumora.

U slučajevima u kojima je detektirana transmisija, malignitet nije bio otkriven prije donacije. Kako je tumor prenesen s donora bez ikakvih prethodnih znakova maligniteta ostaje za utvrditi i dokazati, a trenutno je još u sferi nagađanja.

Jedan od najnovijih radova iz 2019. godine u kojem se kod pacijenta nakon transplantacije jetre zbog hepatocelularnoga karcinoma šest mjeseci kasnije pojavio tumor miješanih histoloških karakteristika bitno različitih od prethodnoga (31). To je bio razlog za sumnju i istraživanje je li porijeklo tumora od donora organa. Razvio se rak pluća ograničen na jetru. Osam od 12 analiziranih lokusa dali su zadovoljavajuće rezultate. Iako donor prije doniranja organa nije imao poznatu povijest maligniteta, genetska analiza tumorskih stanice lokusa i potvrdila je porijeklo od donora jetre (Slika 17).



**Slika 17.** Genotip za jedan od osam informativnih biljega (D3S158) koji pokazuje da je genotip tumora nastalog u transplantiranoj jetri identičan genotipu donora (31)

#### 4.2.4. Identifikacija podrijetla posttransplantacijskog tumora u Hrvatskoj

Prikaz slučaja u kojem je prvi put u Republici Hrvatskoj primijenjena analiza DNA za detekciju podrijetla tumora nastaloga nakon transplantacije jetre objavljen ju u časopisu World Journal of Clinical Cases 2019. godine pod naslovom „Liver re-transplantation for donor-derived neuroendocrine tumor: A case report“. Rad je nastao suradnjom liječnika uključenih u proces transplantacije i znanstvenika koji se bave analizom DNA (54).

S obzirom na značaj i specifičnost ovoga pionirskog rada te moguću ulogu u procesu uvođenja analize DNA u Hrvatskoj kao rutinske analize za sve prepoznate tumore nastale nakon transplantacije organa u nastavku će biti opisan detaljnije.

U literaturi se navodi da je tumor koji potječe od donora organa dobro prepoznata, ali relativno rijetka komplikacija nakon transplantacije jetre kako u svijetu tako i u Republici Hrvatskoj. Povećano korištenje proširenih kriterija za darovatelje uslijed manjka organa povećava rizik za komplikacije. Podatci o neuroendokrinim tumorima (engl. *Neuroendocrine Neoplasms*; NENs) donorskoga podrijetla kao i najprikladnijem tretmanu i liječenju prilično su oskudni. Detaljno je opisan slučaj pacijenta koji je razvio neuroendokrini tumor ograničen na jetru nakon njene transplantacije te je liječenje zahtijevalo retransplantaciju jetre.

Analizirani slučaj: muškarac star 49 godina bez medicinskih komorbiditeta podvrgnut je transplantaciji jetre zbog alkoholne ciroze

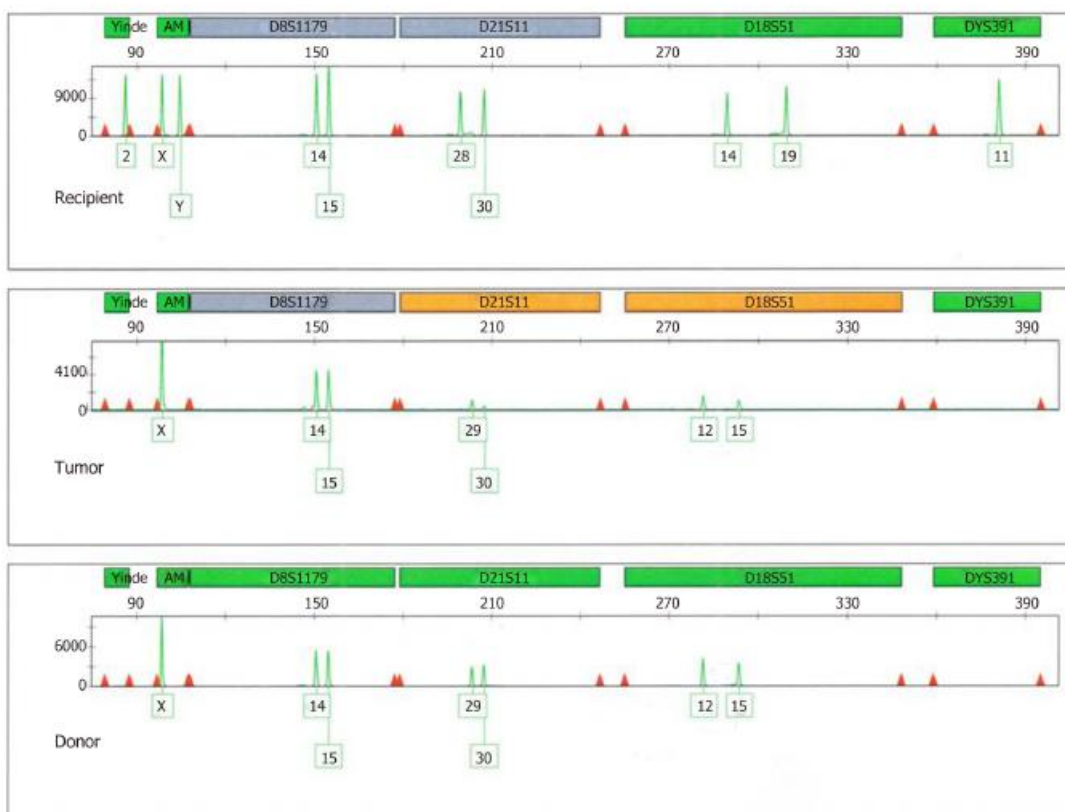
jetre. Donor je bila žena stara 73 godine bez poznatih maligniteta. Ubrzo nakon transplantacije jetre pretragom ultrazvukom abdomena detektirana je hipoehogena lezija veličine 15 mm u lijevom režnju jetre. Lezija je bila stabilna sljedećih 11 mjeseci, ali su magnetskom rezonancijom abdomena identificirane još dvije hipovaskularne lezije veličina 20 i 11 mm. Praćenjem ultrazvukom abdomena i nakon dvije i pol godine nisu nađene nove lezije, ali je magnetskom rezonancijom utvrđena progresija rasta i broja lezija što je također potvrđeno računalnom tomografijom abdomena.

Biopsijom jetre dokazan je dobro diferencirani neuroendokrini tumor. Genetskom analizom uzorka potvrđeno je da tumor potječe od davateljice organa. Zaključeno je da korist od eksplantacije presadka treba odmjeriti prema riziku retransplantacije kao i vjerojatnosti širenja neuroendokrinoga tumora izvan presadka.

S obzirom na to da je tumor bio ograničen samo na presadak jetre, 2018. godine pacijent je podvrgnut retransplantaciji jetre. Godinu dana poslije transplantacije jetre pacijent se osjeća dobro bez znakova pristustva neuroendokrinog tumora.

Analiza DNA kojom se određuje genotip poznata kao „DNA fingerprinting“ napravljena je da se utvrdi potječe li tumor od davatelja ili primatelja organa. Uzorci koji su analizirani su: eksplantirano tumorsko tkivo uklopljeno u parafinski blok, referentni uzorak krvi primatelja i uzorak izolirane DNA donora jetre koji je bio pohranjen u bolnici. Genotipizacija je napravljena korištenjem kompleta GlobalFiler PCR Amplification Kit and Proflex PCR System za umnažanje DNA, a razdvajanje i analiza PCR produkata rađeno je uporabom 3500 Genetic Analyzer sekvencera i GeneMapper ID-X 1.5 softvera (sve od proizvođača Applied Biosystems). Komplet GlobalFiler PCR Amplification

Kit umnaža kratke ponavljajuće sekvence za 21 autosomalni lokus, jedan STR lokus i jedan indel na Y kromosomu te amelogenin (biljeg za određivanje spola). Svi uzorci su uspješno umnoženi i dobiveni su potpuni profili odnosno genotipovi. Rezultati dobiveni za uzorak tumora bili su konzistentni s predominantnim genotipom donora. Utvrđeno je kompletno podudaranje između uzorka tumora i uzorka donora (Slika 18). Statističkom obradom podataka i korištenjem DNA-View softvera dobivena je vjerojatnost  $LR=4 \times 10^{25}$  (engl. *Likelihood ratio*; *LR*) koja snažno ukazuje da je porijeklo tumorskih stanica od donora organa.



**Slika 18.** Profili DNA za šest analiziranih biljega (Yindel, Amelogenin, D8S1179, D21S11, D18S51, and DYS391) za uzorke krvi primatelja (Recipient), tumorskoga tkiva (Tumor) te uzorka donora (Donor). Identični profil dobiven je za uzorak tumorskoga tkiva i uzorak donora (54)

Važno je napomenuti da ovo nije jedini slučaj u Hrvatskoj u kojem je u DNA laboratoriju Zavoda za sudsku medicinu i kriminalistiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu rađena analiza DNA radi identifikacije podrijetla tumora. Iako se obično u literaturi navodi da tumor koji potječe od donora organa poslije transplantacije pojavljuje vrlo rijetko izgleda da to i nije slučaj već možda takve pojave i nisu prepoznate i analizirane na vrijeme.

Prema očekivanjima, mnoge su molekularno-genetičke metode ostvarile prijelaz u klinička područja pa tako molekularna dijagnostika postaje integralni dio kliničke prakse. Daljnjim razvojem tehnologije zasigurno će preuzimati sve značajniju ulogu.

#### 4.2.5. Problemi u identifikaciji podrijetla tumora

Uočeno je nekoliko problema koji su zajednički svim istraživanjima podrijetla tumora bez obzira na vrstu primjenjene analize DNA, a to su:

1. nepostojanje ili nedostupnost nekoga od originalnih uzoraka donora ili primatelja,
2. male količine ili loša kvaliteta uzorka dostupnoga za analizu,
3. mala količina, degradiranost ili loša kvaliteta izolirane DNA,
4. prisustvo inhibitora koji onemogućavaju umnožavanje DNA metodom PCR-a,
5. dobivanje parcijalnih profila odnosno nepotpunih genotipova.

Neka od mogućih rješenja su:

1. komunikacija s institucijama i djelatnicima uključenim u procese transplantacija i/ili objava smjernica o potrebi adekvatnoga pohranjivanja i čuvanja uzoraka za potencijalne neophodne buduće analize,
2. korištenje metode laserske mikrodisekcije za izuzimanje uzoraka,
3. korištenje suvremenih metoda i kompleta ili automatska izolacija DNA,
4. kvantifikacija izolirane DNA upotrebom metode Real-time PCR-a kojom se može detektirati i prisustvo potencijalnih inhibitora kao i odrediti spol od kojeg potječe uzorak (kao i mješovitost uzorka),
5. uporaba viskoosjetljivih komercijalnih kitova za istovremenu analizu više polimorfnih STR lokusa.

4.3. Daljnje smjernice u upravljanju tumorskom bolešću kod pacijenata nakon transplantacije

Brza, pouzdana i sigurna identifikacija podrijetla tumora koji se pojave kod pacijenata nakon transplantacije od iznimne je važnosti za daljnji tretman i liječenje pacijenta.

Ako se tumor pojavio na transplantiranom organu i postoji sumnja da tumor potječe od donora, najvažnije je to dijagnosticirati. Ako se

sumnja potvrdi, u tom slučaju tretman može uključiti eksplantaciju organa te žurnu retransplantaciju. U nekim slučajevima uklanjanjem donorskoga organa te obnovom imunosti mogu se izbjeći fatalne posljedice, a čak i potaknuti potpuna remisija. U pravilu organizacija UNOS (engl. *United Network of Organ Sharing*) omogućava tu opciju kad je dokazano da tumor nakon transplantacije potječe od donora organa (25). Osim toga, moguće je osmisliti daljnje upravljanje antitumorskom terapijom s ciljem izliječenja, produljenja života i poboljšanja kvalitete života pacijenta.

Jedan od optimističnijih pogleda u budućnost je taj da ćemo vrlo skoro takve probleme moći izbjeći transplantacijom organa napravljenih pomoću 3D bioprintera.



**Zaključak**

Primjenom molekularne dijagnostike za identifikaciju podrijetla tumora u pacijenata nakon transplantacije moguće je značajno poboljšati i unaprijediti dosadašnju kliničku praksu. Brza i sigurna identifikacija podrijetla tumora koji se pojave kod pacijenata nakon transplantacije od izuzetne je važnosti za daljnji tretman i liječenje pacijenta.

Metoda molekularne biologije koja se koristi u forenzičke svrhe kao što je analiza DNA korištenjem mikrosatelitskih polimorfnih lokusa (genotipizacija) vrlo je pogodna za identifikaciju podrijetla tumora neovisno o spolu davatelja i primatelja organa. Tom se metodom može individualizirati uzorak odnosno točno utvrditi podrijetlo, a i rezultat podkrijepiti biostatističkim izračunom. Osim što je visokospecifična, metoda je iznimno osjetljiva pa je za analizu potrebna vrlo mala količina uzorka koji može biti i smrznuto tkivo, tkivo uklopljeno u parafinski blok ili histološki preparat pa čak i arhivski materijal.

Uzimanjem u obzir novih spoznaja o podrijetlu tumora kod osoba koje su podvrgnute transplantacijskom postupku, a koje su rezultat primjene molekularne dijagnostike u tom području medicine, otvaraju se nove mogućnosti za poboljšanje sadašnjih smjernica, protokola za probir, testiranja i izbor donora organa te izbor i primjenu personalizirane poslijetransplantacijske terapije s ciljem sprječavanja pojave tumora koji bi mogao potjecati od donora organa.

Ako se za tumor utvrdi da potječe od donora moguće je osmisliti daljnje upravljanje antitumorskom terapijom s ciljem izliječenja, produženja života i poboljšanja kvalitete života pacijenta. Također, moguće je

napraviti i retransplantaciju organa ako se tumor pojavio na transplantiranom organu.

Iznimnim napretkom tehnologije u zadnjih nekoliko godina te primjenom najnovijih znanstvenih dostignuća postoji opravdana nada da će identifikacija podrijetla tumora biti rutinska, jednostavna i pristupačna za velik broj pacijenata širom svijeta.

No, realno je i očekivati da će uskoro biti jednostavnije, brže i isplativije transplantirati organe nastale pomoću 3D bioprintera nego, kao do sada, od davatelja organa.

**Literatura**

1. Hassanain M. Novel guidelines for organ donor cancer screening. *Annals of Transplantation*. 2014;19:241-7.
2. Directive 2010/45/EU of the European Parliament and of the Council of 07.07.2010 on standards of quality and safety of human organs intended for transplantation, Official Journal of European Union. Dostupno na: <https://eurlex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/PDF/>, Pristupljeno 18. lipnja 2019.
3. Hrvatska donorska mreža. Dostupno na: [www.hdm.hr](http://www.hdm.hr), Pristupljeno 21. svibnja 2019.
4. Ministarstvo zdravstva RH. Dostupno na: <https://zdravlje.gov.hr>, Pristupljeno 21. svibnja 2019.
5. Živčić-Ćosić S, Trbonjača Z, Sladoje-Martinović B, Orlić L. Komplikacije nakon presađivanja bubrega. *Medicina Fluminensis*. 2010;46(4):434-47.
6. Strauss DC, Thomas JM. Transmission of donor melanoma by organ transplantation. *Lancet Oncology*. 2010;11:790-6.
7. Chapman JR, Webster AC, Wong G. Cancer in the transplant recipient. *Cold Spring Harb Prospect Med*. 2013;3:a015677.
8. Chapman JR, Lynch SV. Donor-transmitted, donor-derived, and de novo cancer after liver transplant. *Experimental and Clinical Transplantation*. 2014;1:50-4.
9. Foltys D, Linkermann A, Heumann A, Hoppe-Lotichius M, Heise M, Schad A et al. Organ recipients suffering from undifferentiated neuroendocrine small-cell carcinoma of donor origin: A case report. *Transplantation Proceedings*. 2009;41:2639-42.
10. Doshi MD. Chapter 16: Cancer in Solid Organ Transplantation, *Onco-Nephrology Curriculum*. American Society of Nephrology 2016. Dostupno na: <https://www.asnonline.org/education/distancelearning/curricula/onco/Chapter16.pdf>, Pristupljeno 16. lipnja 2019.
11. Cancer. Dostupno na: <https://www.verywellhealth.com>, Pristupljeno 21. srpnja 2020.
12. Understanding cancer. Dostupno na: <https://www.onhealth.com>, Pristupljeno 21. srpnja 2020.
13. Snape K, Izatt L, Ross P, Ellis D, Mann K, O'Grady J. Donor-transmitted malignancy confirmed by quantitative fluorescence Polymerase Chain Reaction genotype analysis: A rare indication for liver retransplantation. *Liver Transplantation*. 2008;14:155-8.
14. Kakar S, Burgart LJ, Charlton MR i sur. Origin of adenocarcinoma in a transplanted liver determined by microsatellite analysis. *Human Pathology*. 2002;33(4):435-6.
15. Baudoux TER, Gastaldello K, Rorive S, Hamade A, Broeders N, Nortier JL. Donor cancer transmission in kidney transplantation. *Kidney International Reports*. 2017;2:134-7.
16. Zelinkova Z, Geurts-Giele I, Verheij J i sur. Donor-transmitted metastasis of colorectal carcinoma in a transplanted liver. *Transplant International*. 2012;25:10-15.

17. Matser YAH, Terpstra ML, Nadalin S i sur. Transmission of breast cancer by a single multiorgan donor to 4 tranaplant recipients. American Journal of Transplantation. 2018;18:1810-14.
18. Stephens JK, Everson GT, Elliot CL, Kam I, Wachs M, Haney J i sur. Fatal transfer of malignant melanoma from multiorgan donor to four allograft recipients. Transplantation. 2000;70(1):232-6.
19. Katabathina VS, Menais CO, Tammiseti VS et al. Malignancy after solid organ transplantation: Comprehensive imaging review. RadioGraphics. 2016;36:1390-1407.
20. The Essentials of Diagnostics series 2013; Introduction to Molecular Diagnostics, Dostupno  
na:<http://www.epemed.org/online/www/content2/108/469/3172/listdownloads/3175/507/ENG/dxinsights.pdf> Pristupljeno 16. lipnja 2019.
21. Mousumi D, Prasad GBKS, Bisen PS. Molecular Diagnostics: Promises and Possibilities Dordrech Heidelberg, London, Springer; 2010. Chapter 1 INTRODUCTION TO MOLECULAR DIAGNOSTICS pp 1-10.
22. Baine I, Hui P. Practical applications of DNA genotyping in diagnostic pathology. Expert Review of Molecular Diagnostics 2019;19(2):175-188.
23. Bilal M, Eason JD, Das K, Sylvestre PB, Dean AG, Vanatta JM. Donor-derived metastatic melanoma in a liver transplant recipient established by DNA fingerprinting. Experimental and clinical transplantation. 2013;5:458-63.
24. Buell JF, Beebe TM, Trofe J, Gross TG, Allowa RR, Hanaway MJ et al. Donor transmitted malignancies. Annals of transplantation 2004;9:53-6.
25. Gandhi MJ, Strong DM. Donor derived malignancy following transplantation: a review. Cell Tissue Banking 2007;DOI10.1007/s10561-007-9061.
26. Baehner R, Magrane G, Balassanian R, Chang C, Millward C, Wakil AE et al. Donor origin of neuroendocrine carcinoma in 2 transplant patients determined by molecular cytogenetics. Human Pathology. 2000; 31:11:1425-9.
27. Olagne J, Caillard S, Gaub MP, Chenard MP, Moulin B. Post-transplant Lymphoproliferative Disorders: Determination of Donor/Recipient Origin in a Large Cohort of Kidney Recipients. American Journal of Transplantation. 2011;11:1260-9.
28. Gill P, Jeffreys AJ, Werrett DJ. Forensic application of DNA 'fingerprints'. Nature. 1985;318:577-9.
29. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. Nature. 1985;316:76-9.
30. Ng IOL, Shek TWH, Thung SN, Ye MMQ, Lo CM, Fan ST i sur. Microsatellite analysis in post-transplantation lymphoproliferative disorder to determine donor/recipient origin. Modern Pathology. 2000;13:1180-5.
31. Sonbol MB, Halling KC, Douglas DD, Ross HJ. A case of donor-transmitted non-small cell lung cancer after liver transplantation: An unwelcome guest. The Oncologist. 2019;24:1-3.

32. Cankovic M, Linden MD, Zarbo RJ. Use of microsatellite analysis in detection of tumor lineage as a cause of death in a liver transplant patient. *Arch Pathol Lab Med*. 2006;130:529-32.
33. Rapisuwon S, Vietsch EE, Wellstein A. Circulating biomarkers to monitor cancer progression and treatment. *Comput Struct Biotechnol J*. 2016;14:211-22.
34. Baine I, Hui P. Practical applications of DNA genotyping in diagnostic pathology. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2019; 19(2):175-188.
35. Wilson LJ, Horvat RT, Tilzer L, Meis AM, Montag L, Huntrakoon M. Identification of donor melanoma in a renal transplant recipient. *Diagn Mol Pathol*. 1992 Dec;1(4):266-71.
36. Beckingham IJ, O'Rourke JS, Bishop MC, Ansell ID, Morgan AG, Blamey RW. The use of DNA typing to clarify the origin of metastatic carcinoma after renal transplantation. *Transpl Int*. 1994;7:379-81.
37. Schmitt C, Ciré K, Schattenkirchner S et al. Highly sensitive DNA typing for detecting tumors transmitted by transplantation. *Transplant International*. 1998;11:382-6.
38. Mies C. Molecular pathology of paraffin-embedded tissue. Current clinical applications. *Diagn Mol Pathol*. 1992 Sep;1(3):206-11.
39. Snow AN, Stence AA, Pruessner JA, Bossler AD, Ma D. A simple and cost-effective method of DNA extraction from small formalin-fixed paraffin-embedded tissue for molecular oncologic testing. *BMC Clin Pathol*. 2014;14:30.
40. Kokkat TJ, Patel MS, McGarvey D, LiVolsi VA, Baloch ZW. Archived formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks: A valuable underexploited resource for extraction of DNA, RNA, and protein. *Biopreserv Biobank*. 2013;11(2):101-6.
41. Imunohistokemija i *in situ* hibridizacija; uniri.hr; Dostupno na: [https://www.medri.uniri.hr/files/NASTAVA/PATOLOGIJA/NASTAVNO GRADIVO/IMUNOHISTOKEMIJA I IN SITU HIBRIDIZACIJA.pdf](https://www.medri.uniri.hr/files/NASTAVA/PATOLOGIJA/NASTAVNO_GRADIVO/IMUNOHISTOKEMIJA_I_IN_SITU_HIBRIDIZACIJA.pdf), Pristupljeno 16. lipnja 2019.
42. Chenghua C, Wei S, Peining L, Fluorescence *In situ* Hybridization: Cell-Based Genetic Diagnostic and Research Applications. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2016 4; 89. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2016.00089/full>, Pristupljeno 16. lipnja 2019.
43. O'Connor C. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Nature Education*. 2008; 1(1):171.
44. FISH, slika. Dostupno na: <https://www.semrock.com/>, Pristupljeno 16. lipnja 2019.
45. Materijal nastao u DNA laboratoriju Zavoda za sudsku medicinu i kriminalistiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu ili u suradnji s autoricom rada.
46. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*. 1985;314:67-73.

47. Richard GF, Kerrest A, Dujon B. Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2008;72(4):686-727.
48. Vieira ML, Santini L, Diniz AL, Munhoz Cde F. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*. 2016; 39(3):312-28.
49. Furač I. Analiza kontrolne regije mitohondrijske DNA u hrvatskoj populaciji (disertacija) Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2011.
50. Frégeau CJ, Fournay RM. DNA typing with fluorescently tagged short tandem repeats: a sensitive and accurate approach to human identification. *Biotechniques*. 1993;15(1):100-19.
51. Lipshutz GS, Baxter-Lowe LA, Nguyen T, Jones KD, Ascher NL, Feng S. Death from donor-transmitted malignancy despite emergency liver retransplantation. *Liver transplantation*. 2003;9(10):1102-7.
52. Katava GL, Donato MD, Hong T, Mannion C, Bhattacharyya PK. Using molecular techniques to confirm donor-derived post-transplant lymphoproliferative disorder. *CAP Today* 2014 June; Dostupno na: <https://www.captodayonline.com/post-transplant-lymphoproliferative-disorder/>, Pristupljeno 18. lipnja 2019.
53. Ventura F, Bonsignore A, Tettamanti C, Verdiani S, Gianelli Castiglione A, De Stefano F. Short tandem repeat analysis of host's hepatocellular carcinoma by laser microdissection confirms the validity of safety procedures in liver transplantation: a forensic case. *Annals of Transplantation*. 2013;18:408-13.
54. Mrzljak A, Kocman B, Skrtic A, Furac I, Popic J, Franusic L et al. Liver retransplantation for donor-derived neuroendocrine tumor: A case report. *World Journal of Clinical Cases*. 2019;7(18): 2794-801.
55. Verneuil L, Varna M, Ratajczak P, Leboeuf C, Plassa LF, Elbouchtaoui M et al. Human skin carcinoma arising from kidney transplant-derived tumor cells. *The Journal of Clinical Investigation*. 2013;123(9):3797-3801.
56. Chan SC, Cheung ST, Leung SY, Liu CL, Fan ST, Lo CM. *De novo* sarcoma of donor origin in a liver allograft determined by microsatellite analysis: A short report. *Liver Transplantation*. 2004 Feb;10(2):320-3.
57. Caillard S, Pencreach E, Braun L, Marcellin L, Woehl Jaegle ML, Wolf P et al. Simultaneous development of lymphoma in recipients of renal transplants from a single donor: donor origin confirmed by human leukocyte antigen staining and microsatellite analysis. *Transplantation*. 2005; 15;79(1):79-84.
58. Morita K, Taketomi A, Soejima Y, Ikegami T, Fukuhara T, Iguchi T, Nagata S, Sugimachi K, Gion T, Shirabe K, Maehara Y. *De novo* hepatocellular carcinoma in a liver graft with sustained hepatitis C virus clearance after living donor liver transplantation. *Liver Transplantation*. 2009;15(11):1412-6.
59. Vernadakis S, Poetsch M, Weber F, Treckmann J, Mathe Z, Baba HA et al. Donor origin *de novo* HCC in a noncirrhotic liver allograft 3 years after liver transplantation. *Transplant International*. 2010;23(3):341-3.



60. Verine J, Varna M, Ratajczak P, El-Bouchtaoui M, Leboeuf C, Plassa LF et al. Human *de novo* papillary renal-cell carcinomas in a kidney graft: evidence of recipient origin with adenoma-carcinoma sequence. *Am J Transplant*. 2013;13(4):984-92.
61. Kim JK, Carmody IC, Cohen AJ, Loss GE. Donor transmission of malignant melanoma to a liver graft recipient: case report and literature review. *Clin Transplant*. 2009;23:571-4.
62. Bajaj NS, Watt C, Hadjiliadis D, Gillespie C, Haas AR, Pochettino A et al. Donor transmission of malignant melanoma in a lung transplant recipient 32 years after curative resection. *Transplant International*. 2010;23:26-31.
63. Cui C-B, Gerber DA. Donor-associated malignancy in kidney transplant patients. *The Journal of Clinical Investigation*. 2013;123(9):3708-9.
64. Robin AJ, Cohen EP, Chongkairatanakul T, Saad E, Mackinnon AC. A single center's approach to discriminating donor versus host origin of renal neoplasia in the allograft kidney. *Annals of Diagnostic Pathology*. 2016; 23:32-4.
65. Baudoux TER, Gastaldello K, Rorive S, Hamade A, Broeders N, Nortier JL. Donor cancer transmission in kidney transplantation. *Kidney International Reports*. 2017;2:134-7.
66. Tamè M, Calvanese C, Cucchetti A, Elisa Gruppioni E, Colecchia A, Bazzoli F. The Onset of *de novo* Hepatocellular Carcinoma after Liver Transplantation can be both of Donor and Recipient origin. A Case Report *Journal Gastrointestinal Liver Disease*. 2015;24(3):387-9.
67. Lipshutz GS, Mihara N, Wong R, Wallace WD, Allen-Auerbach M, Dorigo O et al. Death from metastatic donor-derived ovarian cancer in a male kidney transplant recipient. *American Journal of Transplantation*. 2009;9:428-32.
68. Morath C, Schwenger V, Schmidt, Zeier M. Transmission of Malignancy with Solid Organ Transplants. *Transplantation*. 2005;80:S164-6.