МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО КЛИНИЧНА ЛАБОРАТОРИЯ И КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ

ПРОУЧВАНЕ НА ИМУНОГЕНЕТИЧНИ МАРКЕРИ – РОЛЯ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ НА ХЕМАТОПОЕТИЧНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ

Цветелин Иванов Луканов

ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователна и научна степен "Доктор"

Научен ръководител: Проф. д-р Елисавета Йорданова Наумова, д.м.н.

София, 2015

СЪДЪРЖАНИЕ

ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ **5**

ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР **7**

I. ВЪВЕДЕНИЕ 7

II. ТРАНСПЛАНТАЦИЯ НА ХЕМАТОПОЕТИЧНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ 8

II.1. Фактори, влияещи върху изхода от трансплантация на хематопоетични стволови клетки 9

II.1.1. Роля на HLA съвместимостта 9

II.1.2. Структура на HLA молекулите 9

II.1.3. Роля на отделните HLA несъвместимости 11

II.1.4. Време за намиране на неродствен донор в регистъра 17

II.1.5. Роля на не-HLA генетичните полиморфизми 23

III. ХИМЕРИЗЪМ 26

III.1. Връзка между химеризма и различните терапевтични стратегии 26

III.1.1. Оценка на химеризма при миелоаблативни трансплантации 26

III.1.2. Оценка на химеризма при немиелоаблативни трансплантации 27

III.1.3. Химеризъм при въвеждане на донорни лимфоцити (DLI) 29

III.2. Химеризъм при немалигнени заболявания 30

III.3. Химеризъм при малигнени заболявания 30

III.4. Методи за анализ на химеризма 33

IV. ОБОБЩЕНИЕ 38

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ 40

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ 42

I. МАТЕРИАЛ 42

II. МЕТОДИ 44

II.1.1. Изолиране на геномна ДНК от периферна венозна кръв и костен мозък 44

II.1.2. Определяне на тъканна съвместимост (HLA генотипизиране) 45

II.1.2.1. HLA генотипизиране с ниска разграничителна способност 45

II.1.2.2. HLA генотипизиране с висока разграничителна способност 48

II.1.3. Изследване на химеризъм 51

III. СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ 58

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ ... 60

РАЗДЕЛ I. ПРЕДТРАНСПЛАНТАЦИОННИ ФАКТОРИ, ОКАЗВАЩИ ВЛИЯНИЕ ВЪРХУ ИЗХОДА ОТ ТХСК ... 60

I.1. Роля на съвместимостта по HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 локусите ... 60

I.2. Роля на съвместимостта по HLA-DPB1 локуса ... 64

I.3. Роля на не-имуногенетични фактори ... 66

I.3.1. Роля на първичното заболяване ... 66

I.3.2. Роля на вида донор ... 68

I.3.3. Роля на половата съвместимост ... 69

I.4. Адитивен ефект на различните предтрансплантационни фактори ... 72

I.5. Обсъждане ... 76

РАЗДЕЛ II. СЛЕДТРАНСПЛАНТАЦИОННИ ФАКТОРИ, ОКАЗВАЩИ ВЛИЯНИЕ ВЪРХУ ИЗХОДА ОТ ТХСК ... 83

II.1 Въвеждане на методи за следтрансплантационен мониторинг на химеризъм ... 83

II.1.1. PCR-STR метод за изследване на химеризъм ... 83

II.1.1.1. Точност ... 84

II.1.1.2. Възпроизводимост ... 87

II.1.2. Автоматизация на резултатите и поддържане на база данни ... 92

II.1.2.1. Изчисляване на процента донорна химера ... 92

II.1.2.2. Подбор на информативни маркери ... 92

II.1.2.3. Математически параметри, използвани за оценка на представянето на платформата ... 93

II.1.2.4. Алгоритъм за оценка на резултатите ... 94

II.1.2.5. Проследяване статуса на пациентите и поддържане на база данни ... 94

II.1.3. Количествен real-time PCR метод за изследване на химеризъм ... 97

II.1.4. Обсъждане ... 100

II.2. Химеризъм ... 106

II.2.1. Роля на кондициониращия режим ... 108

II.2.2. Роля на проследяването на нивата на химеризма ... 110

II.2.2.1. Предтрансплантационни фактори, влияещи върху химеризма ... 111

II.2.2.2. Връзка на химеризма със следтрансплантационни събития ... 112

II.2.2.3. Ниво на донорния химеризъм по време на релапс ... 115

II.2.3. Обсъждане ... 117

ОБОБЩЕНИЕ 122

ИЗВОДИ 125

СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ 126

ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА 128

ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

Алогенна трансплантация на стволови клетки – ало-СКТ

Второстепенни антигени на тъканната съвместимост - minor histocompatibility antigens; mHAgs

Главен комплекс за тъканна съвместимост – Major Histocompatibility Complex; MHC

Донорен химеризъм - ДХ

Единични нуклеотидни полиморфизми – single nucleotide polymorphisms; SNP

Ефект на присадката срещу левкемията - graft-versus-leukemia; GVL

Имуноглобулин-подобни рецептори на NK клетките - killer immunoglobulin-like receptors; KIR

Доверителен интервал - confidence interval; CI

Коефициент на риск - hazard ratio; HR

Количествен PCR в реално време – quantitative real-time PCR, RQ-PCR

Къси тандемни повтори – short tandem repeats; STR

Международен регистър за донори на стволови клетки - Bone Marrow Donor Worldwide; BMDW

Международната работна група за тъканна съвместимост - International Histocompatibility Working Group; IHWG

Миелоаблативно кондициониране – myeloablative conditioning; MA

Миелодиспластичен синдром - МДС

Минимална резидуална болест – МРБ

Националната програма за донори на стволови клетки на Съединените Щати - National Marrow Donor Program; NMDP

Немиелоаблативно кондициониране – nonmyeloablative conditioning; HMA

Несвързана с релапс смъртност – non-relapse mortality; NRM

Неунаследени майчини антигени - non-inherited maternal antigens; NIMA

Обща преживяемост – overall survival; OS

Остра лимфобластна левкемия – ОЛЛ

Остра миелобластна левкемия – ОМЛ

Относителен риск – relative risk; RR

Полимеразна верижна реакция – polymerase chain reaction; PCR

Протокол за кондициониране с намален интензитет - reduced intensity conditioning; RIC

Пълна донорна химера – ПДХ

Реакция на присадката срещу гостоприемника - graft-versus-host disease; GvHD

Свободна от болест преживяемост – disease-free survival; DFS

Смъртност, свързана с трансплантацията - transplant related mortality; TRM

Кръв от пъпна връв - КПВ

Трансплантация на хематопоетични стволови клетки - ТХСК

Хронична миелоидна левкемия – ХМЛ

Център за международни проучвания в областта на трансплантациите - Center for International Blood and Marrow Transplant Research; CIBMTR

Човешки левкоцитен антиген - Human Leukocyte Antigen; HLA

Въвеждане на донорни лимфоцити – donor lymphocyte infusion; DLI

ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

I. ВЪВЕДЕНИЕ

През март 1969г. *проф. Thomas,* заедно със своя екип, извършват първата трансплантация на хематопоетични стволови клетки (ТХСК). Оттогава трансплантацията на костен мозък и периферни стволови клетки се е превърнала в рутинен метод за лечение на редица малигнени и немалигнени хематологични заболявания [1-6]. Алогенната трансплантация на стволови клетки е ефективна при възстановяването на нормалната хематопоеза и е предпочитан терапевтичен метод при злокачествените болести на кръвта, поради ефекта на присадката срещу левкемията (graft-versus-leukemia, GVL). Този ефект се дължи главно на донорните Т-клетки, които показват имунореактивност спрямо второстепенните антигени на тъканната съвместимост (minor histocompatibility antigens, mHAgs) на реципиента или епитопи, специфични за левкемичните клетки. Периодът след заселването на стволовите клетки на донора в костния мозък на реципиента може да продължи месеци до години. Най-важното в този период е възстановяването на имунната система и предпазването от реакция на присадката срещу гостоприемника (graft-versus-host disease, GvHD). Всеки етап от трансплантационния процес потенциално излага пациента на компликации и животозастрашаващи събития, които до голяма степен се дължат на липсата на разбиране на механизмите на приемане и отхвърляне на присадката, както и на генетичните различия, които съществуват между донора и реципиента. В допълнение, много фактори, свързани с донора, реципиента, болестта и процеса на трансплантация, могат да повлияят на възникването и тежестта на последващите усложнения. Възстановяването на хематопоезата зависи главно от възможността донорните хематопоетични стволови клетки да генерират достатъчно прогениторни клетки, които да населят нишите на костния мозък. Важно за следтрансплантационното проследяване на пациентите е да се знае, каква част от хематопоезата се дължи на присадените донорни клетки и каква част на собствените клетки на пациента. Определянето на генетичния й произход се нарича изследване на химеризъм. Терминът „химера" е въведен в медицината за първи път от *Anderson и сътрудници* [7] през 1951г., а в областта на трансплантологията - от *Ford* [8] през 1956г. Използва се за лица, които имат клетъчни популации, произхождащи от различни индивиди от същия или различен вид, които възникват

инцидентно при бременност или кръвопреливания, или целево при трансплантация на тъкани, органи и клетки. Съвместното съществуване на клетки от два различни организма в едно тяло се обозначава с термина „химеризъм”.

II. ТРАНСПЛАНТАЦИЯ НА ХЕМАТОПОЕТИЧНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ

Първоначално алогенната ТХСК е разработена като подход за спасяването на пациенти, лекувани със смъртоносни дози радиация или химиотерапия срещу различни злокачествени заболявания. Впоследствие се разбира, че лечебният ефект се дължи основно на имунологични реакции на клетките на донора срещу малигнените клетки на гостоприемника [9]. С това откритие приложението на ТХСК се разширява значително през следващите десетилетия, и продължава да се развива с напредъка в кондиционирането на пациентите, следтрансплантационното лечение и източниците на стволови клетки. Областта, която обхваща ТХСК, е много широка и включва елементи от имунологията, радиобиологията, инфекциозните болести и онкологията.

В ранните етапи на костно-мозъчната трансплантация лечението се е прилагало при пациенти с левкемии в късен етап или при апластична анемия след неуспех в конвенционалното лечение [10]. Понастоящем в световен мащаб годишно се извършват над 60 000 трансплантации на хематопоетични стволови клетки, като през декември 2012г. беше извършена едномилионната трансплантация [11, 12]. Освен постоянното разширяване на списъка на индикациите за трансплантация, се наблюдава и изместване на периода за трансплантация към по-ранните етапи на заболяванията. Ретроспективният анализ на американската национална програма за донори на костен мозък (National Marrow Donor Program, NMDP), включващ близо 4 000 трансплантации от неродствени донори, показва, че трансплантациите в ранните етапи на болестта се свързват с 38% по-нисък риск от смъртност, в сравнение с тези в средните етапи. Когато трансплантацията се извърши в късните етапи на болестта, рискът от смъртност е двойно по-висок [13]. Други изследвания също установяват подобни резултати, като по-късите интервали между диагнозата и трансплантацията се свързват със свободна от болест преживяемост (disease-free survival, DFS) [14, 15]. Освен по-добър изход, ранната трансплантация се свързва и с по-ниска

вероятност от усложнения, като рефракторна болест, инфекции и интоксикация на органите.

II.1. Фактори, влияещи върху изхода от трансплантация на хематопоетични стволови клетки

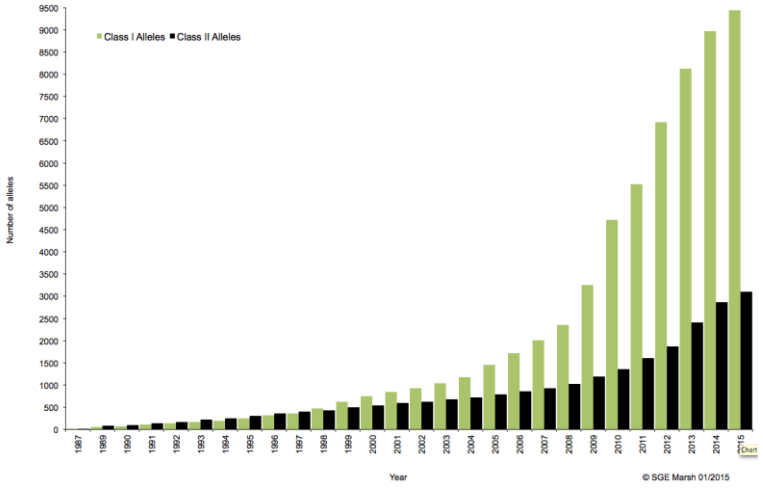
II.1.1. Роля на HLA съвместимостта

Нормалните генетични вариации в човешкия геном могат да генерират потенциално имуногенни трансплантационни антигени и да доведат до GvHD, GVL или отхвърляне на присадката. Два конкретни индивида, каквито са донора и реципиента при ТХСК, се различават по тяхната геномна структура, второстепенни антигени на тъканната съвместимост (mHAg). Имуноглобулин-подобните рецептори на NK клетките (killer immunoglobulin-like receptors, KIR), както и различни други гени. Най-значима роля имат гените на HLA (човешки левкоцитен антиген - Human Leukocyte Antigen) системата, кодирани от главния комплекс за тъканна съвместимост (Major Histocompatibility Complex, MHC). Молекулярно-генетичните методи осигуриха безпрецедентен поглед върху разнообразието на HLA региона. Приложението им при подбора на донори на хематопоетични стволови клетки значително подобри преживяемостта на пациентите и хвърли светлина върху процесите, свързани с изхода от трансплантацията.

II.1.2. Структура на HLA молекулите

HLA клас I и клас II молекулите са трансмембранни гликопротеини, състоящи се от две нековалентно свързани вериги. Клас I молекулите са хетеродимери, изградени от тежка (44 kDa) и лека (12 kDa) верига. Тежката верига, наречена α, е силно полиморфна и се състои от екстрацелуларен, мембранен и цитоплазмен участъци. Обратно, леката верига, наречена β2 микроглобулин, е инвариантна и е кодирана от ген, разположен върху 15 хромозома. Клас II молекулите също са хетеродимери, състоящи се от α (34 kDa верига кодирана от HLA клас II A гените) и β (29 kDa верига кодирана от B гените) трансмембранни гликопротеини [16].

HLA съвместимостта се базира на полиморфизми в антиген-свързващото място. Това е структурата, която директно разпознава пептидите от Т-клетъчния рецептор. При HLA клас I молекулите тя се образува от α1 и α2 домените, кодирани от екзони 2 и 3 на гена за тежката верига, докато при клас II антиген-разпознаващото място се образува от кодирания от екзон 2 β2 домен. Естеството на HLA полиморфизма с пренареждането на генни сегменти значително затруднява определянето на HLA алелите. Разнообразието в HLA региона се дължи главно на обмена на нуклеотидни последователности между рекомбинантните двойки. Това означава, че повечето нови алели възникват поради разместването на вече съществуващи ДНК секвенции, а не в резултат на спонтанни мутации [17]. В резултат на това пренареждане, някои алели от даден локус, а в някои случаи и от различни локуси, споделят общи мотиви, макар и в различни комбинации с други мотиви. Понастоящем, техниките използвани за HLA типизиране често дават неразграничими комбинации именно поради наличието на общи секвенционни мотиви. Повечето методи използват локус-специфична амплификация на един или няколко екзона, което понякога затруднява определянето на ориентацията – *цис* или *транс* – на двата полиморфни сегмента в един хетерозиготен индивид. Допълнително, секвенирането на други екзони доведе до идентификацията на много нови алели (фиг. 1 и табл. 1), което затрудни намирането на напълно съвместими двойки донор-реципиент.



Фигура 1. Графика, показваща броя на алелите по години (адаптирана по Marsh, 2015) [18].

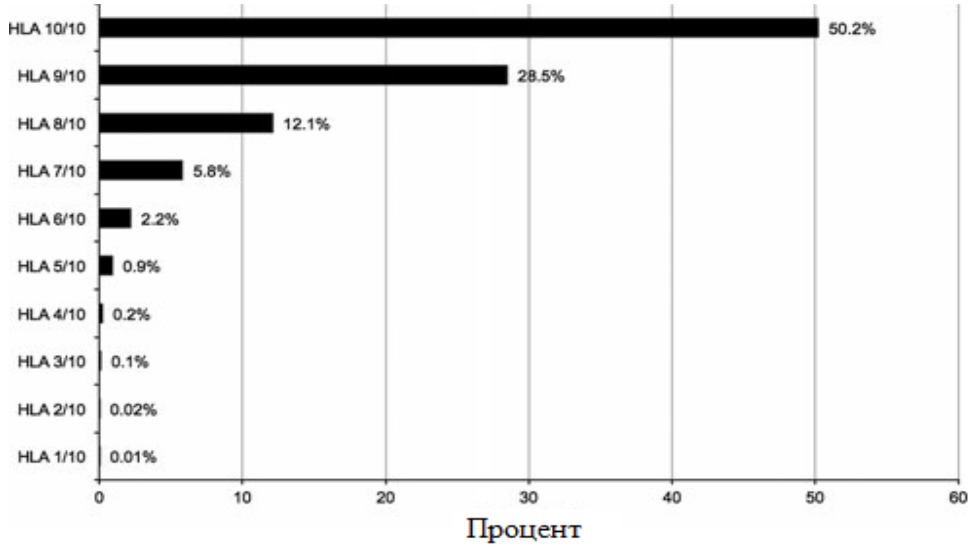
Таблица 1. Брой открити HLA алели (адаптирана по Robinson, 2015) [19].

HLA клас I			
Ген	*A*	*B*	*C*
Алели	2946	3693	2466
Протеини	2077	2741	1739
Нулеви алели	138	122	74

HLA клас II			
Ген	*DRB1*	*DQB1*	*DPB1*
Алели	1684	712	472
Протеини	1237	473	390
Нулеви алели	42	17	13

II.1.3. Роля на отделните HLA несъвместимости

Смята се, че най-добрият донор е сиблинг на пациента, който е идентичен по HLA-A, -B, -C, -DRB1, –DQB1 и –DPB1 локусите (12/12 съвместимост). За тези пациенти, при които не се намира съвместим донор в семейството, възможност за животоспасяваща трансплантация дава намирането на съвместим неродствен донор. За останалите реципиенти единствената опция е намирането на алтернативен донор – хаплоидентичен фамилен (5-9/10 алелни съвместимости), частично несъвместими единици кръв от пъпна връв (3-6/6 по HLA-A, -B, -DRB1) или несъвместим неродствен донор (7-9/10) [20-23]. В такива случаи се препоръчва трансплантация с т. нар. „позволени" несъвместимости, въпреки че дефиницията на този термин е въпрос на постоянен дебат. По данни на Международната работна група за тъканна съвместимост (International Histocompatibility Working Group, IHWG; n=25 855) процентът на 10/10 трансплантациите е 50.2 от общия дял, следвани от 9/10 (28.5%) и 8/10 (12.1%; фиг. 2) [24].



Фигура 2. Процентно съотношение на трансплантациите според нивото на HLA съвместимост (адаптирана по Petersdorf, 2013).

Основно ролята на HLA несъответствията зависи от броя на различията, вида им (алелни или антигенни) и локуса. Изходът от трансплантацията се повлиява и от броя и местоположението на аминокиселинните замени – дали засягат или не антиген-разпознаващото място. При наличие само на несъвместими донори, познаването на локус-специфичния риск на отделните несъответствия би подпомогнало селекцията. Въпреки че са описани като рискови фактори за изхода от ТХСК, ефектът на тези несъответствия в HLA системата може да се контролира. Освен това, наличието им благоприятства GVL ефекта, въпреки че поддържането на баланс между него и GvHD е много трудно [25].

През 2004г. NMDP публикува резултати за изхода на 1874 трансплантации от неродствени донори [22]. Това изследване показа значимо по-висока преживяемост на реципиентите, трансплантирани от 8/8 съвместими донори (HLA-A, -B, -C, -DRB1) в сравнение с тези с една [относителен риск (relative risk - RR) = 1.32] или две (RR=1.53) несъвместимости (P=0.0003). По-късно, *Lee и сътрудници* разширяват групата до близо 4000 трансплантирани пациенти, като се фокусират върху три аспекта на тъканната съвместимост – какви са възможните изходи при HLA несъвместима трансплантация, кой несъвместим донор е по-подходящ и каква е ролята на тъканната съвместимост в сравнение с другите клинични показатели [13]. Обхванатият контингент включва само пациенти с миелоаблативна терапия, които са типизирани на алелно ниво по HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1, -DQB1, -DPA1 и –DPB1 локусите. Основната част от тях са трансплантирани с Т-клетъчно изчерпан костен мозък. Резултатите показват най-добра преживяемост при HLA-A, -B, -C, -DRB1 съвместими трансплантации (едногодишна преживяемост: 8/8=52%; 7/8=43%; 6/8=33%; P=0.001). Когато това не е възможно, единичните несъответствия в HLA-B (RR=1.16) или HLA-C (RR=1.19) локусите се приемат по-добре, отколкото тези в HLA-A (RR=1.36) или HLA-DRB1 (RR=1.48). Всяка допълнителна несъвместимост намалява преживяемостта с 9-10%. Редица изследвания показват, че единичните различия по HLA-DQB1 са добре толерирани, но наличието им в присъствие на други несъответствия по останалите 4 локуса се свързва с неблагоприятен изход от трансплантацията [13, 21, 22, 26]. Несъответствията по HLA-DP локуса също не се свързват с влошаване на общата преживяемост при 8/8 съвместимите двойки [13, 22].

В изследване на Центъра за международни проучвания в областта на трансплантациите (Center for International Blood and Marrow Transplant Research, CIBMTR), включващо пациенти с хронична миелоидна левкемия (ХМЛ) трансплантирани в първа хронична фаза, 5-годишната обща преживяемост (overall survival, OS) при 8/8 е 55%, 40% при 7/8 и 21-34% при >7/8 [26].

IHWG публикува данните от изследване на 5 210 трансплантации от неродствени донори с миелоаблативно кондициониране [27]. За сравнение са използвани 10/10 съвместимите трансплантации, като наличието на несъответствие е оценено с коефициент на риск (hazard ratio, HR) от смъртност 1.20 [95% доверителен интервал (confidence interval, CI): 1.12-1.30; P<0.0001]. При изчисляването на този коефициент са взети предвид тежестта на заболяването, възраста на пациента и етническата принадлежност. Единичните несъответствия по клас I локусите се асоциират със значимо понижаване на OS, докато тези в клас II не оказват влияние.

Друго изследване (n=2399) показа като неприемливи в европейската популация несъответствията по HLA-B, -C и –DRB1 [21]. По-различни резултати се получават при японската популация (n=1298), където различията по HLA-A или -B понижават 3-годишната преживяемост (39.9% срещу 65.4% за 10/10 групата). HLA-C и –DRB1 несъответствията се свързват с повишен риск от остра GvHD и слабо влияние върху OS, докато HLA-DQB1 не оказва влияние [21]. Друго изследване на същата група (n=1790) при пациенти с левкемия, кондиционирани с миелоаблация, показва несъответствията по HLA-A, -B и –DQB1 като независими рискови фактори (HR=1.36; 1.4 и 1.28, съответно) [27]. По-малко е влиянието на различията в HLA-C локуса (HR=1.17), а за DRB1 не се открива такова (HR=0.92). Изследването на IHWG показва силно неблагоприятен ефект на несъответствията в HLA-A локуса при японската популация (HR=2.27, 95% CI: 1.14-4.53), в сравнение с останалите популации (HR=1.24, 95% CI: 0.92-1.67) [28]. Обратно, несъответствията по HLA-C локуса са добре толерирани в японската популация (HR=1.05, 95% CI: 0.50-2.23), но оказват силно неблагоприятен ефект при кавказките популации (HR=1.68, 95% CI: 1.36-2.08). Интерпретацията на тези етнически детерминирани различия е трудна, но може да се обясни с алелните честоти в отделните популации. При разширен анализ на HLA-A2 алелната група при европейците, само A*02:01/A*02:06 алелното

несъответствие, което е често срещано при японците, показа повишаване на смъртността (HR=1.58, P≤0.001). За всички останали разлики, включително A*02:01/A*02:05, който е най-често срещан в другите изследвани популации, не се открива статистически значим ефект [29]. Други възможни обяснения за различията в индивидуалната оценка на отделните локуси може да са т. нар. „разрешени" и „неразрешени" несъответствия, или неравномерното разпределение на отделните несъответствия между различните изследвания.

Редица автори проучват влиянието на HLA несъответствията в зависимост от използваните стволови клетки и вида на кондициониращия режим [30-33]. В известна степен резултатите са противоречиви, но като цяло показват по-слабото влияние на единичните несъответствия при използването на Т-клетъчно изчерпани присадки. *Shaw и сътр.*, показват липсата на значима разлика в OS при пациенти с неродствени донори с една или повече несъвместимости и трансплантирани с изчерпани присадки и протокол за кондициониране с намален интензитет (reduced intensity conditionin, RIC; n=114; P=0.005). Подобни резултати докладва и друг екип, но с немиелоаблативно кондициониране (n=89) [31]. И двете групи установяват слабо повишен риск от отхвърляне на присадката или нейното нефункциониране. Различни данни показват *Но и сътр.*, които изследват влиянието на HLA-C несъвместимостите при немиелоаблативни трансплантации [34]. Резултатите показват значително намалена 2-годишна преживяемост – 27% сравнено с 51% при 10/10 (P=0.02).

Проучването на риска, свързан с антигенни (между две серологично различни HLA детерминанти) или алелни (между две секвенции на един HLA антиген) несъответствия в отделните локуси, показва малко по-голяма имуногенност при първите [13, 22]. Изключение е HLA-C локуса, където несъответствията на антигенно ниво се свързват със значително по-лош изход, отколкото тези на алелно [13, 35]. Тези резултати могат да се обяснят с ниската имуногенност на HLA-C молекулите, както и с наличието на KIR-свързващи HLA-C епитопи, които са по-често срещани при антигенните, отколкото при алелните несъответствия.

От друга страна, при липса на напълно съвместим донор, приоритетното използване на донори с алелни несъответствия, пред тези с антигенни, може да понижи

следтрансплантационните усложнения. *Petersdorf и сътрудници*, показват, че неблагоприятното влияние на HLA се измества от етапа на заболяването, като не се наблюдава разлика между алелни и антигенни несъответствия. Докато несъответствията при ниско рисковите пациенти корелират с повишена смъртност, то при високо рисковите такава корелация не се наблюдава (ниско рискови групи: HR=1.50, 95% CI: 1.28-1.76, P=0.0001; средно рискови групи: HR=1.15, 95% CI: 1.02-1.29, P=0.02; високо рискови групи: HR=1.06, 95% CI: 0.92-1.22, P=0.43) [27]. Зависимостта между етапа на болестта и влиянието на степентта на тъканна съвместимост се потвърждава и от други изследвания [13, 20]. Това означава, че при липса на напълно съвместим донор, високо рисковите пациенти могат да се трансплантират от донори с единични различия, като по този начин ще се осигури ранно лечение и ще се избегне риска от прогресия на заболяването по време на дългия период на търсене на съвместим донор.

Напоследък HLA-DPB1 се приема като класически трансплантационен ген. При HLA-A, -B, -C, -DRB1 и -DQB1 съвместими трансплантации от неродствени донори HLA-DP алоантигените служат за индукцията на GVL и GvHD [36-40]. Този ефект не зависи от броя на HLA несъответствията и може да се използва като терапевтичен подход при пациенти с високо рискови левкемии и би намалил вероятността от релапс на болестта [36, 40]. При 12/12 съвместимите трансплантации в ранен етап на болестта, 5-годишната преживяемост е значително по-добра от тази на 10/10 съвместимите (63% срещу 41%, съответно; P=0.006) [41]. Тези резултати не важат за високо рисковите пациенти. Обратно, при наличието на несъвместимост по един от основните 5 HLA локуса, допълнителното несъответствие по HLA-DPB1 оказва благоприятно влияние върху преживяемостта (5-годишна OS: 39% срещу 21%, P=0.008). По-силно изразено е това влияние при трансплантации в късните етапи на болестта (P=0.01).

Алелните и антиген-специфичните рискове показват, че имуногенността на HLA несъответствията се влияе от природата на нуклеотидните замени в пептид-свързващото място и/или в позиции, влизащи в контакт с Т-клетъчния рецептор. HLA-DP локусът служи като образец за разбирането на секвенционните мотиви, които определят толерантните несъответствия. Чрез използването на място-специфична мутагенеза се откриха HLA-DP мотиви, които определят алореактивни Т-клетъчни епитопи [42].

Наличието на 8LFQG11 мотива, кодиран от β-веригата на HLA-DP молекулите, анулира Т-клетъчния епитоп и се приема като „разрешено" несъответствие [39, 42-44]. Тъй като подбора на донорите се извършва на базата на HLA-A, -B, -C, -DRB1 и –DQB1, голяма част от тях са несъвместими по HLA-DPB1 локуса. Рискът от отхвърляне на присадката е значително по-висок при трансплантации с високо-рискови несъответствия в посока HVG, в сравнение с тези с ниско-рискови HLA-DPB1 комбинации [39, 42, 45, 46]. Изследване на Италианския регистър за донори на стволови клетки (n=621) показва значително по-висока 2-годишна преживяемост при трансплантации с „разрешени" HLA-DPB1 несъвместимости, в сравнение със „неразрешените" (54.8% срещу 39.1%, съответно; P=0.005) [45]. Влиянието на „неразрешените" DPB1 различия се наблюдава, както при 10/10 съвместимите трансплантации, така и при 9/10 и не се влияе от степента на болестта. Подобни са и резултатите в 2 изследвания на IHWG (*Shaw и сътр.* 2009; n=5 846 и *Fleischhuaer и сътр.* 2012; n=8 539) – 12/12 съвместимите трансплантации показват значително по-висок риск от релапс и по-нисък от развитие на остра GvHD степен III-IV , в сравнение с 10/10 с „разрешени" HLA-DPB1 несъвместимости. Трансплантации с 9/10 + „разрешено" DP несъответствие имат сравнима преживяемост с 10/10 + „неразрешена" DP несъвместимост [46, 47].

Ferrara и сътрудници първи се опитват да намерят корелация между изхода от трансплантацията и конкретни несъответствия в HLA клас I молекулите [48]. Те установяват, че несъответствия в позиции 114 и 116 в HLA-B локуса са свързани с повишен риск от смъртност, свързана с трансплантацията (transplant related mortality, TRM). Разлика в позиция 116 повишава риска от тежка GvHD и съответно допринася за високата TRM при тези пациенти. Авторите предполагат, че аминокиселината, която включва позиция 116, играе ключова роля в определянето на имуногенността на HLA-B молекулите. По-детайлно изследване на тази позиция в клас I локуса в японската популация показа, че само замяна Asn→Asp (HLA-A) и Leu→Ser (HLA-C) има неблагоприятен ефект върху изхода от трансплантацията [27]. Тези наблюдения са разширени в изследването на IHWG (n=4 796), което показва 4 HLA-A, 1 HLA-B, 7 HLA-C, 2 HLA-DR/DQ хаплотипа и 2 HLA-DP комбинации от „неразрешени" несъответствия [27]. Установено е повишаване на риска с увеличаване броя на тези различия. Чрез използването на новаторски статистически подход, *Marino и сътр.* докладват 33

аминокиселинни замени, свързани с повишена смъртност в първите 100 дни след ТХСК при ниско и среднорискови пациенти (n=2107), които са трансплантирани от несъвместими по клас I донори [49]. В HLA-A локуса са идентифицирани 14 замени, 4 в HLA-B и 15 в HLA-C. Все още проучванията за ролята на определени аминокиселинни замени са ограничени, но изглежда несъответствията на позиции 116 и 156 за клас I локусите, позиция 9 за HLA-A или HLA-C и позиция 99 за HLA-C се свързват с неблагоприятен изход в ранния следтрансплантационен период [27, 48, 49]. По данни на IHWG при 9/10 трансплантациите (n=6 203) в 41.9% от случаите несъответствието е било в HLA-C локуса, в 23% в HLA-A, 18.3% HLA-DQB1, 10.4% в HLA-B и 6.2% в HLA-DRB1. При 8/10 трансплантациите (n=4 636) най-честата комбинация от несъответствия е DRB1-DQB1 (26%), следвана от B-C (21.6%) и A-C (15.6%). В 58.8% едната разлика е в HLA-C локуса. От 15 027 двойки, типизирани за HLA-DPB1, 82% са различни [24].

Въпреки напредъка в разбирането на ролята на тъканната съвместимост за изхода от трансплантацията на хематопоетични стволови клетки, все още има неизяснени въпроси. Повечето от големите иследвания са извършвани основно при трансплантации с миелоаблативен кондициониращ режим и костен мозък като източник на стволови клетки. Проучванията при Т-клетъчно изчерпани присадки, RIC или немиелоаблативна подготовка (nonmyeloablative conditioning, HMA), друг източник на стволови клетки или различни протоколи за имуносупресия, са малко на брой и включват малки таргетни групи. Въпреки това, получените данни показват по-различно влияние на HLA съвместимостта. Допълнително влияние може да оказват и други генетични фактори, като mHags, цитокиновия генен полиморфизъм, KIR хаплотипите и наличието на анти-HLA антитела. Недобре проучена е и ролята на различните негенетични фактори, като възраст, пол, брой на $CD34^+$ клетките, време до трансплантация и влиянието на различните вирусологични маркери.

II.1.4. Време за намиране на неродствен донор в регистъра

За пациенти, които нямат подходящ донор във фамилията, алтернатива е намирането на нефамилен донор. Търсенето са извършва в международния регистър за донори на стволови клетки (Bone Marrow Donor Worldwide, BMDW), който към февруари 2015г.

наброява 24.9 милиона донора и 0.63 млн. единици кръв от пъпна връв [50]. Въпреки наличието на огромен брой доброволни донори, значителна част от пациентите не се трансплантират. Това се дължи на липсата на подходящи донори, поради неприемливи HLA несъответствия или промяна в клиничното състояние на пациентите по време на продължителния процес на търсене [51]. Тук основна роля за намиране на донор играе честотата на HLA генотипа на пациента, която до голяма степен зависи от етническата му принадлежност.

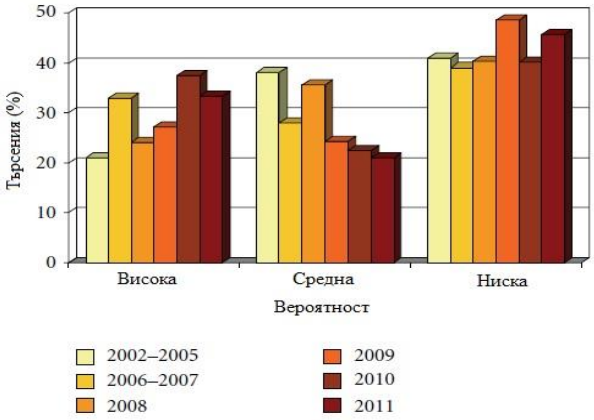
Най-добър вариант е намирането на неродствен донор съвместим на алелно ниво по петте основни HLA локуса – A, B, C, DRB1 и DQB1. Много малка част от наличните в BMDW донори са типизирани на това разграничително ниво и по всички локуси. Това налага извършването на допълнителни тестове на избраните донори, което от своя страна оскъпява и забавя самия процес на търсене. При стартиране на процедурата по търсене на неродствен донор възможността за предвиждане на изхода от нея би била от голяма помощ за клиницистите за евентуално пренасочване на терапевтичния подход. При липсата на напълно съвместим донор, в зависимост от клиничното състояние на пациента и политиката на трансплантационния център, и с оглед да се избегне продължителното търсене, може да се прибегне до алтернативен подход – ранна трансплантация с непълна съвместимост, използването на единици кръв от пъпна връв или конвенционална терапия [20, 52].

Един подход, подпомагащ намирането на съвместим донор, е използването на общите ABDR хаплотипи [53-55]. Тук сериозно ограничение е все по-голямото разнообразие на HLA алелите, както и наличието на различни междулокусни асоциации (B-C, DR-DQ). Добър пример е честият за европейската кавказка популация хаплотип A2-B44-DR11, който се разделя на три комбинации: A*02:01-B*44:02-C*05:01-DRB1*11:01-DQB1*03:01, A*02:01-B*44:02-C*05:01-DRB1*11:04-DQB1*03:01 и A*02:01-B*44:02-C*07:04-DRB1*11:01-DQB1*03:01 [56].

През 2002г., Националният регистър на Швейцария (Swiss Blood Stem Cells; SBSC) въвежда 3-степенна оценка на реципиентите за възможността да им се намери съвместим донор – висока (>95% шанс), ниска (<5% шанс) и средна [57]. Класификацията на пациентите се извършва според наличието на чест хаплотип, алелна честота или

необичайна B-C, DRB1-B3, DRB1-DQB1 комбинация, и цели да подобри алгоритъма за търсене на подходящ неродствен донор. Резултатите на швейцарската група показват, че на 69% от пациентите с висока оценка се намира напълно съвместим донор, докато при тези със средна или ниска оценка процентът е значително по-нисък – 34% и 8%, съответно (n=350). Наскоро публикувано изследване върху 774 фамилии от френската популация показва огромното влияние на наличието на поне един чест хаплотип за намирането на подходящ донор (≥9/10; $P<5x10^{-6}$) [58]. Високият процент вероятност за намиране на 10/10 донор дава на клиницистите и повече свобода при избора на не-HLA критерии или евентуална DPB1 съвместимост, докато за пациентите в някоя от другите две групи трябва да се има предвид трансплантация от несъвместим донор. При сравняване на 3-годишната преживяемостта между групите се наблюдава значителна разлика (висока=75±14%; средна=51±13%; ниска=54±12%; P=0.01). Това различие може да се обясни с високия процент на трансплантации от несъвместими донори при средната и ниската категории, както и по-дългия период на търсене в регистъра при тях. Въпреки това, при сравняване на 10/10 трансплантациите при отделните категории, изходът е по-благоприятен при пациентите от първата група (висока = 73±14%; средна/ниска = 52±14%; P=0.01). Разликата вероятно се дължи на по-голямата съвместимост в генетичните детерминанти извън HLA региона, поради високата честота на консервативни хаплотипи [59].

Разрастването на световния регистър за донори на костен мозък (от 8 млн. през 2002г. до 25.5 млн. през 2015г.), по-добрата HLA информация за наличните донори (типизиране на алелно ниво и включването на допълнителни локуси), както и напредъка в разбирането на ролята на тъканата съвместимост при ТХСК, доведоха до по-прецизното търсене на подходящи донори. В наскоро публикувана осъвременена информация от SBSC (n=1244) съотношението на търсенията с висока вероятност нараства през последните години (от 21% на 33-37%) за сметка на тези със средна вероятност (от 38% на 21%), докато ниско вероятните остават сравнително постоянни през годините (около 40%) (фиг. 3) [60]. Подобни данни показва и изследване на NMDP, обхващащо 7 486 трансплантации [61].



Фигура 3. Разпределение по групи на търсенията в SBSC за периода 2002-2011 (адаптирана по tiercy, 2012).

Сред основните факторите, които оказват негативен ефект върху вероятността за намиране на 10/10 съвместим неродствен донор, са етническата принадлежност, наличието на рядък алел в някой от локусите или рядка асоциация между HLA-B и –C, DRB1-DRB3 или DRB1-DQB1 локусите [58, 60, 61]. Допълнително, възрастта на пациента, етапа на заболяването и опита на трансплантационния център оказват влияние върху вероятността за трансплантация с несъвместим донор [61]. Възрастните пациенти, както и тези в ранен етап на болестта имат значително по-голяма вероятност за 10/10 донор, в сравнение с младите и тези с напреднало заболяване ($P<0.0001$). Значение има и опитът – центровете с по-малко трансплантации избират донори с ниска съвместимост по-често, от тези с по-голяма натовареност ($P=0.003$) [61].

Ролята на редките алели или тези с ниска честота за вероятността за намиране на съвместим донор силно се влияе от хаплотипа, в който са представени. Например шансът на пациенти с A*02:05 ще бъде много по-голям, ако носят хаплотип A2-B50-DR7, отколкото A2-B50-DR3 [58]. Друг пример е редкият алел A*02:151, който е открит само в 18 индивида, като в 13 от случаите той е в хаплотип A*02:151-B*07:02-DRB1*15:01 [62, 63]. Редките алели често се асоциират с добре описани хаплотипи, най-вероятно поради по-скорошния им произход. Също така, много алели се различават помежду си извън екзони 2 и 3 за клас I и екзон 2 за клас II, но клиничното значение на този род несъответствия все още се проучва. Класически пример са DRB1*14:01 и *14:54 – два

често срещани алела с приблизително еднаква честота, които се различават по една нуклеотидна замяна в екзон 3 [63].

Времето за намиране на неродствен донор е важен фактор, определящ ефикасността на търсене. В изследване на колектив от Холандия, обхващащо 212 търсения, донор е намерен за 69% от пациентите, като средно търсенето е отнело 10 седмици [51]. Друго изследване от Великобритания (n=60) показва, че 9-10/10 донор е намерен за 72% от болните средно за 11 седмици, ако търсенето е било в рамките на Кралството, или 14 седмици, ако донор е търсен в BMDW [64]. Ретроспективен анализ на 549 търсения от германски ТЦ показва, че 10/10 донор е намерен за 61.6% от реципиентите, средно за 3 седмици (група с висока вероятност), 7 седмици (средна) и 68 седмици (ниска) [65]. Подобни са данните и на колектив от Австрия (n=2 166) – 78.3% вероятност за намиране на 9-10/10 донор, средно за 7 седмици [64]. В Швейцария средно за 8 седмици се намира донор на пациентите в първа група, за 10 седмици на тези във втора и 11 за тези в трета [60].

Неравномерното представяне на различните популации в BMDW прави етническата принадлежност на реципиента един от основните фактори, които влияят върху ефикасността на търсенето. Според данни на NMDP афроамериканците и пациентите от азиатски или испански произход имат няколко пъти по-нисък шанс за намиране на съвместим донор, в сравнение с реципиентите от кавказката популация (2.83, 2.05, и 1.73 пъти, съответно; P<0.0001) [61]. В Холандия реципиентите от северозападна Европа имат 80% шанс за намиране на съвместим донор, сравнено с 59% при останалите популационни групи [51]. Подобни резултати докладват и други центрове, които дават сериозно предимство на пациентите от кавказката популация [66, 67].

Когато клиничното състояние на пациента изисква спешна трансплантация или има рядък генотип, което предполага дълго търсене на съвместим неродствен донор, наличието на хаплоидентични фамилни донори представлява добра алтернатива за трансплантация. Децата унаследяват по една майчина и една бащина хромозома, а антигените от другия хаплотип се наричат неунаследени. Неунаследените майчини антигени (non-inherited maternal antigens, NIMA), при трансплантация от майка на дете, благоприятстват за по-ниския риск от остра или хронична GvHD и смъртност. Този ефект се дължи на донор-

специфичната супресия на Т-клетъчния отговор срещу NIMA (придобиване на имунологична толерантност) [68, 69]. Обратното, при трансплантация от баща на дете, се наблюдава висок риск от реакция на присадката срещу гостоприемника.

Създаването на банките за кръв от пъпна връв значително подпомогна използването на този род трансплантаци като терапевтичен подход, както при деца, така и при възрастни [70-75]. Уникалните функции на стволовите клетки в кръвта от пъпна връв (КПВ) даде нова насока в разбирането на HLA бариерата. По препоръка на Eurocord 6-8/8 съвместимите трансплантации се толерират добре, като трябва да се избягват единици КПВ с ≥3 несъвместимости. Препоръчва се при възможност да се избират различия в клас I, а не в клас II, както и да се вземе под внимание броят на ядрените клетки [76]. Препоръките на NMDP/CIBMTR също са към по-висока съвместимост - ≥4/6 и използването на подходяща доза ядрени клетки [77]. По-големият толеранс към тъканната съвместимост при трансплантациите от КПВ, в сравнение с тези от периферна кръв или костен мозък, се дължи на по-малкия брой зрели Т-клетки, които също така, имат и намалена способност да участват в Th1 отговорите [78]. Въпреки HLA несъвместимостта, острата GvHD е по-лека, а хроничната реакция – по-податлива на лечение, в сравнение с трансплантациите от неродствен донор [79]. Главното ограничение на трансплантциите от КПВ е нуждата от определена клетъчната доза – ниската доза се свързва с бавно заселване на присадката или липса на такова и висока смъртност. Подходи за преодоляване на това ограничение е трансплантацията от две единици КПВ или *in vitro* намножаването на стволовите клетки [80-82]. Негативният ефект на HLA несъответствията може да се намали с увеличаване на клетъчната доза, но натрупването им, особено комбинацията между клас I и клас II, води до висок риск от отхвърляне на присадката и тежко протичане на острата GvHD [75-77, 83]. От друга страна някои автори съобщават, че GVL ефектът на присадките с по-голям брой на несъвместимостите води до по-висока честота на DFS при пациентите с високо рисковите левкемии [75, 84, 85]. Рискът е локус-специфичен, като разликите в HLA-DRB1 се свързват с остра GvHD и смъртност, докато тези в HLA-A и HLA-C – с намален шанс за заселване на присадката [86, 87].

II.1.5. Роля на не-HLA генетичните полиморфизми

Въпреки че HLA съвместимостта ирае централна роля при селекцията на донори, секвенирането на човешкия геном разкри огромен брой единични нуклеотидни полиморфизми (single nucleotide polymorphisms, SNPs), кодирани извън HLA региона, чиято роля в алогенната ТХСК все още не е добре проучена. Полиморфизмите в регулаторните секвенции на цитокините, рецепторите, гените за метаболизъм на лекарствата или отговор към инфекции, може да промени тяхната секреция или експресия. Анализът на не-HLA функционалната геномика, заедно с конвенционалните рискови фактори при този вид лечение, би подпомогнала предвиждането на изхода от трансплантацията на HLA-съвместими двойки.

Второстепенни антигени на тъканната съвместимост

Алогенната трансплантация на стволови клетки цели излекуването на пациентите със злокачествени хематологични заболявания, при което се разчита основно на GVL ефекта. Този имунотерапевтичен ефект се опосредства основно от донорните Т клетки. Те се насочват от mHags на реципиента, експресирани от раковите клетки. Второстепенните антигени на тъканната съвмесимост представляват къси пептиди изрязани от полиморфни региони на вътреклетъчни пептиди и представени от HLA молекулите. Някои по-широко разпространени mHags, особено H-Y, играят роля не само при GVL ефекта, но и в индукцията на GvHD [88-92]. В ретроспективен анализ (n=225), *Nannya и сътр.* оценяват ефекта на несъответствието по У хромозомата в GvHD посока (жена донор с мъж реципиент) върху цялостната преживяемост [89]. При пациентите със стандартен риск половата несъвместимост оказва неблагоприятен ефект върху изхода от трансплантацията (P=0.021), докато при тези с висок риск не се установява такова влияние (P=0.26) [89]. Допълнително, авторите установяват връзка между половата несъвместимост и смъртен изход без релапс (P=0.019). Друг авторски колектив откриват силна връзка между половата несъвместимост и свръхострата GvHD (HR=1.7; 95% CI:1.1-2.9; p=0.03) [90]. Изследване на NMDP (n=730) не открива значимо влияние на отделни mHAgs при H-Y различни трансплантации [93]. Тази хетерогенност на риска при трансплантираните пациенти може да се обясни със синергичен ефект на второстепенните с главните антигенни на тъканната съвместимост [94, 95]. При сравняване на 12/12 съвместими трансплантации (n=1 332) с

11/12 с 1 HLA-DPB1 несъвместимост (n=3 329) резултатите показват усилващ ефект на DP несъответствието с това по H-Y по отношение на риска от развитие на остра GvHD степен III-IV [95]. По отношение на тези данни предстои да се оцени и влиянието на „разрешените" и „неразрешените" HLA-DPB1 несъответствия.

Други mHAgs се експресират само върху хематопоетичните клетки и могат да се използват за индуцирането на специфичен GVL ефект, без да се повишава риск от GvHD. Откриването на хематопоетичните mHags доведе до разработването на нова концепция, която предлага разделянето на GVL от GvHD чрез насочване на донорните Т клетки към хематопоетичните mHags, експресирани от малигнените клетки [96]. Тази концепция се базира на допускането, че специфичната експресия на mHags върху кръвните клетки на реципиента ефективно ще насочи донорните Т клетки. Така другите тъкани, включително донорните клетки, няма да се засегнат от GvHD, което ще подпомогне възстановяването на хематопоезата на реципиента. Въпреки нарастващия брой открити mHags, експресирани върху хематопоетичните клетки, повечето от тях не са приложими от имунотерапевтична гледна точка, тъй като се представят от сравнително редки HLA алели (HA-I от HLA-B60). Друго важно ограничение е фенотипната им честота (HA-2 и HB-I^H се срещат при 94.5% от кавказката популация), тъй като mHag-специфичната терапия може да се приложи само при mHag-несъвместими трансплнтации [96]. Поради тези причини е важно да се идентифицират „терапевтично значими" mHags, които да са силно експресирани върху левкемичните клетки, да се представят от чести HLA алели и да са с балансиран фенотип в популацията (табл. 2). Предполага се, че за кавказите трябва да се наблегне върху идентификацията на антигени, които се представят от HLA-A1, -A2, -A3, -A11 и -A24 алелите, тъй като поне една от тези молекули се експресира в над 95% от популацията [97].

В заключение, вероятността за намиране на подходящ донор се базира главно на честотата на HLA хаплотипа на реципиента, която е функция на етническата принадлежност. Ето защо е изключително важно да се проучи хаплотипната честота в дадена популация и да се изработи алгоритъм, определящ времето за намиране на донор на всеки един реципиент. Всичко това стои в основата на ефективността на търсенето и на успеваемостта на лечението .

Таблица 2. Второстепенни антигени на тъканната съвместимост, които се експресират от хематопоетичните клетки.

	mHag	Ген/Хромозома	HLA алел	Полиморфизъм	Имуногенен пептиден епитоп
Хематопоетични клетки	HA-1 [H]	HMHA1/19p13.3	A*02:01 A*02:06	rs1801284	VL**H**DDLLEA
	LRH-1	P2X5/17p13.3	B*07:02	rs5818907	TP**NQRQNVC**
	ACC-2 [D]	BCL2A1/15q24.3	B*44:03	rs3826007	KEFED**D**IINW
	HEATR1 [E]	HEATR1/1q43	B*08:01	rs2275687	ISKERA**E**AL
	ACC-1 [Y]	BCL2A1/15q24.3	A*24:02	rs1138357	DYLQ**Y**VLQI
	ACC-6 [V]	HMSD/18q21.3	B*44:02 B*44:03	rs9945924	**MEIFEIVFSHF** *HMSD varient*
	HA-2 [V]	MYO1G/7p13-p11.2	A*02:01	rs61739531	YIGEVLVS**V**
	SP110 [R]	SP110/2q37.1	A*03:01	rs1365776	SLP**R**GTSTPK
	LB-LY75-1K	LY75/2q24	DRB1*13:01	rs12692566	GITYRN**K**SLM
	HA-1 [H]	HMHA1/19p13.3	B*60 B*40:01	rs1801284	KECVL**H**DDL(L)
	ACC-1 [C]	BCL2A1/15q24.3	A*24:02	rs1138357	DYLQ**C**VLQI
В клетки	CD19 [L]	CD19/16p11.2	DQ A1*05 B1*02	rs2904880	WEGEPPC**L**P
	HB-1 [Y]	HMHB1/5q31.3	B*44:02 B*44:03	rs161557	EEKRGSL**Y**VW
	HB-1 [H]	HMHB1/5q32	B*44:02 B*44:03	rs161557	EEKRGSL**H**VW

*Адаптирано по *Bleakley 2011* [96]

III. ХИМЕРИЗЪМ

Химеризмът е важен индикатор за рецидив на болестта, отхвърляне на присадката, минимална резидуална болест (МРБ) или GvHD. Също така, подпомага свързаната с риска имунотерапия при профилактиката и интервенционалното лечение на GvHD или предстоящ релапс. Наличието на персистиращи или новопоявяващи се клетки на реципиента може да означава оцелели левкемични клетки, които да доведат до повторно възникване на малигнен клон, чрез инхибиране на имунокомпетентните донорни клетки. По тази причина точното определяне нивата на донорния химеризъм (ДХ) в кръвта или костния мозък на пациента предоставя критична информация за степента на заселване и спомага за по-адекватното лечение на реципиентите. Първоначално се е смятало, че пълната донорна хематопоеза е от съществено значение за оцеляване на присадката след алогенна трансплантация на стволови клетки [98], но през последните години стана ясно, че следтрансплантационният химеризъм е динамичен процес и пациенти с пълен донорен химеризъм (ПДХ) в даден период след трансплантацията могат впоследствие да развият смесен химеризъм и обратното – пациенти със смесен могат да развият пълен химеризъм.

III.1. Връзка между химеризма и различните терапевтични стратегии

Традиционният миелоаблативен подход включва токсична химиотерапия преди трансплантацията. За да се избегне миелоаблацията и да се постигнат по-добри резултати от ТХСК, е разработен немиелоаблативен подход, който включва супресия на реакцията на гостоприемника срещу присадката и подобряване на GVL ефекта за сметка на по-силна GvHD [99, 100]. Без значение от вида на терапията преди трансплантация, изследването на химеризма е от важно значение за следтрансплантационното проследяване на процеса на заселване на присадката и манипулирането му чрез инфузия на донорни лимфоцити или промяна на имуносупресията [6, 101].

III.1.1. Оценка на химеризма при миелоаблативни трансплантации

Исторически погледнато, аблативните дози химиотерапия и total-body irradiation (TBI) са се считали за необходими, за да се елиминират злокачествените клетки и да се

осигури имуносупресия на реципиента, което да подпомогне заселването на донорните клетки. Високо-дозовите протоколи все още се използват при широк брой пациенти, главно такива с агресивни злокачествени заболявания, при които има нужда от силен анти-левкемичен или анти-туморен ефект. Основно се прилага комбинацията от циклофосфамид и TBI или бусулфан (BU), а все по-често и комбинацията от бусулфан и флударабин в нива, които да премахнат всички лимфоидни и миелоидни стволови клетки в тялото [9]. Агресивната предтрансплантационна терапия осигурява добра ефективност срещу заболяването, но използването ѝ е ограничено до по-млади и по-здрави пациенти, които биха могли да понесат съпътстващата лечението токсичност. Подготвителните схеми за миелоаблативно кондициониране (myeloablative conditioning, MA) служат за улесняване на нормалната хематопоетична реконституция с пълен лимфоцитен химеризъм към ден 30 след ТХСК [102]. При този род трансплантации се наблюдават повече случаи на GvHD и по-рядко - рецидиви. Анализът на химеризма показва предимно пълна донорна химера, въпреки че ранното ѝ установяване е индикация за GvHD [103]. При 50% до 100% от пациентите, които са трансплантирани с Т-клетъчно изчерпан костен мозък, се наблюдава смесен химеризъм [104]. Т-клетъчно изчерпана присадка се използва с цел намаляване риска от развитие на GvHD. При този вид трансплантации честа практика е и донорно-лимфоцитната инфузия, която е изключително полезна при ХМЛ пациентите [104]. Изследване на колектив от Северна Америка показва значително повишен риск от развитие на остра или хронична GvHD при пациенти, които достигат нива на донорен химеризъм в Т клетките >90% (HR=1.92, P=0.08 и HR=2.26, P=0.07, съответно) [105].

III.1.2. Оценка на химеризма при немиелоаблативни трансплантации

Голяма заслуга за разширяването на приложимостта и използването на алогенните ТХСК има разработването на немиелоаблативните протоколи за кондициониране и на тези с намален интензитет. Използването на по-щадящите протоколи води до по-ниска TRM, в сравнение с миелоаблативния режим на кондициониране. Това от своя страна направи трансплантацията на хематопоетични стволови клетки подходящ терапевтичен метод и за по-възрастни пациенти, както и за такива във влошено клинично състояние. Друго предимство е теоретично по-добрата имунна реконституция, поради по-слабото увреждане на тимуса, въпреки че данните в литературата показват близки резултати между двата

режима. Това позволява по-бърза регенерация на наивните Т лимфоцити от пре-тимусните донорни стволови клетки, както и пролиферация на имунологично компетентните клетки на реципиента, които са оцелели след кондиционирането. Повечето RIC протоколи се базират на комбинацията на пуринови аналози, обикновено флударабин, с алкилиращи агенти като бусулфан или циклофосфамид и представляват различна степен на миелосупресия [106-109]. Друг подход е използването на ниски дози TBI, самостоятелно или в комбинация с флударабин [110, 111]. Тази стратегия разчита на GVL ефекта на присадката и води до минимални хематопоетична и общата токсичност. Няколко изследвания показват връзка между предтрансплантационната химиотерапия и нивата на химеризъм [112-115].

За разлика от алогенната трансплантация след миелоаблативно кондициониране, немиелоаблативната подготовка първоначално води до смесен химеризъм [6]. Също така, вероятността за развитие на остра GvHD е по-ниска, докато при хроничната GvHD реакция нещата са сравними между различните протоколи за кондициониране. Смесеният химеризъм не означава непременно лоша прогноза, но неговата продължителност може да увеличи риска от рецидив [116].

Относително намалената честотата и тежест на остра GvHD след RIC трансплантация може да се обясни с комбинация от предтрансплантационното кондициониране с нисък интензитет и първоначалния смесен химеризъм, които могат да благоприятстват, както толеранс на реципиента към присадката, така и в обратна посока [117, 118]. При някои пациенти се наблюдава късно настъпване на остра GvHD, което съвпада с преминаването от смесена към пълна донорна химера в Т лимфоцитите [112, 118]. Ако пациентът не развие GvHD, може да се извърши инфузия на донорни лимфоцити, които да доведат до пълен химеризъм, поради GVL ефекта. Затова при немиелоаблативните ТХСК е важно да се следят нивата на химеризма, за да се направи правилна преценка за необходимостта и времето на инфузията на донорни лимфоцити, както и да се следи ефектът от нея [103, 119]. Ниски нива на Т и NK клетките в първите 30 дена след ТХСК се свързват със значително повишен риск от отхвърляне на присадката. Нивата на донорната химера в гранулоцитите и моноцитите имат по-ниска информативна стойност по отношение на отхвърлянето на присадката [112, 120]. Обратно, високите нива на донорни Т клетки в

първия месец след ТХСК предхождат остра GvHD степен 2 – 4 [105, 112, 121, 122]. Също така, достигането на >90% донорни Т и/или NK клетки се свързва с анти-туморен отговор и преживяемост без прогресия на заболяването [112, 123]. Подобни резултати докладват и *Mohty и сътр.* (n=102) [122]. Обратно, някои изследвания не откриват връзка между нивото на донорните Т лимфоцити и развитието на GvHD [124, 125]. В изследване на *Lim и сътр.* бързата конверсия към пълен донорен химеризъм се свързва с намалена обща преживяемост (43.5% спрямо 69.7%, P<0.03), DFS (43.7% спрямо 65.4%, P<0.03) и повишена TRM (37.2% спрямо 8.7%, P<0.01) в сравнение с наличието на смесен химеризъм. Не е установена разлика в честотата на релапс на болестта [126]. Наличието на смесен химеризъм се свързва с подобрена преживяемост [126-128]. Това наблюдение може да се обясни с персистиращите клетки на реципиента, които се свързват с участие в защитата от инфекции и цялостната преживяемост [129-131]. Пациенти с нисък абсолютен брой на дендритните клетки 1 месец след ТХСК имат по-висока TRM (60% спрямо 12%, P<0.02) и понижена обща преживяемост (15% спрямо 45%, P<0.002) [132]. Освен това се наблюдава връзка между намаления брой на $CD16^+$ дендритни клетки и по-високата честота на смъртност от инфекции (50% срещу 0%, P<0.05). Възможността самата инфекция да е допринесла за намаляване броя на тези клетки не се изключва от авторите [132].

III.1.3. Химеризъм при въвеждане на донорни лимфоцити (DLI)

Инфузията на донорни лимфоцити е нова терапевтична стратегия, която се прилага основно при немиелоаблативни, Т-клетъчно изчерпани миелоаблативни ТХСК или хаплоидентични трансплантации, поради нейния GVL ефект. При тези пациенти се наблюдава забавяне в имунната реконституция, което повишава риска от релапс на болестта [104, 133-135]. Приложението на стандартната DLI е ограничено от GvHD ефекта и аплазията. Разработени са нови протоколи, използващи G-CSF стимулирани периферно-кръвни прогениторни клетки, алоизчерпани донорни Т-клетки и mHag-специфични $CD8^+$ цитотоксични Т-лимфоцити, които позволяват по-широкото приложение на тази терапия [136-139]. Важен момент за успеха от терапията е определянето на точното време за DLI. Профилактични дози DLI в ранните етапи на релапс се свързват с по-благоприятен изход [140, 141]. Това налага както честото

изследване на химеризъм, за да се установи наличието на хематопоеза от реципиента, така и разграничаването на малигнените клетки от немалигнените чрез изследване на МРБ [6, 101, 104, 133-135, 142]. Допълнително е необходимо изследването на химеризъм след това, за да се следи ефекта от манипулацията. Въведените лимфоцити се сенсибилизират от повърхностни антигени – асоциирани с левкемията, или полиморфни второстепенни трансплантационни антигени - експресирани от левкемичните клетки. Това води до трансформацията им в цитотоксични лимфоцити, които убиват раковите клетки. Въвеждането на донорни лимфоцити е най-ефективна при пациентите с ХМЛ (около 75% от случаите), което може да се обясни с антигенпредставящите клетки, които са част от малигнените клонове. Този вид терапия е по-неефективен при пациенти с остра миелобластна левкемия (ОМЛ) или с множествен миелом. С разработването на нови протоколи за терапия се намали аплазията и GvHD.

III.2. Химеризъм при немалигнени заболявания

В днешно време много голяма част от наследствените или придобитите немалигнени заболявания, като таласемия, апластична анемия, различни имунодефицити и други, са лечими чрез трансплантация на стволови клетки. При този род трансплантации, целта е да се постигне стабилно заселване на присадката, която да осигури необходимата хематопоетична функция, ензимна активност или имунокомпетентност. Поради тази причина постигането на пълна донорна химера не е задължително и съответно подготовката на реципиента често се извършва с немиелоаблативна терапия. Това води до по-честото наличие на смесен химеризъм и увеличава риска от отхвърляне на присадката [143, 144]. От друга страна, бързото развитие на пълен химеризъм в NK и Т-клетките изглежда играе важна роля при успешното заселване на присадката [119].

III.3. Химеризъм при малигнени заболявания

При тази група пациенти е важно да се следи МРБ и нивата на химеризъм. Минималната резидуална болест се мониторира чрез изследване на пренареждания в гените за Т-клетъчния рецептор или имуноглобулините (при острата лимфобластна левкемия, ОЛЛ) и фузионните иРНК транскрипти на В-клетъчния рецептор и ABL (при

ХМЛ), използвайки PCR технология (полимеразна верижна реакция - polymerase chain reaction) [145, 146]. Молекулярните доказателства за остатъчни или появяващи се клетки на реципиента могат да са отражение на оцелели левкемични или здрави клетки на гостоприемника, или и на двете. Това може да доведе до възстановяването на малигнена клетъчна линия, като инхибира имунокомпетентните ефекторни клетки на донора.

Измерване на BCR-ABL1 при ХМЛ осигурява отличен модел за следене на МРБ в следтрансплантационния период. При ОМЛ и миелодиспластичния синдром (МДС) се полагат усилия за прехвърляне на вече съществуващи МРБ маркери от консервативното лечение към следтрансплантационния мониторинг, но за голяма част от тези пациенти химеризмът, периферно-кръвните показатели и костно-мозъчната цитоморфология остават единствените варианти за следене на болестта след ТХСК. При пациентите с ХМЛ е доказано, че възстановяването на хематопоетични клетки на реципиента в мононуклеарната клетъчна фракция води до рецидив [147, 148]. Това от своя страна води до намален GVL ефект при тази група пациенти. Комбинацията от анализ на химеризма и BCR-ABL-анализа за детекция на минимална резидуална болест е силно предиктивно за рецидив на болестта.

При ХЛЛ след трансплантация се наблюдава забавен отговор към болестта както при МА, така и при RIC, като максимален отговор може да се наблюдава след 3 и повече месеци [149, 150]. Алогенната ТХСК е ефективно терапевтично средство, както за ниско-рисковите, така и за високо-рисковите ХЛЛ пациенти. Изследване при 44 високо-рискови ХЛЛ пациенти със 17p делеция и RIC трансплантация, показва 34% 4-годишна кумулативна честота на прогресия на болестта [151]. Наличието на смесен химеризъм в Т-лимфоцитите на ден 90 и хеморефракторна болест се свързват с повишен риск от прогресия на заболяването [152]. Постигането на пълна донорна химера и липсата на МРБ се свързват с продължителна DFS [150]. Налични са малко данни за изхода от релапс при ХЛЛ, като някои пациенти дават благоприятен отговор на DLI или прекратяване на имуносупресията [153]. По-добър отговор се наблюдава при пациентите със 100% донорни Т-клетки [152]. Повечето изследвания показват, че конверсията от смесен към пълен донорен химеризъм предхожда или се асоциира с началото на GvHD [112, 119, 154-156].

Спорен е въпросът, дали при пациентите с остри левкемии (ОМЛ и ОЛЛ) смесеният химеризъм води до повишен риск от отхвърляне на присадката [4]. На по-голяма опасност са изложени пациентите, при които се наблюдават високи нива на резидуални клетки и/или бързо покачване на нивата на клетките на реципиента [2, 4, 5, 157]. Мониторирането на нивото на експресия на WT1 и проследяването кинетиката на несепарирания химеризъм и $CD34^+$ клетките дават възможност за ранна диагностика на релапс при пациенти с МДС и ОМЛ. При пациенти, които не показват значителен спад в $CD34^+$ клетките и подържат ниво на WT1 експресия под определени граници, почти сигурно може да се изключи релапс на болестта в следващите 28 дни [158].

Наличието на смесен химеризъм зависи от много фактори, включително интензитета на предтрансплантационната терапия, използването на Т-клетъчно изчерпани присадки, броя на трансплантираните стволови клетки, чувствителността на използваната техника за откриване и интервала на изследване, както и вида на болестта. Поради динамичната природа на развитието на химеризъм, се предпочита изследването да се извършва на кратки интервали, особено в първите 1-2 месеца след трансплантация, когато рискът от рецидив или отхвърляне на присадката е най-голям. В най-ранния следтрансплантационен период, наличието на персистиращ смесен химеризъм или изчезването на донорни алели се асоциира, както с отхвърляне на присадката, така и с ранен релапс [159]. От друга страна, нарастващият брой на клетки на реципиента в по-късните периоди след трансплантацията се асоциират с релапс или късно отхвърляне на алографта [160].

Поради сравнително ниската си чувствителност от около 1%, анализът на химеризма може да се използва предимно като прогностичен, отколкото като индиректен показател за МРБ. С въвеждането на RQ-RCR-технологията, чувствителността на изследването на химеризъм се покачи до 0.1%, което значително подобри прогностичната стойност на анализа по отношение детекцията на МРБ. Когато не е наличен специфичен за болестта маркер, изследването на химеризма в клетъчните субпопулации може да послужи като заместващ маркер за МРБ [161].

Нивата на химеризма след ТХСК зависят от редица фактори, включително от типа на болестта и вида на пред- и следтрансплантационната терапия. Основната цел при следтрансплантационният мониторинг е ранната диагностика на нежелани събития. Много

изследвания показват, че точният количествен анализ на кинетиката на химеризма би позволил ранна диференциация между липсата на заселване и забавянето му, както и ранна диагностика на пациенти с висок риск от развитие на GvHD или предразположени към рецидив [2, 4-6, 98, 101, 103, 119, 157, 162]. В този контекст, изследването на химеризма без съмнение е важен метод за проследяване на изхода от ТХСК.

III.4. Методи за анализ на химеризма

Главният принцип при определянето на химеризма е наличието на разлики между донорните и реципиентните генетични маркери или техните продукти. Разработени са различни техники за изследване нивата на химеризма, но повечето от тях са много бавни и трудоемки и не позволяват изследването на всички пациенти. Обща процедура за всички е, че пациентът и донорът му се скринират преди трасплантацията за генетични маркери, по които да се различават, като тези маркери се обозначават като информативни. Изборът на белег и метод, чрез който да се изследва, зависи от чувствителността и специфичността на технологията, половата идентичност, както и от вида на заболяването (табл. 3).

Еритроцитно фенотипизиране

Фенотипизирането на червените кръвни клетки се използва главно при пациенти с ХМЛ, тъй като при рецидив се появяват гранулоцити, моноцити и еритроцити на реципиента, които прогресивно изместват съответните кръвни клетки на донора, докато В- и NK-клетките остават от донорски произход [104].

Цитогенетичен анализ

Приложим основно при ХМЛ случаи. Информативен е при двойки с различен пол, където X и Y специфични проби се използват за отграничаване на донорните клетки от тези на реципиента [104].

Флуоресцентна in situ хибридизация (FISH)

Използва полово-специфични проби. Методът е количествен и лесен за изпълнение, като изисква много малки количества материал [163]. Прилага се основно за засичане на рецидив при полово неидентични трансплантации и за оценка на отделните клетъчни

линии при изследване на сепариран химеризъм. Използват се главно проби от периферна кръв или костен мозък, но е възможно и приложението на цереброспинална течност, в която лимфоцитите също мигрират.

Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

Широко използван метод за детекция на автоложна хематопоеза след ТХСК. Базира се на различните профили на донора и реципиента, които се получават след третиране с набор от рестрикционни ензими.

Специфични маркери за Y хромозомата

Изследването на характерни за Y хромозомата гени, Y-STR (къси тандемни повтори - short tanden repeats) или Y-биалелни маркери е приложимо при полово неидентични ТХСК, като максимална точност се постига в случаите, когато реципиентът е мъж.

Специфични маркери за X хромозомата

В случаите на полово неидентични ТХСК, при които донорът е мъж, се предпочита изследване на Х-свързания ген за човешки андрогенен рецептор (HUMARA), който съдържа силно полиморфен три нуклеотиден повтор CAG.

Изследване на маркера Амелогенин

Изследва се при полово неидентични трансплантации с донор жена. Генът разположен в Х хромозомата и при PCR амплификация дава по-къс бенд от този в Y хромозомата, което позволява лесното им отграничаване при електрофореза [162].

Таблица 3. Техники за анализ на химеризъм

Техника	**Положителни страни**	**Недостатъци**	**Чувствителност (%)**	**Информа-тивност**
Er фено-типизиране	Лесна, точна и много чувствителна техника. Предимно при ХМЛ	Ниско информативна, тъй като определя само един клетъчен тип и се влияе от кръвопреливанията	0.04% - 3%	Ниска
Цитогенетика	Предимно при ХМЛ	Оценява само делящи се клетки, ниско чувствителен, висока степен на фалшиво- позитивни стойности	5 - 10%	Ниска
FISH	Висока чувствителност и ниска степен на фалшиво-позитивни стойности	Ограничена е до полово несъвместими ТХСК и изисква големи количества материал	0.7 – 5%	Висока
RFLP	Оценява всички ядрени клетки, изисква малки количества проба и е високо информативна	Ниска чувствителност и объркващи резултати	5 – 10%	Висока
Y-хромозомни маркери	Високо информативна при полово неидентични ТХСК	Полезна при донор от женски пол, не може да се използва при полово идентични ТХСК	0.1 – 4%	Висока
X-хромозомни маркери	Високо информативна при полово неидентични ТХСК	Полезна при донор от мъжки пол, не може да се използва при полово идентични ТХСК	0.1 – 4%	Висока
Амелогенин	Не зависи от пола на донора и е високо информативна	Неприложима при половоидентични ТХСК, високи стойности на фалшиво-позитивни резултати	0.1 – 4%	Висока
STR/VNTR	Силно информативна и с много голяма приложимост	Ниска чувствителност, поради праймерно съревнование в PCR-реакцията	1 - 5%	Висока
RQ-PCR	Бързо, надеждно и точно количествено определяне на клетките. Най-чувствителната техника и е високо информативна	Сравнително скъп анализ и ефективен главно при двуалелни маркери	0.1%	Висока

Къси тандемни повтори и тандемни повтори с вариабилен брой (variable number tandem repeats; VNTR)

Изследването на микросателитите (STR) и минисателитите (VNTR) се смята за най-чувствителната и информативна техника за изследване нивата на химеризъм след ТХСК. Микро- (2-6 нк) и минисателитите (15-50 нк) са тандемно повтарящи се блокове от ДНК, чийто брой повторения варира при индвидите. Методът е умерено чувствителен (1-5%), не зависи от HLA- и половата съвместимост на донора и реципиента и може да се използва веднага след трансплантация, когато са налични много малък брой клетки. При мултиплексните платформи се избират STR/VNTR локуси с идентични амплификационни протоколи и различни алелни дължини, като се използват флуоресцентно белязани праймери. Поради по-големия си размер, VNTR по-често показват разминавания в оценката на химеризма между отделните маркери [164]. Всички локуси се амплифицират заедно в една PCR реакция и амплификационният продукт се разделя електрофоретично на автоматичен ДНК секвенатор – фрагментен анализ. По-нататъшният анализ се осъществява чрез специализирани софтуери. Предпочита се използването на микросателити, тъй като те са по-полиморфни, по-чувствителни, по-бързи за работа и по-евтини. Въпреки отличното им приложение в криминалистиката, приложението им при изследването на химеризъм има своите ограничения. Най-важното от тях идва от самия дизайн на платформата – количеството ДНК индиректно се оценява въз основа на измерване на флуоресценцията по време на електрофореза. Различните флуорофори се различават по своята ефективност на излъчване на светлината, а платформата няма вътрешна калибрация за измерването. В резултат на това измерването на една и съща абсолютна стойност на ДНК няма да бъде оценена еднакво от всички локуси. Въпреки това тази флуоресцентно-базирана технология е приета за златен стандарт при изследването на химеризъм [101]. Друга особеност на STR-системата е наличието на допълнителни сигнали, т. нар. „прищъпвания", които основно са n-1 и в по-малка степен n+1 сигнали [165, 166]. Тези артефакти са резултат от slipped-strand mispairing по време на амплификацията. Размерът им зависи от големината и вида на алела и е в границите 2-13% от съответния им основен пик. Ако прищъпванията съвпадат с коерспондиращия пик на донора или реципиента, биха повлияли върху точната оценка на химеризма. Това е особено важно при ниски нива на резидуални клетки на гостоприемника и би затруднило оценката на минималната резидуална болест.

Количествен real-time PCR

Това е най-чувствителен метод за детекция на смесен химеризъм, който е базиран на количествен real-time PCR, използващ TaqMan технологията [101]. Методът засича и измерва самия амплификационен процес, използвайки секвенционно-специфични проби между правия и обратния праймер. По време на фазата на удължаване на амплификата, флуорогенната проба се освобождава, като по този начин излъчва светлина, която се анализира от самия амплификатор. С всеки цикъл на PCR протокола количеството ДНК, а съответно и излъченият флуоресцентен сигнал, се увеличават. Това води до силна линейна връзка между логаритъма от броя на копията ДНК в началото на амплификацията и номера на първия PCR цикъл, в който е засечено значително повишаване на флуоресцентния сигнал. Тази техника не се влияе от половата съвестимост, използва биалелни маркери (единични нуклеотидни полиморфизми) и позволява бързо, точно и надеждно определяне количеството на смесен химеризъм, като постига точност от 0.1%. Освен по-високата си чувствителност спрямо PCR-STR технологията, този метод постига и по-добра линеарност [101]. Приложимостта му обаче е малко по-ниска от тази на фрагментния анализ – 90% [101].

Изследване на минисателитни маркери в митохондриалния геном

Това е най-новият разработен метод за детекция на нивата на химеризъм след алогенна ТХСК, при който се използват минисателитни маркери в митохондриалната ДНК (mtMS) [167, 168]. МтДНК маркерите показват чувствителност и точност, сравними с тези на STR системите. Поради наличието на множество митохондрии в една клетка mtMS маркерите имат много добро приложение в проби с ниско качество [168].

Детекция на сепариран химеризъм

В някои случаи се прави и сепариран химеризъм. Той се изследва чрез разделяне на мононуклеарните клетки в периферна кръв или костен мозък, използвайки антитела – CD3 (за Т-клетките), CD19 (за В-клетките), CD56 (за NK клетките), CD15 (за миелоидните клетки), тъй като отделните клетъчни линии могат да са от различен произход – например Т-клетките да са от реципиента, а В-клетките - от донора [169]. Изследването на химеризъм в индивидуалните клетъчни линии се извършва чрез

количествен PCR в реално време (quantitative real-time PCR, RQ-PCR) или STR/VNTR-системата.

IV. ОБОБЩЕНИЕ

Годишно в световен мащаб се извършват над 60 000 трансплантации на хематопоетични стволови клетки, като в края на 2012г. беше извършена едномилионната трансплантация. С напредъка в разбирането на биологията на ТХСК и разработването на нови по-щадящи протоколи за кондициониране все повече заболявания могат да се лекуват, обхващайки по този начин и все повече хора. Известна е ролята на съвместимостта по HLA-A, -B, -C, -DRB1 и –DQB1 локусите за изхода от ало-СКТ. Все по-актуален е въпросът за значението на HLA-DPB1 локуса, като е установено, че DPB1 несъвместимостите могат да предизвикат алореактивен Т-клетъчен отговор с потенциален анти-туморен ефект. Разработен е алгоритъм, който определя природата на несъвместимоста, т. нар. „разрешени" и „неразрешени" съвместимости, който да подпомогне избора на подходящ DPB1 съвместим/несъвместим донор. Въпреки това данните в литературата относно значението му за преживяемостта след ало-СКТ са противоречиви и ролята му като трансплантационен антиген е силно дискутабилна. За идеален донор се приема сиблинг с HLA 10/10 съвместимост, но това не винаги е възможно – едва 50.2% от общия брой на алогенните ТХСК се правят с напълно съвместим 10/10 донор. Поради много слабата неравновесна връзка на HLA-DPB1 локуса с останалите локуси от клас II региона на HLA системата, голям процент от трансплантациите от HLA 10/10 съвместим неродствен донор всъщност са с несъвместим DPB1 локус. Неизяснена е и ролята на полиморфизмите в гените извън HLA региона, които също определят индивидуалния имунологичен фенотип на двойките донор-реципиент. Това оставя отворен въпроса за ролята и обхвата на тъканата съвместимост при трансплантацията на хематопоетични стволови клетки.

Допълнително, различни следтрансплантационни фактори оказват влияние върху изхода от алогенната ТХСК. Един от най-важните параметри на следтрансплантационния мониторинг е проследяването на нивата на химеризма. Поради динамичния характер на възстановяването на хематопоезата, точното определяне на нивата на донорния химеризъм предоставя критична информация за степента на заселване и спомага за по-адекватно лечение на пациентите. В литературата

няма единно становище за ролята на мониторинга на химеризма, както и стандартизация по отношение на алгоритъма за неговото проследяване и използваните методи. Всичко това поставя нуждата от по-добро познаване на ролята на различните имуногенетични и неимуногенетични пред- и следтрансплантационни фактори.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се проучи влиянието на имуногенетични маркери, свързани с изхода от трансплантация на хематопоетични стволови клетки.

За постигането на целта си поставихме следните **задачи**:

1. Проучване ролята на предтрансплантационни фактори за изхода от алогенна трансплантация на хематопоетични стволови клетки при пациенти, трансплантирани у нас:

1.1. Проучване ролята на HLA съвместимостта между пациентите и техните донори;

1.2. Оценка на HLA-DPB1 локуса като самостоятелен трансплантационен антиген;

1.3. Проучване ролята на други имуногенетични и не-имуногенетични фактори.

1.4. Комплексна оценка на ролята на различните предтрансплантационни фактори за изхода от алогенна ТХСК.

2. Проучване ролята на следтрансплантационни фактори за изхода от алогенна трансплантация на хематопоетични стволови клетки:

2.1. Въвеждане на методи за следтрансплантационен мониторинг на химеризъм.

2.1.1. Въвеждане на RQ-PCR метод, използващ TaqMan технология за изследване на нивата на химеризъм;

2.1.2. Оценяване на отделните маркери в мултиплексния AmpFlSTR Identifiler кит (Life Technologies,USA) за PCR-STR, прилаган рутинно в Клиниката по клинична имунология с банка за стволови клетки, УМБАЛ „Александровска” ЕАД;

2.1.3. Сравняване на двата метода и определяне на приложимостта на всеки от тях;

2.1.4. Разработване на компютърно приложение за полуавтоматичен анализ на резултатите от PCR-STR метода, оценяване на надежността и достоверността

на количественото определяне на процента химеризъм, както и поддържане на база данни;

2.2. Оценка на предиктивната роля на проследяването на нивата на химеризъм.

2.3. Разработване схема за следтрансплантационен мониторинг на химеризъм с модел за ранна детекция на усложнения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

I. МАТЕРИАЛ

Изследвани бяха 90 пациента след алогенна ТХСК и техните донори. Всички пациенти са диагностицирани в Специализирана болница за активно лечение на деца с онкохематологично заболяване – СБАЛДОХЗ, София; Специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания - СБАЛХЗ, София; УМБАЛ „Св. Марина", Варна; УМБАЛ „Св. Георги", Пловдив и УМБАЛ „Александровска", София по съответните цитоморфологични и клинични критерии и насочени към Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки, УМБАЛ „Александровска" за HLA типизиране, определяне на тъканна съвместимост и търсене на родствен и/или неродствен донор.

Трансплантациите са осъществени в периода 2005г. – 2014г. в СБАЛДОХЗ и СБАЛХЗ. Средната възраст на пациентите е 30.7±15 години, като 54 са мъже (60%) и 36 жени (40%). Преобладават пациентите с остра левкемия – 72.2%, от които 37 (41.1% от всички пациенти) с миелоидна неоплазия и 28 (31.1% от всички пациенти) с лимфоидна. При пациентите със злокачествено хематологично заболяване преобладават трансплантациите в първа пълна ремисия (compleate remission; CR) – 39.1%. Само 12.4% от пациентите са трансплантирани без ремисия и 9.4% - в частична ремисия.

Педесет и шест от пациентите (62.2%) са трансплантирани от родствен донор (сиблинг или родител), а 34 (37.8%) от неродствен. Преобладават донорите мъже – 53 (58.9%) срещу 37 (41.1%) жени, като 59 (65.5%) от реципиентите са трансплантирани от полово съвместим донор и 30 (33.3%) - от полово несъвместим. Предпочитани са донори, които са идентични по петте основни HLA локуса – A, B, C, DRB1 и DQB1 (10/10 съвместимост). Медианата на времето на проследяване на живите пациенти е 30.9 месеца (7 – 112.6), а медианите за настъпване на събитие са съответно 5.4 месеца (0.6 – 30.6) за общата преживяемост и несвързаната с релапс и 3.8 месеца (0.4 – 30.6) за свободната от болест преживяемост. В таблица 4 са представени основните характеристики на разглежданите групи.

Таблица 4. Характеристиктики на изследваната група

Брой пациенти	90	
Брой ТХСК	96	
Средна възраст (години)	30.73 (2 - 59)	
Пол		
Мъже	54	60.0%
Жени	36	40.0%
Първично заболяване		
ОЛЛ	28	31.1%
ОМЛ	37	41.1%
ХМЛ	4	4.4%
МДС	2	2.2%
НХЛ	3	3.3%
ММ	3	3.3%
АА	7	7.8%
β-таласемия	6	6.7%
Донор		
Родствен	56	62.2%
Неродствен	34	37.8%
Полова съвместимост		
Не	30	33.7%
Да	59	66.3%
Източник на стволови клетки		
ПК	82	92.1%
КМ	7	7.9%
HLA съвместимост		
10/10	80	88.9%
9/10	4	4.4%
<9/10	6	6.7%
HLA-DPB1 съвместимост		
2/2	41	65.1%
1/2	9	14.3%
0/2	13	20.6%

Кондициониращ протокол		
МА	48	61.5%
- BU	19	39.6%
- TBI	29	60.4%
RIC	18	21.3%
НМА	12	15.4%
Профил на химеризма		
ПДХ	38	43.7%
От смесен към ПДХ	20	23.0%
<68 дни	10	50.0%
>68 дни	10	50.0%
Стабилен смесен химеризъм	11	12.6%
Намаляваща ДХ	18	20.7%
Статус		
Средна проследяемост (седмици)	114.3 (2.7 - 482.4)	
Починали	40	44.4%
Живи	50	55.6%
Релапс		
Не	60	75.9%
Да	19	24.1%
aGVHD		
Не	47	61.8%
Да	29	38.2%
степен I-II	20	69.0%
степен III-IV	9	31.0%
cGVHD статус		
Не	61	77.2%
Да	18	22.8%
Време на трансплантация		
Извън ремисия	8	12.4%
I CR	25	39.1%
>I CR	25	39.1%
Частична ремисия	6	9.4%

Използвани съкращения: ОЛЛ = *остра лимфобластна левкемия; ОМЛ = остра миелобластна левкемия; ХМЛ = хронична миелоидна левкемия; МДС = миелодиспластичен синдром; НХЛ = Неходжкинов лимфом; ММ = множествен миелом; АА = апластична анемия; ПК = периферна кръв; КМ = костен мозък; МА = миелоаблативен; RIC = протокол за кондициониране с намален интензитет; НМА =немиелоаблативно; ПДХ = пълен донорен химеризъм; ДХ = донорен химеризъм; CR = пълна ремисия.*

Като рецидив са определени случаите, в които цитоморфологично или хистологично е доказан субстрат на хематологичното заболяване. Острата (aGvHD) и хроничната (cGvHD) болест на присадката срещу приемателя са диагностицирани според стандартните критерии. Свободна от болест преживяемост е времето от трансплантация на стволови клетки до цитоморфологично или хистологично регистриран рецидив или летален изход. Несвързана с рецидив смъртност (non-relapse mortality, NRM) е дефинирана във всеки случай на летален изход без доказан рецидив след алогенна трансплантация на стволови клетки (ало-СКТ). Общата преживяемост включва периода от трансплантация на алогенни стволови клетки до летален изход, независимо от причината или крайната дата на изследването. Като HLA несъвместимости са приети само различията в екзони 2 и 3 на клас I молекулите и екзон 2 на клас II, т. нар. клинично значими региони. Различия извън тези екзони не са приемани като несъвместимости (n=3). Класификацията на пациентите по отношение на кондициониращия режим е направена в зависимост от използваните лекарствени препарати след консултация с лекари хематолози от двете звена, където са извършвани трансплантациите – СБАЛДОХЗ и СБАЛХЗ. Проследяването на нивата на химеризъм е извършвано на първия месец след трансплантация, втория месец, третия месец и след това на тримесечни интервали. Взависимост от кондициониращия режим, клиничното състояние на пациента и резултатите от изследването на химеризма, както и по преценка на лекуващите лекари, се извършват и междинни изследвания.

II. МЕТОДИ

II.1.1. Изолиране на геномна ДНК от периферна венозна кръв и костен мозък

Геномната ДНК беше екстрахирана чрез автоматична система за ДНК изолиране - iPrep™ Purification Instrument (Invitrogen, USA) и iPrep PureLink® gDNA™ Blood kit. Принципът на този вид екстрахиране се основава на свързването на ДНК към силиконовата повърхност на намагнетизирани частици с последващото им сепариране чрез магнитен елемент, вграден в апарата, и елуиране на ДНК.

Изпълнение на метода:

Като изходен материал беше използвана 350 ml периферна венозна кръв или костен мозък, взети върху антикоагулант натриев цитрат. Към нея се прибавят лизиращ разтвор, необходим за разкъсване на клетъчните мембрани и протеиназа К за разграждане на клетъчните белтъци. Следва смесване на лизата с магнитни микросфери - Dynabeads® MyOne™ SILANE. Сферите са положително заредени и свързват силно отрицателната ДНК. Следват две последователни измивания със съответните буфери за премахване на контаминиращи агенти и потенциални PCR инхибитори. Като последна стъпка ДНК се елуира чрез буфер и магнитен сепаратор. Концентрацията на изолираната ДНК е определена спектрофотометрично, чрез спектрофотометър SHIMADZU (Shimadzu, Japan) или Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Corp., USA). Чистотата е изчислена от съотношението A260/A280, от което, с оглед коригиране на ефекта на магнитните частици, се вади абсорбцията при 320nm. Оптималната чистота е между 1.6 и 1.9 (съотношение под 1.6 показва наличие на РНК, а над 1.9 – за наличие на белтъци). При нужда интактността на ДНК е оценявана електрофоретично върху 0.7% агарозен гел (100V, 15 мин.). Изолираната ДНК е съхранявана на +4^{o}C за няколко седмици или при -20^{o}C за по-продължителен период.

II.1.2. Определяне на тъканна съвместимост (HLA генотипизиране)

II.1.2.1. HLA генотипизиране с ниска разграничителна способност

PCR-SSP метод

PCR-SSP методът е базиран на принципа, че напълно комплементарни на ДНК матрицата праймери ще се използват по-ефективно в първите критични цикли на PCR реакцията в сравнение с праймери, съдържащи в 3` края си един или няколко различни нуклеотида. Taq полимеразата не притежава 3`→5` екзонуклеазна активност и поради това праймер с един или наколко несъвпадащи нуклеотида в 3` края не може да бъде използван ефективно.

При PCR-SSP метода се използва панел от праймерни смеси, всяка от които съдържа двойка праймери, чиито 3` краища съвпадат напълно с последователността на даден алел или група от алели. Когато PCR реакцията се провежда при строго

определени условия, амплификация се наблюдава само при пълно съответствие на двойката алел - или групово-специфични праймери и матрицата. Тъй като специфичността на типизирането е част от амплификацията, постамплификационните процедури са сведени до разделяне на амплификатите чрез агарозна гел електрофореза и визуализирането им чрез етидиев бромид. По този начин въз основа на наличието и размера на амплификационния продукт за дадена реакционна смес може да се определи специфичността на изследваната проба. Липсата на амплификат за дадена смес може да е резултат от технически грешки. Поради това всяка смес от праймери съдържа и една двойка вътрешно контролни праймери, които амплифицират консервативен участък от геномната ДНК и верифицират ефективността на PCR реакцията.

Изходен материал

За извършване на теста се използва ДНК с концентрация 30-50 ng/μl изолирана от периферна венозна кръв.

Изпълнение на метода:

1. Праймери: Olerup-SSP китове (Olerup SSP, Sweden) съдържат лиофилизирани, предварително разпределени в 0.2 ml тънкостенни PCR епруветки или плаки праймери.

2. Приготвяне на PCR амплификационните смеси: За всички PCR реакции, които трябва да бъдат извършени за типизирането на една проба (един пациент), се приготвя една предварителна PCR смес, съдържаща: Olerup SSP™ PCR Master Mix, включен във всеки кит; изолираната ДНК и Taq полимераза. Olerup SSP™ PCR Master Mix съдържа:

- Смес от dATP, dGTP, dCTP, dTTP – крайна концентрация на всеки нуклеотид – 200 μl
- PCR буфер – крайни концентрации: 50mM KCl, 1.5mM $MgCl_2$, 10mM Tris-HCl с ph 8.3, 0.001% w/v желатин.
- Глицерол – крайна концентрация 5%
- Cresol red – крайна концентрация 100 μg/ml

Обемът на отделните компоненти, необходими за приготвянето на предварителната PCR смес, се изчислява въз основа на таблица, приложена към отделните китове. За всяка ДНК проба 10μl от предварителната PCR смес се добавят незабавно към всяка PCR епруветка, съдържаща лиофилизирани праймери. Епруветките се поставят в амплификатора и незабавно се стартира програмата за амплификация.

3. Параметри на PCR реакцията: PCR амплификацията е разграничаващата хибридизационна стъпка за SSP метода, поради което амплификацията трябва да бъде проведена при точно подбрани PCR параметри като температури и време. За всички PCR реакции с Olerup SSP китове (както за HLA клас I така и за клас II типизиране) се използва следната амплификационна програма в амплификатор Applied Biosystems 9700 с параметри на температурния блок PE 9600:

94°C	2мин.	1 цикъл
94°C	10сек.	10 цикъла
65°C	1мин.	
94°C	10сек.	20 цикъла
61°C	50сек.	
72°C	30сек.	
12°C	∞	

4. Детекция на амплификатите чрез агарозна гел-електрофореза. Агарозната гел-електрофореза е метод за разделяне на ДНК фрагменти по големина и при PCR-SSP метода има редица предимства като: визуализиране на вътрешната конрола, възможност за относително определяне размера на амплификатите и разграничаване на специфичните амплификати от праймер-олигомерни артефакти и неспецифични амплификати.

4.1 Приготвяне на 1.5% агарозен гел в 1xTAE буфер: 575g агароза се разтварят в 35ml 1xTAE буфер чрез загряване в микровълнова печка. Охлажда се до 60°C и се добавят 1.75μl етидиев бромид (10mg/ml). Гелът се излива във вана с гребени и се оставя да изстине до втвърдявне.

4.2 Гребените се отстраняват, а гелът се поставя във ваната за подводна електрофореза, като трябва да бъде покрит с 1xTAE буфер на дълбочина 1-2мм.

4.3 Цялото количество PCR амплификати се нанася директно върху гела. Стартира се програма за електрофореза (15 мин., 200 V).

4.4 Разделените амплификати се визуализират чрез UV облъчване и се документират чрез фотографиране.

5. Интерпретиране на резултатите: специфичността на отделните разтвори на праймери от всеки OLERUP-SSP типизиращ кит е отбелязана в информация, приложена към кита и е специфична за всеки лот номер. Всеки OLERUP-SSP кит съдържа и таблица за интерпретиране на резултатите.

II.1.2.2. HLA генотипизиране с висока разграничителна способност

PCR-SBT метод

Методът използва две технологии: 1) PCR амплификация и 2) директно автоматично флуоресцентно ДНК секвениране. Гените, които ще се анализират се амплифицират в PCR амплификационна смес с използване на Taq полимераза активираща се при висока температура (“hot-start”; AmpliTaq Gold, Life Technologies). Полученият амплификационен продукт се пречиства чрез третиране с ExoSAP-IT (комбинация от ензимите Exonuclease I и shrim alkaline phosphatase; Affimetrix Corp., USA) за отстраняване на неусвоените праймери и dNTPs. Пречистеният амплификационен продукт се използва като матрица за секвенционната реакция със съответните праймери и секвенционна химия - BigDye Terminator mix (Life Technologies). Получените ДНК секвенции се анализират чрез автоматичен флуоресцентен ДНК секвенатор, а крайният анализ се извършва чрез специализиран софтуер (Assign SBT, Conexio Genomics, Australia).

Изходен материал

Като изходен матириал може да бъде използвана геномна ДНК с концентрация 20ng/μl. Оптималното количество ДНК за един тест е 40-80ng геномна ДНК.

Изпълнение на метода

1. Амплификация чрез AlleleSEQR HLA секвенционен кит (Celera Corp., USA): приготвя се реакционна смес с Taq полимераза както следва:

Клас I (HLA-A, -B, -C) китове			Клас II (HLA-DRB1, -DQB1) китове		
Брой ДНКи	PCR смес	Ampli Taq Gold	Брой ДНКи	PCR смес	Ampli Taq Gold
1	16 μl	0.3 μl	1	8 μl	0.1 μl
10	160 μl	3.0 μl	10	80 μl	1.0 μl
25	400 μl	7.5 μl	25	200 μl	2.5 μl
100	1600 μl	30 μl	100	800 μl	10 μl

1.1 За клас I типизиране се прибавят 16 μl от така приготвената смес в 200 μl PCR епруветка, а за за за клас II типизиране се прибавят по 8 μl;

1.2 Добавя се съответното количество геномна ДНК (20 ng/μl): 4 μl за клас I локусите и 2 μl за клас II локусите;

1.3 Центрофурига се за смесване на реактивите;

1.4 Епруветките се поставят в PCR апарата (Applied Biosystems 9700 с параметри на температурния блок PE 9600) и се стартира програмата за амплификация:

95°C	10мин.	1 цикъл
96°C	20сек.	36 цикъла
60°C	30сек.	
72°C	3мин.	
12°C	∞	

След приключване на амплификацията 3 μl от амплифицирания продукт се нанасят в агарозен гел за оценка качеството на амплификата. Позитивните амплификати трябва да се визуализират като добре ограничена ивица.

2. Пречистване на амплификационните продукти: 3 μl от ExoSAP-IT се добавят към амплификационните продукти с оглед отстраняване на праймерите и dNTP. Епруветките се поставят в PCR апарата и се стартира програмата за пречистване:

37°C	15 - 30мин.*	1 цикъл
80°C	15мин.	1 цикъл
12°C	∞	

** Времето за пречистване зависи от качеството на амплификата и ефикасността на ензима.*

След пречистване амплификационните продукти се разреждат със стерилна дейонизирана вода в съотношение 2 обема вода: 1 обем амплификационен продукт.

3. Секвенционна реакция: секвенционните реакции за всички клас I и клас II локуси се извършват по следния протокол:

3.1. В отделни 0.2 ml тънкостенни PCR епруветки се пипетират 8 μl от съответните готови реакционни смеси;

3.2. Към всяка епруветка се добавят по 2 μl от пречистения PCR продукт;

3.3. След центрофугиране за няколко секунди епруветките се поставят в PCR апарата (Applied Biosystems 9700 с параметри на температурния блок PE 9600) и незабавно се стартира програмата за секвениране.

96°C	20сек.	25 цикъла
50°C	10сек.	
60°C	2мин.	
12°C	∞	

4. Преципитация на секвенционните реакции: преди да се извърши електрофорезата секвенционните реации се концентрират чрез преципитация с етилов алкохол. Тази процедура е необходима за отстраняване на нереагиралите компоненти (напр. флуоресцентно маркирани терминиращи нуклеотиди), които могат да доведет до фруоресцентни артефакти в крайната секвенция.

4.1. Секвенционните реакции се прехвърлят в 96-гнездна плака;

4.2. Към всяка секвенцоинна реакция се прибавят 2 µl NaOAc/EDTA буфер и 25 µl 99.8% етанол. Плаката се затваря и се разбърква чрез вортексиране;

4.3. Центрофугира се при 2000 g за 45 мин.;

4.4. Супернатантата се отстранява чрез обръщане на плаката върху филтърна хартия и се центрофугира при 100 g за 1 мин.;

4.5. Към всяко гнездо се добавят по 50 µl 80% етанол. Плаката се центрофугира при 2000 g за 15 мин.;

4.6. Повтаря се стъпка 4.4;

4.7. Плаката се оставя в термостат при 37ºC до пълно изпаряване на остатъчния етанол. Тази процедура е необходима, защото етанола би влошил качеството на секвенциите.

5. Електрофоретичен анализ на секвенционните реакции: за електрофоретичен анализ се използва автоматичен ДНК секвенатор.

5.1. Подготовка на пробите: преципитираните секвенционни реакции се разтварят в 10 µl високо пречистен формамид;

5.2. Плаката се затваря със септа и се денатурира чрез нагряване на 95°C за 5 мин., след което веднага се поставят върху лед;

5.3. Плаката се поставя в апарата и се стартира електрофорезата.

II.1.3. Изследване на химеризъм

PCR-STR метод

Методът се основава на идентификация на смесени ДНК проби, въз основа на къси тандемни повтори. Тези повтори могат да включват от 2 до 7 нуклеотида. Алелната специфичност на тези локуси е уникална за отделните индивиди. STR локусите могат да бъдат амплифицирани и получените продукти да бъдат анализирани чрез гел-електрофореза за определяне на алелите според тяхната големина. Амплифицираните алели се детектират, въз основа на маркирането им с флоуресцентни багрила. Типизирането на STR локусите на всички индивиди, включени в дисертацията,

беше извършено чрез търговски кит AmpFlSTR Identifiler PCR amplification (Life Technologies). Китът използва мултиплексна PCR амплификация чрез локус-специфични праймери, маркирани с различни флуоресцентни багрила. Технологията позволява едновременното анализиране на 16 локуса (табл. 5), включително и такива, чиито алели са с припокриваща се големина. Анализът е извършен чрез автоматичен ДНК секвенатор ABI PRISM 3100 или 3130xl (Life Technologies). Заедно с всяка проба се натоварва и вътрешен стандарт Gene Scan-LIZ 500 (Life Technologies) за автоматично определяне на амплифицираните продукти и за нормализиране на разликите в електрофоретичната подвижност.

Изходен материал

За извършване на теста се използва ДНК изолирана от периферна венозна кръв или костен мозък. Необходимото количество ДНК за извършване на теста е 1-2.5ng.

Изпълнение на метода

1. Реактивите, включени в кита – PCR реакционна смес (PCR Reaction Mix) и праймери (Primer Set), се разбъркват добре чрез вортексиране. Центрофугират се за няколо секунди.
2. В Епендорф епруветка се приготвя реакционна смес, в зависимост от броя на изследваните проби (n), която включва:

   2.1. N x 10.5µl PCR реакционна смес;

   2.2. N x 0.5 µl AmpliTaq Gold полимераза

   2.3. N x 5.5 µl праймери.
3. Посочените компоненти се разбъркват добре, чрез вортексиране.
4. 15 µl от така приготвената реакционна смес се разпределят в PCR епруветки.

Таблица 5. Локуси определяни чрез AmpFlSTR Identifiler® кит

Локус	**Хромозома**	**Алели, включени в AmpFlSTR Identifiler® алелен ладер**	**Флуоро-фор**
D8S1179	8	8, 9 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	6-FAM™
D21S11	21q11.2-q21	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38	
D7S820	7q11.21-22	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	
CSF1PO	5q33.3-34	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	
D3S1358	3p	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	VIC®
TH01	11p15.5	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11, 13.3	
D13S317	13q22-31	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	
D16S539	16q24-qter	5, 8, 9, 10, 11, 12,13, 14, 15	
D2S1338	2q35-37.1	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28	
D19S433	19q12-13.1	9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2	NED™
vWA	12p12-pter	11,12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24	
TPOX	2p23-2per	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13	
D18S51	18q21.3	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27	
Amelogenin	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	X, Y	PET®
D5S818	5q21-31	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16	
FGA	4q28	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2	

5. Добавя се 10 µl от изследваната ДНК проба с концентрация не по-висока от 0.25ng/µl. Аналогично се приготвя негативна контрола (съдържаща дестилирана вода) и позитивна контрола (ДНК проба с известен генотип).

6. Епруветките се поставят в амплификатор Applied Biosystems 9700 с параметри на температурния блок PE 9600 и се стартира програмата:

95°C	11мин.	1 цикъл
94°C	1мин.	28 цикъла
59°C	1мин.	
72°C	1мин.	
60°C	60мин.	1 цикъл
12°C	∞	

7. След приключване на амплификацията епруветките се съхраняват в хладилник на тъмно. За по-продължителен период съхранението се извършва във фризер при -15°C до -25°C.

Електрофоретичен анализ

Електрофоретичният анализ се извършва чрез автоматичен секвенатор, съгласно протокола за фрагментен анализ:

Подготовка на пробите:

1. В Епендорф се смесват дейонизиран формамид и Gene Scan-LIZ500 стандарт (Life Technologies). Необходимите количества за едно пускане са 174µl дейонизиран формамид и 6µl Gene Scan-LIZ500 стандарт;

2. Сместа се разбърква добре, чрез вортексиране;

3. Приготвената смес се разпределя по 10 µl в 96-гнездни плаки;

4. Добавя се 0.4 µl от амплифицирания продукт;

5. Добавя се 1 µl от алелния ладер;

6. Пробите се денатурират при 95°C за 3мин. и веднага след това се поставят върху лед;

7. Плаката се поставя в апарата и се стартира електрофорезата.

Анализ на резултатите

За анализ на резултатите се използва Gene Mapper софтуер (Life Technologies).

Изчисляване на процента донорна химера

При първоначалното изследване е необходимо да се определи профила на реципиента преди трансплантация и на донора. Въз основа на тези генетични профили се идентифицират информативните локуси, съдържащи алели, които са специфични за реципиента и не се наблюдават при донора. Изчисляването на процента донорна химера в пробата, взета от реципиента след трансплантация, се извършва въз основа на площа на пиковете от информативните локуси. За достоверност на резултата е необходимо да има поне 3 информативни локуса. За всеки информативен локус се определя процента донорна химера по формулата:

$$\text{донорна химера (\%)} = \frac{\text{Д1} + \text{Д2}}{\text{Р1} + \text{Р2} + \text{Д1} + \text{Д2}} \times 100$$

Р1 и Р2 са площите или височините на специфичните за реципиента алели, а Д1 и Д2 са площите или височините на специфичните за донора алели. Крайният резултат се дава като средно аритметично от процента донорна химера, определен за всеки информативен локус.

Количествен real-time PCR метод

Методът се основава на детекцията на единични нуклеотидни полиморфизми, които се откриват само при донора или само при реципиента. Количественият real-time PCR използва TaqMan технология, която се основава на 5’ нуклеазната активност на Taq полимеразата. По време на фазата на удължаване на PCR полимеразата разделя специфична двойно-белязана флуорогенна хибридизационна проба. Едната от флуоресцентните бои се използва като репортер (6-carboxyfluorescein [FAM]), а другата като гасител (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine [TAMRA]). По време на удължаването на ДНК фрагментите полимеразата разделя пробата, като по този начин позволява пространственото отделяне на репортера от гасителя, което води до нарастване на

флуоресцентния сигнал. След всеки цикъл real-time PCR апаратът чертае амплификационна крива, която представлява отношение на интензитета на флуоресцентния сигнал (ΔRn) към номера на цикъла. Стойността ΔRn представлява вариацията в интензитета на репортера, нормализирана спрямо вътрешна контрола. За всеки PCR се определя специфично Ct – номерът на цикъла, при който за пръв път се е засякло значително увеличаване на флуоресцентния сигнал.

Китът AlleleSEQR Chimerism (Celera Corp.) се състои от скрининг плака, 34 генетични маркера и един референтен маркер. Процедурата по определянето на процента химеризъм се състои от две части: 1) скрининг тест и 2) количествено определяне.

При скрининг теста двете ДНКи – на донора и на реципиента преди трансплантация, се амплифицират на плака съдържаща всички 34 маркера. Целта е да се открият информативните маркери и за двете проби. Един или повече от информативните маркери се използва за последващото количествено определяне.

Изходен материал

За извършване на теста се използва ДНК изолирана от периферна венозна кръв или костен мозък. Необходимото количество ДНК за извършване на теста е 1-100ng за PCR реакция.

Извършване на скрининг теста

1. Изчислява се необходимото количество ДНК:

$$X\ \mu l = \frac{\text{ДНК концентрацията в ng/µl}}{\text{Желаното количество ДНК за PCR реакция в ng}}$$

2. В Епендорф епруветка се приготвя реакционна смес за всяка от двете ДНК проби:

   2.1. (740 – X) µl PCR сертифицирана вода;

   2.2. 185 µl 5x PCR реакционна смес;

   2.3. X µl ДНК.

3. Посочените компоненти се разбъркват добре чрез вортексиране.

4. 25 µl от така приготвената реакционна смес се разпределя в съответните гнезда на скрининг плаката.

5. Плаката се поставя в амплификатор Applied Biosystems 7500 и се стартира програмата:

50°C	2мин.	1 цикъл
95°C	10мин.	1 цикъл
95°C	45 сек.	40 цикъла
60°C	1мин.	

6. За анализ на резултатите се използват софтуери SDS 1.4 (Life Tehchnologies) и AlleleSEQR v1.1 Chimerism Analysis Software (Celera Corp.).

След като се определят информативните маркери, един или два от тях се използват в количественото определяне на химеризма. Той се изчислява като съотношение на търсения геном в химерната ДНК проба и същият този геном в референтна проба (калибратор). В доплнение се амплифицира и референтен маркер, който се използва за определяне и нормализиране на количеството ДНК в реакцията, както и за положителна контрола на амплификацията.

Извършване на теста за количествено определяне на химеризъм

1. В Епендорф епруветка се приготвя реакционна смес за всеки от използваните маркери:

   1.1. (15 – X) µl PCR сертифицирана вода;

   1.2. 5 µl *N реакции Маркер;

   1.3. 5 µl *N реакции 5x PCR реакционна смес;

   1.4. X µl ДНК.

2. Посочените компоненти се разбъркват добре чрез вортексиране.

3. 25 µl от така приготвената реакционна смес се разпределя в съответните гнезда на плаката.

4. Стартира се PCR амплификация с параметрите от т.5 на скрининг теста.

5. За анализ на резултатите се използват софтуери SDS 1.4 (Life Tehchnologies) и AlleleSEQR v1.1 Chimerism Analysis Software (Celera Corp.).

III. СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ

За статистическа обработка на данните от дисертационния труд беше използван софтуерен продукт SPSS Statistics 16.0 (IBM Corp., USA). За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза, бе избрано $P \leq 0.05$.

Честотното разпределение на разглежданите признаци, разбити по групи, беше оценено чрез дескриптивен анализ. С оглед на правилния избор на набора статистически тестове в последващия анализ на данните, формата на честотните разпределения беше тествана за нормалност чрез тест на Kolmogorov-Smirnov и непараметричен тест на Shapiro-Wilk. Student's t-test, Mann-Whitney U тест и Fischer's exact тест бяха използвани за проверка на хипотези за различие между две независими извадки в зависимост от нормалността на честотното им разпределение. Тестването на хипотези за еднаквост при количествени, категорийни и непрекъснати зависими променливи с 3 или повече групи, беше извършено чрез one-way ANOVA дисперсионен анализ и Kruskal-Wallis H тест. При получаване на сигнификантен резултат използвахме Tukey HSD (при голям брой групи и нужда от контрол на грешката от тип I) или Bonferroni (при малък брой групи, когато броят на сравненията надвишава степените на свобода на сравняваните групи) post hoc тестове, за да специфицираме разликите. За търсене на зависимост между количествени променливи използвахме регресионен анализ, а при оценката на корелационните зависимости използвахме корелационен коефициент на Pearson.

При проучване влиянието на пред- и посттрансплантационните фактори за изхода от алогенна ТХСК като крайни точки бяха заложени OS, DFS, GvHD (остра и/или хронична), рецидив и NRM. Поради наличието на цензорирани събития за оценка на тези фактори, използвахме статистическите техники Life tables, Kaplan-Meier и Cox регресионен анализ.

За оценка на разпределението на времената между две събития и изчисляване на вероятността от терминално събитие в даден времеви интервал използвахме life tables.

За изчисляване на time-to-event моделите и изчисляване на вероятността от настъпване на събитие използвахме Kaplan-Meier метод. Еднаквостта на разпределенията при отделните статистически променливи беше тествана чрез log rank статистика. За спецификация на сигнификантните разлики между отделните групи използвахме pairwise comparison анализ. Оценка на риска за възникване на пострансплантационни компликации беше определена чрез Cox-регресионен анализ и изчисляване на коефициент на риск и доверителен интервал (95%).

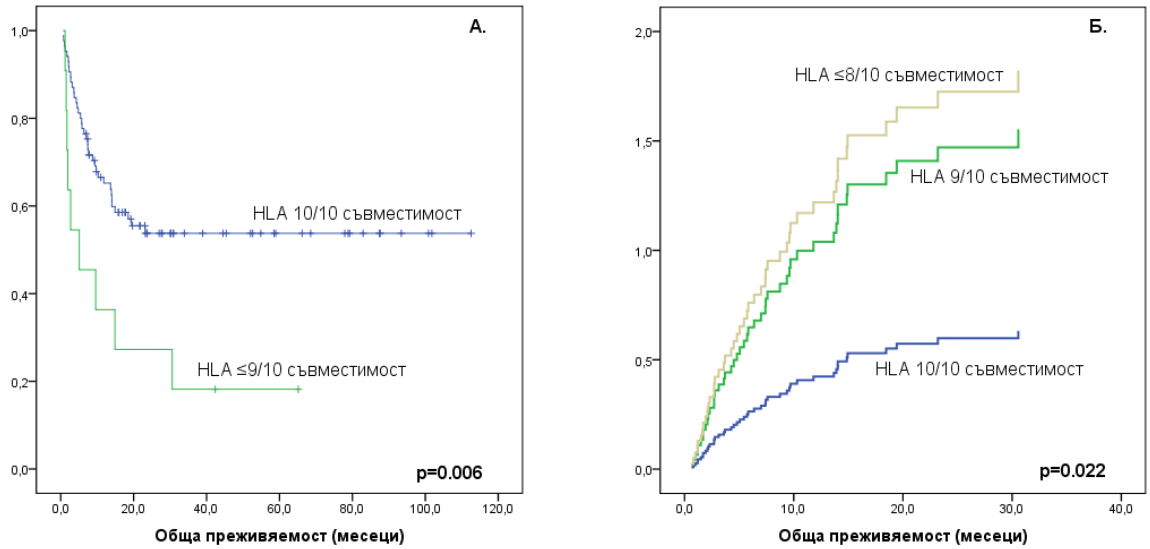
При разработването на Ecxel-базираното приложение за автоматизация на резултатите от изследването на химеризма и подържане на база данни използвахме статистически и количествени нестатистически параметри, описани подробно в раздел II.1.2. на глава „Резултати и дискусия”.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

РАЗДЕЛ I. ПРЕДТРАНСПЛАНТАЦИОННИ ФАКТОРИ, ОКАЗВАЩИ ВЛИЯНИЕ ВЪРХУ ИЗХОДА ОТ ТХСК

I.1. Роля на съвместимостта по HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 локусите

В изследваната група при 10 болни трансплантацията е била от несъвместим донор – 5 трансплантации с 1 HLA несъвместимост, 4 - с две и 1 - с 3 несъвместими алела (ММ). Медианата на периода на проследяване е 14.9 месеца (0.6 – 112.6). Наличието на несъвместимости се асоциира със силно намалена обща преживяемост (P=0.021). В изследваната група не се наблюдава изразен адитивен ефект на HLA несъответствията, като те са оценени с приблизително еднакъв риск – HR=2.46 (95% CI = 0.87 – 6.9; P=0.088) за 1 ММ и HR=2.88 (95% CI = 1.13 – 7.36; P=0.027) за ≥2 ММ (фиг. 4/Б). Поради наблюдаваното еднакво влияние върху OS в последващите анализи, обединихме двете групи в една обща - ≤9/10 съвместими трансплантации. Оценената средна преживяемост е 64.2 месеца при напълно съвместимите ало-СКТ срещу 18.1 месеца при наличието на поне една несъвместимост (P=0.006; фиг. 4/А), а рискът – HR=2.68 (95% CI = 1.29 – 5.56, P=0.008).



Фигура 4. А/ Влияние на несъвместимостите върху общата преживяемост. Б/ Кумулативен риск от настъпване на летален изход в зависимост от броя несъвместимости по HLA.

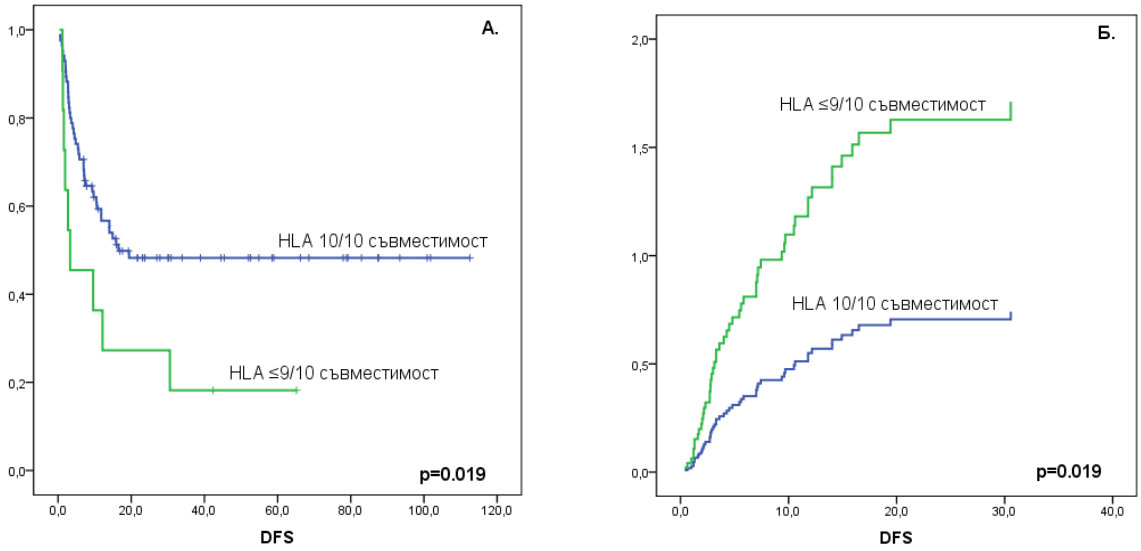
Смъртността през първата година е 36% при 10/10 ало-СКТ в сравнение с 64% при ≤9/10. До края на втората година смъртността достига 48% при 10/10 и 73% при ≤9/10 трансплантациите. Първите две години от следтрансплантационния период са най-критични за пациентите, като данните показват, че 100% от наблюдаваните смъртни случаи при напълно съвместимите ТХСК са наблюдавани в този период, докато в групата на ТХСК от несъвместим донор този процент е 89.9%. Медианата на периода до настъпване на летален изход е 5.8 месеца (0.6 – 23.2) в групата на 10/10 ало-СКТ и 2.7 месеца (1.2 – 30.6) при ≤9/10 ало-СКТ (фиг. 6/А). Подробно описание на преживяемостта в различни периоди след ало-СКТ са представени в таблица 6. Медианата на периода на проследяване на живите пациенти е 30.2 месеца (7 – 112.6) и 53.8 месеца (42.4 – 65.2), съответно за 10/10 и ≤9/10 групите.

Таблица 6. Смъртност през различни периоди след ТХСК

	Период до настъпване на събитието и процент					
	Медиана (месеци)	*0-3м.*	*3-6м.*	*6-9м.*	*9-12м.*	*2г.*
10/10 ТХСК	5.8 (0.6-23.3)	27%	24.4%	16.2%	10.8%	21.6%
≤9/10 ТХСК	2.7 (1.2 - 30.6)	55.6%	11.1%	0%	11.1%	11.1%

Всички 10 HLA несъвместими ало-СКТ са извършени в групата на пациентите с малигнени неоплазии, поради което успяхме да проучим ролята на HLA само в тази група. Оценената средна преживяемост при 10/10 ТХСК на реципиенти със злокачествено заболяване е 57.4 месеца, сравнено с 18.1 месеца при ≤9/10 (P=0.009). Пациентите с диагностицирано немалигнено заболяване имат най-висока оценена средна преживяемост - 67.7м. Въпреки това не се наблюдава статистически значима разлика между вида първично заболяване и смъртността при 10/10 трансплантациите (P=0.680; виж раздел I.2).

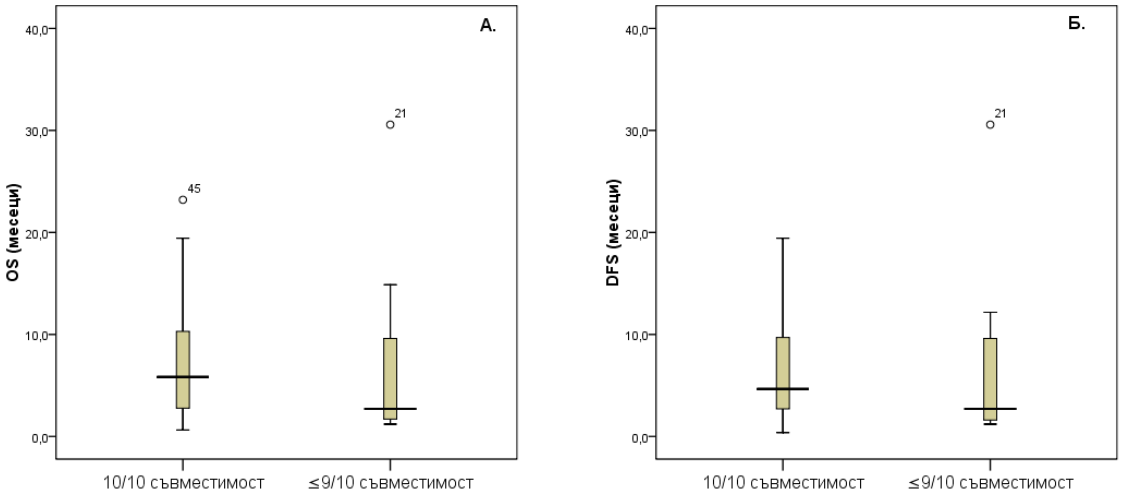
Наличието на една или повече несъвместимости по някой от петте основни локуса значително намалява и свободната от болест преживяемост – P=0.019. Рискът от възникване на събитие – летален изход или релапс, при наличие на HLA несъвместимост, е оценен с HR=2.31 (95% CI 1.12 – 4.75, P=0.023; фиг. 5). След края на втората година DFS е 47% при 10/10 групата и 27% - при ≤9/10 групата. Медианата за настъпване на събитие е 4.7 месеца (0.4 – 19.4) при 10/10 и 2.7 месеца (1.2 – 30.6) при ≤9/10 (табл. 7 и фиг. 6/Б).



Фигура 5. А/ Влияние на несъвместимостите върху DFS. Б/ Кумулативен риск от настъпване на събитие (летален изход или релапс) в зависимост от HLA съвместимостта.

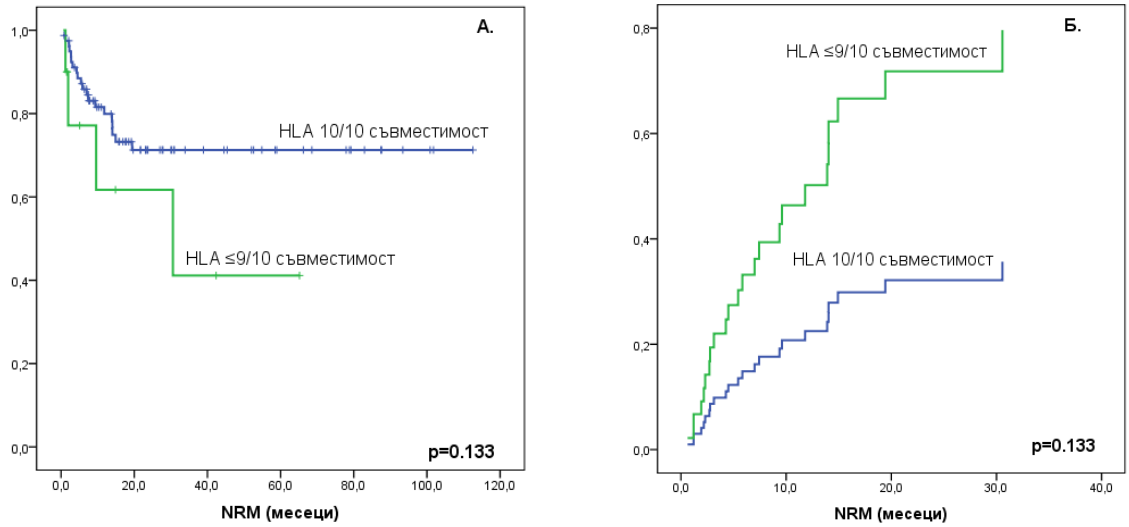
Таблица 7. Настъпване на летален изход или релапс през различни периоди след ТХСК

	Период до настъпване на събитието и процент					
	Медиана (месеци)	*0-3м.*	*3-6м.*	*6-9м.*	*9-12м.*	*2г.*
10/10 ТХСК	4.7 (0.4-19.4)	33.3%	26.2%	11.9%	14.3%	14.3%
≤9/10 ТХСК	2.7 (1.2 - 30.6)	55.6%	11.1%	0%	11.1%	11.1%



Фигура 6. Бокс плот графика на разпределението на събитията при общата (А) и свободната от болест (Б) преживяемост.

Влиянието на HLA съвместимостта е по-слабо изразено по отношение на несвързаната с рецидив смъртност. Наличието на ≥1 ММ се оценява с HR=2.23 (95% CI = 0.76 – 6.55, P=0.133), малко по-ниско, отколкото при DFS, но тук не се достига ниво на статистическа достоверност. Максималният кумулативен риск е 0.8 (фиг. 4Б и 5Б), докато при OS и DFS той е над 1.5 (фиг. 7). След края на втората година NRM при 10/10 съвместимите трансплантации е 30%, а при ≤9/10 – 35%. Медианата за настъпване на NRM е 5.6 месеца (0.6 – 19.4) и 5.8 (1.2 – 30.6), съответно за 10/10 и ≤9/10 (табл. 8).



Фигура 7. А/ Влияние на несъвместимостите върху NRM. Б/ Кумулативен риск от NRM в зависимост от HLA съвместимостта.

Таблица 8. Настъпване на NRM през различни периоди след ТХСК

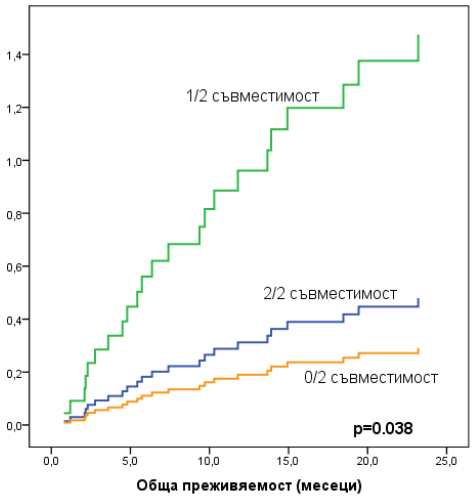
	Период до настъпване на събитието и процент					
	Медиана (месеци)	*0-3м.*	*3-6м.*	*6-9м.*	*9-12м.*	*2г.*
10/10 ТХСК	5.6 (0.6-19.4)	30%	25%	10%	10%	25%
≤9/10 ТХСК	5.8 (1.2 - 30.6)	50%	0%	0%	25%	25%

Трима от пациентите са трансплантирани от полово съвместим неродствен донор с HLA несъвместимост извън клинично значимите екзони (екзони 2 и 3 за клас I и екзон 2 за клас II) – един с ММ в екзон 4 на HLA-A локуса и двама с ММ в екзон 3 на HLA-DRB1. И тримата са диагностицирани с ОМЛ, като при анализа на данните са класифицирани в групата на HLA 10/10 съвместимите ТХСК. Близо две години след трансплантацията и тримата са живи (22, 21 и 20 месеца след ало-СКТ), като и при

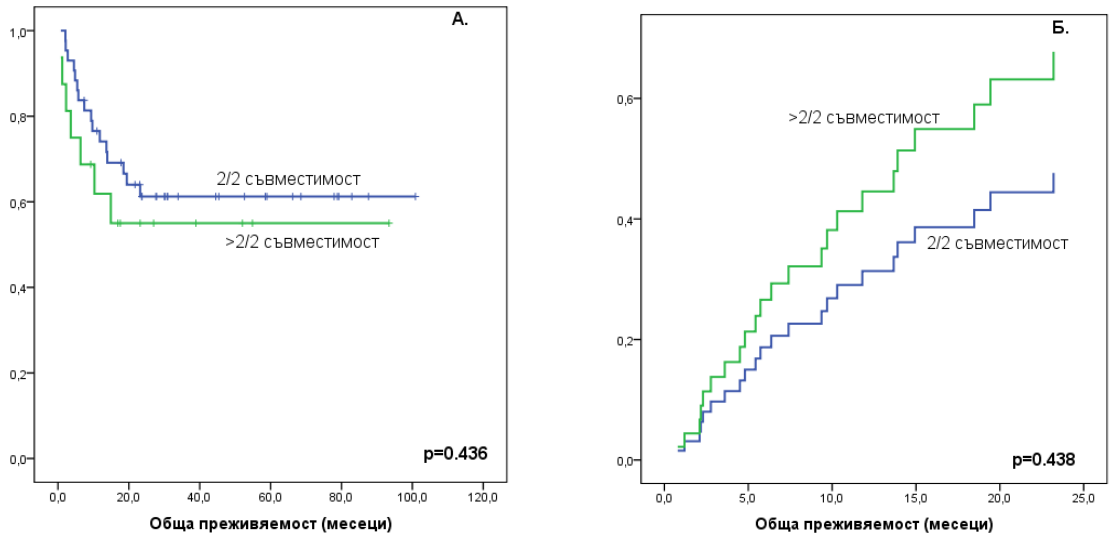
тримата не са наблюдавани усложнения. Интересно е, че донорите на двама от тях са жени, т.е. трансплантация Ж-Ж и са съвместими по HLA-DPB1 локуса (виж раздел I.3.3. и I.2.).

I.2. Роля на съвместимостта по HLA-DPB1 локуса

Несъвместимостите в основните 5 HLA локуса – A, B, C, DRB1 и DQB1, силно повлияват преживяемостта след ало-СКТ. Допълнително анализирахме ролята на DPB1 локуса в групата на HLA 10/10 съвместимите трансплантации. Интересен резултат се получи при анализа на общата преживяемост – трансплантациите от напълно несъвместими по HLA-DPB1 локуса донори (0/2 съвместимост) показват подобна преживяемост с тези от напълно съвместими (2/2; P=0.508) и много по-добра от тези с една алелна или антигенна несъвместимост (1/2; P=0.021). Съответно кумулативният риск при наличие на един MM е HR=3.08 (95% CI = 1.12 – 8.45, P=0.029), а при 2 MM е HR=0.61 (95% CI = 0.14 – 2.65, P=0.507; фиг. 8). Когато разгледахме данните от гледна точка на наличието (>2/2) или липсата (2/2) на несъвместимост по този локус, резултатите не дадоха сигнификантна разлика (P=0.436; фиг. 9). Добавянето на етапа на болестта, като кофактор в анализа не оказва влияние върху оценката на ролята на HLA-DPB1 локуса.



Фигура 8. Кумулативен риск за OS в зависимост от броя насъвместимости в DPB1 локуса



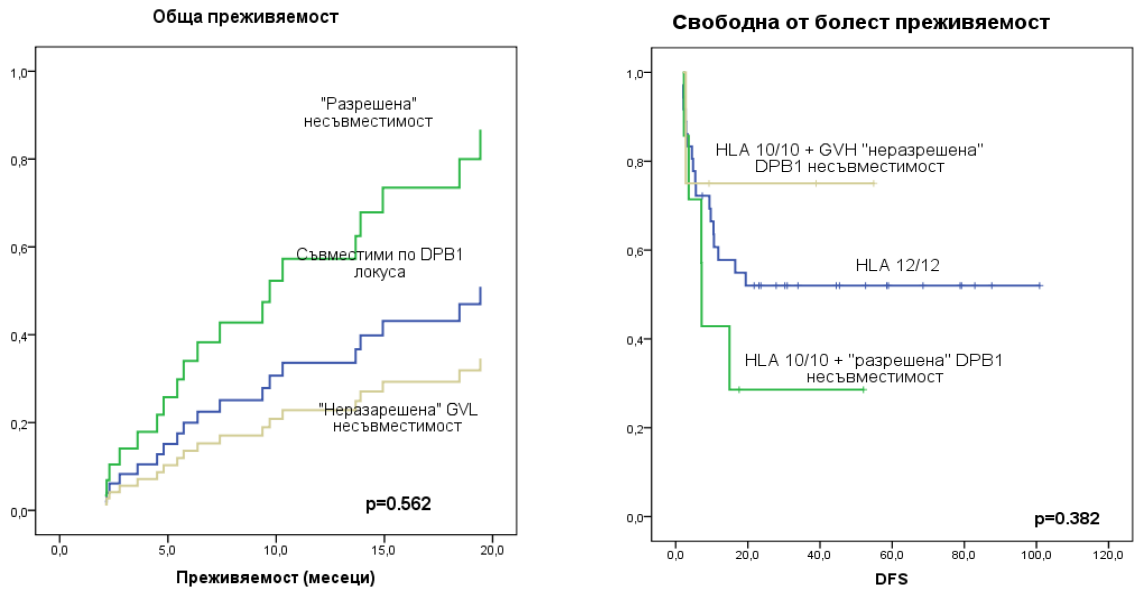
Фигура 9. А/ Влияние на несъвместимостите по HLA-DPB1 локуса върху OS. Б/ Кумулативен риск за OS в зависимост от наличието на HLA-DPB1 съвместимост.

Опитахме се да обясним тези резултати с т. нар. „разрешени" и „неразрешени" несъвместимости. Използвахме интернет базирана програма, за да определим наличието на алореактивни Т-клетъчни епитопи при двойките с поне един различен алел в HLA-DPB1 локуса. Резултатите са обобщени в таблица 9.

Таблица 9. Дефиниране на вида HLA-DPB1 несъвместимост в зависимост от Т-клетъчните епитопи.

Двойка	***TCE група***	***Предполагаема имуногенност***	***Коментар***
1	*3*	*Ниска*	*Разрешена несъвместимост*
2	*3*	*Ниска*	*Разрешена несъвместимост*
3	*3*	*Ниска*	*Разрешена несъвместимост*
...	*...*	*...*	*...*
13	*3*	*Ниска*	*Разрешена несъвместимост*
14	*2*	*Средна*	*Неразрешена несъвместимост в посока HvG*
15	*1*	*Висока*	*Неразрешена несъвместимост в посока HvG*
16	*2*	*Средна*	*Неразрешена несъвместимост в посока HvG*
17	*2*	*Средна*	*Неразрешена несъвместимост в посока HvG*
18	*2*	*Средна*	*Неразрешена несъвместимост в посока HvG*
19	*1*	*Висока*	*Неразрешена несъвместимост в посока GvH*
20	*2*	*Средна*	*Неразрешена несъвместимост в посока GvH*
21	*2*	*Средна*	*Неразрешена несъвместимост в посока GvH*
22	*1*	*Висока*	*Неразрешена несъвместимост в посока GvH*
23	*1*	*Висока*	*Неразрешена несъвместимост в посока GvH*
24	*2*	*Средна*	*Неразрешена несъвместимост в посока GvH*

Анализът показа, че 13 от реципиентите са трансплантирани от донор с „разрешена” несъвместимост, 5 трансплантации са с „неразрешена” DPB1 несъвместимост в посока HVG и 6 с „неразрешена” в посока GVH. Общата преживяемост (HLA 10/10 съвместими ало-СКТ, хематологична неоплазия) на пациентите с „разрешена” несъвместимост е по-ниска от тази на пациентите с HVG или GVH „неразрешена” несъвместимост (P=0.454 и 0.439, съответно), но различията не са статистически достоверни. Разделихме вида DPB1 несъвместимост според потенциалния GVL ефект и оценихме ролята му за OS в 10/10 съвместимите ало-СКТ при пациенти с малигнено заболяване. Получените резултати отново не са статистически значими (фиг. 10). Въпреки това се наблюдава тенденция към по-добра обща преживяемост и DFS при HLA 10/10 с GVH „неразрешена” несъвместимост (фиг. 10).



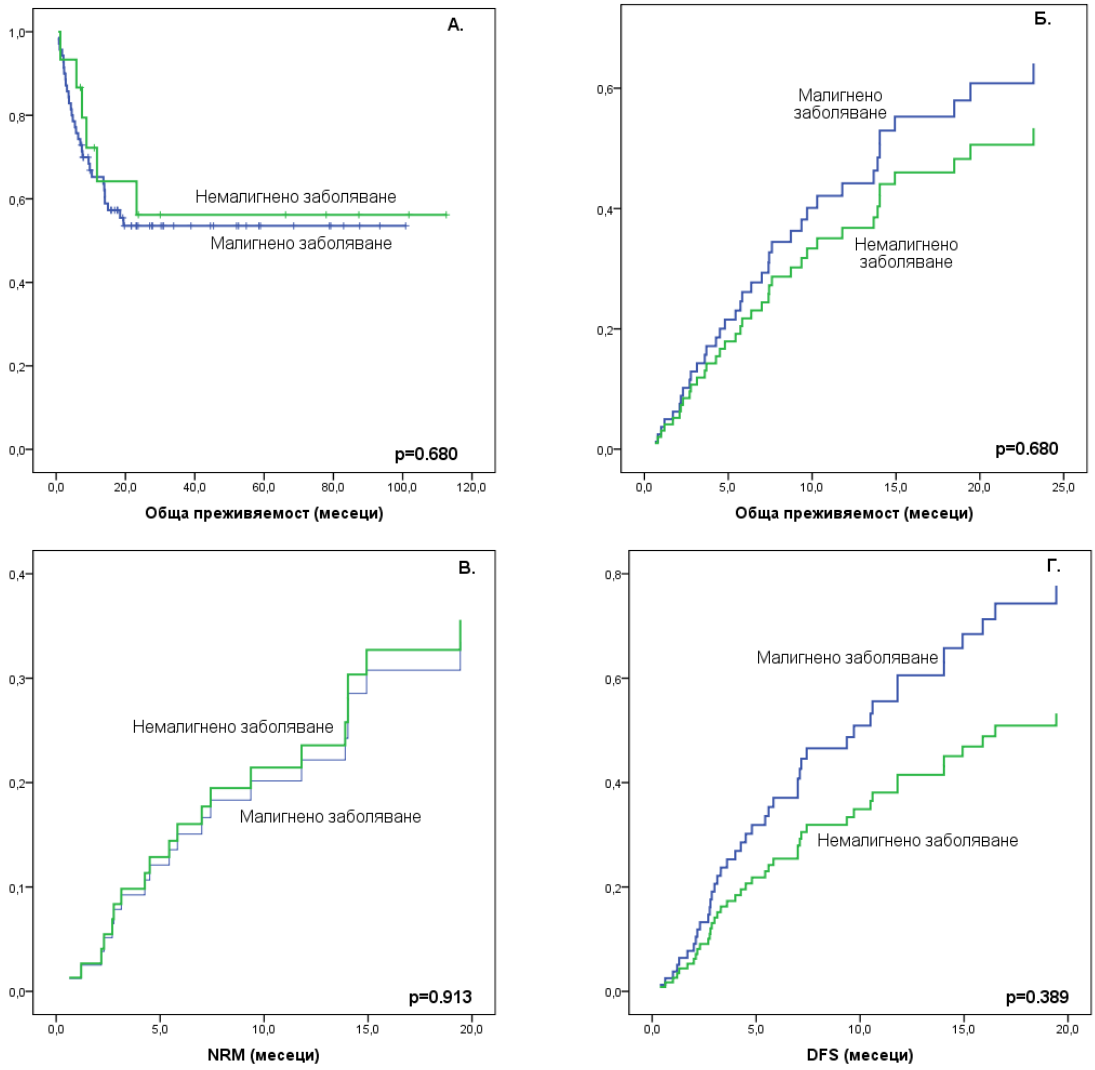
Фигура 10. Антитуморен ефект на несъвместимостите по HLA-DPB1 локуса.

I.3. Роля на не-имуногенетични фактори

I.3.1. Роля на първичното заболяване

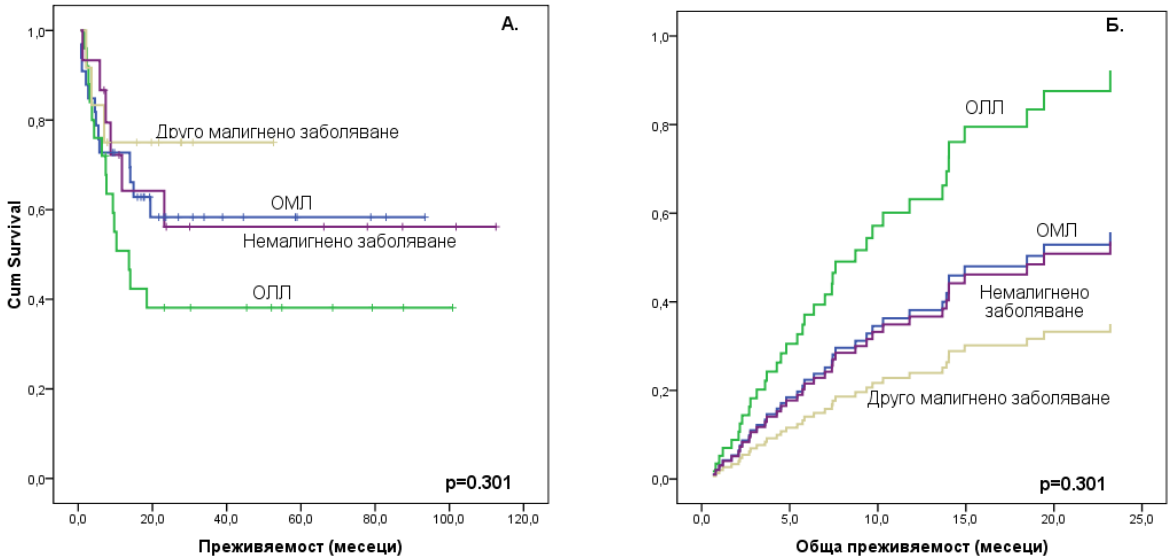
В изследваната група, пациентите с хематологични неоплазии показват сходна преживяемост с тези, диагностицирани с немалигнено първично заболяване. Двугодишната обща преживяемост за цялата група е съответно 49.9±5.8% и 56.2±13.6%. При ало-СКТ с напълно съвместим (10/10) донор 2-годишната OS е още

по-близка – 53.5±6.2% и 56.2±13.6%, съответно. Не се наблюдават различия по отношение на ролята и кумулативния риск за вида заболяване и OS, NRM и DFS (фиг.11).



Фигура 11. Роля на вида първично заболяване за общата преживяемост (А. и Б.), несвързаната с рецидив смъртност (В.) и свободната от болест преживяемост (Г.) при HLA 10/10 съвместими ало-СКТ.

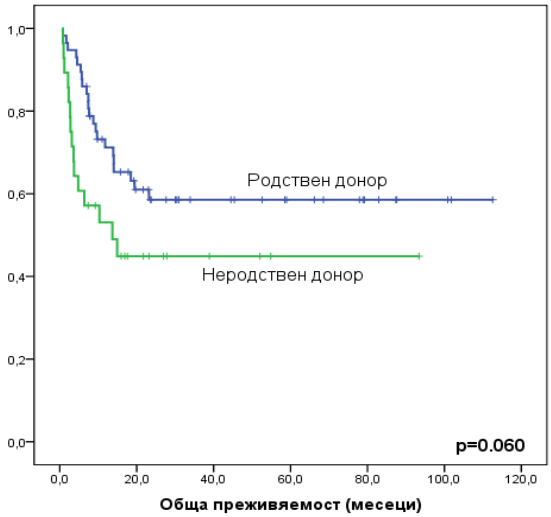
Направихме оценка на преживяемостта и при отделните заболявания, като отделихме двете основни групи пациенти – тези с ОЛЛ и тези с ОМЛ (фиг. 12). Анализът не показа статистически значими данни за връзка между вида първично заболяване и OS, DFS и NRM.



Фигура 12. Обща преживяемост и кумулативен риск при различните видове първично заболяване.

I.3.2. Роля на вида донор

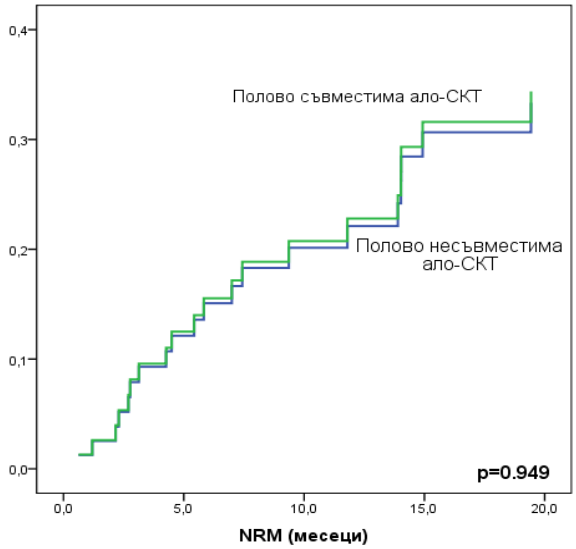
Пациентите, които са трансплантирани от HLA 10/10 съвместим родствен донор показват по-добра обща преживяемост в сравнение с тези, които са трансплантирани от съвместим неродствен донор – 2-годишна OS: 58.5% срещу 44.9%, съответно (P=0.060). Разликата е още по-осезаема по отношение на преживяемостта след първата година – 71.2% срещу 53.1%, съответно (фиг. 13). Видът донор изглежда не оказва влияние върху NRM (P=0.391) и DFS (P=0.116).



Фигура 13. Обща преживяемост според вида донор.

I.3.3. Роля на половата съвместимост

Пациентите, трансплантирани от полово несъвместим донор, имат 2-годишна обща преживяемост 66.5±9.2%, докато при тези с ало-СКТ от полово съвместим донор 2-годишната OS е по-ниска – 48.4±7.1% (P=0.206). Резултатите не са сигнификантни и по отношение на DFS и NRM (фиг. 14). Макар разликата между двете групи да не е статистически достоверна, резултатите показват малко по-добра OS и DFS за полово несъвместимите ТХСК. Потърсихме обяснение на получените резултати като допълнително оценихме ролята на пола и в групата на пациентите с хематологична неоплазия, но отново не установихме значима разлика (OS: P=0.432; DFS: P=0.461; NRM: P=0.624).



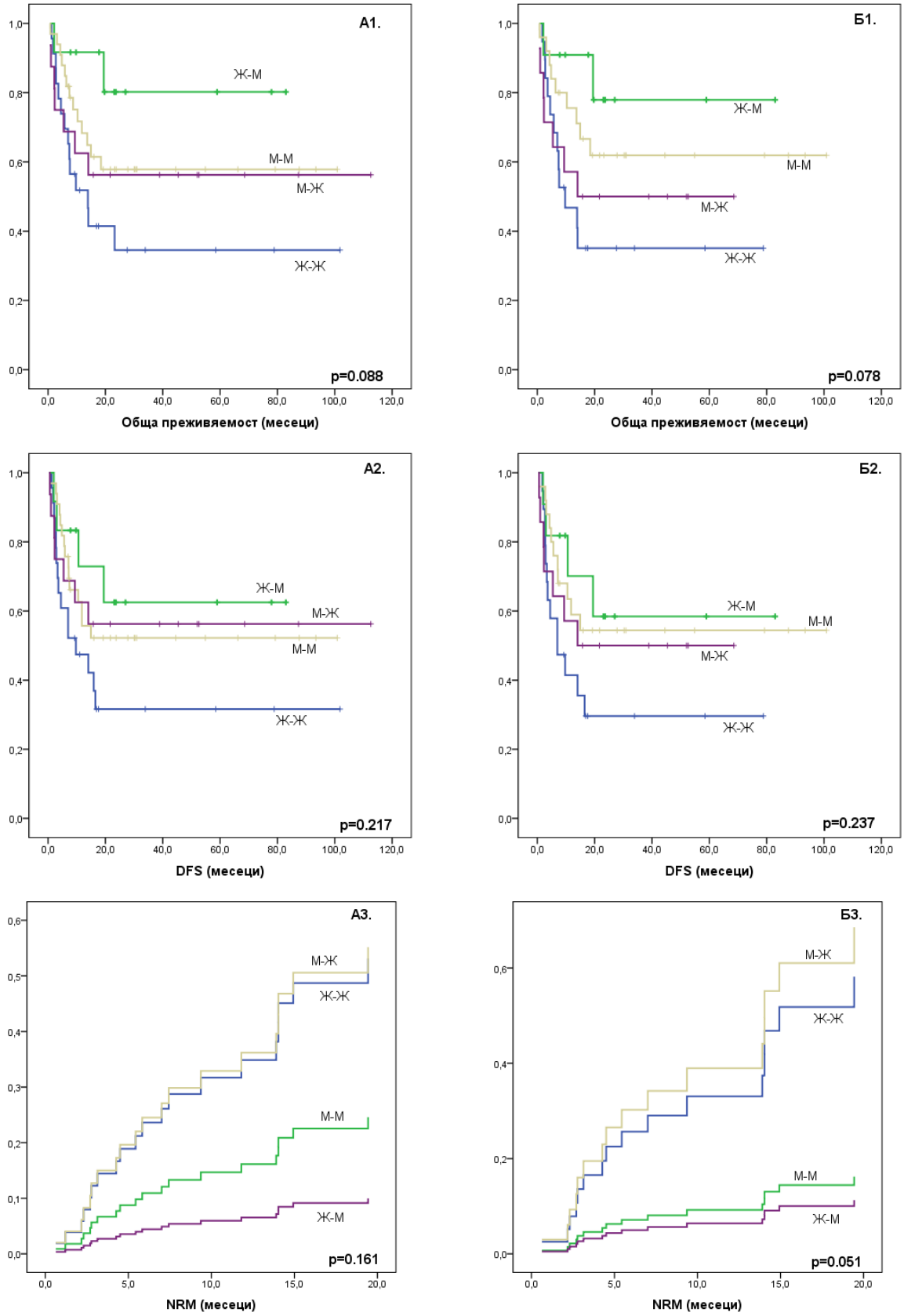
Фигура 14. Кумулативен риск за NRM в зависимост от половата съвместимост между донора и реципиента.

Разгледахме влиянието на пола според вида полова съвместимост - реципиент мъж с донор мъж (М-М) или жена (М-Ж), реципиент жена с донор мъж (Ж-М) или жена (Ж-Ж). Оценихме влиянието в групата на HLA 10/10 съвместимите алогенни трансплантации (Фиг. 15/А1-3) и в групата на пациенти с малигнено заболяване, които са трансплантирани от HLA 10/10 съвместим донор (Фиг. 15/Б1-3). В групата на 10/10 съвместимите ТХСК, двойката Ж-М е с най-добра преживяемост – 2-годишна OS=80.2%, следвана от М-М (2-годишна OS=57.9%) и М-Ж (2-годишна OS=56.2%), докато при Ж-Ж 2-годишната OS е 34.5% (P=0.018, P=0.082 и P=0.368, съответно; фиг. 15/А1.). При пациенти с хематологични неоплазии, трансплантирани от HLA съвместим донор, двойките Ж-Ж също показват най-ниска преживяемост (2-годишна

OS=35.1%), в сравнение с Ж-М (2-годишна OS=77.9%; P=0.022), М-М (2-годишна OS=61.9%; P=0.052; фиг. 15/Б1). Когато реципиентът е жена, кумулативният риск за OS при трансплантация от HLA 10/10 донор мъж е оценен с HR=0.20 (95% CI = 0.045 – 0.882; P=0.033), спрямо донор жена. Когато реципиентът е жена, страдаща от малигнено заболяване, този риск е HR=0.21 (95% CI = 0.047 – 0.94; P=0.041) при HLA съвместим донор мъж, в сравнение с донор жена.

При свободната от болест преживяемост резултатите не показват статистически значима разлика в нито една от двете групи. Гранични стойности на сигнификантност се наблюдават при двойките Ж-М срещу Ж-Ж при HLA 10/10 (2-годишна OS=62.5% срещу 31.6%, P=0.071), както и Ж-Ж срещу Ж-М и срещу М-М при реципиенти с малигнено заболяване показват гранични стойности на значимост (2-годишна OS=29.6% срещу 58.4%, P=0.089 и срещу 54.4%, P=0.078, съответно; фиг. 15/А2. и Б2.).

При оценка на кумулативния риск за несвързаната с релапс смъртност нито една от двойките и в двете групи не показа значими различия с някоя от останалите двойки (фиг. 15/А3. и Б3.).



Фигура 15. Влияние на вида полова съвместимост при HLA 10/10 съвместими ало-ТХСК (А.) и при HLA 10/10 съвместими ало-ТХСК на пациенти с хематологични неоплазии (Б.) за OS (А1.и Б1.), DFS (А2.и Б2.) и кумулативен риск за NRM (А3.и Б3.).

I.4. Адитивен ефект на различните предтрансплантационни фактори

Данните ни показват, че видовете първично заболяване – малигнено или немалигнено, не се различават по между си по отношение на следтрансплантационни събития като OS, DFS и NRM (виж раздел I.3.1.). Двете групи заболявания се характеризират с много различни етиология и патогенеза, а оттам и в лечението им в предтрансплантационния период. Процесът на търсене на донор, включително спешността и свързаните с нея „компромиси", които биха могли да се направят по отношение на критериите за избор, могат значително да се различават. Други разлики има по отношение на количеството хематопоетични стволови клетки, кондициониращите протоколи и последващото следтрансплантационно лечение. Всички тези различия, поотделно или допълвайки се едно друго, оказват влияние върху хода на лечението. Поради тази причина, а и за да оценим по-прецизно влиянието на различните фактори върху лечението на хематологичните неоплазии чрез алогенна ТХСК, изключихме пациентите с немалигнени заболявания при оценката на адитивния ефект на предтрансплантационните фактори.

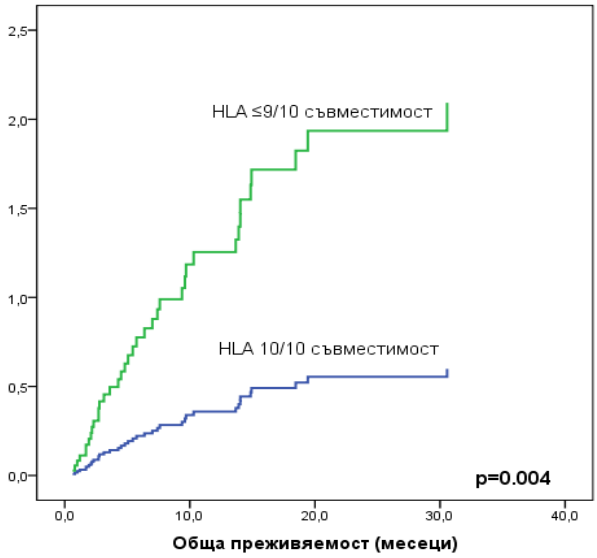
Използвахме еднофакторен регресионен анализ, за да оценим риска за следтрансплантационни усложнения при пациенти, трансплантирани от HLA 10/10 съвместим донор и такива, трансплантирани от донор с поне една HLA несъвместимост по някой от основните 5 локуса (HLA ≤9/10). Чрез стъпково добавяне на различни параметри като кофактори в регресионния анализ, направихме по-точна оценка на ролята на HLA съвместимоста, както и оценихме потенциалния им адитивен ефект. В анализа бяха включени 78 пациента с малигнено заболяване след ало-СКТ.

При оценката на общата преживяемост рискът при трансплантация от донор с поне една HLA несъвместимост, без да се отчита влиянието на други фактори, е HR=2.39 (95% CI = 1.09 – 5.23; P=0.024). При добавяне на вида клетки като кофактор рискът се променя на HR=2.51 (95% CI = 1.14 – 5.51; P=0.022), а за костния мозък като източник на стволови клетки е HR=3.24 (95% CI = 1.12 – 9.33; P=0.030). Цялостният анализ е оценен с P=0.007. Добавянето и на вида полова съвместимост значително повишава риска при HLA ≤9/10 трансплантациите – HR=3.77 (95% CI = 1.59 – 8.94; P=0.003). При вида клетки рискът се увеличава в по-малка степен – HR=3.50 (95% CI = 1.14 – 10.78; P=0.029). При вида полова съвместимост единствената значима разлика е при Ж-М, където HR=0.18 (95% CI = 0.05 – 0.68; P=0.011), спрямо трансплантациите Ж-

Ж. Цялостният анализ е оценен с p=0.003. Добавянето на вида донор като трети кофактор не носи статистическа значимост на анализа и води до понижаване на оценката на риска за HLA (HR=3.49, 95% CI = 1.46 – 8.38; P=0.005) и вид клетки (HR=3.39, 95% CI = 1.09 – 10.53; P=0.034). Последният кофактор - етапът на болестта преди трансплантация, също не носи статистическа значимост на анализа, но силно понижава оценката за ролята на вида клетки (табл. 10). Подробна разбивка на влиянието на различните кофактори е показана в табл. 10, а графиката от фиг. 16 показва риска от трансплантация с несъвместим донор при отчетено влияние на източника на стволови клетки, половата съвместимост, вида донор и етап на болестта преди трансплантация като кофактори.

Таблица 10. Комплексна оценка на различните предтрансплантационни фактори

	HR	**95% CI**	**P стойност**
Наличие на HLA несъвместимост (5 локуса)	**3.48**	**1.42 – 8.55**	**0.006**
Източник на ХСК	2.85	0.85 – 9.06	0.091
Вид полова съвместимост (спрямо Ж-Ж)			**0.050**
Ж-М	**0.17**	**0.04 – 0.65**	**0.009**
М-М	0.48	0.20 – 1.15	0.100
М-Ж	0.81	0.29 – 2.29	0.699
Донор	1.41	0.72 – 2.77	0.317
Етап на болестта (спрямо частична ремисия)			0.517
Без ремисия	0.45	0.09 – 2.15	0.318
Първа ремисия	0.81	0.22 – 2.93	0.742
Втора и следваща ремисия	0.51	0.15 – 1.74	0.285

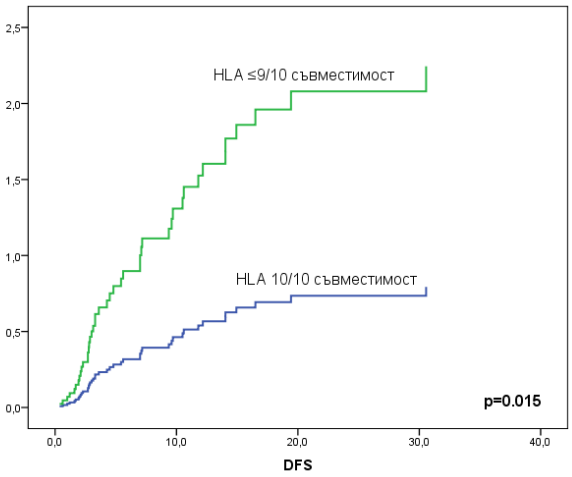


Фигура 16. Комплексна оценка на кумулативния риск за OS в зависимост от HLA съвместимостта.

В изследваната група от пациенти с левкози, HLA съвместимостта като самостоятелен фактор показва гранична стойност на значимост по отношение на свободната от болест преживяемост – HR=2.00 (95% CI = 0.93 – 4.32; P=0.077) за наличието на HLA несъвместимост. При отчитане на влиянието на източника на клетки оценката на HLA ≤9/10 съвместимостта се променя на HR=2.15 (95% CI = 0.99 – 4.66; P=0.054). Трансплантацията със стволови клетки от костен мозък е оценена като силно рисков фактор – HR=3.77 (95% CI = 1.44 – 9.85; P=0.007). Цялостният анализ е с P=0.004. Добавянето на вида полова съвместимост като втори кофактор в анализа не оказва голямо влияние върху оценката за използваните клетки, но силно повлиява тази за ролята на HLA – HR=2.77 (95% CI = 1.2 – 6.38; P=0.017). И тук, както и при OS, трансплантациите с реципиент жена и донор мъж са значително по-добре толерирани от тези с донор жена (HR=0.33, 95% CI = 0.11 – 0.97; P=0.044). Самият анализ за ролята на HLA съвместимостта с кофактори източникът на клетки и видът полова съвместимост, е с P=0.007. И тук видът донор не носи статистическа значимост на анализа (P=0.611) и слабо понижава оценката на риска за HLA и вид клетки. Етапът на болестта преди трансплантация, отново не носи статистическа значимост на анализа, но променя оценката за ролята на пола. Подробна разбивка на влиянието на различните кофактори е показана в табл. 11, а графиката от фиг. 17 показва риска от трансплантация с несъвместим донор при отчетено влияние на източника на стволови клетки, половата съвместимост, вида донор и етапа на болестта като кофактори.

Таблица 11. Комплексна оценка на различните предтрансплантационни фактори

	HR	95% CI	P стойност
Наличие на HLA несъвместимост (5 локуса)	**2.83**	**1.15– 6.95**	**0.023**
Източник на ХСК	**3.73**	**1.31 – 10.67**	**0.014**
Вид полова съвместимост (спрямо Ж-Ж)			0.488
Ж-М	0.42	0.13 – 1.29	0.128
М-М	0.71	0.32 – 1.59	0.405
М-Ж	0.86	0.32 – 2.31	0.768
Донор	1.13	0.59 – 2.15	0.717
Етап на болестта (спрямо частична ремисия)			0.357
Без ремисия	0.74	0.20 – 2.75	0.653
Първа ремисия	0.49	0.16 – 1.56	0.229
Втора и следваща ремисия	0.43	0.14 – 1.28	0.129



Фигура 17. Комплексна оценка на кумулативния риск за DFS в зависимост от HLA съвместимостта.

При несвързаната с рецидив смъртност HLA съвместимостта изглежда не играе съществена роля, тъй като регресионният анализ не достига сигнификантна значимост на нито един етап от стъпковото добавяне на различните кофактори. Статистическа

достоверност на оценката на риска от трансплантация с несъвместим по HLA донор се достига чак при включването на вида полова съвместимост (HR=4.27, 95% CI = 1.24 – 14.71, P=0.022) и вида донор (HR=4.40, 95% CI = 1.23 – 15.70, P=0.022). И в двата случая цялостният многофакторен анализ не е сигнификантен – P=0.120 и P=0.185, съответно. При добавяне и на последния кофактор – етапа на болестта, съвместимостта по HLA и пол е оценена съответно с HR=4.49 (95% CI = 1.21 – 16.65, P=0.025) и HR=0.16 (95% CI = 0.03 – 0.93, P=0.042) за Ж-М и HR=0.25 (95% CI = 0.06 – 1.06, P=0.060) за М-М спрямо Ж-Ж.

I.5. Обсъждане

С наредъка в науката списъкът на заболяванията, лечими чрез алогенната трансплантация на хематопоетични стволови клетки, става все по-дълъг. Докато за някои неоплазии този вид терапия се прилага само след неуспех на конвенционалното лечение, то при други, като левкемиите, това е единствената възможност. Основни причини за неуспех на ало-СКТ са различни следтрансплантационни усложнения като отхвърляне на присадката или нейното нефункциониране, релапс на болестта, GvHD, инфекции. Много от тези компликации са генетично обусловени и се дължат на имуногенността на трансплантационните антигени, като най-значима роля имат клас I и клас II гените на HLA системата. Същевременно и други генетични и негенетични вариации, като mHAgs, KIR, кръвно-групова съвместимост, възраст, пол и вирусологичен статус на донора и реципиента, допринасят поотделно или адитивно към други фактори за изхода от лечението.

В настоящия дисертационен труд изследвахме съвместимостта между донора и реципиента по HLA-A, -B, -C, -DRB1 и –DQB1 локусите, за да оценим нейното влияние върху изхода от ТХСК. Допълнително проучихме влиянието на съвместимостта по HLA-DPB1 локуса, както и ролята на първичното заболяване, източника на хематопоетични клетки, половата съвместимост и вида донор.

Индивидуално оценена, ролята на HLA е силно сигнификантна по отношение на общата и свободната от болест преживяемост, но не и по отношение на несвързаната с релапс на болестта смъртност. В изследваната група, пациентите трансплантирани от донор с една, две и повече несъвместимости, имат сходна преживяемост, поради което, а и с оглед да компенсираме малкия брой HLA несъвместими трансплантации и да

повишим достоверността на получените резултати, в последващите анализи сме обединили тези пациенти в една група – HLA ≤9/10. Наличието на дори една несъвместимост силно понижава OS и DFS, като над 60% от тези ало-СКТ завършват с летален изход още през първата година. Както при OS, така и при DFS най-критични са първите месеци след трансплантацията. Данните ни показват, че и при двата параметъра половината от събитията при HLA ≤9/10 ТХСК се случват преди третия месец, докато при съвместимите това става около шестия месец. Въпреки малкия брой на пациентите, трансплантирани от донор с несъвместимост извън клинично значимата антиген свързваща област (n=3), към момента на обобщаване на данните и тримата са живи без усложнения на лечението. Тези данни съвпадат с резултатите на други авторски колективи [170, 171].

В литературата са налични все повече данни за евентуална роля на HLA-DPB1 локуса като трансплантационен ген. Смята се, че алоантигените срещу него индуцират GVL и GvHD, което при високо рисковите левкемии би имало благоприятен ефект [36-40]. *Shaw и сътр.* показва, че в ранните етапи на болестта наличието на съвместимост и по DPB1 локуса оказва благоприятен ефект върху 5-годишната OS [41]. В настоящето проучване изследвахме влиянието на HLA съвместимостта по DPB1 локуса между донора и реципиента за изхода от ТХСК. Анализът е направен в групата на HLA 10/10 ало-СКТ, като целта е да се изключи влиянието на несъвместимостите по някой от основните 5 HLA локуса. Резултатите ни показват близка преживяемост между пациенти, трансплантирани от напълно съвместим (2/2) и напълно несъвместим (0/2) донор. Средното положение – наличието на една разлика (1/2), води до трикратно по-лоша обща преживяемост. Сигнификантността на анализа се губи при обединяване на несъвместимостите – 2/2 съвместими и <2/2 съвместими.

Наличието на различие по DPB1 може да има анти-левкемичен ефект, но и пълната съвместимост по този локус благоприятства общата преживяемост [36, 172]. Натрупват се все повече доказателства, че специфични позиции в аминокиселинната последователност на пептид-свързващия домен на β-веригата се свързват с Т-клетъчна алореактивност, както и че определени различия или АК остатъци се асоциират с по-добра или по-лоша преживяемост след ТХСК [27, 46, 173-175]. Изискването за трансплантация от HLA-DPB1 съвместим неродствен донор значително би намалило шанса за намиране на подходящ донор, поради което е важно да се определят, кои несъвместимости не повишават риска („разрешени”), и кои са свързани с

неблагоприятен изход („неразрешени"). Редица изследвания показаха, че HLA-DPB1 несъответствията могат да индуцират алореактивен Т-клетъчен отговор [174, 176-179]. Това откритие послужи за разработването на модел, който да идентифицира наличието на „неразрешени" несъвместимости на база на наличието на различни Т-клетъчни епитопи [42, 43, 45, 46]. Използвайки този модел, италианският регистър за донори на стволови клетки (Italian Bone Marrow Donor Registry, IBMDR) показва, че „неразрешените" HLA-DPB1 несъответствия се свързват с по-висок риск от неблагоприятен изход, отколкото „разрешените" [39]. Други ретроспективни изследвания също докладват подобни асоциации, въпреки че не винаги достигат статистическа значимост [46, 175].

За по-добра оценка на ролята на съвместимостта по HLA-DPB1 локуса използвахме интернет-базирано приложение, за да определим вида несъвместимост. Получените резултати не показаха статистически достоверна разлика. Допълнително изследвахме потенциалния GVL ефект на „неразрешените" DPB1 несъвместимости при пациенти с малигнено заболяване. Отново не установихме значими различия, въпреки че се наблюдава тенденция към по-добра OS при тези пациенти.

Данните ни показват, че съвместимостта по HLA-DPB1 локуса не оказва влияние върху изхода от ало-СКТ и вероятно наблюдаваната висока преживяемост при 0/2 съвместимите трансплантации се дължи по-скоро на преобладаващия химерен профил с ПДХ (виж раздел II.2.2). В изследваната група пациенти етапът на болестта не оказва влияние върху изхода от трансплантацията и не променя оценката на съвместимостта по HLA-DPB1 локуса. Резултатите, които получаваме, съвпадат с тези от други проучвания [13, 22]. Обратно, други изследвания показват благоприятния ефект на трансплантациите от 12/12 съвместим неродствен донор в ранните етапи на болестта, както и на несъвместимостта по DP в късните етапи на болестта [41]. Допълнителна яснота за ролята на HLA-DPB1 локуса като трансплантационен антиген дават и няколко мулти-центрови проучвания, обхващащи голям брой трансплантации – „разрешените" несъвместимости намаляват риска от релапс и компенсират негативното влияние на несъответствията в някои от основните 5 локуса [46, 47]. Поради ниския брой на трансплантациите с несъвместимост по HLA-DPB1 локуса не можем да дадем достоверна оценка на неговото влияние за изхода от ало-СКТ. Статистическият анализ на данните не достига сигнификантно ниво, но от друга страна се наблюдава тенденция за потенциален GVL ефект при пациентите със злокачествени хематологични

заболявания. Необходими са допълнителни изследвания в тази посока и разширяване на таргетната група, за да се направи по-пълна оценка на този локус. За разлика от предложения алгоритъм, който предполага слаб Т-клетъчен отговор при „разрешените" несъвместимости, други изследвания показват, че поликлонални HLA-DP специфични имунни отговори могат да се генерират, както срещу „разрешените", така и срещу „неразрешените" различия [177-180]. Установено е, че полиморфизмите в β2-домена на HLA клас II молекулите засяга афинитета на свързване на CD4 ко-рецептора, а това от своя страна повлиява цитокиновата секреция на Т-клетките [181-183]. Тези открития демонстрират нуждата от допълнтелни изследвания върху молекулярните механизми, свързани с „разрешената" и „неразрешената" HLA-DP алореактивност и върху способността на $CD4^+$ Т-клетките да секретират инфламаторни цитокини.

В изследваната група не установихме зависимост между първичното заболяване или вида донор и изхода от ало-СКТ. Двете групи хематологични заболявания – малигнени и немалигнени, показаха сходни криви на преживяемост. Несигнификантни бяха и резултатите при отделните заболявания, като пациентите с ОЛЛ показаха най-ниска обща преживяемост. Сравняването на преживяемостта според вида донор показа гранично ниво на статистическа значимост (P=0.060), като смъртността при неродствените донори е по-голяма в първите месеци след трансплантацията.

Проучването на човешкия геном показа, че полиморфизми на гени, които не са HLA-свързани, могат също да определят индивидуалния имунологичен фенотип на двойките донор-реципиент и по този начин да окажат влияние върху GvHD, релапс и общата преживяемост [184]. Много клинични и експериментални проучвания върху HLA-идентични ало-СКТ показват, че както потенциално лечебния GVL ефект, така и GvHD се развиват в резултат на Т-клетъчен отговор срещу второстепенните антигени на тъканната съвместимост [185-188]. Това са полиморфни пептиди, състоящи се от 9-12 амино киселини. Едни от първите описани и най-добре характеризирани mHAgs са група от протеини кодирани от гени, разположени върху Y-хромозомата (H-Y) и се срещат в почти всички тъкани, включително хематопоетичните клетки [189, 190]. Изследване на *Markiewicz и сътр.* показва, че GVH-насочените несъвместимости в mHAgs се свързват с по-често развитие на хронична GvHD, докато при HVG посоката, това става значително по-рядко [191]. Автозомните mHAgs, които се експресират върху хематопоетичните клетки, както и всички полово-свързани mHAgs могат да служат като мишени за донорните Т-лимфоцити и така да се благоприятства GVL ефекта, като

респективно се намали и риска от релапс. В скорошно изследване *van der Torren* и сътр. показват връзка между донорния имунен отговор срещу HA-1 – mHAg, експресиран от хематопоетичните клекти, и кинетиката на химеризма [188]. Авторите установяват по-високи нива на донорен химеризъм при пациенти с HA-1 специфични цитотоксични Т-лимфоцити, отколкото при такива без тях (P<0.05). Резултатите, които получихме, индиректно потвърждават ролята на второстепенните антигени – трансплантациите с реципиент мъж, където се очаква най-силно да е изразена ролята на H-Y, показват сравними резултати и са с по-висока OS от трансплантациите Ж-Ж. При М-Ж благоприятният GVL ефект се съпътства от GvHD, като именно поддържането на необходимия баланс би повишил общата преживяемост. При избора на донор за пациентите мъже трабва да се вземе предвид и заболяването – трансплантацията с донор жена при високо-рисковите пациенти би изместила този баланс в полза на GVL, докато при ниско-рисковите по-вероятно ще е в полза на GvHD [89]. Интересни резултати, подкрепящи тезата за H-Y, са публикувани от *Miklos и сътр.*, които показват, че в 52% от случаите на трансплантация М-Ж и 8.7% от случаите на М-М се установяват антитела срещу поне един H-Y. Също така, при 41.4% от здравите жени се откриват такива естествени антитела (P<0.0001) [192]. Резултатите от нашите изследвания показват най-добра преживяемост на пациентите, който са получили хематопоетични стволови клетки от донор мъж (2-годишна OS=80.2% за Ж-М и 57.9% за М-М). Високата обща преживяемост в групата на Ж-М ало-СКТ можем да отдадем по-скоро на останалите mHAgs, както и на наблюдаваната по-ниска заболеваемост от GvHD в тази група. Също така, по-бързото възстановяване на хематопоезата, както и по-рядкото развитие на cGvHD при донорите мъже може да оказва благоприятно влияние върху OS [193]. Последното важи и за донор жена, която не е забременявала. Обратно, при трансплантаците от жена на жена рискът от неблагоприятен изход е с 80% по-висок отколкото, ако донорът е мъж (P=0.033). Подобни резултати, но с гранични стойности на значимост, получихме и при DFS, докато при NRM не установихме различия между видовете полова несъвместимост. Въпреки че изследвания, анализиращи голям брой трансплантации, не установяват разлика в преживяемостта между различните комбинации по пол, други изследвания показват роля на анти-HLA и анти-mHAgs антитела [13, 89, 194-198]. Преформираните донор-специфични HLA антитела се определят като рисков фактор за отхвърляне на присадката при HLA несъвместимите трансплантации, докато клиничното значение на наличието на анти-HLA антитела в донорите не е добре проучено [196, 199-203]. С

присадката - периферна кръв или костен мозък, пасивно се прехвърлят и имунокомпетентни В лимфоцити, които могат да се диференцират в антитяло продуциращи плазматични клетки [198, 202]. *Han и сътр.* демонстрират, че $CD27^+$ клетки изолирани от сенсибилизирани пациенти могат да бъдат стимулирани да секретират HLA антитела, показвайки, че съществуват HLA антиген-специфични паметови В клетки [204]. Предполага се, че поради количествените и качествените различия между ПК и КМ - повече моноцити, В- и Т-клетки в ПК, появата на реципиент-специфични антитела е по-често при трансплантациите с ПКСК. Също така, използването на G-CSF при ПК присадки играе роля на прайминг за В-лимфоцитите, като по този начин ги прави по-податливи на антиген-стимулирана активация, отколкото В-клетките в КМ [205]. Можем да обясним по-ниската обща преживяемост в случаите на донор жена и с наличието на преформирани реципиент-специфични анти-HLA и анти-mHAgs антитела, които да подпомогнат развитието на GvHD. Трябва да отбележим, че оценката на преживяемостта е направена при HLA 10/10 съвместими ало-СКТ, така че, ако има влияние на алоантителата, то е по-скоро на такива, насочени срещу някои от некласическите трансплантационни HLA антигени. Резултатите, които получихме остават отворена врата за бъдещо по-детайлно проучване на ролята на преформираните антитела в донорите на стволови клетки, и по-специално - преоценка на жените като донори, конкретно бременността като честа причина за алосенсибилизация.

Разгледани самостоятелно, вида на първичното заболяване и на донора, половата съвместимост и етапа на болеста преди трансплантация изглежда не оказват никакво влияние, с малки изключения, върху следтрансплантационния период. Терапията на хематологичните заболявания чрез ТХСК е сложен мултифакторен процес и трудно може да се отграничи даден фактор като важен за лечението. Едно изключение е съвместимостта по HLA, която има огромно значение за успеха на трансплантацията. Но дори и при нея има особености, като високо-рисковите левкемии, при които могат да се правят по-големи компромиси със съвместимостта. Чрез еднофакторен регресионен анализ оценихме адитивната роля на някои неимуногенетични фактори към тази на HLA съвместимостта. Самостоятелно оценена, трансплантацията с поне една HLA несъвместимост оказва силно влияние в следтрансплантационния процес (OS: HR=2.39, P=0.024; DFS: HR=2.00, P=0.077; NRM: HR=2.24, P=0.142). При отчитане на влиянието на вида клетки и половата съвместимост, рискът при HLA ≤9/10 ало-СКТ се увеличава значително спрямо HLA 10/10 (OS: HR=3.77, P=0.003; DFS: HR=2.77,

P=0.017; NRM: HR=4.27, P=0.022). Въпреки че периферната кръв като източник на стволови клетки се свързва с по-чести cGvHD и TRM, а при неродствените донори и с aGvHD, отколкото костния мозък, не се наблюдава разлика в OS и DFS [206]. Комплексната оценка на факторите, влияещи върху изхода от ало-СКТ, показа костния мозък като рисков фактор спрямо периферната кръв по отношение на DFS (OS: HR=2.85, P=0.091; DFS: HR=3.73, P=0.014; NRM: HR=1.49, P=0.717). Нито един от пациентите, трансплантирани с костен мозък, не е развил aGvHD, а само един е диагностициран с cGvHD. За сметка на това, към момента на обобщаване на данните, само един пациент е успял да задържи пълен донорен химеризъм, докато при всички останали се наблюдава или продължителен смесен ДХ, или намаляващ. Данните ни показаха, че за жените реципиенти най-подходящи са мъжете като донори, тъй като така значително се намалява риска спрямо донор жена (OS: HR=0.16, P=0.009; DFS: HR=0.42, P=0.128; NRM: HR=0.16, P=0.042). Обратно, видът донор и етапът на болестта изглежда не оказват влияние за общата и свободната от болест преживяемост и несвързаната с рецидив смъртност при пациентите с малигнено заболяване. Източникът на клетки не оказва влияние върху NRM, докато видът донор показва гранични нива на сигнификантност.

РАЗДЕЛ II. СЛЕДТРАНСПЛАНТАЦИОННИ ФАКТОРИ, ОКАЗВАЩИ ВЛИЯНИЕ ВЪРХУ ИЗХОДА ОТ ТХСК

II.1 Въвеждане на методи за следтрансплантационен мониторинг на химеризъм

Главният принцип при определянето на химеризма е наличието на разлики между донорните и реципиентните генетични маркери или техните продукти. Разработени са различни техники за изследване нивата на химеризма, но повечето от тях са много бавни и трудоемки и не позволяват изследването на всички пациенти. Обща процедура за всички е, че пациентът и донорът му се скринират преди траснплантацията за генетични маркери, по които да се различават, като тези маркери се обозначават като информативни. Фрагментният анализ (PCR-STR методът) се приема за златен стандарт за мониторирането на химеризма и се базира на изследване на късите тандемни повтори. Приема се за полу-количествен метод с чувствителност 1-5%. Обратно, RQ-PCR методът използва TaqMan технология за амплификация на SNP. Той е количествен, като се смята, че чувствителността му надхвърля 0.1%. Нашата цел беше да проучим информативността на двата метода и да определим приложимостта им за проследяване на кинетиката на химеризма в следтрансплантационния период.

II.1.1. PCR-STR метод за изследване на химеризъм

За оценка на фрагментния анализ бяха изработени 31 нехимерни индивида, разделени в групи в зависимост от нуждите на съответния експеримент. Характеристиките на платформата бяха оценени по 2 показателя - точност и възпроизводимост на определянето на химеризма. Модели, представящи изкуствено създаден и симулиран химеризъм, бяха сравнени с оглед оценка на индивидуалното представяне на маркерите.

II.1.1.1. Точност

Параметърът се дефинира като разликата между истинските и наблюдаваните стойности на химеризма. За да оценим точността на платформата изкуствено създадохме химерни смеси с различно процентно съотношение. За целта подбрахме 7 нехимерни индивида, които комбинирахме по двойки в 4 групи, така че да обхванем максимален брой от амплифицираните от Identifiler кита локуси. За 3 от локусите – D3S135, vWA и TPOX, не успяхме да намерим подходяща комбинация, поради ниската им полиморфност в българската популация. Локусът за полова принадлежност – Amelogenine, не беше включен, понеже се отнася към случай 7 от таблица 17 и нормално не се използва в изчисленията. Изолираната ДНК беше смесена по групи в различно процентно съотношение – 0.5%, 1%, 10% и 50%, а чистата ДНК беше използвана за контрола на 0% и 100%. Смесите бяха приготвени на база на концентрация на ДНК, която беше измерена чрез спектрофотометър Nanodrop, даващ най-точното измерване. Процентът донорна химера беше изчислен, както на базата на площта на пиковете (А), така и на тяхната височина (Н). Допълнително изчислихме аналитичната откриваемост чрез метода recovery (добавено/намерено). Средните стойности на получените резултати бяха сравнени чрез Т-критерий на Стюдънт.

Разреждането с 99.5% донорна химера показа много близки стойности, както между четирите отделни групи (средно SD=0.8), така и между двата подхода за неговото изчисляване (А=99.1%, Н=99.2%). Не всички локуси успяха да засекат наличието на второстепенните пикове, но всички групи дадоха положителни стойности, като резултатите са в интервала 98.9% - 99.6% (табл. 12).

Разреждането с 99% донорна химера също показа много близки стойности - А=98.7±0.8% и Н=98.8±0.8%. И тук имаше локуси, макар и единични, които не успяха да засекат наличието на втори генетичен материал. (табл. 13)

Значително по-голямо стандартно отклонение се наблюдава при 90% донорна химера в сравнение с 0.5% и 1% разрежданията. Въпреки това средните стойности на изчисления химеризъм са най-близки до очакваните – разлика от 0.1% (Н) и 0.3% (А). Тук вече всички локуси са засекли наличието на втора ДНК, като средните стойности за четирите групи са в границите 88.2% - 93.9% (табл. 14).

Таблица 12. Получени резултати при 0.5% второстепен компонент

99.5%								
	Площ (А)				***Височина (Н)***			
Локус/Група	*I*	*II*	*III*	*IV*	*I*	*II*	*III*	*IV*
D8S1179	99.2				99.0			
D21S11		99.3	98.9			99.3	98.8	
D7S820	100.0	99.5			100.0	99.5		
CSF1PO		100.0				100.0		
TH01				99.5				99.5
D13S317	98.4			99.0	99.4			99.0
D16S539	98.5		100.0		98.4		100.0	
D2S1338	98.2	100.0	98.8	100.0	98.3	100.0	98.8	100.0
D19S433	98.4				98.7			
D18S51	99.5	99.1			99.5	99.2		
D5S818			97.9				98.7	
FGA				97.1				97.1
% XM	*98.9*	*99.6*	*98.9*	*98.9*	*99.0*	*99.6*	*99.1*	*98.9*
SD	*0.6*	*0.4*	*0.7*	*1.1*	*0.6*	*0.4*	*0.5*	*1.1*
Recovery	100.6%	99.9%	100.6%	100.6%	100.5%	99.9%	100.4%	100.6%
Общо	% XM	**99.1**	**SD**	**0.8**	% XM	**99.2**	**SD**	**0.8**

Таблица 13. Получени резултати при 1.0% второстепен компонент

99.0%								
	Площ (А)				**Височина (Н)**			
Локус/Група	I	II	III	IV	I	II	III	IV
D8S1179	97.2				98.3			
D21S11		99.0	97.8			99.0	98.1	
D7S820	98.8	97.3			98.5	97.2		
CSF1PO		98.1				98.1		
TH01				98.5				98.6
D13S317	98.8			97.7	99.3			98.0
D16S539	98.3		100.0		98.4		100.0	
D2S1338	98.6	99.3	99.4	100.0	97.6	99.5	99.4	100.0
D19S433	98.3				98.7			
D18S51	99.3	100.0			98.7	100.0		
D5S818			99.1				99.5	
FGA				99.3				99.4
% XM	98.5	98.7	99.1	98.9	98.5	98.7	99.3	99.0
SD	0.6	0.9	0.8	0.9	0.5	1.0	0.7	0.8
Recovery	100.5%	100.3%	99.9%	100.1%	100.5%	100.3%	99.7%	100%
Общо	% XM	**98.7**	**SD**	**0.8**	% XM	**98.8**	**SD**	**0.8**

Таблица 14. Получени резултати при 10.0% второстепен компонент

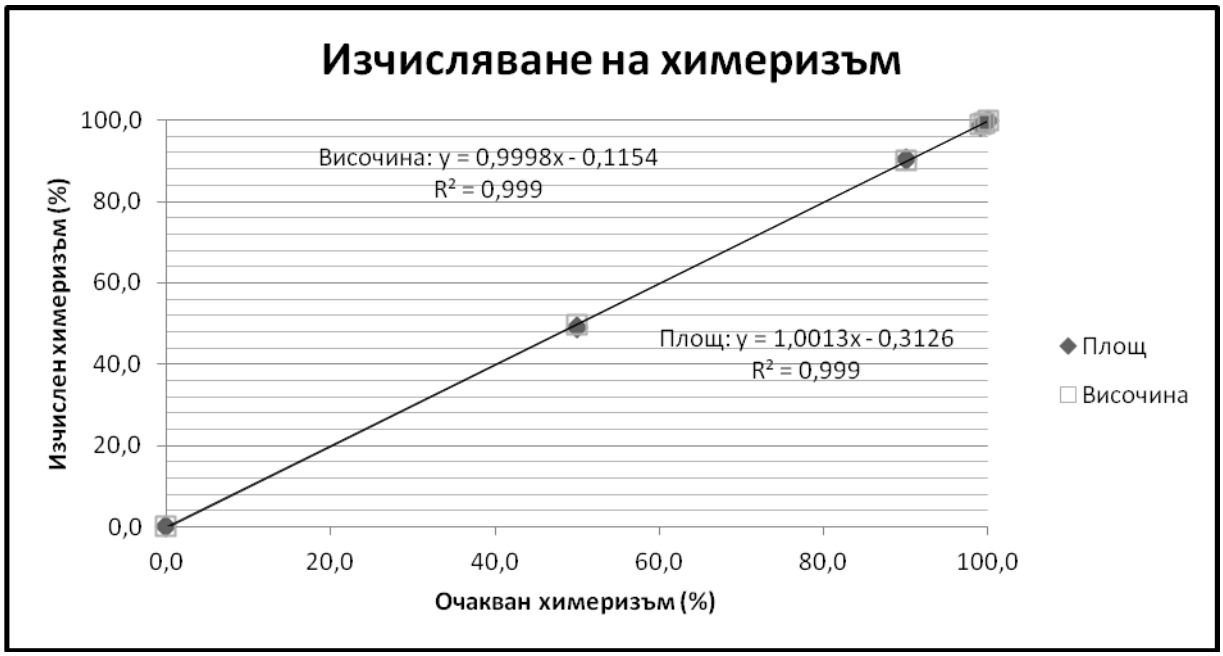
90.0%								
	Площ (A)				***Височина (H)***			
Локус/Група	*I*	*II*	*III*	*IV*	*I*	*II*	*III*	*IV*
D8S1179	89.1				89.5			
D21S11		94.9	91.9			94.7	92.3	
D7S820	91,8	90,9			92,3	90,9		
CSF1PO		95.5				95.1		
TH01				90.0				88.0
D13S317	92.8			90.3	92.0			89.7
D16S539	88.2		87.9		88.2		86.0	
D2S1338	89.0	98.9	90.3	87.5	89.1	99.1	90.0	89.7
D19S433	82.8				79.0			
D18S51	87.4	89.0			87.6	90.0		
D5S818			88.6				88.6	
FGA				90.0				91.2
% XM	*88.7*	*93.8*	*89.7*	*89.5*	*88.2*	*93.9*	*89.2*	*89.7*
SD	*3.0*	*3.5*	*1.6*	*1.1*	*4.1*	*3.3*	*2.3*	*1.2*
Recovery	101.5%	95.9%	100.3%	100.5%	102%	95.8%	100.9%	100.3%
Общо	% XM	**90.3**	**SD**	**3.4**	% XM	**90.1**	**SD**	**4.0**

Таблица 15. Получени резултати при равна смес на двата компонента

50.0%								
	Площ (A)				***Височина (H)***			
Локус/Група	*I*	*II*	*III*	*IV*	*I*	*II*	*III*	*IV*
D8S1179	49.4				51.4			
D21S11		45.5	49.6			47.6	50.7	
D7S820	47.6	39.9			46.3	41.0		
CSF1PO		39.2				41.7		
TH01				53.0				51.9
D13S317	51.7			51.1	50.9			51.8
D16S539	47.6		44.0		47.4		43.9	
D2S1338	53.7	51.5	47.2	48.5	54.7	52.7	47.6	48.6
D19S433	53.8				53,6			
D18S51	53,5	48.1			52.8	50.6		
D5S818			54.6				54.3	
FGA				50.9				52.3
% XM	*51.0*	*44.9*	*48.8*	*50.9*	*51.0*	*46.7*	*49.1*	*51.2*
SD	*2.6*	*4.7*	*3.9*	*1.6*	*2.9*	*4.7*	*3.9*	*1.5*
Recovery	98%	111.4%	102.5%	98.2%	98%	107.1%	101.8%	97.6%
Общо	% XM	**49.0**	**SD**	**4.3**	% XM	**49.6**	**SD**	**4.0**

Най-голяма е разликата в стандартното отклонение при равни количества на двата компонента – 4 (H) и 4.3 (A). Интервалът на процента химеризъм за локусите е от 39.2% до 54.7%, а за групите – от 44.9% до 51.2% (табл. 15).

Доказа се област на аналитична откриваемост 99.9%-100.6% при 0.5% добавен компонент, 99.7%-100.5% при 1% добавен компонент, 95.8%-102% при 10% добавен компонент и 97.6%-111.4% при 50% добавен компонент. В изкуствено създадения химеризъм наблюдаваният и очакваният процент показаха силна корелация (r=0.999; фиг. 18). Параметърът, който се използва при изчисленията – височина или площ на пиковете, също не показва съществена разлика (P=0.99).



Фигура 18. Корелация между изкуствено създаденият химеризъм и получените резултати, изчислени чрез височината и площта на пиковете.

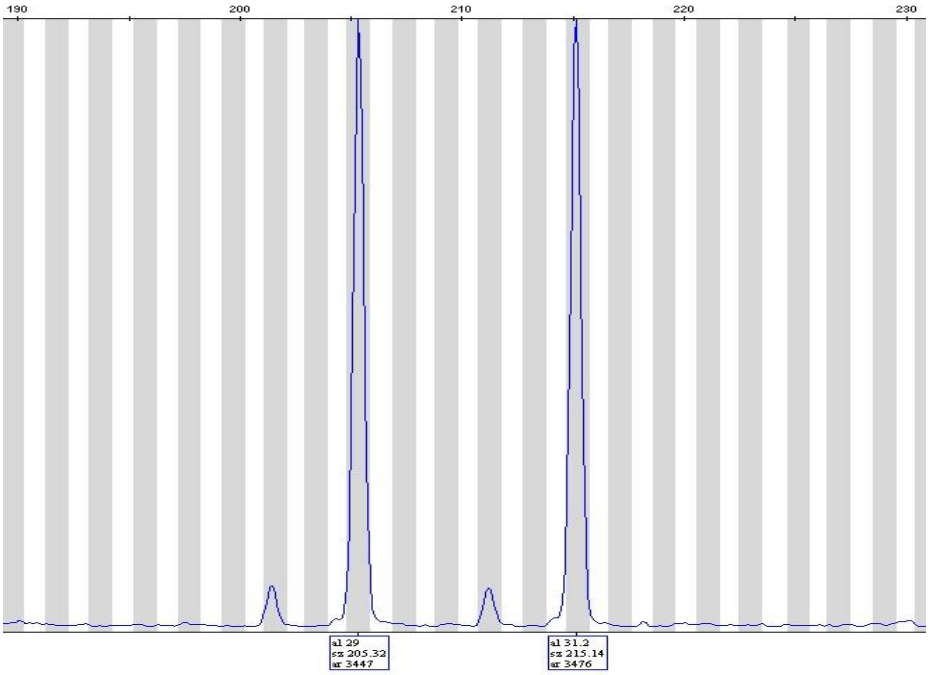
II.1.1.2. Възпроизводимост

Симулиран химеризъм

За оценка на възпроизводимостта на кита Identifiler използвахме модела „симулиран химеризъм", като изследвахме обратната количествена характеристика – невъзпроизводимост, по типа на day-to-day imprecision (невъзпроизводимост във време). Този подход се базира на анализа на STR профила на един здрав нехимерен индивид. Тъй като двата алела на даден хетерозиготен локус са представени в еднакво

количество в клетките, този модел може да се приеме за истински 50% химеризъм (фиг. 19). При симулирания химеризъм липсват артефактите, свързани с изкустеното приготвяне на еквивалентен процент смесена ДНК, като по този начин се изключват странични влияния и се оценява реалното представяне на платформата.

Подбрахме и анализирахме 24 здрави индивида, хетерозиготни по поне 6 локуса (n=215 локуса), като успяхме да обхванем всички 16 локуса, амплифицирани от Identifiler кита. Информативните локуси бяха подбрани така, че алелите да не си влияят един на друг чрез своите прищъпвания. Фрагментите с по-малка дължина бяха избрани за донорни, докато тези с по-голяма – за алели на реципиента.



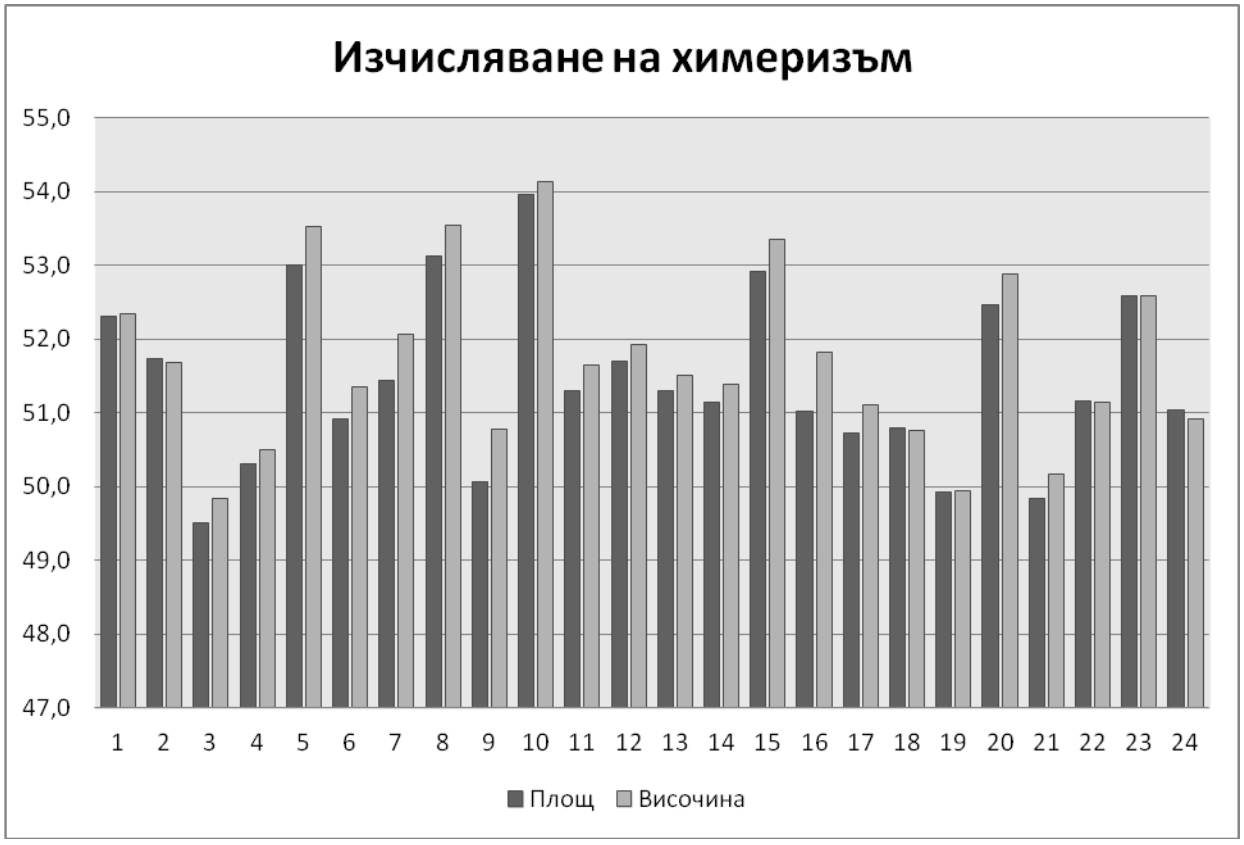
Фигура 19. Локус с 2 алела – на теория Д1 = Д2, r=1

Изработването на пробите на всички 24 индивида беше разделено във времето, за да се сведе до минимум влиянието на амплификационните и електрофоретичните фактори върху представянето на платформата (табл. 16).

Изчисляване на химеризъм

Химеризмът се изчислява като средна стойност на количеството ДНК от всички информативни за двойката донор-реципиент локуси. Могат да се използват, както височината, така и площта на пиковете. Изчислихме съотношението на компонентите, използвайки и двата параметъра, след което сравнихме получените резултати чрез Т-

критерий на Стюдънт. Както се и очакваше, базирайки се на данни в литературата, не се откри статистическа значимост (P=0.42). И двата подхода са подходящи, но все пак в по-нататъшните изчисления решихме да използваме площта на пиковете, тъй като нейната стойност е по-близка до теоретично вярната – 51.4±0.9% срещу 51.7±0.9% (фиг.20).



Фигура 20. Сравняване на двата метода за изчисляване на процента химеризъм

Представяне на кита в клинични проби

От анализираните 384 локуса бяха подбрани 215. Средно пациентите имаха по 9 информативни локуса, което позволи добра оценка на параметрите. За всеки пациент беше изчислен процентът химеризъм за отделните локуси, средният процент химеризъм, стандартното отклонение, коефициентът на вариация (CV) и локусната грешка (LE). Там, където се наложи, беше изчислена грешката на измерването (ME) и бяха направени необходимите корекции, съгласно алгоритъма за оценка на резултатите (фиг. 21). Най-ниският процент, който беше определен в локус, е 44.8, а най-високият – 59, което значително се различава от истинската стойност (табл. 16). Тази разлика от над 10% относителна грешка се компенсира от останалите локуси и наблюдавания

химеризъм в пациентите е 51.4±0.9%. Средната локусна грешка е 4.3% (1.9% - 6.7%), а средният коефициент на вариация – 5.6% (2.4% - 8.2%).

Представяне на отделните локуси

Резултатите бяха анализирани и от гледна точка на индивидуалното представяне на маркерите (табл. 16). Най-близки стойности показават локусите D21S11 (50.1%; n=14), D18S51 (50.5%; n=16) и D3S1358 (50.8%; n=18). Най-голяма разлика показват локусите D19S433 (52.8%; n=14), D7S820 (52.7%; n=14), D8S1179 (52.4%; n=11) и D5S818 (52.4%, n=10).

Разгледани по групи според флуорофора, с който са маркирани (табл. 5), резултатите отново са сравними. Най-близка до истинската стойност показаха маркерите, белязани с PET® (50.8±3.4%; n=30), следвани от VIC® (51.4±2.8%; n=77), NED™ (51.7±3.0%; n=57) и 6-FAM™ (51.8±3.1%; n=52). Въпреки че червеният флуорофор PET® показва най-малко отклонение от процента химеризъм, при него се наблюдава най-голяма разнородност (SD=3.4%). Обратно, зелената боя VIC® е с най-близки една до друга стойности – SD=2.8% (табл. 16).

Таблица 16. Невъзпроизводимост във времето (day-to-day precision) на кит Identifiler за фрагментен анализ.

Локус	**D8S1179**	**D21S11**	**D7S820**	**CSF1PO**	**D19S433**	**vWA**	**TPOX**	**D18S51**	**D3S1358**	**TH01**	**D13S317**	**D16S539**	**D2S1338**	**Amelogenin**	**D5S818**	**FGA**	**% XM**	**SD**
Пациент	*n=11*	*n=14*	*n=14*	*n=13*	*n=14*	*n=15*	*n=12*	*n=16*	*n=18*	*n=17*	*n=14*	*n=12*	*n=16*	*n=8*	*n=10*	*n=11*		
1	57.8	49.2			58.0	53.0				52.3	49.4	48.1	52.8			50.3	**52.3%**	**3.6**
2	58.6	46.5			54.3	51.2	51.3			48.8	52.8				50.3		**51.7%**	**3.7**
3				.	51.9	50.1	44.8	51.1	52.7	49.0	51.2		50.0	44.8			**49.5%**	**2.9**
4						52.9		45.0	48.3	52.7	49.4	52.3	45.1		56.8		**50.3%**	**4.1**
5		50.6	50.7	53.8	48.4	52.5		52.3	55.5	54.7	56.6	53.3	55.2	52.3			**53.0%**	**2.4**
6	46.0	48.4		56.6		50.7	57.0	47.9			53.3	50.8	49.4	49.2			**50.9%**	**3.6**
7	52.4	49.0			53.0			54.0	48.4	51.8							**51.4%**	**2.2**
8	54.8		52.8	50.7	56.6		56.7	51.5	52.6	50.2	53.3		53.6			51.5	**53.1%**	**2.2**
9			53.0	48.5	47.2	53.9	56.4	50.9	44.8	49.5		48.6	50.1		47.7		**50.1%**	**3.3**
10	46.3	54.7	59.0					53.7	55.8	49.5	57.2					55.6	**54.0%**	**4.2**
11	50.8				50.3	50.5	49.9			52.5		51.5	51.2			53.7	**51.3%**	**1.3**
12		49.5		50.0		52.4		53.0	50.9	52.8	51.5				53.5		**51.7%**	**1.5**
13	47.8	51.9		50.8	49.9	51.0		50.6	50.8	52.8	49.5	57.6					**51.3%**	**2.6**
14		46.8	52.1	51.1		49.9						48.4	57.0	49.6	54.2		**51.1%**	**3.3**
15	53.8	52.1	51.2	52.0	55.4	52.5	54.2	51.6	51.9		53.6		53.9		52.7		**52.9%**	**1.3**
16		50.3	47.0		54.6		52.0	54.2	54.9			49.9	51.1			45.1	**51.0%**	**3.4**
17			51.8	52.5	52.3			52.5	50.3	54.1	50.4		53.1	47.1	45.9	48.0	**50.7%**	**2.7**
18			552	51.9			53.0	44.8				51.8		48.1			**50.8%**	**3.7**
19		49.5				53.1		44.9	48.2		49.9	51.9	44.9		57.0		**49.9%**	**4.1**
20			48.1	54.8	53.9				51.5						55.9	50.5	**52.5%**	**2.9**
21			52.8			49.9	51.2		48.1	45.3			52.7	46.6		52.0	**49.8%**	**2.9**
22			54.3		53.6	48.1	46.2	50.5	49.8	53.7	52.2	50.1				53.1	**51.2%**	**2.7**
23	55.1	50.8	56.6	51.9			50.2		50.7	52.8			55.7	50.4		51.7	**52.6%**	**2.4**
24	52.8	51.9	52.8	51.1					49.6	50.3			47.2		50.1	53.5	**51.0%**	**2.0**
% XM	**52.4%**	**50.1%**	**52.7%**	**52.0%**	**52.8%**	**51.5%**	**51.9%**	**50.5%**	**50.8%**	**51.3%**	**52.2%**	**51.2%**	**51.5%**	**48.5%**	**52.4%**	**51.4%**		
SD	**4.3**	**2.2**	**3.1**	**2.1**	**3.1**	**1.6**	**3.9**	**3.2**	**2.8**	**2.4**	**2.5**	**2.6**	**3.5**	**2.4**	**3.8**	**2.9**		

II.1.2. Автоматизация на резултатите и поддържане на база данни

Създадохме, валидирахме и въведохме в рутинната работа Excel-базирано приложение, което да подпомогне анализа и интерпретацията на резултатите от PCR-STR метода, както и проследяването на статуса на пациентите.

II.1.2.1. Изчисляване на процента донорна химера

Приложението позволява полуавтоматично изчисляване на резултатите. Потребителят трябва ръчно да идентифицира информативните маркери, след което да копира стойностите на алелите от GeneMapper софтуера. Данните се обработват автоматично и се извежда табличен и графичен вид на резултата. Освен процента химеризъм, приложението изчислява и няколко статистически и количествени нестатистически параметри за оценка на представянето на платформата.

II.1.2.2. Подбор на информативни маркери

Информативни са тези маркери, при които алелите на донора и реципиента могат да се отграничат един от друг и не си влияят взаимно, чрез своите прищъпвания. Приемливите комбинации са показани в табл. 17.

Таблица 17. Алелни комбинации, които позволяват изчисляване на резултат

Случай	***Пик 1***	***Пик 2***	***Пик 3***	***Пик 4***	***Информативност***
1	*Д1*	*Д2*	*Р1*	*Р2*	*ДА*
2	*Д1*	*Р1*	*Д2 + Р2*	-	*ДА*
3	*Д1 + Д2*	*Р1*	*Р2*	-	*ДА*
4	*Д1*	*Р1 + Р2*	*Д2*	-	*ДА*
5	*Д1 + Д2*	*Р1 + Р2*		-	*ДА*
6	*Д1*	*Д2 + Р1 + Р2*	-	-	*НЕ*
7	*Д1 + Д1 + Р1*	*Р2*	-	-	*НЕ*

Прищъпванията представляват малки пикове на около 4bp от основния пик и съдържат до 10% от амплифицираната ДНК. В редки случаи, могат да се явят и след него. Значението им в клиничната практика е, че могат да повлияят резултата, ако алелите, с които съвпадат, се използват в изчисленията. Въпреки това, нашата практика показва, че при химеризъм над 40% те не оказват влияние и могат да се използват.

II.1.2.3. Математически параметри, използвани за оценка на представянето на платформата

1. Изчисленият процент химеризъм за всеки локус, както и средната стойност за пробата, се използват за определяне на стандартното отклонение (SD) и коефициента на вариация.

2. Грешка при измерването на ДНК (%ME) – това е нестатистически параметър, който дава оценка за всеки локус на относителното отклонение на измерената ДНК от оптималното. Приложението му се базира на отношението на алелите в химерен локус при оптимални условия, т.е. при идеални условия Д1=Д2 и Р1=Р2 (фиг. 19).

$$\%ME = \frac{A - Б}{B} \times 100,$$

където А = Р1+Д1, Б = Р2+Д2, а В е по-голямата стойност от А и Б. На В се присвоява по-голямата стойност, тъй като се приема, че в един хетерозиготен локус, алелът с по-голям пик представлява по-точното измерване. Колкото разликата между пиковете в дадена проба е по-голяма, толкова грешката в измерването ще бъде по-голяма.

3. Локусна грешка (%LE) – представлява разликата между изчисления процент химеризъм за даден локус (А) и средната стойност за пробата (Б):

$$\%\text{LE} = \frac{Б - A}{\text{Б}} \times 100$$

Локусната грешка, подобно на %ME и CV, е относителна стойност, която се променя в зависимост от нивото на химеризъм. Важно е да се отбележи, че %LE и %ME дават относителна оценка на цялостното представяне на платформата и комбинират влиянието на различни източници. Това означава, че локус със силно изразена асиметрия между пиковете, може да покаже приемливи стойности на двата параметъра при условие, че грешките са балансирани.

II.1.2.4. Алгоритъм за оценка на резултатите

Индивидуалните параметри за оценка на резултата се разглеждат в определен ред – CV, LE и ME (фиг. 21). Първоначално се преглежда CV, който отразява вариациите в пробата и насочва към нуждата от допълнителна оценка на пробата. Причината, поради която се дава приоритет на локусната грешка пред ME е, че LE отразява цялостното състояние на пробата, докато ME – само на отделните локуси. Критериите за приемане на резултата са показани в таблица 18. Когато коефициентът на вариация излезе извън установените граници, приложението автоматично генерира предупреждение, което насочва към необходимостта да се прегледат и допълнителните критерии за оценка. Допълнително предупреждение се извежда и за отделните локуси, които са извън заложените граници.

Таблица 18. Критерии за приемане на резултата от изследването

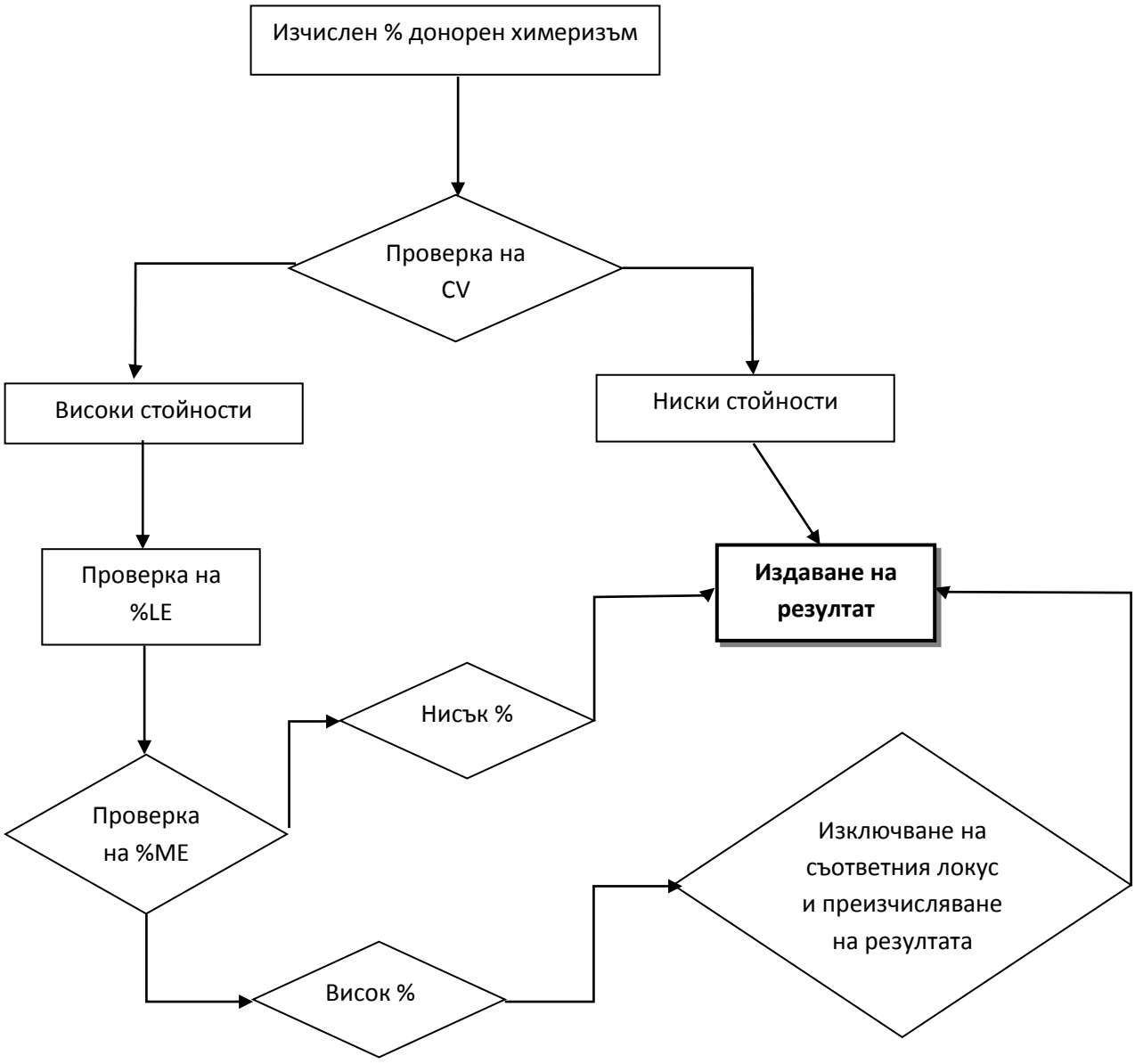
Химеризъм	*CV*	*%LE*	*%ME*
<70%	<10%	<10%	<15%
>70%	<5%	<5%	<10%

След приемането на изследването приложението генерира официален резултат за пациента, който се изпраща на клиницистите.

II.1.2.5. Проследяване статуса на пациентите и поддържане на база данни

Всички резултати на пациентите се съхраняват в индивидуални файлове, които осигуряват бърз и лесен достъп до досиетата им. В тях се съхранява цялата налична информация за следтрансплантационния статус на пациентите. Изследванията са

обобщени в табличен и графичен вид, така че да позволяват лесна оценка на движението на донорната химера (фиг. 22).



Фигура 21. Алгоритъм за оценка на резултатите от PCR-STR платформата

Фигура 22. Изглед от приложението за изчисляване на химеризъм

1

Алел / Локус	Д1	Д2	Р1	Р2	Информативен
D8S1179	1195	1195	822,5	822,5	Y
D21S11	544,5	544,5	367,5	367,5	Y
D7S820	547,5	547,5	446	446	Y
CSF1PO	504,5	504,5	465,5	465,5	Y
D3S1358	827,5	827,5	724,5	724,5	Y
TH01	0	0	0	0	N
D13S317	1310	1310	872,5	872,5	Y
D16S539	629	629	597,5	597,5	Y
D2S1338	0	0	0	0	N
D19S433	0	0	0	0	N
vWA	0	0	0	0	N
TPOX	537	537	479	479	Y
D18S51	492	492	599,5	599,5	Y
Amelogenin	0	0	0	0	N
D5S818	417	417	447	447	Y
FGA	0	0	0	0	N

	Химеризъм	%LE	%ME	
D8S1179	59,23	9,7	9,8	
D21S11	59,70	10,6	14,0	
D7S820	55,11	2,1	3,4	
CSF1PO	52,01	3,6	1,9	
D3S1358	53,32	1,2	1,0	
TH01				
D13S317	60,02	11,2	15,5	!!!
D16S539	51,28	5,0	2,8	
D2S1338				
D19S433				
vWA				
TPOX	52,85	2,1	4,1	
D18S51	45,08	16,5	18,9	!!!
Amelogenin				
D5S818	48,26	10,6	7,2	
FGA				

54,0	Донорна химера
5,0	s.d.
9,2	c.v.

Внимание! Прегледай %LE и %ME

2

УНИВЕРСИТЕТСКА МНОГОПРОФИЛНА БОЛНИЦА ЗА АКТИВНО ЛЕЧЕНИЕ "АЛЕКСАНДРОВСКА"
Клиника по клинична имунология
Национална референтна лаборатория по тъканно типизиране и имунологичен мониторинг
EFI Акредитирана от 1998г.
Началник: Проф. д-р Е. Наумова
София 1431, ул."Георги Софийски" № 1, тел/факс:9230 496; тел: 9230 690, 760, 450
e-mail: immun@alexandrovska-hospital.bg

3

Изследване на химеризъм след костно-мозъчна трансплантация

Реципиент: XXX XXX XXX **Диагноза:** ALL
Рег. № XX XXXX / XX.XX.XXXX **Изпращащо звено:**
ЕГН: XXXXXXXXXX **Лекар:**

Донор: XXX XXX XXX **Пол:** Мъж **Съвместимост:** 10/10

Трансплантация с ПКСК

Дата на трансплантация: XX.XX.XX

Материал: Периферна венозна кръв

Ден след КМТ:

STR локус	Профил	Донорна Химера
D8S1179	**13, 13**	**59,2%**
D21S11	**30, 30**	**59,7%**
D7S820	**8, 9**	**55,1%**
CSF1PO	**10, 10**	**52,0%**
D3S1358	**16, 17**	**53,3%**
TH01	7, 9	
D13S317	8, 10	
D16S539	**9, 12**	**51,3%**
D2S1338	18, 19	
D19S433	15, 16	
vWA	16, 19	
TPOX	**8, 10**	**52,9%**
D18S51	15, 17	
Amelogenin	X, X	
D5S818	**12, 12**	**48,3%**
FGA	21, 24	

Резултат: **54,0%** **Брой информативни локуси:** **8**

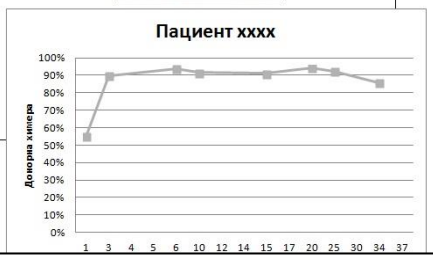
Заключение: Въз основа на установените **8** информативни локуса съдържащи алели специфични за реципиента, които не се намират при донора (посочени с удебелен шрифт) е определена 54,0% донорна химера в ДНК проба на реципиента (XX XXXX от XX.XX.XXXX), изолирана от периферна венозна кръв 41 дни след костно-мозъчна трансплантация.

Дата: Началник:
/проф. д-р Е. Наумова/

4

ИНФОРМАЦИЯ ЗА ПАЦИЕНТА

Име:	XXX XXX XXX	Донор:	XXX XXX XXX
ЕГН:	XXXXXXXXXX	ЕГН:	XXXXXXXXXX
Диагноза:	ALL	Роднинска връзка:	брат
Дата на трансплантация:	XX-XX-XXXX	Съвместимост:	10/10
Материал:	ПКСК		
Кондициониращ режим:	RIC		
Усложнения:			



1. Първата страница, където се въвеждат суровите данни от Gene Mapper софтуера и се определят информативните локуси;

2. На втората страница се извежда детайлна информация за %ХМ, представянето на отделните локуси и параметрите за качествен контрол;

3. Официалният резултат, който се генерира от приложението;

4. Секцията с информация за пациента.

II.1.3. Количествен real-time PCR метод за изследване на химеризъм

За оценка на метода бяха подбрани 10 пациента и техните донори с общо 14 проби от следтрансплантационния период, както и 3 двойки с 4 проби от схема на UK NEQUAS за външна оценка на качеството (ВОК). Скрининг плаки за установяване на информативни маркери бяха пуснати на 6 двойки (табл. 19). Две от тях вече бяхме изследвали през 2010г. в Laboratoire Universitaire d'Immunologie, Faculté de Médecine (Рен, Франция) съвместно с екипа, който разработи този метод. При останалите 7 тази стъпка беше прескочена, тъй като подбрахме полово несъвместими двойки с донор жена и реципиент мъж. При тази комбинация може да се използва директно маркер CA017, който се намира върху У-хромозомата.

Средният брой информативни SNP при реципиентите е 6, а при донорите – 4. Резултатите от скрининга на двете двойки QC 1 и QC 2 показаха пълно съвпадение с тези, получени при изработването им в Laboratoire Universitaire d'Immunologie. Отново като информативни бяха определени маркери CA008, CA011, CA012, CA017, CA022, CA030 (за QC 1) и CA002, CA003, CA007, CA011-014, CA017, CA019, CA024, CA026-028, CA030-032 (за QC 2).

Таблица. 19. Резултати от скрининг теста

	Двойка Р-Д														
Маркер	QC 1R	QC 1D	QC 2R	QC 2D	P 1R	P 1D	P 2R	P 2D	P 3R	P 3D	P 4R	P 4D	Инф. за Р	Инф. за Д	Невалиден
CA 001					nv	nv					nv	nv	0	0	4
CA 002				+			nv	nv					0	1	2
CA 003			+				nv	nv					1	0	2
CA 004									nv	nv			0	0	2
CA 005	nv	nv	nv	nv							+		1	0	4
CA 006						+	+			+		+	1	3	0
CA 007				+					nv	nv	nv	nv	0	1	4
CA 008		+					nv	nv			nv	nv	0	1	4
CA 009					nv	nv	+				nv	nv	1	0	4

CA 010	nv	nv	nv	nv					+			+	1	1	4
CA 011		+	+				nv	nv	nv	nv	+		2	1	4
CA 012	+		+									+	2	1	0
CA 013			+						nv	nv		+	1	1	2
CA 014	+			+	nv	nv		+					1	2	2
CA 015	nv	nv	nv	nv			nv	nv		+			0	1	6
CA 016					nv	nv	+				nv	nv	1	0	4
CA 017		+	+		nv	nv					nv	nv	1	1	4
CA 018					nv	nv	nv	nv	nv	nv			0	0	6
CA 019			+		nv	nv		+			+		2	1	2
CA 020							+				+		2	0	0
CA 021					+				nv	nv	nv	nv	1	0	4
CA 022		+			+					+		+	1	3	0
CA 023	nv	nv	nv	nv		+	+		nv	nv	+		2	1	6
CA 024			+		nv	nv	+		nv	nv	nv	nv	2	0	6
CA 025					nv	nv	nv	nv	nv	nv	+		1	0	6
CA 026				+		+	+		nv	nv	nv	nv	1	2	4
CA 027				+		+	nv	nv		+			0	3	2
CA 028			+				nv	nv					1	0	2
CA 029	nv	nv	nv	nv	nv	nv	+		nv	nv			1	0	8
CA 030	+		+			+	nv	nv	nv	nv	nv	nv	2	1	6
CA 031				+	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	0	1	8
CA 032			+		nv	nv	nv	nv	+		nv	nv	2	0	6
CA 033	nv	nv	nv	nv			nv	nv	nv	nv	nv	nv	0	0	10
CA 034					nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	0	0	8

Заб: "+" – положителен резултат; nv – невалиден поради наличие в Д и Р.

Ефективност на амплификацията

За изчисляване на ефикасността на PCR реакцията беше използвана следната формула:

$$E = \left(10^{\left(\frac{-1}{\text{наклон на стандартната крива}}\right)} - 1\right) \times 100$$

Методът показа много висока ефективност – 98% средна стойност, с много малко стандартно отклонение (SD = 0.4) и нисък коефициент на вариация (CV = 1.2%).

Резултатите и от двата метода влизат в определените граници (табл. 20). За проба QC 1 фрагментният анализ и TaqMan методът дават резултат 90.4%, който е с 1.6% над определената средна стойност. При QC 2 RQ-PCR дава с 0.3% по-малко от средната стойност, докато PCR-STR – 2% над нея. Обратното се получи при QC 3 – съответно 5.7% под определения процент и 0.2% над него.

Таблица 20. Сравняване на резултатите от двата метода с консенсусните резултати от BOK схемата.

Проба	PCR-STR	RQ-PCR	BOK	
	% ХМ			Граница
QC 1	90.40%	90.40%	88.8%	84.5% - 93.1%*
QC 2	96.50%	94.20%	94.5%	90.7% - 97.9%*
QC 3	87%	81.10%	86.80%	93% - 81.1%**
QC 4	32.70%	31.30%	34%	42.9% - 30.2%**

** ±2 SD*
*** 2,5^{mu} - 97,5^{mu} персентил*

Количественият RQ-PCR метод откри наличие на ДНК на реципиента във всички проби, които са дали резултат на фрагментния анализ 100% донорна химера. Най-високата достигната чувствителност от RQ-PCR е 0.03%. Фрагментният анализ показа чувствителност от 0.2% в пробата на 120 ден на пациент Р 6. Интересно е, че чрез другия метод – RQ-PCR, в същата проба е определена 99.12% донорна химера (табл. 21).

Получените резултати от двата метода показват силна корелация (r=0,992). Разликите между отделните проби са в границата 0.03%-9.2%. Най-голяма е разликата при пациентите с по-ниска донорна химера – 2.3% - 9.2%, сравнена с 0.03% - 1.6% при групата с химеризъм близък до 100%. Резултатите от сравняването на двата теста са подобни на тези, които получихме при изследването на 12 проби в Laboratoire Universitaire d'Immunologie – силна корелация (r=0.995), малка разлика при висок процент химеризъм и висока - при нисък. Използвахме две проби – P2 и P10, с ниско качество на екстрахираната ДНК и концентрация <10ng/µl, за да направим по-детайлна оценка на RQ-PCR метода. При P10 успяхме да изчислим процента донорна химера, въпреки че ефикасността на PCR реакцията беше под средната, докато за P2 TaqMan технологията не успя да даде резултат.

Таблица 21. Сравняване на процента донорна химера получен чрез PCR-STR и RQ-PCR.

Пациент	Ден след ТХСК	PCR-STR*	RQ-PCR	Разлика	Пациент	Ден след ТХСК	PCR-STR*	RQ-PCR	Разлика
P 1	16	100%	99.80%	0.20%	**P 4**	31	100%	99.70%	0.30%
	91	55.30%	59.50%	-4.20%	**P 5**	33	99.60%	98%	1.60%
	108	2.60%	3.70%	-1.10%		139	100%	99.97%	0.03%
	127	28%	21.30%	6.70%	**P 6**	30	96.90%	97.10%	-0.20%
	145	18.30%	11.50%	6.80%		120	99.80%	99.12%	0.68%
P 2	348	91.80%	93.60%	-1.80%	**P 7**	78	100%	99.55%	0.45%
	393	100%	99.80%	0.20%		79	100%	99.74%	0.26%
	400**	81.10%	x	x		158	100%	99.91%	0.09%
	431	59.20%	50%	9.20%	**P 8**	44	99.20%	99.33%	-0.13%
P 3	39	66.30%	71%	-4.70%	**P 9**	44	100%	99.96%	0.04%
	70	81.80%	84.90%	-3.10%	**P 10**	32**	99%	99.49%	-0.49%
	126	90.00%	92.30%	-2.30%		62	99.50%	99.33%	0.17%

** Средният брой информативни локуси е 6.*

***Проба с лошо качество и много ниска концентрация (<10ng/µl).*

II.1.4. Обсъждане

Алогенната трансплантация на хематопоетични стволови клетки създава динамична химера, чието проследяване се е превърнало във важен компонент на следтрансплантационния мониторинг на пациентите [207, 208]. С разширяването на

обхвата на заболяванията, които могат да се лекуват чрез ТХСК, както и въвеждането на нови по-щадящи протоколи за кондициониране, се увеличава и броя на пациентите, които могат да се подложат на лечение. Това налага по-точно проследяване на процеса на заселване на присадката и съответно повишава изискванията към използваните методи за изследване на химеризъм. Качествената оценка на химеризма дава индикация за наличие или отсъствие на донорни клетки в дадена проба. Количественото изследване позволява оценка на стойността на химеризма в пациента, базирайки се на съотношението на клетките на реципиента и донора в кръвта на пациента. И докато въпросът за значението на абсолютната стойност все още е дискусионен, относителните промени в кинетиката на заселването са сигурен предвестник за приемането или отхвърлянето на присадката [209-211]. Различните количествени и полу-количествени методи за оценка на химеризма имат своите силни и слаби страни, поради което е важно да се знае до каква степен наблюдаваните промени се дължат на вариации, присъщи на използваната платформа.

Използването на единични STR локуси може да доведе до значително отклоняване от истинския процент химеризъм, докато използването на мултиплексен PCR позволява независимото изчисляване на резултата, въз основа на информацията от няколко локуса. Това предоставя по-точна средна стойност и позволява оценка на статистическата вариабилност и достоверност на резултата. Въпреки че STR платформата е приета в световен мащаб за златен стандарт в изследването на химеризъм, тя има своите недостатъци в количествената оценка на химеризма. Количеството на ДНК се детектира индиректно, чрез измерване на флуоресценцията по време на електрофорезата. Нивата на емисия на отделните бои не са стандартизирани и различните флуорофори варират в тяхната способност да излъчват светлина. Освен това, платформата няма вътрешна калибрация [212, 213]. Като резултат ДНК измерванията за същата абсолютна стойност не се оценяват еднакво между отделните измервания. Дори отделните алели на един генотип не се оценяват еднакво, въпреки че на теория трябва да са представени в равно съотношение. В тези случаи измереното количество ДНК ще варира и ще доведе до грешка в изчисляването на процента химеризъм. Именно тези ограничения на платформата я правят полу-количествена и с по-ниска информативност като абсолютна стойност, от количествените методи като RQ-PCR. Други ограничения идват от неадекватна PCR амплификация, поради ниски нива на продукта, което води до ниски нива на

флуоресценция. Такива грешки могат да се получат случайно поради характеристиките на индивидуалните маркери.

Ето защо ние си поставихме за цел да оценим надежността и чувствителността на данните с оглед правилната интерпретация на резултатите от изследването. Това наложи включването в рутинната работа на няколко статистически и количествени нестатистически параметъра за качествен контрол на представянето на пробата и валидността на резултатите – стандартно отклонение, коефициент на вариация, локусна грешка и грешка на измерването [214-216]. Изчисляването им е заложено в Excel-базираното приложение, което разработихме в Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки. То позволява полуавтоматичен анализ на резултатите и поддържане на база данни с информация за следтрансплантационния мониторинг на пациентите. Въвеждането на информацията става ръчно, чрез копиране на суровите данни от Gene Mapper софтуера и определяне на информативните локуси. Приложението автоматично изчислява различните параметри, прави качествен контрол по заложени критерии на получените стойности и генерира официален резултат. Друга функция на програмата е поддържане на база данни, където се съхранява цялата налична информация за предходни изследвания на пациента. Стойностите са представени в графичен и табличен вид, което позволява бърза оценка на движението на химеризма в следтрансплантационния период.

Като следваща стъпка разработихме платформа за оценка на точността и възпроизводимостта, с която се определя съотношението между клетките на донора и реципиента - едни от най-важните параметри на методите за следтрансплантационен мониторинг на химеризъм [216, 217]. Точността на кита Identifiler оценихме като изкуствено смесихме ДНК проби в различни процентни съотношения. Получените резултати ни позволиха да дефинираме системната грешка на PCR-STR метода (кит Identifiler) в различните процентни съотношения на отделните генетични профили. В смесите с нисък процент на втория генотип – 0.5% и 1%, някои от локусите не го засякоха и показаха наличие само на основния профил. Въпреки това, средният резултат за всяка група е в много близки до очакваните граници. Максималното отклонение от процента донорна химера е 0.6%, което дава 0.6% изчислена грешка на метода при ниските нива. С повишаването на втория компонент се увеличават и вариациите между отделните

измервания, като при сместа от 10% максимално наблюдаваната разлика е 3.9%, което дава 4.3% изчислена грешка. Най-големи са вариациите при равни смеси, където максимално наблюдаваната разлика е 5.1%, което означава, че изчислената грешката на метода е над 10%. Все пак трябва да се вземе под внимание и влиянието на различните артефакти, свързани с приготвянето на смесите, което до известна степен ще намали изчислената грешка на метода. Влиянието на тези фактори може частично да се оцени, чрез сравняването със симулирания химеризъм. Това е теоритичен модел и при него се оценява само представянето на платформата [215]. Най-голямата наблюдавана относителна грешка, свързана с единична стойност на локус, е 18%, но тя се компенсира от останалите локуси в пробата и най-голямата относителна грешка за пациент е 8%. Наблюдаваната разлика между 50% очакван и 50% симулиран химеризъм се дължи основно на приготвянето на смесите. С увеличаване на процентното съотношение на единия компонент, грешката намалява, като на долната граница на детекция на STR метода тя е само 0.6% изчислена. Това означава, че обхватът на относителната грешка на метода е в границите 0.25% - 8%. Резултати между отделните модели при PCR-STR метода, не показаха значима разлика помежду си (P=0.84). Китът за фрагментен анализ Identifiler показа и много добра възпроизводимост, като при оценените 215 локуса, разпределени в 24 пациента, стойността на изчисления химеризъм е 51.4±0.9%.

Сравнителният анализ между PCR-STR и RQ-PCR показва, че PCR-STR методът дава по-големи вариации между отделните изчисления, но се държи по-стабилно при проби с по-висок процент на втория генетичен профил. Количественият real-time PCR е по-чувствителен и прецизен от фрагментния анализ, подходящата валидация на STR метода значително повишава неговата точност и прецизност. Разгледани отделно, различните локуси показват значителни вариации, което може да доведе до сериозно отклонение от истинския химеризъм, ако броят на включените в изчислението информативни локуси е много малък. И докато значението на точното определяне при високо съотношение на генетичните компоненти, е с малка клинична стойност, то при нисък процент неправилно оцененият химеризъм може да доведе до грешна преценка на клиничното състояние на пациента. И двата метода - STR и RQ-PCR, показват висок процент грешка при определянето на химеризма в средните стойности, но са много прецизни при ниските,

съответно - високите стойности. Именно тази прецизност прави двата метода изключително подходящи за мониторирането на функционирането на присадката.

В резултат на нашите проучвания можем да обобщим практичността на двата метода:

PCR-STR

- (+) нисък процент на относителната грешка – 0.25% - 8%;
- (+) постигната чувствителност в нефракционирана периферна кръв от 0.5%;
- (+) теоретично има по-голяма вероятност да се открие информативен маркер за дадена двойка – в изследваната група от 90 трансплантирани пациента броят информативни маркери е 5±1.96 при родствените ало-СКТ и 7±1.72 при неродствените;
- (+) евтино изследване;
- (-) по-голяма вариабилност между отделните изследвания;
- (-) при малък брой на информативните локуси може да се получи голямо разминаване с реалната стойност;
- по-бавно изследване - над 8 часа.

RQ-PCR

- (+) Постигната чувствителност в нефракционирана периферна кръв – 0.03%;
- (+) много висока повтаряемост между отделните проби, което позволява точно проследяване на кинетиката на химеризма;
- бърз метод – в рамките на 3 часа;
- (-) много по-голяма относителна грешка при голямо съотношение между различните генотипи;
- (-) по-скъп метод.

Въз основа на получените разултати и направените изводи, препоръчваме изследването на химеризъм да се извършва чрез комбиниране на двата метода – PCR-STR и RQ-PCR. Предлагаме при наличие на повече от 3 информативни STR локуса, фрагментният анализ да се използва като основен метод за изследване. След достигане на донорна химера над 98% мониторирането да се извършва чрез RQ-PCR, тъй като поради по-високата си чувствителност и по-доброто определяне на кинетиката TaqMan технологията ще позволи по-навременно и по-прецизно диагностициране на евентуално клинично усложнение. При наличие на по-малко от 3 информативни локуса, проследяването на химеризма да се извършва изцяло чрез RQ-PCR.

Нашите проучвания показват, че при анализа на химеризма трябва да се вземат под внимание различни фактори, свързани с методите, използвани за неговата оценка, които оказват значително влияние върху крайния резултат, а оттам и върху състоянието на пациентите. Особен принос за правилната интерпретация на цифровото изражение на процента химеризъм има оценената от нас надежност и чувствителност на методите за мониторинг на химеризма. Подходящо валидираната информация е приложима за планиране на следтрансплантационната терапия и подпомага навременната реакция при възникване на живото-застрашаващи събития.

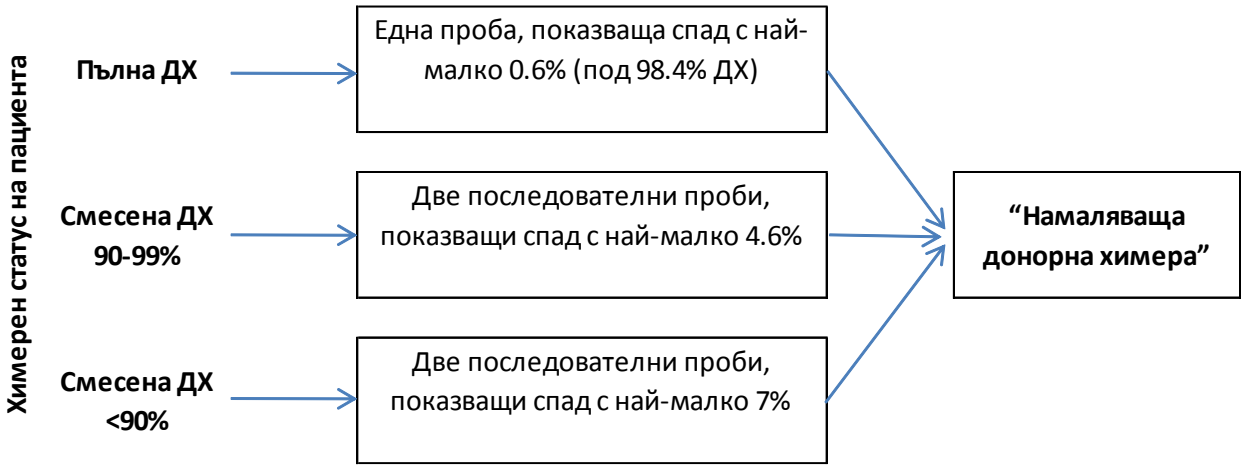
II.2. Химеризъм

С разработването на протоколи за подготовка за трансплантация, които използват по-нисък интензитет на аблация, границите на трансплантацията на хематопоетични стволови клетки се разшириха още повече, обхващайки по-голям брой болести и позволявайки на повече хора да понесат това тежко лечение. Миелоаблативните лекарства са създадени така, че да могат напълно да унищожат имунната система на гостоприемника и по този начин да улеснят заселването на клетките на донора. Обратно, немиелоаблативното кондициониране и това с намален интензитет целят по-скоро имуносупресия, отколкото аблация. Поради тази причина, при тези пациенти е по-вероятно наличието на първоначален смесен химеризъм, което налага и по-честото му проследяване, за да може да се контролират последващи усложнения като релапс или GvHD, както и по-точното преценяване на необходимостта от DLI. Много проучвания засягат значението на проследяването на химеризма след алогенна ТХСК, но резултатите са противоречиви.Изследването му при пациенти с МА кондициониране се смята за ниско информативно и ненужно, тъй като се разчита, че агресивната предтрансплантационна подготовка на пациетните води до стабилен пълен донорен химеризъм. Все повече нови изследвания показват, че границата между различните кондициониращи режими е силно размита и това допълнително усложнява интерпретацията на следтрансплантационния химерен статус.

Оценката на кондициониращия режим е направена върху 78 пациента, разделени в 3 групи – МА (n=48), RIC (n=18) и НМА (n=12). Допълнително МА групата беше разгледана и по отношение на основния препарат, използван за миелоаблация – BU (n=19) и TBI (n=29). Медианата на периода за проследяване е 13.9 месеца (0.6 – 112.6) за МА, 19.3 месеца (2.1 – 93.4) за RIC и 19 (1.2 – 78.8) за НМА.

Трима пациента, починали преди да бъдат изпратени за анализ, са изключени от оценката на ролята на мониторинга на химеризма. Други пациенти с липсващи данни за кондициониращия режим (n=18), релапс (n=11), остра или хронична GvHD (n=11 и n=11, съответно), също бяха изключени от съответните анализи. По време на следтрансплантационния период 6 пациента са получили втора ало-СКТ от същия донор, поради неуспешно заселване на присадката, нейното нефункциониране или релапс.Поради

по-големият обем на данни за нивата на химеризъм от PCR-STR платформата (дисертационният труд има частично ретроспективен характер), а и с оглед да се направи по-пецизна и коректна оценка на ролята на мониторирането на химеризъм, в настоящата глава сме използвали данни за химерния статус на пациентите само от фрагментния анализ. В раздел II.1 показахме валидиране на 0.5% чувствителност на STR платформата с кит Identifiler, но поради по-добро сравнение с изследвания на други авторски колективи, оценката на мониторинга на химеризма е направена с ниво на чувствителност от 1%. Пълна донорна химера е приета при ниво на химеризма ≥99%. Пациентите с пълна донорна химера от самото начало на проследяването са класифицирани в група „ПДХ от самото начало" (n=43); тези, които първоначално имат смесен химеризъм и впоследствие на даден етап от следтрансплантационния период успяват да достигнат ПДХ (най-малко 2 последователни проби с ниво на ДХ ≥99%), са класифицирани в група „От смесена към ПДХ" (n=26); пациентите, които имат смесен ДХ през целия период на проследяване, са калсифицирани като „Стабилен смесен химеризъм" (n=14). Пациентите, които имат само една проба за изследване, са изключени от анализа (n=4), освен ако тази проба не е показала ≥99% ДХ (n=6). Допълнително разделихме групата „От смесена към ПДХ" на две подгрупи в зависимост от времето, необходимо да се достигне ПДХ. За целта използвахме медианата на времето за достигане на ПДХ - 68 дни. Създадохме и трета класификация на пациентите, която се базира на динамиката на химеризма и взима под внимание единичните промени в химерния статус (фиг. 23). Ако при пациент с ПДХ е установена дори една проба със спад в ДХ ≥0.6% (до 98.4%), той попада в групата с „Намаляваща ДХ". Ако пациент има ДХ ≥90%<99% или <90%, необходими са две последователни проби, показващи спад по-голям съответно от 4.6% и 7%, за да попадне в групата с намаляваща ДХ. Третата калсификация се базира на валидирането в раздел II.1 на STR метода и има за цел по-добро отдиференциране на флуктуациите, дължащи се на представянето на платформата от реалните хематологични промени.

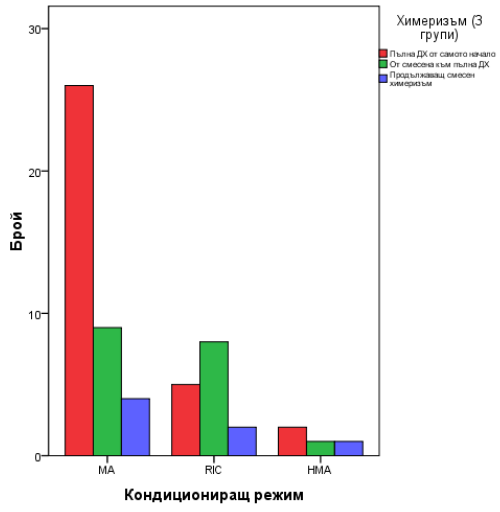


Фигура 23. Критерии за класификация на пациентите спрямо динамиката в химерния им профил.

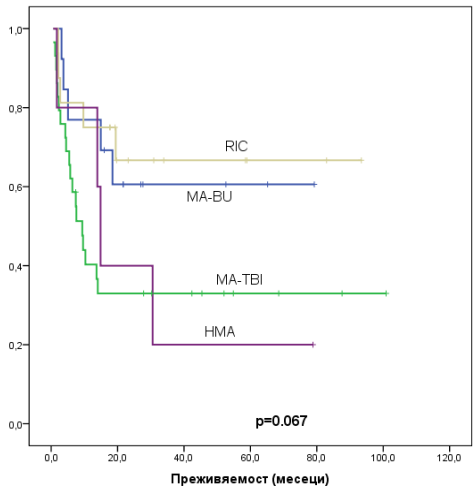
II.2.1. Роля на кондициониращия режим

Поради силно сигнификантната роля на типа първично заболяване – малигнено или немалигнено, извършихме анализите, засягащи значението на вида кондициониращ режим в групата на пациентите, диагностицирани със злокачествено заболяване (n=77).

Фигура 24. Наблюдаван химеризъм според използвания протокол за кондициониране



Фигура 25. Роля на кондициониращия режим върху преживяемостта



В групата на МА само 10.3% не са успели да достигнат пълен донорен химеризъм, сравнено с 13.3% от пациентите с RIC и 25% от тези с НМА (фиг. 24). Като цяло трите кондициониращи режима показват малко различия помежду си, относно следтрансплантационния профил на химеризма – по-голям процент от пациентите с МА са показали пълна донорна химера от самото начало на мониторинга, докато в групата на RIC преобладават тези с първоначален смесен ДХ, които впоследствие конвертират до пълен. Наблюдаваните разлики не са сигнификантни (P=0.116). Интересно е, че всички спадове в донорната химера, които са били достатъчни за класифицирането им като „Намаляваща ДХ" (виж раздел II.2.2) са наблюдявани само в групите на МА и RIC, но не и в тази на НМА (P=0.063). Интересен резултат се получи и когато разгледахме влиянието на вида миелоаблация – базирана на busulfan, или на TBI. Оказа се, че пациентите на които е даван BU в последствие много по-бързо са успели да постигнат ПДХ (42.5±25.4 дена; обхват 21 – 79 дена) в сравнение с тези, чиято аблация се дължи на използването на TBI (126±85.6 дена; обхват 47 - 270; P=0.032).

Изследвахме влиянието на предтрансплантационната подготовка на пациентите върху тяхната преживяемост, като резултатите показаха различие между отделните протоколи (P=0.067; фиг. 25). За да специфицираме разликите между отделните групи извършихме pairwise comparison анализ. Резултатите показаха по-съществена разлика в преживяемостта между MA-TBI и MA-BU групите (P=0.076) и MA-TBI и RIC (P=0.030). В първите 12 месеца след трансплантацията най-висока е преживяемостта в групата на НМА – 80%, сравнено със 77% при MA-BU, 75% при RIC и 40% при MA-TBU. След края на втората година процентите са съответно 40%, 59%, 67% и 33%. Средната преживяемост при пациентите с НМА преди да настъпи терминалното събитие е 15.26±11.83 месеца (1.7 – 30.6), при MA-BU е 9.06±7.12 (3.1 – 18.5), при RIC е 7.22±7.54 (2.1 – 19.4), а при MA-TBI – 5.81±4.13 месеца (0.6 – 14). Ниската преживяемост при пациентите, кондиционирани с TBI, е оценена от Cox регресионния анализ с HR=2.96 (95% CI = 1.01 – 7.96), спрямо RIC (P=0.032) и HR=2.41 (95% CI = 0.24 – 2.82), спрямо MA-BU (P=0.081). За да обясним различната преживяемост оценихме влиянието и на допълнителни фактори. Данните вече бяха показали, че е малко вероятно времето за реконституция на имунната система да има отношение (фиг. 24), затова се насочихме към други следтрансплантационни усложнения – релапс и реакция на присадката срещу гостоприемника.

Случаите на релапс и хронична GvHD показаха изключително ниска разнородност между групите (P=0.835 и P=0.602, съответно), за разлика от развитието на остра GvHD. Анализът показа силно сигнификантни резултати (F=6.54, P=0.003), което наложи да използваме post hoc тест (Bonferroni), за да специфицираме разликите. Интересен резултат се получи в групата на НМА – въпреки че пациентите в тази група са с най-добра преживяемост в първите месеци след трансплантацията, те са и с най-тежко протичаща остра GvHD – едно от най-сериозните живото-застрашаващи събития в този период. И четиримата пациенти развиват aGVHD – един втора степен на реакция (той е с първоначален смесен химеризъм и последваща конверсия към ПДХ), а другите трима – трета (двама са с ПДХ, а третия - със стабилен смесен химеризъм). За сравнение пациентите с RIC или МА са засегнати в много по-слаба степен от aGVHD (P=0.002 и P=0.009, съответно). В групата на МА 46.3% от пациентите развиват aGVHD (1 – степен I; 12 – степен II; 1 – степен III; 5 – степен IV), докато пациентите с RIC са най-пощадени – 33% (1 – степен I; 4 – степен II).

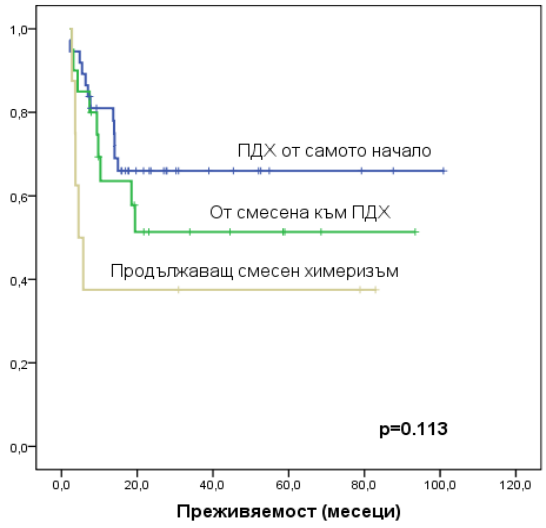
II.2.2. Роля на проследяването на нивата на химеризма

Вида заболяване – малигнено или немалигнено, показва много различен профил по отношение на наблюдавания химеризъм (P<0.000) и последващите анализи, отнасящи се до значението на мониторинга на ДХ са извършени в групата на пациентите, диагностицирани със злокачествено заболяване (n=78). Влиянието на нивата на химеризъм върху преживяемостта е оценено и в групата на HLA 10/10 съвместимите трансплантации, поради огромното влияние на HLA системата. Това наложи да променим групите за конверсия от смесен химеризъм на ПДХ от 68 дни на 79, тъй като се промени медианата на времето за достигането ѝ.

II.2.2.1. Предтрансплантационни фактори, влияещи върху химеризма

Разгледахме пациентите според вида заболяване – ОЛЛ, ОМЛ или друго малигнено, за да оценим тяхната хетерогенност относно химеризма. Такава не се наблюдава, като първоначалния профил на донорната химера – „Пълна донорна химера от началото", „От смесена към пълна ДХ" и „Стабилен смесен химеризъм", беше равномерно разпределен между групите (P=0.391). Допълнително разгледахме и други предтрансплантациони фактори, които биха могли да окажат влияние върху химерния профил – вида донор (P=0.211), половата съвместимост (P=0.610), вида полова съвместимост (P=0.108), източника на стволови клетки (P=0.072), съвместимостта по HLA-A,-B,-C,-DRB1,-DQB1 локусите (P=0.663), както и съвместимостта по HLA-DPB1 локуса (P=0.359). Интересни резултати се получиха при източника на стволови клетки и HLA-DPB1 съвместимостта при отделянето на четвъртата група с намаляваща ДХ. При трима (60%) от пациентите, трансплантирани със стволови клетки от костен мозък, е наблюдаван спад на ДХ (впоследствие са диагностицирани с релапс), а при останалите двама (40%) – продължаващ смесен химеризъм. Тези резултати рязко контрастираха с периферната кръв като източник на $CD34^+$ клетки (P=0.003). Спад в ДХ е наблюдаван при 10 (27%) пациента, трансплантирани от съвместим по HLA-DPB1 локуса донор, при 4 (36.4%) от тези с 1 несъвместимост и при нито един от тези с напълно несъвместим HLA-DPB1 локус (F=6.32; P=0.003). Липсата на съвместимост по този локус изглежда благоприятства по-бързото достигане на ПДХ, тъй като 10 от тези пациенти (83.3%)

Фигура 26. Прогностична роля на статичните профили на химеризма спрямо преживяемостта.



Kaplan-Meier survival анализа показва слаби различия в преживяемостта между отделните групи. Пациентите с продължаващ смесен химеризъм са най-застрашени, като оценената им средна продължителност на живот е 33.6 месеца. За сравнение групата с ПДХ е с 69.6 месеца, а тази с конверсията – 52.8 месеца.

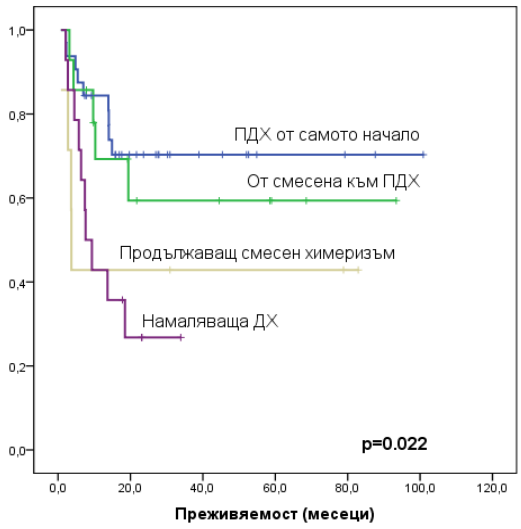
имат ПДХ от самото начало на проследяването, а останалите двама (16.7%) конвертират до ден 39. Профилът на химеризма в тази група рязко се различава, спрямо пациентите с напълно съвместим по DPB1 локуса донор (P=0.015) и тези с 1 несъвместимост (P=0.004).

II.2.2.2. Връзка на химеризма със следтрансплантационни събития

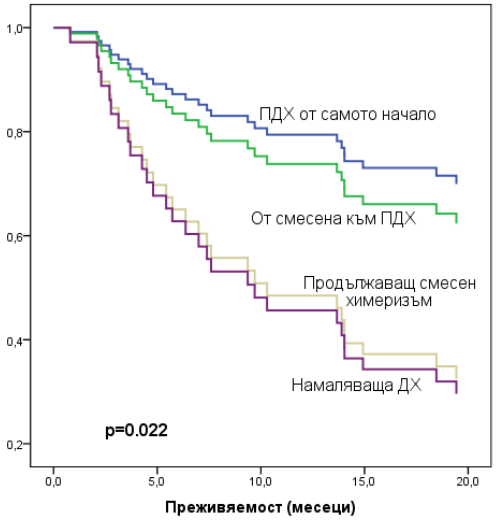
Използването на статичен профил на химеризма не показва сигнификантна връзка със следтрансплантационни събития като релапс (P=0.364), остра или хронична GvHD (P=0.706 и P=0.276, съответно), преживяемост (P=0.113; фиг. 26). Обратно, динамичният химерен профил се оказа силно предиктивен по отношение на смъртност и релапс на болестта.

Когато отчетохме ролята на единичните спадове в донорния химеризъм на пациентите се оказа, че пациентите от отделните групи са със силно различаваща се преживяемост (P=0.022). Медианата на установен спад в химеризма е 96 дни (14 – 660), като само 11.1% са в първите 30 дни, а 44.4% - в първите 90. В групата на „ПДХ от самото начало" смъртността е 28.1% сравнено със 71.4% при „Намаляваща ДХ" (P=0.004) или 57.1% в „Стабилен смесен химеризъм" (P=0.054; фиг. 27). Пациентите, които успяват да направят конверсия от смесен до пълен ДХ имат с 35.7% по-добра преживяемост от тези със спад (P=0.057). Оценихме риска от спад на ДХ чрез Cox регресионен анализ, като резултатите показаха най-лоша прогноза при спад в ДХ (HR=3.41, 95% CI: 1.38 – 8.42, P=0.008), следвани от пациентите, които поддържат смесен химеризъм (HR=3.15, 95% CI: 0.97 – 10.24, P=0.057). Рискът при пациентите, които успяват да достигнат ПДХ, е малко по-висок от този при ПДХ от самото начало (HR=1.32, 95% CI: 0.44 – 3.94, P=0.619; фиг. 28). За да оценим ролята на първоначалния смесен химеризъм, разделихме „От смесена към пълна ДХ" според медианата на времето, което е било необходимо за конверсия – 79 дни. Двете нови подгрупи – „От смесена към ПДХ за <79 дни" и „От смесена към ПДХ за >79 дни" не показват сигнификантна разлика с другите групи. Въпреки това, пациентите, които конвертират до ПДХ след ден 79 имат сравнима преживяемост с тези, които имат ПДХ от началото (P=0.885). Обратно - тези, които конвертират по-бързо (преди ден 79), имат крива на преживяемост подобна на пациентите с персистиращ смесен химеризъм

(P=0.766). Трябва да отбележим, че броят на пациентите във всяка от тези две подгрупи е твърде нисък за достоверен анализ на преживяемостта.



Фигура 27. *Прогностична роля на динамичните профили на химеризма спрямо преживяемостта.*

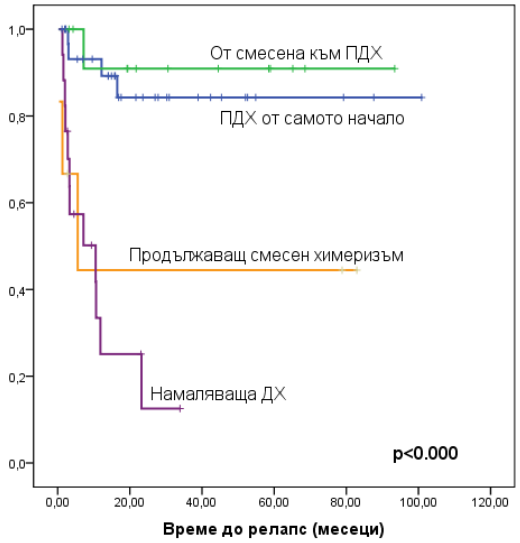


Фигура 28. Предиктивен модел за преживяемостта при отделните групи ("time-to-event" модел)

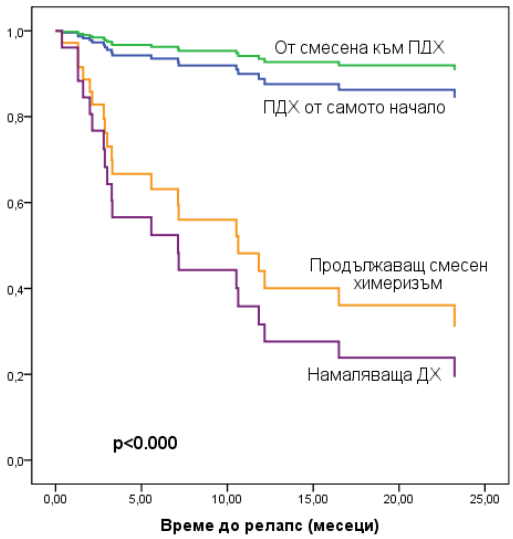
Въпреки това Kaplan-Meier анализът ясно показва разлика между преживяемостта им (P=0.231). Потърсихме обяснение за тези резултати в две от най-честите причини за TRM – релапс и GvHD. Само 1 от 8 (<79 дни) и 2 от 9 (>79 дни) са били диагностицирани с релапс. По-интересни резултати, макар и не сигнификантни, се получиха по отношение на GvHD. Изглежда групата с по-бърза конверсия (<79 дни) е по-податлива на остра GvHD, тъй като 5/8 пациента са развили заболяването – 3 са развили степен II, 1 степен III и 1 степен IV. В групата с по-бавна конверсия (>79 дни) само 3/9 са били диагностицирани с остра форма на GvHD, като и тримата са развили II степен. По отношение на хроничната форма на заболяването не се установи разлика между групите, като само 2/8 (<79 дни) и 3/9 (>79 дни) са я развили. Получените резултати не могат да обяснят разликата в преживяемостта между двете групи, тъй като при тях релапса на болестта и GvHD (остра или хронична) са разпознати от клиницистите като причина за летален изход само в единични случаи.

Единичните спадове на донорната химера са силно предиктивни и по отношение на релапс на първичното заболяване (F=10.84, P<0.000). Използвахме Bonferroni post hoc тест, за да специфицираме сигнификантните различия между групите. Анализът показа, че пациентите от групата „Намаляваща ДХ" силно се различават от тези в останалите две групи (P<0.000 и в двата случая). Резултатите се потвърдиха от Kaplan-Meier log-rank тест (P<0.000; фиг. 29 и 30)

Пациентите, при които се установява спад в нивото на донорната химера, както и тези, които поддържат смесен химеризъм, е по-вероятно да направят релапс, отколкото пациентите, поддържащи ПДХ от самото начало (HR=9.68, 95% CI=3.07–30.56, P<0.000; и HR=6.89, 95% CI=1.54–30.92, P=0.012, съответно) или тези, които успяват да направят конверсия към ПДХ (HR=17.05, 95% CI=2.19–132.66, P=0.007; и HR=12.13, 95% CI=1.26–116.95, P=0.031, съответно). Първите месеци след ало-СКТ са най-критични за възвръщане на болестта, като в 60% от случаите това е станало в рамките на първите 6 месеца, а 85% до първата година (медиана 3.3 месеца, обхват 0.4 – 23.2).



Фигура 29. Вероятност за релапс на болестта при различните профили на химеризъм.



Фигура 30. Предиктивен модел за развитието на релапс при отделните профили на химеризъм („time-to-event" модел)

II.2.2.3. Ниво на донорния химеризъм по време на релапс

С оглед на по-добрата оценка на предиктивната способност на мониторинга на химеризъм извършихме по-детайлен преглед на движението на нивата на донорната химера непосредствено преди и по време на диагностициране на релапс на болестта.

В групата „ПДХ от самото начало" 4 пациента (12.1%) са диагностицирани с релапс. При двама от тях нивото на ДХ е било 100% в периферната кръв (ПК) по време на диагностицирането на релапса. От останалите двама 1 не е изследван по това време, а другият е показал малък спад (100%→99.2% в ПК), който не е достатъчен, за да се класифицира като хематологичен спад на ДХ при приетото ниво от 1% чувствителност на PCR-STR метода.

В групата на „От смесена към ПДХ" само един пациент (7.7%) е диагностициран с релапс, като при него също е наблюдаван спад под приетото ниво за класификация (100%→99.7% в ПК).

В групата на „Продължаващ смесен химеризъм" 3 пациента (50%) са диагностицирани с релапс. Двама от тях не са изследвани по време на поставяне на диагнозата или малко преди това. Третият пациент е бил с високи нива на собствените клетки, като не е наблюдавано някакво значимо движение в химерния му профил.

В групата на „Намаляваща ДХ" само 5 пациента (29.4%) не са диагностицирани с релапс, като детайлна информация за движението на химеризма при тях е дадена в таблица 22. Средният период, с който диагностицирането на спад в ДХ предхожда диагностицирането на релапс е 18 дена (6 – 26).

Таблица 22. Профил на химеризма при пациентите със спад в ДХ, които не са диагностицирани с релапс.

	Ниво на донорната химера / ден след ало-СКТ								Статус
П1	99.4% *(ден 24)*	88.3% *(ден 33)*	97.6% *(ден 46)*						Умира поради инфекция от *Aspergillus* на ден 81
П2	98.7% *(ден 20)*	100% *(ден 30)*	100% *(ден 37)*	98.6% *(ден 48)*	98.4% *(ден 76)*	98.7% *(ден 117)*			Умира от сърдечен арест на ден 132
П3	96.9% *(ден 30)*	...	99.1% *(ден 100)*	...	99.8% *(ден 184)*	99.6% *(ден 213)*	98.9% *(ден 240)*	97.8% *(ден261)*	Умира извън болничното заведение по неизяснени медицински причини на ден 281
П4	88.8% *(ден 30)*	78% *(ден 56)*	100% *(ден 179)*	...	100% *(ден 500)*				Жив
П5	89% *(ден 32)*	90.5% *(ден 61)*	87.3% *(ден 94)*	87% *(ден 182)*	100% *(ден 368)*				Жив

II.2.3. Обсъждане

Днес са разработени различни протоколи за подготовително лечение на пациентите преди ТХСК. Те се различават помежду си по интензитета на миелоаблацията. Миелоаблативното кондициониране е много агресивно и води до висока токсичност и TRM, поради което приложението му е ограничено до по-млади пациенти и такива в добро клинично състояние. Рискът от TRM намалява с времето, въпреки че причините за това не са напълно изяснени [218]. Най-вероятно това се дължи на напредъка в технологията за типизиране на МНС системата, по-доброто разбиране на ролята на HLA съвместимостта, особено по отношение на трансплантациите от неродствени донори, както и по-доброто медицинско обслужване, което се полага за пациентите. С разработването на протоколи с по-нисък интензитет се разшири и обхвата на трансплантацията на стволови клетки, като сега много повече пациенти могат да се подложат на това лечение. Различните кондиционни протоколи се счита, че имат и различна степен на аблация на имунната система на реципиента, а следователно и различни профили на следтрансплантационно възстановяване. Все повече изследвания показват, че границите между различните протоколи са размити [105, 219, 220]. Това до известна степен се потвърждава и от нашите резултати в групата на пациентите с хематологични неоплазии – МА кондиционирането рядко води до задържането на стабилен смесен химеризъм (10.3%) и повечето пациенти бързо достигат ПДХ (66.7%), докато при RIC 53.3% имат първоначален смесен химеризъм, като впоследствие успяват да достигнат ПДХ. Нехарактерен резултат се наблюдава при НМА, където преобладават пациентите, които бързо достигат ПДХ (50%), а при 25% се наблюдава персистиращ смесен химеризъм. Резултатите ни показват, че при повечето пациенти НМА кондиционирането не се различава сигнификантно от МА и RIC по отношение на скоростта на заселване на присадката. Пълна ерадикация на лимфохематопоетичната система на реципиента не винаги се постига след МА и при много от пациентите засичаме собствените им левкоцити дълго след миелоаблацията. Бихме могли да обясним тези резултати с данните от други изследвания, които показват слаби различия между протоколите за предтрансплатационна подготовка. Също така има предтрансплантационни фактори, които не са обект на настоящия дисертационен труд, като първичната диагноза и лечение, които имат по-голямо влияние върху

възстановяването на ИС [103]. Наличието на специфични към HA-1 цитотоксични Т-лимфоцити допълнително могат да окажат влияние върху степента и скоростта на достигане на пълна донорна химера [188]. Трябва да отбележим и ниския брой на пациентите с НМА кондициониране, който въпреки направената статистическа корекция, би могъл да обясни получените резултати.

При МА кондиционирането се използва цялостна ирадиация на тялото и/или алкилиращи агенти. Целта е да се постигне необратима цитопения и да се възпрепятства автоложното възстановяване на хематопоезата. Най-често се използват комбинациите BU-CY и CY-TBI, като понякога се въвеждат и други агенти, които допълнително да подсилят ерадикацията [221]. Установихме сигнификантна разлика между начина на аблация – BU или TBI и времето до достигане на ПДХ. Други фактори като релапс на заболяването или смъртност изглежда не се влияят от вида аблация, докато острата GvHD показва силна асоциация. Смята се, че НМА кондиционирането води до по-продължителен смесен химеризъм, а това от своя страна предпазва от GvHD и може да се използва като основа за последваща терапия чрез DLI, за да се повиши ДХ и да се подсили антитуморния ефект [155, 222-224]. Други изследвания показват, че при RIC смесеният химеризъм често се наблюдава по време на aGVHD и регресия на заболяването [112, 123, 225, 226]. Нашите данни показват, че пациентите с малигнено заболяване, които са кондиционирани с НМА, впоследствие са по-податливи на aGVHD. Тези данни отново показват неясните граници между различните протоколи.

Разделянето на пациентите на база на статичен химерен профил – „ПДХ от самото начало", „От смесена към ПДХ" и „Стабилен смесен химеризъм", не се свързва с нито едно следтрансплантационно усложнение. Тези резултати съвпадат с други изследвания, които докладват слаба или дори липсваща прогностична роля на мониторирането на химеризъм [105, 227, 228]. Недостатък на този модел е, че не взема под внимание ролята на индивидуалните спадове, а разглежда информативността на химеризма спрямо статични групи, базиращи се на първоначалния ход на ДХ. Така разгледан анализът на донорната химера, резултатите подкрепят широко разпространеното мнение, че проследяването му няма клинична стойност, особено по отношение на пациентите с левкемии, които са с МА кондициониране. Дори през 2001г. на работна среща *American*

Society of Blood and Marrow Transplantation и *International Bone Marrow Transplant Registry* дават препоръка да не се проследява рутинно химеризмът в тази група [103]. Едно ретроспективно изследване върху 89 пациента с ОЛЛ не открива сигнификантна разлика в 3-годишната DFS между пациентите, достигнали ≥90% донорни $CD3^+$ Т-клетки и тези с <90% (48% срещу 62%, P=0.49) [228]. Изследване на Mickelson и сътр. също разделя пациентите на ≥90% и <90% донорен химеризъм, като в изследваната група от 233 пациента с различни заболявания не установяват предиктивна роля на химеризма (в левкоцитите и в Т-клетките) по отношение на отхвърляне на присадката, релапс или смъртност. Единствено достигането на ≥90% донорни Т-клетки се свързва с развитие на хронична GvHD (HR=3.73, P<0.001) и екстензивна cGVHD (HR=3.11, P=0.026) [105]. Трето изследване (хетерогенна група от 673 пациента) използва 5% чувствителност на метода за изследване на химеризъм и също не установява връзка между ниските нива на донорни Т-клетки с релапс, NRM или OS. Авторският колектив докладва асоциация между ниския процент донорни Т-клетки и намален риск от cGVHD (HR=0.76, P=0.02) [227].

Голяма част от проучванията извършват първото изследване на химеризма 30-80 дни след ало-СКТ, докато нашите резултати показват, че 40.9% от случаите на релапс са наблюдавани в първите 90 дена [105, 227-229]. Вземайки предвид силната динамика, която се наблюдава при възстановяването на имунната система, решихме да обособим четвърта група пациенти – такива, при които се наблюдава спад в ДХ. Резултатите показаха силно предиктивната роля на мониторинга на химеризъм по отношение на събития като релапс на болестта или летален изход. Най-рискови са пациентите, при които се наблюдава спад в ДХ. Обратно, пациентите с ПДХ от началото на проследяването са с най-ниски нива на смъртност, докато тези, при които се наблюдава конверсия от смесена към пълна ДХ имат най-малък шанс за релапс. Първоначалният смесен химеризъм изглежда има протективна роля по отношение на релапса, а бавната му конверсия към ПДХ намалява шанса за развитие на остра GvHD, както и тежестта ѝ. Нашите резултати се потвърждават и от други изследвания, които, макар да оценяват динамиката на химеризма като цяло, също откриват положителна асоциация на спада в ДХ с повишена вероятност от релапс и намалена обща преживяемост [116, 219, 230-234]. В изследване на *Baron и сътр.* резултатите от многофакторен анализ на над 300 пациента с хематологични злокачествени заболявания показват силна асоциация между ПДХ и намален риск от релапс [235]. Това

изследване се фокусира върху събитието ПДХ, определено като ≥95% донорни клетки, и не взема впредвид времето до достигането му – това, което се окава най-информативно в нашите резултати. Друго изследване върху хетерогенна група пациенти също показва благоприятно въздействие на смесения химеризъм върху релапса и общата преживяемост, докато МА кондиционирането не се различава значимо от RIC [220]. Авторите разграничават смесения химеризъм на стабилен, намаляваща ДХ и увеличаваща се ДХ при ниво на разграничаване 5%. Изследване на *Bader и сътр.* при 101 деца с ОЛЛ показва по-висока 3-годишна DFS при пациенти с ниски нива на клетки на реципиента (DFS=66%) или намаляващ смесен химеризъм (DFS=66%), в сравнение с пациенти, при които се наблюдава увеличаване на смесения химеризъм (DFS=23%; P<0.0001) [236]. Авторите приемат >5% промяна в ДХ за разделяне между групите.

Възможно обяснение за различните данни между отделните изследвания може да се дължи на хетерогенността на изследваните групи по отношение на вида заболяване, възраст на пациентите, кондициониращ режим, интервала за мониториране на химеризма, както и използваните методи за изследване, приетото ниво на чувствителност и отчитането на динамиката на движение на химеризма. Поради малкия брой трансплантации в настоящата работа нямахме възможност да изследваме хомогенна група. Резултатите ни са базирани на болни с онкохематологични заболявания, като анализа показва, че видовете кондициониращ режим не показват значима разлика по отношение на последващия химерен статус. За проследяването на пациентите сме използвали стандартен PCR-STR метод, като сме валидирали 0.5% чувствителност и сме определили обхвата на видовете грешки, така че да можем да разграничим техническите флуктуации от биологичните промени в хематопоезата на пациентите. Нашите резултати изтъкват степента на промяна на химеризма, а не химерния статус или абсолютната му стойност в отделни времеви точки, като най-важен фактор за предсказването на различни събития. Това наблюдение е много важно, тъй като подчертава значимостта на еволюцията на донорната присадка във времето, която може да се променя независимо от основното заболяване, поради влиянието на разнообразни фактори, засягащи имунната система. От друга страна, промяната в процента донорни клетки във времето може да бъде директна функция от релапс и на свой ред може да намали възможността на присадката да контролира заболяването. Освен това, малигнените клетки като цяло имат по-висока пролиферативна

способност в сравнение с нормалните клетки и бавно намаляващият донорен химеризъм може да е отражение на пролиферация на нормални хематопоетични клетки на гостоприемника, а не на злокачествени такива.

Границите между различните предтрансплантационни подготвителни протоколи са неясни и е трудно да се разграничат посттрансплантционните последствия и да се предвиди хода на възстановяването на имунната система. Въпреки рептроспективния характер на нашето изследване, малкия брой и високата хетерогенност, резултатите ясно показват важната роля на мониторинга на кинетиката на химеризма. Стойността на химеризма от единични изследвания може да подведе, тъй като при нея не се оценява цялостната посока на движение. Поради тази причина сме интерпретирали резултатите в контекста на предходните изследвания, като по този начин обхващаме цялостния следтрансплантационен химерен статус на пациентите. Единичните спадове в ДХ показват силно положителна асоциация с повишен риск от релапс и смъртност, като спада в ДХ предхожда с около 18 дена диагнозата на релапс. Също така трябва да отбележим, че диагностицирането се извършва на база изследване на материал от костния мозък на пациента, докато нивата на химеризма се тестуват основно в периферната кръв. Така резултатите, които се получават за химеризма са с няколко дни назад от актуалното състояние в костния мозък. Повишаването на чувствителността на методите за анализ на химеризъм, както и неговото регулярно изследване биха допринесли за по-навременното диагностициране на някои следтрансплантационни усложнения, а оттам и за по-голямата успеваемост на ТХСК.

ОБОБЩЕНИЕ

С напредъка в науката и разработването на нови и по-щадящи протоколи за кондициониране се разширява обхвата на заболяванията, лечими чрез алогенна трансплантация на стволови клетки. Разширяват се и възрастовите граници и клиничните показатели, които позволяват трансплантация. Като резултат все повече хора биват подлагани на този вид лечение, което налага нуждата от изясняване на факторите, влияещи върху изхода от трансплантацията и подобряване на следоперативните грижи. В настоящата работа за пръв път у нас беше направена комплексна оценка на ролята на различни имуногенетични и не-имуногенетични маркери за изхода от алогенна трансплантация на хематопоетични стволови клетки. Проучването обхваща 90 алогенни трансплантации, направени в двата трансплантационни центъра на Република България – СБАЛДОХЗ и СБАЛХЗ, за периода 2005 – 2014г.

В изследваната група, наличието на поне една несъвместимост в HLA-A, -B, -C, -DRB1 и –DQB1 локусите силно понижава общата и свободната от болест преживяемост. Данните ни показват, че най-критични за успеха на лечението са първите 3 месеца след ало-СКТ, като полиморфизми извън антиген свързващия домен изглежда нямат клинична проява. Поради силно полиморфната природа на HLA системата – описани над 12 000 алела към м. октомври 2014г., за много пациенти не може да се открие съвместим донор и това изисква добро познаване на ролята на HLA несъвместимостта.

Въпреки все по-убедителните данни за роля на HLA-DPB1 локуса в ТХСК, изследването ни не откри статистическа достоверност. Трябва да отбележим, че данните ни за ролята на DPB1 са базирани върху много малък брой несъвместими по HLA-DPB1 локуса трансплантации и не можем да дадем заключение за неговата роля като трансплантационен антиген. Все пак, при пациентите с малигнени заболявания се наблюдава тенденция към GVL ефект, индуциран от GVH „неразрешените” несъвместимости. Този резултат, макар и несигнификантен, подкрепя тезата за по-силен Т-клетъчен отговор при „неразрешените” спрямо „разрешените” несъвместимости. Наблюдаваната тенденция може да се разглежда и в посока на потенциално различната цитокинова секреция в резултат на полиморфизмите в β2 домена на DPB1 молекулите.

Резултатите ни индиректно показаха ролята на второстепенните антигени на тъканната съвместимост в трансплантационния процес. При двойките реципиент мъж и донор жена се наблюдава понижена преживяемост, която вероятно се дължи на индуцираната основно от H-Y mHAg GvH реакция. В изследваната група явно благоприятният GVL ефект е замаскиран от по-остро протичащата GvHD, което би се очаквало при трансплантация в ранен етап на болестта. Получените резултати определят като най-подходяща трансплантацията с HLA 10/10 съвместим донор от мъжки пол, докато трансплантацията от жена на жена е с най-ниска обща и свободна от болест преживяемост. Тези данни подкрепят хипотезите за ролята на mHAgs и за по-бързата реконституция на имунната система при донорите мъже, както и за ролята на реципиент-специфичните алоантитела, наблюдавани предимно при жени след сенсибилизиращи събития. Въпреки това, по-разпространено е мнението, че половата съвместимост не оказва съществено влияние върху изхода от ало-СКТ. Трябва да отбележим, че различните трансплантационни центрове могат да се различават по протоколите, които използват за превенция и лечение на GvHD, съответно влиянието, което оказва това заболяване за изхода от ТХСК, може да е различно.

Данните ни показват силно намалени OS и DFS при използването на стволови клетки от КМ, което контастира с общоприетото мнение, че ПК води до по-висока заболеваемост от GvHD и по-висока TRM в сравнение с КМ, особено при неродствените донори.. В изследваната група на пациенти, трансплантирани с клетки от КМ, не е диагностициран нито един случай на aGvHD. Повишената смъртност свързваме с наблюдаваните рискови профили на химерния статус.

С оглед на подобряване на чувствителността и повишаване на предиктивната стойност на мониторинга на химеризъм валидирахме и въведохме в рутинната работа два метода за анализ на химеризъм – RQ-PCR и PCR-STR. Оценката на надежността и чувствителността на използваните методи е важно за правилната интерпретация на цифровото изражение на процента химеризъм. Това наложи включването на няколко статистически и количествени нестатистически параметъра за качествен контрол на представянето на пробата и валидността на резултатите – стандартно отклонение, коефициент на вариация, локусна грешка и грешка на измерването. Изчисляването им е

заложено в Excel-базираното приложение, което разработихме по време на подготовката на дисертационния труд. То позволява полу-автоматичен анализ и качествен контрол на резултатите, както и поддържане на база данни с информация за следтрансплантационния мониторинг на пациентите.

Използването на статичен химерен профил няма информативна стойност за следтрансплантационния мониторинг на пациентите. Благодарение на направената оценка на Identifiler кита за фрагментен анализ, успяхме да дефинираме техническите флуктоации на кита и създадохме модел за разграничаване на истинските промени в хематопоезата на пациентите. При отчитане динамиката в процеса на възстановяване на имунната система моделът е силно предиктивен по отношение на релапс на болестта и обща преживяемост. В групата на злокачествените хематологични заболявания, пациентите с ПДХ от началото на проследяването са с най-ниски нива на смъртност. Изглежда първоначалният смесен химеризъм има протективна роля по отношение на релапса на болестта, а бавната му конверсия към ПДХ – по отношение на развитието на остра GvHD. Въпреки рептроспективния характер на нашето изследване, малкият брой и високата хетерогенност, резултатите ясно показват важната роля на мониторинга на кинетиката на химеризма. Единичните спадове в ДХ показват силно положителна асоциация с повишен риск от релапс и смъртност, като спада в ДХ предхожда с около 18 дена диагнозата на релапс. Нашите резултати изтъкват степента на промяна на химеризма, а не химерния статус или абсолютната му стойност в отделни времеви точки, като най-важен фактор за предсказването на различни събития.

ИЗВОДИ

1. Наличието на една или повече несъвместимости между донора и реципиента в HLA-A, -B, -C, -DRB1 или DQB1 локусите се свързва със силно неблагоприятен изход от ало-СКТ.

2. Генетичните несъвместимости в HLA-DPB1 локуса не оказват влияние върху преживяемостта. При пациенти с малигнено заболяване се наблюдава тенденция за GVL ефект на „неразрешените" в посока донор – реципиент DPB1 несъвместимости.

3. Второстепенните антигени на тъканната съвместимост и особено H-Y оказват влияние за индуциране на анти-туморен ефект и GvHD. Понижена е преживяемостта при трансплантациите с клетки от жена, спрямо тези с клетки от мъж.

4. Самостоятелно оценени, първичното заболяване, вида донор и източника на стволови клетки не оказват влияние върху изхода от алогенна трансплантация на хематопоетични стволови клетки, но имат адитивен ефект към ролята на HLA съвместимостта по отношение на общата и свободната от болест преживяемост.

5. PCR-STR и RQ-PCR методите позволяват прецизна и точна оценка на химерния статус на пациента. Използването им в комбинация има потенциала значително да повиши предиктивната стойност на изследването на химеризма.

6. Включването на статистически и количествени нестатистически методи при оценката на химеризма позволява дефинирането на критерии за определяне на същността на флуктуациите в химерния статус на пациентите, повишава специфичността на анализа и допринася за по-ранна детекция на следтрансплантационни усложнения.

7. Първоначалният смесен химеризъм силно намалява риска от релапс на заболяването, докато бързото постигане на пълна донорна химера се свързва с по-висока обща преживяемост. Единичните спадове в донорния химеризъм показват силно положителна асоциация с повишен риск от релапс и смъртност. По-бързо постигане на пълен донорен химеризъм се наблюдава при пациенти с миелоаблативно кондициониране с бусулфан, отколкото при тези с радиотерапия.

СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ

ТЕОРЕТИЧНИ (НАУЧНО-ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ) ПРИНОСИ

1. Актуализирана и обогатена беше информацията за ролята на HLA съвместимостта при алогенна трансплантация на хематопоетични стволови клетки.
2. За първи път в Р. България беше проучена и анализирана ролята на HLA-DPB1 локуса като трансплантационен антиген.
3. Направена беше комплексна оценка на ролята на предтрансплантационните фактори за изхода от алогенна трансплантация на стволови клетки. Намерените асоциации на половата съвместимост и източника на стволови клетки, както и индиректно оценената роля на второстепенните антигени на тъканната съвместимост между донора и реципиента с изхода от алогенна трансплантация, могат да послужат за изработването на алгоритъм за намиране на подходящ донор.
4. Особено значим принос на настоящата работа е направената за първи път у нас оценка на процеса на заселване на присадката.

ПРИЛОЖНИ (НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИ) ПРИНОСИ

1. Въведен е количествен real-time PCR метод за изследване на химеризъм с добра аналитична надежност и себестойност, който би могъл да се използва в рутинната практика за следтрансплантационния мониторинг на пациентите.
2. Оптимизиран е полу-количествен PCR-STR метод за изследване на химеризъм с добра аналитична надежност и себестойност, който се използва в рутинната практика за следтрансплантационния мониторинг на пациентите.
3. Създадено и въведено в рутинната работа е Excel-базирано приложение за полу-автоматичен анализ на данните от PCR-STR платформата и поддържане на база данни за статуса на трансплантираните пациенти. Въведени са статистически и количествени нестатистически параметъра за оценка на представянето на STR

платформата. Предложен е подход за увеличаване на чувствителността и надеждността на изследването на химеризма.

4. Разработен е модел за ранна детекция на следтрансплантационни усложнения.

5. Разработен е алгоритъм за изследване на химеризъм, който е включен в Медицински стандарт „Имунологична подготовка при трансплантация на органи, тъкани и клетки" утвърден с наредба №18/01.08.2014 (ДВ бр.70 от 22.08.2014).

ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

1. Kvasnicka HM, Wickenhauser C, Thiele J et al., *Mixed chimerism of bone marrow vessels (endothelial cells, myofibroblasts) following allogeneic transplantation for chronic myelogenous leukemia.* Leuk Lymphoma 2003. **44**: p.321-328.

2. Bader P, Hancock J, Kreyenberg H et al., *Minimal residual disease (MRD) status prior to allogeneic stem cell transplantation is a powerful predictor for post-transplant outcome in children with ALL.* Leukemia, 2002. **16**: p.1668-1672.

3. Elmaagacli A, Peceney R, Steckel N et al., *Outcome of transplantation of highly purified peripheral blood CD34+ cells with T cells add back compared with unmanipulated bone marrow or peripheral blood stem cells from HLA identical sibling donors in firstchronic phase CML.* Blood, 2003. **102**: p.446-453.

4. Bader P, Beck J, Frey A et al., *Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR inpatients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT.* Bone Marrow Transplant, 1998. **2**: p.487-492.

5. Bader P, Holle W, Klingebiel T et al., *Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation: the impact of quantitative PCR analysis for prediction of relapses and graftreject ion in children.* Bone Marrow Transplant, 1997. **19**: p.697-702.

6. Mapara MY, Kim YM, Marx J et al., *Donor lymphocyte infusion-mediated graft-versus-leukemia effects in mixed chimeras established with a nonmyeloablative conditioning regimen: extinction of graft-versus-leukemia effects after conversion to full donor chimerism.* Transplantation, 2003. **76**: p.297-305.

7. Anderson D, Billingham RE, Lampkin GH et al., *The use of skin grafting to distinguish between monozygotic and dizygotic twins in cattle.* Heredity, 1951. **5**: p.379-397.

8. C Ford, *Cytological identification of radiation-chimeras.* Nature, 1956. **177**: p.452-454.

9. Gyurkocza B, Rezvani A, Storb R, *Alloeneic hematopoietic cell transplantation: the state of the art.* Expert Rev Hematol, 2010. **3**: p.285-299.

10. Thomas ED, Storb R, Clift RA et al., *Bone-marrow transplantation.* N. Engl. J. Med, 1975. **292**(16, 17): p.832-843, 895-902.

11. Gratwohl A, Baldomero H, Gratwohl M et al., *Quantitative and qualitative differences in use and trends of hematopoietic stem cell transplantation: a Global Observational Study.* Haematologica, 2013. **98**(8): p.1282-1290.

12. WBMT. *Worldwide Network for Blood & Marrow Transplantation (WBMT)*. [cited 14 февруари 2015]; Available from: http://www.wbmt.org/.

13. Lee SJ, Klein J, Haagenson M et al., *High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation.* Blood, 2007. **13**: p.4576-4583.

14. Cornelissen JJ, Carston M, Kollman C et al. , *Unrelated marrow transplantation for adult patients with poor-risk acute lymphoblastic leukemia: strong graft-versus-leukemia effect and risk factors determining outcome.* Blood, 2001. **97**(6): p.1572-1577.

15. McGlave PB, Shu XO, Wen W et al., *Unrelated donor marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia: 9 years' experience of the National Marrow Donor Program.* Blood, 2000. **95**(7): p.2219-2225.

16. Наумова Е, Иванова М, *Главен комплекс на тъканната съвместимост - факти, хипотези, приложение в медицината*. Първо издание ed. 2006, София: Лице.

17. Parham P Adams EJ, Arnett KL *The Origins of HLA-A,B,C Polymorphism.* Immunological Reviews, 1995. **143**: p.141-180.

18. Marsh SGE, *Nomenclature for Factors of the HLA System*. 2015 [cited 14 февруари 2015]; Available from: http://hla.alleles.org/.

19. Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JH et al., *The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases*. 2015 [cited 14 февруари 2015]; Available from: http://hla.alleles.org/.

20. Petersdorf EW, Anasetti C, Martin PJ et al., *Limits of HLA mismatching in unrelated hematopoietic cell transplantation.* Blood, 2004. **104**: p.2976–2980.

21. Morishima Y, Sasazuki T, Inoko H et al., *The clinical significance of human leukocyte antigen (HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow transplant from serologically HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matched unrelated donors.* Blood, 2002. **99**: p.4200–4206.

22. Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D et al., *Impact of HLA class I and class II high resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplant outcome.* Blood, 2004. **104**: p.1923–1930.

23. Sasazuki T, Juji T, Morishima Y, *Effect of matching of class I HLA alleles on clinical outcome after transplantation of hematopoietic stem cells from an unrelated donor.* N. Engl. J. Med, 1998. **339**: p.1177–1185.

24. Petersdorf EW, Malkki M, Hsu K et al., *16th IHIW: International Histocompatibility Working Group in Hematopoietic Cell Transplantation.* Int J Immunogenetics, 2013. **40**: p.2-10.

25. Godder KT, Henslee-Downey PJ, Mehta J et al., *Long term disease-free survival in acute leukemia patients recovering with increased gammadelta T cells after partially mismatched related donor bone marrow transplantation.* Bone Marrow Transplant, 2007. **39**: p.751-757.

26. Arora M, Weisdorf DJ, Spellman SR, *HLA-identical sibling compared with 8/8 matched and mismatched unrelated donor bone marrow transplant for chronic phase chronic myeloid leukemia.* Journal of Clinical Oncology, 2009. **27**: p.1644–1652.

27. Kawase T, Morishima Y, Matsuo K et al., *High-risk HLA allele mismatch combinations responsible for severe acute graft versus host disease and implication for its molecular mechanism.* Blood, 2007. **110**: p.4576-4583.

28. Petersdorf EW, Bardy P, Cambon-Thomsen A et al., *14th International HLA and Immunogenetics Workshop: Report on hematopoietic cell transplantation.* Tissue Antigens, 2007. **69**: p.17-24.

29. Morishima Y, Kawase T, Malkki M et al., *Effect of HLA-A2 allele disparity on clinical outcome in hematopoietic cell transplantation from unrelated donors.* Tissue Antigens, 2007. **69**: p.31-35.

30. Shaw BE, Russell NH, Devereux S et al., *The impact of donor factors on primary non-engraftment in recipients of reduced intensity conditioned transplants from unrelated donors.* Haematologica, 2005. **90**: p.1562–1569.

31. Maris MB, Niederwieser D, Sandmaier BM et al., *HLA-matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning for patients with hematologic malignancies.* Blood, 2003. **102**: p.2021–2030.

32. Niederwieser D, Maris M, Shizuru JA et al., *Low-dose total body irradiation (TBI) and fludarabine followed by hematopoietic cell transplantation (HCT) from HLA-matched or mismatched unrelated donors and postgrafting immunosuppression with cyclosporine and mycophenolate mofetil (MMF) can induce durable complete chimerism and sustained remissions in patients with hematological diseases.* Blood, 2003. **101**: p.1620–1629.

33. Tiercy JM, Passweg J, van Biezen A et al., *Isolated HLA-C mismatches in unrelated donor transplantation for CML.* Bone Marrow Transplant, 2004. **34**: p.249-255.

34. Ho VT, Kim HT, Liney D, et al., *HLA-C mismatch is associated with inferior survival after unrelated donor nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation.* Bone Marrow Transplant, 2006. **37**: p.845-850.

35. Petersdorf EW, Hansen JA, Martin PJ et al., *Major-histocompatibility-complex class I alleles and antigens in hematopoietic-cell transplantation.* N. Engl. J. Med, 2001. **345**: p.1794–1800.

36. Shaw BE, Theodore A. et al., *The importance of HLA-DPB1 in unrelated donor hematopoietic cell transplantation.* Blood, 2007. **110**: p.4560-4566.

37. Shaw BE, Marsh SG, Mayor NP et al., *HLA-DPB1 matching status has significant implications for recipients of unrelated donor stem cell transplants.* Blood, 2006. **107**: p.1220–1226.

38. Morishima Y, Yabe T, Matsuo K et al., *Effects of HLA allele and killer immunoglobulin-like receptor ligand matching on clinical outcome in leukemia patients undergoing transplantation with T-cell-replete marrow from an unrelated donor.* Biol Blood Marrow Transplant, 2007. **13**: p.315–328.

39. Fleischhauer K, Locatelli F, Zecca M et al., *Graft rejection after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation for thalassemia is associated with nonpermissive HLA-DPB1 disparity in hostversus-graft direction.* Blood, 2006. **107**: p.2984–2992.

40. Petersdorf EW, *Immunogenomics of unrelated hematopoietic cell transplantation.* Current Opinion in Immunology, 2006. **18**: p.559–564.

41. Shaw BE, Mayor NP, Russell NH et al., *Diverging effects of HLA-DPB1 matching status on outcome following unrelated donor transplantation depending on disease stage and the degree of matching for other HLA alleles.* Leukemia, 2010. **24**: p.58-65.

42. Zino E, Frumento G, Marktel S et al., *A T-cell epitope encoded by a subset of HLA-DPB1 alleles determines nonpermissive mismatches for hematologic stem cell transplantation.* Blood, 2004. **103**: p.1417–1424.

43. Zino E, Vago L, Di Terlizzi S, *Frequency and targeted detection of HLA-DPB1 T cell epitope disparities relevant in unrelated hematopoietic stem cell transplantation.* Biol Blood Marrow Transplant, 2007. **13**: p.1031–1040.

44. Sizzano F, Zito L, Crivello P et al, *Significantly higher frequencies of alloreactive CD4+ T cells responding to nonpermissive than to permissive HLA-DPB1 T-cell epitope disparities.* Blood, 2010. **116**: p.1991-1992.

45. Crocchiolo R, Zino E, Vago L et al., *Nonpermissive HLA-DPB1 disparity is a significant independent risk factor for mortality after unrelated hematopoietic stem cell transplantation.* Blood, 2009. **114**: p.1437–1444.

46. Fleischhauer K, Shaw BE, Gooley T, et al., *Effect of T-cell-epitope matching at HLA-DPB1 in recipients of unrelated-donor haemopoietic-cell transplantation: a retrospective study.* Lancet Oncology, 2012. **13**: p.366.

47. Shaw BE, Fleischhauer K, Zino E et al., *Significant differences in outcome following unrelated donor HCT can be better predicted using an algorithm incorporating both*

allele and epitope level matching for HLA-DPB1. Bone Marrow Transplant, 2009. **43**: p.S78.

48. Ferrara GB, Bacigalupo A, Lamparelli T et al., *Bone marrow transplantation from unrelated donors: the impact of mismatches with substitutions at position 116 of the human leukocyte antigen class I heavy chain.* Blood, 2001. **98**: p.3150–3155.

49. Marino SR, Lin S, Maiers M et al., *Identification by random forest method of HLA class I amino acid substitutions associated with lower survival at day 100 in unrelated donor hematopoietic cell transplantation.* Bone Marrow Transplant, 2012. **47**: p.217-226.

50. BMDW. *Bone Marrow Donors Worldwide*. 2015 [cited 14 февруари 2015]; Available from: http://www.bmdw.org/.

51. Heemskerk MB, van Walraven SM, Cornelissen JJ et al., *How to improve the search for an unrelated haematopoietic stem cell donor. Faster is better than more!* Bone Marrow Transplant, 2005. **35**: p.645–652.

52. Souillet G, Rey S, Bertrand Y et al., *Outcome of unrelated bone marrow donor searches in 174 children resulting in 45 patients transplanted in the HLA-matched and -mismatched situation.* Bone Marrow Transplant, 2000. **26**: p.31-34.

53. Hurley CK, Wagner JE, Setterholm MI et al., *Advances in HLA: practical implications for selecting adult donors and cord blood units.* Biol Blood Marrow Transplant, 2006. **12**: p.28-33.

54. Pedron B, Duval M, Elbou OM et al., *Common genomic HLA haplotypes contributing to successful donor search in unrelated hematopoietic transplantation.* Bone Marrow Transplant, 2003. **31**: p.423-427.

55. Pedron B, Yakouben K, Adjaoud D et al., *Listing of common HLA alleles and haplotypes based on the study of 356 families residing in the Paris, France, area: implications for unrelated hematopoietic stem cell donor selection.* Hum Immunol, 2005. **66**: p.721-731.

56. Tiercy JM, *Analysis of 250 HLA-B44 genotypes in European Caucasoids: high diversity and preferential ABCDRB1 associations in B*4402, B*4403, and B*4405 haplotypes.* Tissue Antigens, 2005. **65**: p.429-436.

57. Tiercy JM, Villard J, Roosnek E, *Selection of unrelated bone marrow donors by serology, molecular typing and cellular assays.* Transplant Immunol, 2002. **10**: p.215-221.

58. Pedron B, Khourouj VGE, Dalle JH et al., *Contribution of HLA-A/B/C/DRB1/DQB1 Common Haplotypes to Donor Search Outcome in Unrelated Hematopoietic Stem Cell Transplantation.* Biol Blood Marrow Transplant, 2011. **17**: p.1612-1618.

59. Tiercy JM, Nicoloso G, Passweg J et al., *The probability of identifying a 10/10 HLA allele-matched unrelated donor is highly predictable.* Bone Marrow Transplant, 2007. **40**: p.515-522.

60. Tiercy JM, *Unrelated Hematopoietic Stem Cell DonorMatching Probability and Search Algorithm.* Bone Marrow Research, 2012. **2012**: p.8.

61. Dehn J, Arora M, Spellman S et al., *Unrelated Donor Hematopoietic Cell Transplantation: Factors Associated with a Better HLA Match.* Biol Blood Marrow Transplant, 2008. **14**: p.1334-1340.

62. Hurley CK, Baxter-Lowe LA, Begovich AB et al., *The extent of HLA class II allele level disparity in unrelated bone marrow transplantation: analysis of 1259 National Marrow Donor Program donorrecipient pairs.* Bone Marrow Research, 2000. **25**: p.385-393.

63. EMBL-EBI. *IPD - IMGT/HLA*. 2015 [cited 01 февруари 2015]; Available from: http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/.

64. Querol S, Mufti GJ, Marsh SGE et al., *Cord blood stem cells for hematopoietic stemcell transplantation in the uk: how big should the bank be?* Haematologica, 2009. **4**: p.536-541.

65. Hirv K, Bloch K, Fischer M, *Prediction of duration and success rate of unrelated hematopoietic stem cell donor searches based on the patient's HLA-DRB1 allele and DRB1-DQB1 haplotype frequencies.* Bone Marrow Transplant, 2009. **7**: p.433-440.

66. Rosenmayr A, Pointner-Prager M, Winkler M et al., *The Austrian Bone Marrow Donor Registry: Providing Patients in Austria with Unrelated Donors for Transplant – a Worldwide Cooperation.* Transfusion Medicine and Hemotherapy, 2011. **38**: p.292-299.

67. Pidala J, Kim J, Schell M et al, *Race/ethnicity affects the probability of finding an HLA-A, -B, -C and -DRB1 allele-matched unrelated donor and likelihood of subsequent transplant utilization.* Bone Marrow Transplant, 2013. **48**: p.346-350.

68. Rocha V, Spellman S, Zhang MJ, et al., *Effect of HLA-matching recipients to donor noninherited maternal antigens on outcomes after mismatched umbilical cord blood transplantation for hematologic malignancy.* Biol Blood Marrow Transplant, 2012. **18**: p.1890.

69. van Rood JJ, Scaradavou A, Stevens CE, *Indirect evidence that maternal microchimerism in cord blood mediates a graft-versus-leukemia effect in cord blood transplantation.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012. **109**: p.2509.

70. Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P et al., *Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia.* N. Engl. J. Med, 2004. **351**: p.2265-2275.

71. Rocha V, Labopin M, Sanz G et al., *Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia.* N. Engl. J. Med, 2004. **351**: p.2276-2285.

72. Cornetta K, Laughlin M, Carter S et al., *Umbilical cord blood transplantation in adults: results of the prospective Cord Blood Transplantation (COBLT).* Biol Blood Marrow Transplant, 2005. **11**: p.149-160.

73. Kurtzberg J, Cairo MS, Fraser JK et al., *Results of the cord blood transplantation (COBLT) study unrelated donor banking program.* Transfusion, 2005. **45**: p.842-855.

74. Parkman R, Cohen G, Carter SL et al., *Successful immune reconstitution decreases leukemic relapse and improves survival in recipients of unrelated cord blood transplantation.* Biol Blood Marrow Transplant, 2006. **12**: p.919-927.

75. Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ et al., *Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study.* Lancet, 2007. **369**: p.1947-1954.

76. Gluckman E. *Cord Blood Transplant*. in *Eurocord ESH-EBMT Training Course*. 2014. Vienna.

77. Spellman SR, Eapen M, Logan BR et al., *A perspective on the selection of unrelated donors and cord blood units for transplantation.* Blood, 2012. **120**(2): p.259-265.

78. Bradley MB, Cairo MS, *Cord blood immunology and stem cell transplantation.* Hum Immunol, 2005. **66**: p.431-446.

79. Arora M, Nagaraj S, Wagner JE et al., *Chronic graft-versus-host disease (cGVHD) following unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation (HSCT): higher response rate in recipients of unrelated donor (URD) umbilical cord blood (UCB).* Biol Blood Marrow Transplant, 2007. **13**: p.1145-1152.

80. Ballen KK, Spitzer TR, Yeap BY et al., *Double unrelated reduced-intensity umbilical cord blood transplantation in adults.* Biol Blood Marrow Transplant, 2007. **13**: p.82-89.

81. Brunstein CG, Barker JN, Weisdorf DJ et al., *Umbilical cord blood transplantation after nonmyeloablative conditioning: impact on transplantation outcomes in 110 adults with hematologic disease.* Blood, 2007. **110**: p.3064-3070.

82. Barker JN, Weisdorf DJ, Defor TE et al., *Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy.* Blood, 2005. **105**: p.1343-1347.

83. Gluckman E, Rocha V, Arcese W et al., *Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice.* Exp Hematol, 2004. **32**: p.397-407.

84. Gluckman E, Rocha V, *Donor selection for unrelated cord blood transplants.* Current Opinion in Immunology, 2006. **18**: p.565-570.

85. Rocha V, Gluckman E, *Clinical use of umbilical cord blood hematopoietic stem cells.* Biol Blood Marrow Transplant, 2006. **12**: p.34-41.

86. Kogler G, Enczmann J, Rocha V et al., *High-resolution HLA typing by sequencing for HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ in 122 unrelated cord blood/patient pair transplants hardly improves long-term clinical outcome.* Bone Marrow Transplant, 2005. **36**: p.1033-1041.

87. van Heeckeren WJ, Fanning LR, Meyerson HJ et al., *Influence of human leucocyte antigen disparity and graft lymphocytes on allogeneic engraftment and survival after umbilical cord blood transplant in adults.* Br J Hematol, 2007. **139**: p.464-474.

88. Vogt MH, van den Muijsenberg JW, Goulmy E et al., *The DBY gene codes for an HLA-DQ5-restricted human male-specific minor histocompatibility antigen involved in graft-versus-host disease.* Blood, 2002. **99**: p.3027-3032.

89. Nannya Y, Kataoka K, Hangaishi A et al., *The negative impact of female donor/male recipient combination in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation depends on disease risk.* Transpl Int, 2011. **24**: p.469-476.

90. Saliba RM, de Lima M, Giralt S et al., *Hyperacute GVHD: risk factors, outcomes, and clinical implications.* Blood, 2007. **109**: p.2751-2758.

91. Riddell SR, Murata M, Bryant S et al., *Minor histocompatibility antigens--targets of graft versus leukemia responses.* Int J Hematol, 2002. **76**: p.155-161.

92. Falkenburg JH, Marijt WA, Heemskerk MH et al., *Minor histocompatibility antigens as targets of graft-versus-leukemia reactions.* Current Opinion in Hematology, 2002. **9**: p.497-502.

93. Spellman S, Warden MB, Haagenson M et al., *Effects of mismatching for minor histocompatibility antigens on clinical outcomes in HLA-matched, unrelated hematopoietic stem cell transplants.* Biol Blood Marrow Transplant, 2009. **15**: p.856-863.

94. Florence B, Jakob P, Urs S et al., *Impact of HLA-DPB1 Haplotypes on Outcome of 10/10 Matched Unrelated Hematopoietic Stem Cell Donor Transplants Depends on MHC-Linked Microsatellite Polymorphisms.* Biol Blood Marrow Transplant, 2012. **18**(4): p.608-616.

95. Spierings E, Kim Y-H, Hendriks M et al., *Multicenter Analyses Demonstrate Significant Clinical Effects of Minor Histocompatibility Antigens on GvHD and GvL after HLA-*

Matched Related and Unrelated Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant, 2013. **19**(8): p.1244-1253.

96. Bleakley M, Riddell SR, *Exploiting T Cell Specific for Human Minor Histocompatibility Antigens for Therapy of Leukemia.* Immunol Cell Biol, 2011. **89**(3): p.396-407.

97. Goulmy E, Schipper R, Pool J et al., *Mismatches of Minor Histocompatibility Antigens between HLA-Identical Donors and Recipients and the Development of Graft-Versus-Host Disease after Bone Marrow Transplantation.* N. Engl. J. Med, 1996. **334**: p.281-285.

98. McCann SR, Lawler M, *Mixed chimerism: detection and significance following BMT.* Bone Marrow Transplant, 1993. **11**: p.91-94.

99. Serrano J, Roman J, Sanchez J et al., *Molecular analysis of lineage-specific chimerism and minimal residual disease by RTPCR of p210(BCR-ABL) and p190(BCR-ABL) after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: increasing mixed myeloid chimerism and p190(BCR-ABL) detection precede cytogenetic relapse.* Blood, 2000. **95**: p.2659-2665.

100. Ortega M, Escudero T, Caballin MR et al., *Follow-up of chimerism in children with hematological diseases after allogeneic hematopoietic progenitor cell transplants.* Bone Marrow Transplant, 1999. **24**: p.81-87.

101. Alizadeh M, Bernard M, Danic B et al., *Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction.* Blood, 2002. **99**: p.4618-4625.

102. Tramsen L, Koehl U, Tonn T et al., *Clinical-scale generation of human anti-Aspergillus T cells for adoptive immunotherapy.* Bone Marrow Transplant, 2009. **43**: p.13-19.

103. Antin JH, Childs R, Filipovich AH et al., *Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem meetings.* Biol Blood Marrow Transplant, 2001. **7**: p.473-485.

104. Schaap N, Schattenberg A, Bar B et al., *Red blood cell phenotyping is a sensitive technique for monitoring chronic myeloid leukemia patients after T-cell-depleted bone marrow transplantation and after donor leukocyte infusion.* Br J Hematol, 2000. **108**: p.116-125.

105. Mickelson DM, Sproat L, Dean R et al. , *Comparison of donor chimerism following myeloablative and nonmyeloablative allogeneic hematopoietic SCT.* Bone Marrow Transplant, 2011. **46**: p.84-89.

106. Giralt S, Thall PF, Khouri I et al., *Melphalan and purine analogs containing preparative regimens: reduced-intensity conditioning for patients with hematologic malignancies undergoing allogeneic progenitor cell transplantation.* Blood, 2001. **97**: p.631-637.

107. Khouri IF, Saliba RM, Giralt SA et al., *Nonmyeloablative allogeneic hematopoietic transplantation as adoptive immunotherapy for indolent lymphoma: low incidence of toxicity, acute graft-vs-host disease, and treatmentrelated mortality.* Blood, 2001. **98**: p.3595-3599.

108. Martino R, Caballero MD, Simon JAP et al., *Evidence for a graft-versus-leukemia effect after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning in myelogenous leukemia and myelodisplastic syndromes.* Blood, 2002. **100**: p.2243-2245.

109. Nagler A, Aker M, Or R et al., *Low-intensity conditioning is sufficient to ensure engraftment in matched unrelated bone marrow transplantation.* Exp Hematol, 2001. **29**: p.362-370.

110. McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA et al., *Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-vs-tumor effects.* Blood, 2001. **97**: p.3390-3400.

111. Storb R, Yu C, Wagner JL et al., *Stable mixed chimerism in DLA identical littermate dogs given sublethal total body irradiation before and pharmacological immunosuppression after marrow transplantation.* Blood, 1997. **89**: p.3048-3054.

112. Baron F, Baker JE, Storb R et al., *Kinetics of engraftment in patients with hematological malignancies given allogenic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning.* Blood, 2004. **104**: p.2254-2262.

113. Valcarcel D, Martino R, Caballero D et al., *Chimerism analysis following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning.* Bone Marrow Transplant, 2003. **31**: p.387-392.

114. Carvallo C, Geller N, Kurlander R et al, *Prior chemotherapy and allograft CD34+ dose impact donor engraftment following nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation in solid tumor patients.* Blood, 2004. **103**: p.1560-1563.

115. Svenberg P, Mattsson J, Ringden O et al., *Allogeneic hematopoietic SCT in patients with non-malignant diseases, and importance of chimerism.* Bone Marrow Transplant, 2009. **44**: p.757-763.

116. Mattsson J, Uzunel M, Tammik L et al., *Leukemia lineage-specific chimerism analysis is a sensitive predictor of relapse in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation.* Leukemia, 2001. **15**: p.1976-1985.

117. McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA et al., *Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects.* Blood, 2001(97): p.3390-3400.

118. Mielcarek M, Martin PJ, Leisenring W, et al., *Graft-versus-host disease after nonmyeloablative versus conventional hematopoietic stem cell transplantation.* Blood, 2003. **102**: p.756–762.

119. Childs R, Clave E, Contentin N et al., *Engraftment kinetics after non-myeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses.* Blood, 1999. **94**: p.3234-3241.

120. Matthes-Martin S, Lion T, Haas OA et al., *Lineage-specific chimaerism after stem cell transplantation in children following reduced intensity conditioning: potential predictive value of NK cell chimaerism for late graft rejection.* Leukemia, 2003. **17**: p.1934-1942.

121. Petersen SL, Madsen HO, Ryder LP et al. , *Chimerism studies in HLA-identical nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation point to the donor CD8 T-cell count on day +14 as a predictor of acute graft-versus-host disease.* Biol Blood Marrow Transplant, 2004. **10**: p.337-346.

122. Mohty M, Avinens O, Faucher C et al., *Predictive factors and impact of full donor T-cell chimerism after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation.* Haematologica, 2007. **92**: p.1004-1006.

123. Keil F, Prinz E, Moser K et al., *Rapid establishment of long-term culture-initiating cells of donor origin after nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation, and significant prognostic impact of donor T-cell chimerism on stable engraftment and progression-free survival.* Transplantation, 2003. **76**: p.230-236.

124. Kapp M, Rasche L, Einsele H et al., *Cellular therapy to control tumor progression.* Current Opinion in Hematology, 2009. **16**: p.437-443.

125. Schmaltz C, Alpdogan O, Kappel BJ et al., *T cells require TRAIL for optimal graft-versus-tumor activity.* Nat Med, 2002. **8**: p.1433-1437.

126. Lim ZY, Pearce L, Ho AY et al., *Delayed attainment of full donor chimaerism following alemtuzumab-based reduced-intensity conditioning haematopoeitic stem cell transplantation for acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndromes is associated with improved outcomes.* Br J Hematol, 2007. **138**: p.517-526.

127. Shaw BE, Byrne JL, Das-Gupta E et al., *The impact of chimerism patterns and predonor leukocyte infusion lymphopenia on survival following T cell-depleted reduced intensity conditioned transplants.* Biol Blood Marrow Transplant, 2007. **13**: p.550-559.

128. Ting DT, Spitzer TR, Chaudhary A et al., *Clinical outcomes of late rather than early full-donor chimerism in patients with advanced lymphomas receiving nonmyeloablative allogeneic hematopoietic SCT.* Bone Marrow Transplant, 2008. **42**: p.329-335.

129. Junghanss C, Boeckh M, Carter RA et al., *Incidence and outcome of cytomegalovirus infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic stem cell transplantation, a matched control study.* Blood, 2002. **99**: p.1978-1985.

130. Poutsiaka DD, Munson D, Price LL et al., *Blood stream infection (BSI) and acute GVHD after hematopoietic SCT (HSCT) are associated.* Bone Marrow Transplant, 2011. **46**: p.300-307.

131. Stikvoort A, Gertow G, Sundin M et al., *Chimerism Patterns of Long-Term Stable Mixed Chimeras Posthematopoietic Stem Cell Transplantation in Patients with Nonmalignant Diseases: Follow-Up of Long-Term Stable Mixed Chimerism Patients.* Biol Blood Marrow Transplant, 2013. **19**(5): p.838-844.

132. Talarn C, Urbano-Ispizua A, Martino R et al., *Kinetics of recovery of dendritic cell subsets after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation and clinical outcome.* Haematologica, 2007. **92**: p.1655-1663.

133. Bacigalupo A, McCann SR, Lawler M, *Recurrence of Philadelphia chromosome-positive leukemia in donor cells after bone marrow transplantation for chronic granulocytic leukemia.* Leuk Lymphoma, 1993. **10**: p.419-425.

134. Slavin S, Naparstek E, Nagler A et al., *Allogeneic cell therapy for relapsed leukemia after bone marrow transplantation with donor peripheral blood lymphocytes.* Exp Hematol, 1995. **23**: p.1553-1562.

135. Collins RH, Shpilberg O, Drobyski WR et al., *Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation.* J Clin Oncol, 1997. **15**: p.433-444.

136. Hasskarl J, Zerweck A, Wasch R et al., *Induction of graft versus malignancy effect after unrelated allogeneic PBSCT using donor lymphocyte infusions derived from frozen aliquots of the original graft.* Bone Marrow Transplant, 2012. **47**: p.277-282.

137. Huang XJ, Wang Y, Liu DH et al., *Administration of short-term immunosuppressive agents after DLI reduces the incidence of DLI-associated acute GVHD without influencing the GVL effect.* Bone Marrow Transplant, 2009. **44**: p.309-316.

138. Warren EH, Fujii N, Akatsuka Y, et al., *Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation with T cells specific for minor histocompatibility antigens.* Blood, 2010. **115**: p.3869-3878.

139. Roddie C, Peggs KS, *Donor lymphocyte infusion following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.* Expert Opin Biol Ther, 2011. **11**: p.473-487.

140. Wang Y, Liu DH, Xu LP, et al., *Prevention of relapse using granulocyte CSF-primed PBPCs following HLA-mismatched/haploidentical, T-cell-replete hematopoietic SCT in patients with advanced-stage acute leukemia: a retrospective risk-factor analysis.* Bone Marrow Transplant, 2012. **47**: p.1099-1104.

141. Wang Y, Liu DH, Fan ZP, 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. **26**: p.635-643.

142. Qin X-Y, Li G-X, Qin Y-Z et al., *Quantitative chimerism kinetics in relapsed leukemia patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.* Chin Med J, 2012. **125**(11): p.1952-1959.

143. Bader P, Niethammer D, Willasch A et al., *How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation?* Bone Marrow Transplant, 2005. **35**: p.107-119.

144. McCann SR, Crampe M, Molloy K et al., *Hemopoietic chimerism following stem cell transplantation.* Transfus Apher Sci, 2005. **32**: p.55-61.

145. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzangia G et al. , *Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects.* Leukemia, 2003. **17**: p.1013-1034.

146. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M et al., *Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lympgoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936.* Leukemia, 2003. **17**: p.2257-2317.

147. Elmaagacli AH, Becks HW, Beelen DW et al., *Detection of minimal residual disease and persistence of host-type hematopoiesis: a study in 28 patients after sex-mismatched, non-T celldepleted allogeneic bone marrow transplantation for Philadelphia-chromosome positive chronic myelogenous leukemia.* Bone Marrow Transplant, 1995. **16**: p.823–829.

148. Mackinnon S, Barnett L, Heller G et al. , *Minimal residual disease is more common in patients who have mixed T-cell chimerism after bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia.* Blood, 1994. **83**: p.3409–3416.

149. Dreger P, Corradini P, Kimby E, et al., *Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus.* Leukemia, 2007. **21**: p.12-17.

150. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al., *Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines.* Blood, 2008. **111**: p.5446-5456.

151. Schetelig J, van Biezen A, Brand R, et al., *Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia with 17p deletion: a retrospective European Group for Blood and Marrow Transplantation analysis.* J Clin Oncol, 2008. **26**: p.5094-5100.

152. Khouri IF, Saliba RM, Admirand J, et al. , *Graft-versus-leukaemia effect after non-myeloablative haematopoietic transplantation can overcome the unfavourable expression of ZAP-70 in refractory chronic lymphocytic leukaemia.* Br J Hematol, 2007. **137**: p.355-363.

153. Ben-Bassat I, Raanani P, Gale RP, *Graft-versus-leukemia in chronic lymphocytic leukemia.* Bone Marrow Transplant, 2007. **39**: p.441-446.

154. Balon J, Halaburda K, Bieniaszewska M, et al., *Early complete donor hematopoietic chimerism in peripheral blood indicates the risk of extensive graft-versus-host disease.* Bone Marrow Transplant, 2005. **35**: p.11.

155. Sykes M, Preffer F, McAfee S et al., DM, *Mixed lymphohaemopoietic chimerism and graft-ver suslymphoma effects after non-myeloablative therapy and HLA-mismatched bone-marrow transplantation.* Lancet, 1999. **353**: p.1755–1759.

156. Shaffer BC, Modric M, Stetler-Stevenson M et al., *Rapid complete donor lymphoid chimerism and graft-versus-leukemia effect are important in early control of chronic lymphocytic leukemia.* Exp Hematol, 2013. **41**(9): p.772-778.

157. Ramirez M, Diaz MA, Garcia-Sanchez F et al., *Chimerism after allogeneic hematopoietic cell transplantation in childhood acute lymphoblastic leukemia.* Bone Marrow Transplant, 1996. **18**: p.1161-1165.

158. Lange T, Hubmann M, Burkhardt R, et al., *Monitoring of WT1 expression in PB and CD34(1) donor chimerism ofBMpredicts early relapse in AML and MDS patients after hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity conditioning.* Leukemia, 2011. **25**: p.498-505.

159. Hancock JP, Burgess MF, Goulden NJ et al. , *Same-day determination of chimaeric status in the immediate period following allogeneic bone marrow transplantation.* Br J Hematol, 1997. **99**: p.403-409.

160. Molloy K, Goulden N, Lawler M et al., *Patterns of hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation for childhood acute lymphoblastic leukemia from volunteer unrelated donors.* Blood, 1996. **87**: p.3027-3031.

161. Thiede C, Bornhauser M, Oelschlagel U et al., *Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allergenic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers.* Leukemia, 2001. **15**: p.293-302.

162. Choi SJ, Lee KH, Lee JH et al., *Prognostic value of hematopoietic chimerism in patients with acute leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: a prospective study.* Bone Marrow Transplant, 2000. **26**: p.327-332.

163. Hibi S, Tsunamoto K, Todo S et al., *Chimerism analysis on mononuclear cells in the CSF after allogeneic bone marrow transplantation.* Bone Marrow Transplant, 1997. **20**: p.503–506.

164. Butler JM, *Commonly used short tandem repeat markers.* Forensic DNA Typing, 2001: p.53–79.

165. Walsh PS, Fildes NJ, Reynolds R, *Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA.* Nucleic Acids Res, 1996. **24**: p.2807-2812.

166. Butler JM, *Biology of STRs: stutter products, non-template addition, microvariants, null alleles, and mutation rates.* Forensic DNA Typing, 2001: p.81-98.

167. Shin MG, Kim HJ, Kim HR, et al., *Mitochondrial DNA minisatellites as new markers for the quantitative determination of hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation.* Leukemia, 2007. **21**: p.369-373.

168. Won EJ, Kim HR, Kim HY et al., *Diagnostic and Prognostic Value of Mitochondrial DNA Minisatellites after Stem Cell Transplantation.* Biol Blood Marrow Transplant, 2013. **19**: p.918-924.

169. Forbes GM, Fogarty J, Meyer B et al., *Intestinal mucosal mononuclear cell chimaerism after sex-mismatched allogeneic bone marrow transplantation.* Bone Marrow Transplant, 1995. **16**: p.589-593.

170. Bade-Doeding C, Cano P, Huyton T et al., *Mismatches outside exons 2 and 3 do not alter the peptide motif of the allele group B*44:02P*. Hum Immunol, 2011. **72**(11): p.1039-1044.

171. Pasi A, Crocchiolo R, Bontempelli M et al., *The conundrum of HLA-DRB1*14:01/*14:54 and HLA-DRB3*02:01/*02:02 mismatches in unrelated hematopoietic SCT.* Bone Marrow Transplant, 2011. **46**(7): p.916-922.

172. Petersdorf EW, Gooley T, Malkki M et al., *The biological significance of HLA-DP gene variation in haematopoietic cell transplantation.* Br J Hematol, 2001. **112**(4): p.988-994.

173. Cesbron A, Moreau P, Cheneau ML et al., *Crucial role of the third and fourth hypervariable regions of HLA-DPB1 allelic sequences in primary mixed-lymphocyte reaction: application in allogeneic bone marrow transplantation.* Transplant Proc, 1993. **25**: p.1232-1233.

174. Nicholson I, Varney M, Kanaan C et al., *Alloresponses to HLA-DP detected in the primary MLR: correlation with a single amino acid difference.* Hum Immunol, 1997. **55**(2): p.163-169.

175. Ludajic K, Balavarca Y, Bickeböller H et al., *Impact of HLA-DPB1 allelic and single amino acid mismatches on HSCT.* Br J Hematol, 2008. **142**(3): p.436-443.

176. Fleischhauer K et al., *Peripheral blood stem cell allograft rejection mediated by CD4(+) T lymphocytes recognizing a single mismatch at HLA-DP beta 1*0901.* blood, 2001. **98**: p.1122-1126.

177. Rutten CE, van Luxemburg-Heijs SA, van der Meijden ED et al., *HLA-DPB1 mismatching results in the generation of a full repertoire of HLA-DPB1 specific CD4+ T-cell responses showing immunogenicity of all HLA-DPB1 alleles.* Biol Blood Marrow Transplant, 2010. **16**(9): p.1282-1292.

178. Rutten CE, van Luxemburg-Heijs SA, van der Meijden ED et al., *Both permissive and nonpermissive HLA-DPB1 mismatches can induce polyclonal HLA-DPB1 specific immune responses in vitro and in vivo.* Blood, 2010. **115**(1): p.151-153.

179. Vié H, Gaschet J, Milpied N, *Permissive, nonpermissive HLA-DPB1 epitope disparities and the specificity of T cells infiltrating the skin during acute graft-versus-host disease.* Blood, 2011. **117**(21): p.5779-5783.

180. Rutten CE, van Luxemburg-Heijs SA, Halkes CJ et al., *Patient HLA-DP-specific CD4+ T cells from HLA-DPB1-mismatched donor lymphocyte infusion can induce graft-versus-leukemia reactivity in the presence or absence of graft-versus-host disease.* Biol Blood Marrow Transplant, 2013. **19**(1): p.40-48.

181. Konig R, Shen X, Germain R, *Involvement of both major histocompatibility complex class II alpha and beta chains in CD4 function indicates a role for ordered oligomerization in T cell activation.* J Exp Med, 1995. **182**(3): p.779-787.

182. Fleury S, Thibodeau J, Croteau G et al., *HLA-DR polymorphism affects the interaction with CD4.* J Exp Med, 1995. **182**(3): p.733-741.

183. Gilfillan S, Shen X, König R, *Selection and function of CD4+ T lymphocytes in transgenic mice expressing mutant MHC class II molecules deficient in their interaction with CD4.* J Immunol, 1998. **161**(12): p.6629-6637.

184. Shaw BE, Madrigal A, *Immunogenetics of allogeneic HSCT,* in *Haematopoietic Stem Cell Transplantation, ESH-EBMT Handbook,* C.E. Apperley J, Gluckman E, Masszi T, Editor. 2012. p. 74-89.

185. Bleakley M, Riddell SR, *Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect.* Nat Rev Cancer, 2004. **4**: p.371-380.

186. Goulmy E, *Human minor histocompatibility antigens: new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy.* Immunol Rev, 1997. **157**: p.125-140.

187. Riddell SR, Berger C, Murata M et al., *The graft versus leukemia response after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.* Blood Rev, 2003. **17**: p.153-162.

188. van der Torren CR, van Hensbergen Y, Luther S et al., *Possible role of minor h antigens in the persistence of donor chimerism after stem cell transplantation; relevance for sustained leukemia remission.* PLoS One, 2015. **10**(3): 18.

189. Falkenburg JH, Van De Corput L, Marijt EW et al., *Minor histocompatibility antigens in human stem cell transplantation.* Exp Hematol, 2003. **31**: p.743-751.

190. Goulmy E, Termijtelen A, Bradley BA et al., *Alloimmunity to human H-Y.* Lancet, 1976. **2**: p.1206.

191. Markiewicz M, Siekiera U, Karolczyk A et al., *Immunogenic disparities of 11 minor histocompatibility antigens (mHAs) in HLA-matched unrelated allogeneic hematopoietic SCT.* Bone Marrow Transplant, 2009. **43**(4): p.293-300.

192. Miklos DB, Kim HT, Miller KH et al., *Antibody responses to H-Y minor histocompatibility antigens correlate with chronic graft-versus-host disease and disease remission.* Blood, 2005. **105**(7): p.2973-2978.

193. Kollman C, Howe CW, Anasetti C et al., *Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age.* Blood, 2001. **98**(7): p.2043-2051.

194. Ciurea SO, de Lima M, Cano P et al., *High risk of graft failure in patients with anti-HLA antibodies undergoing haploidentical stem-cell transplantation.* Transplantation, 2009. **88**(8): p.1019-1024.

195. Taylor PA, Ehrhardt MJ, Roforth MM et al., *Preformed antibody, not primed T cells, is the initial and major barrier to bone marrow engraftment in allosensitized recipients.* Blood, 2007. **109**(3): p.1307-1315.

196. Spellman S, Bray R, Rosen-Bronson S et al., *The detection of donor-directed, HLA-specific alloantibodies in recipients of unrelated hematopoietic cell transplantation is predictive of graft failure.* Blood, 2010. **115**(13): p.2704-2708.

197. Leffell MS, Cao K, Coppage M et al., *Incidence of humoral sensitization in HLA partially mismatched hematopoietic stem cell transplantation.* Tissue Antigens, 2009. **74**(6): p.494-498.

198. Taniguchi K, Yoshihara S, Maruya E et al., *Donor-derived HLA antibody production in patients undergoing SCT from HLA antibody-positive donors.* Bone Marrow Transplant, 2012. **47**(10): p.1338-1342.

199. Yoshihara S, Taniguchi K, Ogawa H et al., *The role of HLA antibodies in allogeneic SCT: is the 'type-and-screen' strategy necessary not only for blood type but also for HLA?* Bone Marrow Transplant, 2012. **47**(12): p.1499-1506.

200. Ciurea SO, Thall PF, Wang X et al., *Donor-specific anti-HLA Abs and graft failure in matched unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation.* Blood, 2011. **118**(22): p.5957-5964.

201. Yoshihara S, Maruya E, Taniguchi K et al., *Risk and prevention of graft failure in patients with preexisting donor-specific HLA antibodies undergoing unmanipulated haploidentical SCT.* Bone Marrow Transplant, 2012. **47**(4): p.508-515.

202. Brand A, Doxiadis IN, Roelen DL. *On the Role of HLA antibodies in Hematopoietic Stem Cell transplantation.* Tissue Antigens, 2013. **81**: p.1-11

203. Zhu H, He J, Cai J et al., *Pre-existing anti-HLA antibodies negatively impact survival of pediatric aplastic anemia patients undergoing HSCT*. Clin Transplant 2014. **28**(11): p.1225-1233.

204. Han M, Rogers JA, Lavingia B et al., *Peripheral blood B cells producing donor-specific HLA antibodies in vitro.* Hum Immunol, 2009. **70**(1): p.29-34.

205. Lapierre V, Aupérin A, Tayebi H et al., *Increased presence of anti-HLA antibodies early after allogeneic granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation compared with bone marrow transplantation.* Blood, 2002. **100**(4): p.1484-1489.

206. Sirinoglu DI, Tekgunduz E, Altuntas F, *What Is the Most Appropriate Source for Hematopoietic Stem Cell Transplantation? Peripheral Stem Cell/Bone Marrow/Cord Blood.* Bone Marrow Research, 2012. **2012**: p.834040.

207. Alpdogan O, van den Brink MR, *Immune tolerance and transplantation.* Semi oncol, 2012. **6**(39): p.629-642.

208. Fadi I, Kathryn JW, *Translating tolerogenic therapies to the clinic – where do we stand?* Front Immunol, 2012. **3**: p.1.

209. Gineikiene E, Stoskus M, Griskevicius L., *Recent advances in quantitative chimerism analysis.* Expert Rev Mol Diagn, 2009. **8**(9): p.817-32.

210. Thiede C, *Diagnostic chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation: new methods and markers.* Am J Pharmacogenomics, 2004. **4**(3): p.177-187.

211. Lion T, Watzinger F, Preuner S et al. *The EuroChimerism concept for a standardized approach to chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation.* Leukemia, 2012. **26:** p.1821-1828.

212. Lee LG, Spurgeon SL, Heiner CR et al., *New energy transfer dyes for DNA sequencing.* Nuclei Acids Res, 1997. **25**: p.2816-2822.

213. Butler JM, *Commonly used short tandem repeat markers*, in *Forensic DNA Typing*. 2001, Academic Press: San Diego. p. 53–79.

214. Kristt D, Stein J, Yaniv I et al., *Interactive ChimerTrack software facilitates computation, visual displays and long-term tracking of chimeric status based on STRs.* Leukemia, 2004. **18**(5): p.909-911.

215. Kristt D, Klein T, *Reliability of quantitative chimerism results: assessment of sample performance using novel parameters.* Leukemia, 2006. **6**(20): p.1169-72.

216. Kristt D, Stein J, Klein T, *Frontiers of stem cell transplantation monitoring: capturing graft dynamics through routine longitudinal chimerism analysis.* Isr Med Assoc J, 2007. **3**(9): p.159-62.

217. Kazuyuki M, Kazuyoshi Y, Minoru T et al. , *Monitoring of hematopoietic chimerism by short tandem repeats, and the effect of CD selection on its sensitivity.* Clin Chem, 2004. **50**(12): p.2411-2414.

218. Pagel JM, Matthews DC, Appelbaum FR et al., *The use of radioimmunoconjugates in stem cell transplantation.* Bone Marrow Transplant, 2002. **29**(10): p.807-816.

219. Huisman C, de Weger RA, de Vries L et al., *Chimerism analysis within 6 months of allogeneic stem cell transplantation predicts relapse in acute myeloid leukemia.* Bone Marrow Transplant, 2007. **39**: p.285-291.

220. Michallet AS, Furst S, Le QH et al, *Impact of chimaerism analysis and kinetics on allogeneic haematopoietic stem cell transplantation outcome after conventional and reduced-intensity conditioning regimens.* Br J Hematol, 2005. **128**: p.676-689.

221. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D et al., *Defining the Intensity of Conditioning Regimens: Working Definitions.* Biol Blood Marrow Transplant, 2009. **15**(12): p.1628-1633.

222. Spitzer TR, *Nonmyeloablative allogeneic stem cell transplant strategies and the role of mixed chimerism.* Oncologist, 2000. **5**: p.215-223.

223. Maris M, Sandmaier BM, Maloney DG et al., *Non-myeloablative hematopoietic stem cell transplantation.* Transfus Clin Biol, 2001. **8**: p.231-234.

224. Childs R, Clave E, Contentin N et al., *Engraftment kinetics after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses.* Blood, 1999. **94**: p.3234-3241.

225. Mattsson J, Uzunel M, Brune M et al., *Mixed chimaerism is common at the time of acute graft-versus-host disease and disease response in patients receiving non-myeloablative conditioning and allogeneic stem cell transplantation.* Br J Hematol, 2001. **115**: p.935-944.

226. Uzunel M, Mattsson J, Brune M et al., *Kinetics of minimal residual disease and chimerism in patients with chronic myeloid leukemia after nonmyeloablative conditioning and allogeneic stem cell transplantation.* Blood, 2003. **101**: p.469-472.

227. Mossallam GI, Kamel AM, Storer B et al., *Prognostic utility of routine chimerism testing at 2 to 6 months after allogeneic hematopoietic cell transplantation.* Biol Blood Marrow Transplant, 2009. **15**: p.352-359.

228. Doney K, Loken M, Bryant E et al., *Lack of utility of chimerism studies obtained 2–3 months after myeloablative hematopoietic cell transplantation for ALL.* Bone Marrow Transplant, 2008. **42**: p.271-274.

229. Koreth J, Kim HT, Nikiforow S et al., *Donor Chimerism Early after Reduced-intensity Conditioning Hematopoietic Stem Cell Transplantation Predicts Relapse and Survival.* Biol Blood Marrow Transplant, 2014: p.1516-1521.

230. Barrios M, Jimenez-Velasco A, Roman-Gomez J et al., *Chimerism status is a useful predictor of relapse after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia.* Haematologica, 2003. **88**: p.801-810.

231. Miura Y, Tanaka J, Toubai T et al., *Analysis of donor-type chimerism in lineage-specific cell populations after allogeneic myeloablative and non-myeloablative stem cell transplantation.* Bone Marrow Transplant, 2006. **37**: p.837-843.

232. Wasch R, Bertz H, Kunzmann R et al., *Incidence of mixed chimaerism and clinical outcome in 101 patients after myeloablative conditioning regimens and allogeneic stem cell transplantation.* Br J Hematol, 2000. **109**: p.743-750.

233. Tobiasson M, Olsson R, Hellstrom-Lindberg E et al., *Early detection of relapse in patients with myelodysplastic syndrome after allo-SCT.* Bone Marrow Transplant, 2011. **46**: p.719-726.

234. Andreani M, Testi M, Lucarelli G. *Mixed chimerism in haemoglobinopathies: from risk of graft rejection to immune tolerance.* Tissue Antigens, 2014. **83**(3): p.137-146.

235. Baron F, Maris MB, Sandmaier BM et al., *Graft-versus-tumor effects after allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning.* J Clin Oncol, 2005. **23**: p.1993-2003.

236. Bader P, Kreyenberg H, Hoelle W et al., *Increasing mixed chimerism is an important prognostic factor for unfavorable outcome in children with acute lymphoblastic leukemia after allogeneic stem-cell transplantation: possible role for pre-emptive immunotherapy?* J Clin Oncol, 2004. **22**: p.1696-1705.