

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО КЛИНИЧНА ЛАБОРАТОРИЯ И КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ

Цветелин Иванов Луканов

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

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна
степен “Доктор”**

Докторска програма „Имунология”

София, 2015

Дисертационният труд е написан на 148 стандартни печатни страници, онагледен е с 23 таблици и 30 фигури. Библиографията съдържа 236 заглавия, от които 1 на кирилица и 235 на латиница.

Във връзка с дисертационния труд са реализирани 4 публикации и 15 участия в научни форуми.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на научния съвет към Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология, Медицински Университет – София на 04.03.2015г. и е насочен за официална защита пред научно жури в състав:

Официални рецензенти:

1. Проф. д-р Фани Мартинова, дмн
2. Доц. Милена Иванова-Шиварова, дм

Становища:

3. Проф. д-р Елисавета Наумова, дмн (научен ръководител)
4. Проф. д-р Драган Бобев, дмн
5. Доц. д-р Дора Попова, дм

Материалите по защитата са на разположение в деловодството на Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 17.06.2015г. от 14.00ч. в аулата на УМБАЛ „Св. Екатерина”, ул. Пенчо Славейков” 52А.

Съдържание

ПО-ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	5
I. ВЪВЕДЕНИЕ	6
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	7
МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	8
I. МАТЕРИАЛ	8
II. МЕТОДИ	9
II.1.1. Изолиране на геномна ДНК от периферна венозна кръв и костен мозък	
9	
II.1.2 Определяне на тъканна съвместимост (HLA генотипизиране) 11	
II.1.2.1 HLA генотипизиране с ниска разграничителна способност	11
II.1.2.2 HLA генотипизиране с висока разграничителна способност ...	11
II.1.3. Изследване на химеризъм	11
III. СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ.....	12
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	13
РАЗДЕЛ I. ПРЕДТРАНСПЛАНТАЦИОННИ ФАКТОРИ, ОКАЗВАЩИ	
ВЛИЯНИЕ ВЪРХУ ИЗХОДА ОТ ТХСК	13
I.1.Роля на съвместимостта по HLA-A,-B,-C,-DRB1,-DQB1 локусите ...	13
I.2.Роля на съвместимостта по HLA-DPB1 локуса	15
I.3.Роля на не-имуногенетични фактори.....	16
I.4.Обсъждане	19
РАЗДЕЛ II. СЛЕДТРАНСПЛАНТАЦИОННИ ФАКТОРИ, ОКАЗВАЩИ	
ВЛИЯНИЕ ВЪРХУ ИЗХОДА ОТ ТХСК	25
II.1 Въвеждане на методи за следтрансплантационен мониторинг на	
химеризъм	25
II.1.1. PCR-STR метод за изследване на химеризъм	25
II.1.1.1. Точност	26
II.1.1.2. Възпроизводимост	27
II.1.2. Автоматизация на резултатите и поддържане на база данни ...	28
II.1.2.1. Изчисляване на процента донорна химера	28
II.1.2.2. Подбор на информативни маркери	28
II.1.2.3. Математически параметри, използвани за оценка на представянето	
на платформата	29
II.1.2.4. Алгоритъм за оценка на резултатите	29
II.1.1.1. Проследяване статуса на пациентите и поддържане на база данни	
30	
II.1.2. Количествен real-time PCR метод за изследване на химеризъм 30	
II.1.3. Обсъждане	31
II.2. Химеризъм.....	36
II.2.1. Роля на кондициониращия режим.....	38

П.2.2.	Роля на проследяването на нивата на химеризма	40
П.2.2.1.	Предтрансплантационни фактори, влияещи върху химеризма	40
П.2.2.2.	Връзка на химеризма със следтрансплантационни събития.....	41
П.2.2.3.	Ниво на донорния химеризъм по време на релапс	43
П.1.1.	Обсъждане.....	44
	ОБОБЩЕНИЕ.....	49
	ИЗВОДИ	52
	СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ.....	53

ПО-ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ало-СКТ - алогенна трансплантация на стволови клетки;
mHAg - minor histocompatibility antigens;
ДХ - донорен химеризъм;
SNP - single nucleotide polymorphisms;
GVL - graft-versus-leukemia;
CI - confidence interval;
HR - hazard ratio;
RQ-PCR – quantitative real-time PCR;
STR – short tandem repeats;
МА – myeloablative conditioning;
НМА – немелоаблативно кондициониране;
NRM - non-relapse mortality;
OS – overall survival;
ОЛЛ - остра лимфобластна левкемия;
ОМЛ - остра миелобластна левкемия;
RR – relative risk;
PCR – polymerase chain reaction;
RIC - reduced intensity conditioning;
ПДХ - пълна донорна химера;
GvHD - graft-versus-host disease;
DFS – disease-free survival;
TRM - transplant related mortality;
ТХСК - трансплантация на хематопоеични стволови клетки;
HLA - human leukocyte antigen.

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Трансплантацията на хематопоетични стволови клетки (ТХСК) се е превърнала в рутинен метод за лечение на редица малигнени и немалигнени хематологични заболявания. Годишно в световен мащаб се извършват над 60 000 трансплантации, като в края на 2012г. беше трансплантиран едномилionenният пациент. С напредъка в разбирането на биологията на ТХСК и разработването на нови по-щадящи протоколи за кондициониране се разшири спектъра на заболяванията, които могат да се лекуват, обхващайки по този начин и все повече хора. Алогенната трансплантация на стволови клетки е ефективна при възстановяването на нормалната хематопоеза и е предпочитан терапевтичен метод при злокачествените хематологични неоплазии, 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, mHAg) на реципиента или епитопи, специфични за левкемичните клетки. 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 несъвместимостта, т. нар. „разрешени” и „неразрешени” съвместимости, които 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. 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 тъканната съвместимост при трансплантацията на хематопоетични стволови 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 усложнения 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 ѝ произход - изследване на 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 Identifier 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 аlogenна ТХСК и техните донори. Пациентите 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 (complete 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 1 са представени основните характеристики на разглежданите групи.

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). Общата схема за мониторинг на пациентите включва проследяването на нивата на химеризъм през първия месец след трансплантация, втория месец, третия месец и след това на тримесечни интервали. В зависимост от кондициониращия режим, клиничното състояние на пациента и резултатите от изследването на химеризма, както и по преценка на лекуващите лекари, са извършвани 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, използваща намагнетизирани силиконови частици.

Таблица 1. Характеристики на изследваната група

Брой пациенти	90		Кондициониращ протокол		
Брой ТХСК	96		МА	48	61.5%
Средна възраст (години)	30.73 (2 - 59)		- ВU	19	39.6%
Пол			- ТВI	29	60.4%
Мъже	54	60.0%	RIC	18	21.3%
Жени	36	40.0%	НМА	12	15.4%
Първично заболяване			Профил на химеризма		
ОЛЛ	28	31.1%	ПДХ	38	43.7%
ОМЛ	37	41.1%	От смесен към		
ХМЛ	4	4.4%	ПДХ	20	23.0%
МДС	2	2.2%	<68 дни	10	50.0%
НХЛ	3	3.3%	>68 дни	10	50.0%
ММ	3	3.3%	Стабилен смесен		
АА	7	7.8%	химеризъм	11	12.6%
			Намаляваща		
β-таласемия	6	6.7%	ДХ	18	20.7%
Донор			Статус		
Родствен	56	62.2%		114.3	
Неродствен	34	37.8%	Средна проследяемост	(2.7 -	
Полова съвместимост			(седмици)	482.4)	
Не	30	33.7%	Починали	40	44.4%
Да	59	66.3%	Живи	50	55.6%
Източник на стволови клетки			Релас		
ПК	82	92.1%	Не	60	75.9%
КМ	7	7.9%	Да	19	24.1%
HLA съвместимост			aGVHD		
10/10	80	88.9%	Не	47	61.8%
9/10	4	4.4%	Да	29	38.2%
<9/10	6	6.7%	степен I-II	20	69.0%
HLA-DPB1 съвместимост			степен III-IV	9	31.0%
2/2	41	65.1%	cGVHD статус		
1/2	9	14.3%	Не	61	77.2%
0/2	13	20.6%	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%

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

II.1.2.1. HLA генотипизиране с ниска разграничителна способност

Използвахме **PCR-SSP метод** с кит Olerup SSP (Olerup SSP, Sweden) за определяне на основните алелни групи на HLA клас I и клас II локусите. За допълнително разграничаване на хетерозиготни алелни комбинации и определяне на индивидуални алели от дадена алелна група използвахме алел-специфични SSP праймери (Olerup SSP). След провеждане на електорфореза резултатите бяха интерпретирани въз основа на наличието на специфични амплификационни продукти. Анализът и интерпретацията на получените резултати бяха извършени ръчно чрез приложената в китовите и специфична за всеки лот номер информация и/или автоматично чрез софтуер SCORE (Helmsberg W.). Методът беше изпълняван съгласно съответната СОП на Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки, УМБАЛ „Александровска”.

II.1.2.2. HLA генотипизиране с висока разграничителна способност

Използвахме **PCR-SBT метод** с AlleleSEQR HLA секвенционен кит (Celera Corp., USA) за типизиране на HLA клас I и клас II локусите на алелно ниво. Методът използва две технологии: 1) локус-специфична PCR амплификация и 2) директно циклично секвениране с използване на флуоресцентно белязани терминаращи дидезоксинуклеотиди. Получените продукти се разделят електрофоретично на автоматичен ДНК секвенатор. За анализ и интерпретация на резултатите използвахме софтуер Assign SBT (Copexio Genomics, Australia). Методът беше изпълняван съгласно съответната СОП на Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки, УМБАЛ „Александровска”.

II.1.3. Изследване на химеризъм

PCR-STR метод

Методът се основава на идентификация на смесени ДНК проби, въз основа на къси тандемни повтори – STR локуси, комбинацията от които е уникална за всеки индивид. След амплификация се извършва гел-електрофореза за определяне на алелите според тяхната големина. Типизирането на STR локусите на всички индивиди, включени в дисертацията, беше извършено чрез търговски кит AmpFISTR Identifier PCR amplification (Life Technologies, USA). Китът използва мултиплексна PCR амплификация чрез локус-специфични праймери, маркирани с различни флуоресцентни багрила. Технологиията позволява едновременното

анализиране на 16 локуса, 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. За анализ на резултатите използвахме Gene Mapper софтуер (Life Technologies). Методът беше изпълняван съгласно съответната СОП на Клиника по клинична имунология с банка за стволони клетки, УМБАЛ „Александровска”.

Количествен real-time PCR метод

Методът се основава на детекцията на единични нуклеотидни полиморфизми (SNP), които се откриват само при донора или само при реципиента. За изследване на химеризма използвахме AlleleSEQR Chimerism кит (Celera Corp.), който 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, при който се амплифицират всички 34 маркера и се определят информативните SNPs и 2) количествено определяне на съотношението между двата генетични профила. За анализ на резултатите използвахме софтуер 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. 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 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 или Bonferroni 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 с цензурирани събития за изхода от аlogenна ТХСК, използвахме статистическите техники Life tables, Kaplan-Meier (log rank) и Cox регресионен анализ.

При разработването на Excel-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 ОБСЪЖДАНЕ

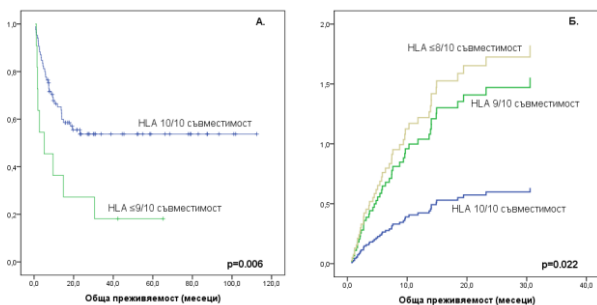
РАЗДЕЛ I. ПРЕДТРАНСПЛАНТАЦИОННИ ФАКТОРИ, ОКАЗВАЩИ ВЛИЯНИЕ ВЪРХУ ИЗХОДА ОТ ТХСК

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

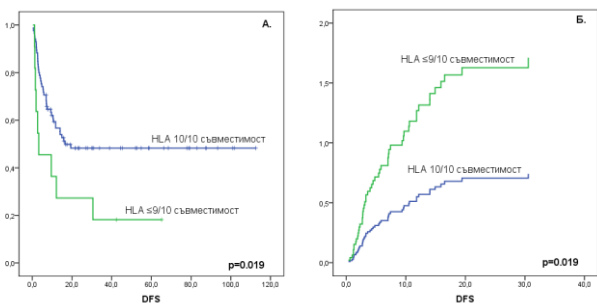
В изследваната група при 10 болни трансплантацията е била от несъвместим донор – 5 трансплантации с 1 HLA несъвместимост, 4 - с две и 1 - с 3 несъвместими алела (MM). Медианата на периода на проследяване е 14.9 месеца (0.6 – 112.6). Всички 10 HLA несъвместими ало-СКТ са извършени в групата на пациентите с малигнени неоплазии, поради което усяхме да проучим ролята на HLA само в тази група. 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 MM и $HR=2.88$ (95% CI = 1.13 – 7.36; $P=0.027$) за ≥ 2 MM (фиг. 1/Б). Поради наблюдаваното еднакво влияние върху OS в последващите анализи, обединихме двете групи в една обща - $\leq 9/10$ 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. 1/А), а рискът – $HR=2.68$ (95% CI = 1.29 – 5.56, $P=0.008$).

Смъртността през първата година е 36% при 10/10 ало-СКТ в сравнение с 64% при $\leq 9/10$. До края на втората година смъртността достига 48% при 10/10 и 73% при $\leq 9/10$ трансплантаците.

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. 2). След края на втората година DFS е 47% при 10/10 групата и 27% - при $\leq 9/10$ групата. Влиянието на HLA съвместимостта е по-слабо изразено по отношение на несвързаната с рецидив смъртност. Полиморфизми извън клинично значимите втори (клас I и клас II) и трети (клас I) екзони изглежда не оказват влияние върху изхода от ало-СКТ.



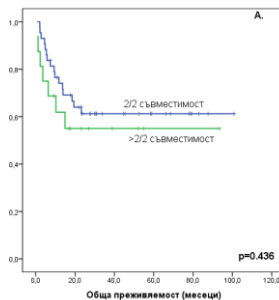
Фигура 1. А/ Влияние на несъвместимостите върху общата преживяемост. Б/ Кумулативен риск от настъпване на летален изход в зависимост от броя несъвместимости по HLA.



Фигура 2. А/ Влияние на несъвместимостите върху DFS. Б/ Кумулативен риск от настъпване на събитие (летален изход или релапс) в зависимост от HLA съвместимостта.

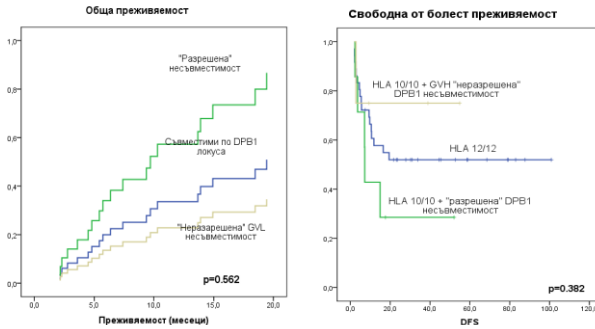
I.2. Роля на съвместимостта по HLA-DPB1 локуса

Анализирахме ролята на DPB1 локуса в групата на HLA 10/10 съвместимите трансплантации, за да изключим влиянието на допълнителните несъвместимости в HLA-A, -B, -C, -DRB1 и -DQB1 локусите. Интересен резултат се получи при анализа на общата преживяемост – трансплантациите от напълно несъвместими по HLA-DPB1 локуса донори (0/2 съвместимост) показват много по-добра преживяемост от тези с една алелна или антигенна несъвместимост (1/2; $P=0.021$). 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. 3). Добавянето на етапа на болестта, като кофактор в анализа не оказва влияние върху оценката на ролята на HLA-DPB1 локуса.



Фигура 3. Влияние на несъвместимостите по HLA-DPB1 локуса върху OS.

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. Анализът показва, 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. 4).



Фигура 4. Антитуморен ефект на несъвместимостите по HLA-DPB1 локуса.

Въпреки това се наблюдава тенденция към по-добра обща преживяемост и DFS при HLA 10/10 с GVH „неразрешена” несъвместимост (фиг. 4).

1.3. Роля на не-имуногенетични фактори

Направихме индивидуална оценка на някои не-имуногенетични фактори, като изключихме влиянието на HLA съвместимостта.

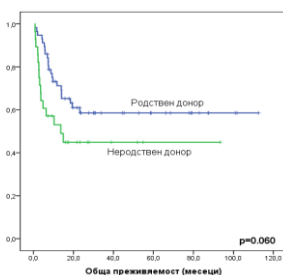
В изследваната група пациенти видът първично заболяване – малигнено или немалигнено, показва сходна OS, DFS и NRM. Направихме оценка на преживяемостта и при отделните заболявания, като отделихме двете основни групи пациенти – тези с ОЛЛ и тези с ОМЛ. Анализът отново не показва статистически значими различия.

По отношение на вида донор наблюдавахме гранично ниво на достоверност – пациентите 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. 5). Видът донор изглежда не оказва влияние върху NRM ($P=0.391$) и DFS ($P=0.116$).

Пациентите, трансплантирани от полово несъвместим донор, имат 2-годишна обща преживяемост $66.5 \pm 9.2\%$, докато при тези с ало-СКТ от полово съвместим донор 2-годишната OS е по-ниска – $48.4 \pm 7.1\%$ ($P=0.206$). Резултатите не са сигнификантни и по отношение на DFS и NRM. 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: $P=0.624$).

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). 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. 6/A1.). При пациенти с хематологични неоплазии,

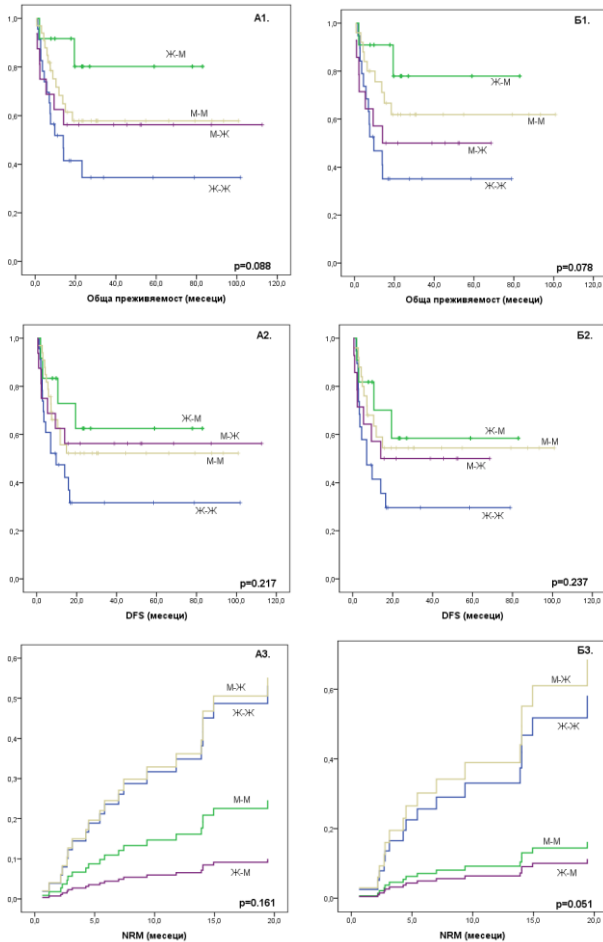


Фигура 5. Обща преживяемост според вида донор.

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. 6/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. 6/A2. и Б2.).

При оценка на кумулативния риск за несвързаната с релапс смъртност нито една от двойките и в двете групи не показва значими различия с някоя от останалите двойки (фиг. 6/A3. и Б3.).



Фигура 6. Влияние на вида полова съвместимост при HLA 10/10 съвместими ало-TXCK (А.) и при HLA 10/10 съвместими ало-TXCK на пациенти с хематологични неоплазии (Б.) за OS (A1.и B1.), DFS (A2.и B2.) и кумулативен риск за NRM (A3.и B3.).

Направихме оценка на адитивния ефект на различните предтрансплантационни фактори върху лечението на хематологичните неоплазии чрез аlogenна TXCK. 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 $\leq 9/10$). Чрез стъпково добавяне на различни параметри като кофактори в регресионния анализ, направихме по-точна оценка на ролята на HLA съвместимостта, 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 добавянето на вида клетки и половата съвместимост този риск постепенно се увеличава и достига HR=3.77 (95% CI = 1.59 – 8.94; P=0.003). Включването в анализа на вида донор и времето на трансплантация не носи статистическа достоверност за анализа и понижава крайната оценка на останалите фактори. Подробна разбивка на влиянието на различните кофактори е показана в табл. 2.

Аналогични са данните за свободната от болест преживяемост - добавянето на вида полова съвместимост като втори кофактор заедно с източника на стволови клетки в анализа силно повлиява оценката за ролята на HLA – HR=2.77 (95% CI = 1.2 – 6.38; P=0.017). 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. 3, а графиката от фиг. 7 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.

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.

I.4. Обсъждане

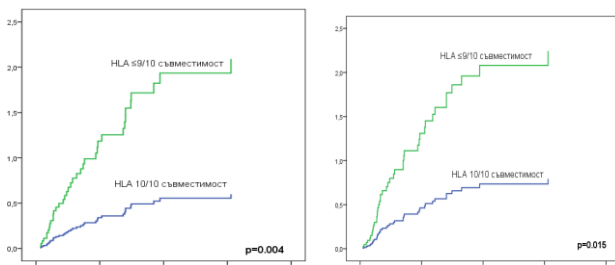
С наредъка в науката списъкът на заболяванията, лечими чрез алогенната трансплантация на хематопоеични стволови клетки, става все по-дълъг. Докато за някои неоплазии този вид терапия се прилага само след

Таблица 2. Комплексна оценка на различните предтрансплантационни фактори за общата преживяемост.

	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

Таблица 3. Комплексна оценка на различните предтрансплантационни фактори за свободната от болест преживяемост.

	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 7. Комплексна оценка на кумулативния риск за OS и DFS в зависимост от HLA съвместимостта.

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 хематопоеични 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. 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 $\leq 9/10$ ТХСК се случват преди третия месец, докато при съвместимите това става около шестия месец.

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. 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 несъвместим (<2/2) донор.

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. Това откритие послужи за разработването на модел, който да идентифицира наличието на „неразрешени“ несъвместимости на база на наличието на различни Т-клетъчни епитопи. Използвахме този модел, за да определим вида HLA-DPB1 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. В изследваната група пациенти етапът на болестта не оказва влияние върху изхода от трансплантацията и не променя оценката на съвместимостта по HLA-DPB1 локуса. Поради ниския брой на трансплантациите с несъвместимост по DP 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.

В изследваната група не установихме зависимост между първичното заболяване или вида донор и изхода от ало-СКТ. Сравняването на преживяемостта според вида донор показва 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 показва, 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 оказват влияние върху GvHD, релапс и общата преживяемост. 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. Установено е наличието на антитела срещу поне един H-Y при трансплантирани пациенти, както и в здрави жени. 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 трябва 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 вероятно ще е в полза на GvHD. Високата обща преживяемост в групата на Ж-М ало-СКТ можем да отдадем по-скоро на останалите mHAgs, както и на наблюдаваната по-ниска заболяемост 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. Последното важи и за донор жена, която не е забременявала. Обратно, при трансплантациите 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. 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. С присадката - периферна кръв или костен мозък, пасивно се прехвърлят и имунокомпетентни В лимфоцити, които могат да се диференцират в антитяло продуциращи плазматични клетки. 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. 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 неklasическите 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 алоенсибилизация.

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 \leq 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. Комплексната оценка на факторите, влияещи върху изхода от ало-СКТ, показва 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 показваха, 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

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 трансплантацията 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. 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%. Процентът донорна химера беше изчислен, както на базата на площта на пиковите (A), така и на тяхната височина (H). Допълнително изчислихме аналитичната откриваемост чрез метода *rescovery* (добавено/намерено). Средните стойности на получените резултати бяха сравнени чрез T-критерий на Стюдънт.

Разрежданията с нисък процент на втория генетичен профил (99.5% и 99% донорна химера) показаха много близки стойности, както между четирите отделни групи (средно $SD=0.8$ и при двете разреждания), така и между двата подхода за неговото изчисляване (A=99.1% и 98.7%, H=99.2% и 98.8%). Не всички локуси успяха да засекат наличието на второстепенните пикове, но всички групи дадоха положителни стойности.

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% (H) и 0.3% (A). Тук вече всички локуси са засекли наличието на втора ДНК, като средните стойности за четирите групи са в границите 88.2% - 93.9%.

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%.

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 ($r=0.999$). Параметърът, който се използва при изчисленията – височина или площ на пиковите, също не показва съществена разлика ($P=0.99$).

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. 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.

Представяне на кита в клинични проби

От анализиранияте 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. 8). Най-ниският процент, който беше определен в локус, е 44.8, а най-високият – 59, което значително се различава от истинската стойност. Тази разлика от над 10% относителна грешка се компенсира от останалите локуси и наблюдавания химеризъм в пациентите е $51.4 \pm 0.9\%$. 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. Най-близки стойности показват 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, 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%.

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

Таблица 4. Алелни комбинации, които позволяват изчисляване на резултат

Случай	Пик 1	Пик 2	Пик 3	Пик 4	Информативност
1	<i>D1</i>	<i>D2</i>	<i>P1</i>	<i>P2</i>	<i>ДА</i>
2	<i>D1</i>	<i>P1</i>	<i>D2+P2</i>	-	<i>ДА</i>
3	<i>D1+D2</i>	<i>P1</i>	<i>P2</i>	-	<i>ДА</i>
4	<i>D1</i>	<i>P1+P2</i>	<i>D2</i>	-	<i>ДА</i>
5	<i>D1+D2</i>	<i>P1+P2</i>	-	-	<i>ДА</i>
6	<i>D1</i>	<i>D2+P1+P2</i>	-	-	<i>НЕ</i>
7	<i>D1+D1+P1</i>	<i>P2</i>	-	-	<i>НЕ</i>

реципиента могат да се отграничат един от друг и не си влияят взаимно, чрез своите прищъпвания. Приемливите комбинации са показани в табл. 4. Нашата практика показва, че при химеризъм над 40% прищъпванията не оказват влияние и могат да се използват в изчисляването на резултата.

П.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 $D1=D2$ и $P1=P2$ (фиг. 19).

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

където $A = P1+D1$, $B = P2+D2$, а B е по-голямата стойност от A и B . На B 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 пиковите 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 (A) и средната стойност за пробата (B):

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

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 пиковите, може да покаже приемливи стойности на двата параметъра при условие, че грешките са балансирани.

П.1.2.4. Алгоритъм за оценка на резултатите

Индивидуалните параметри за оценка на резултата се разглеждат в определен ред – CV, LE и ME (фиг. 8). 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 5. 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 5. Критерии за приемане на резултата от изследването

<i>Химеризъм</i>	<i>CV</i>	<i>%LE</i>	<i>%ME</i>
<70%	<10%	<10%	<15%
>70%	<5%	<5%	<10%

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

II.1.1.1. 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.

II.1.2. 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 (BOK). Средният брой информативни SNP при реципиентите е 6, а при донорите – 4.

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 показва 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 – RQ-PCR и PCR-STR, влизат в определените граници (табл. 6). 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%.

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%. Използвахме две проби – P2 и P10, с ниско качество на екстрахираната ДНК и концентрация $<10\text{ng}/\mu\text{l}$, 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.

II.1.3. Обсъждане

Алогенната трансплантация на хематопоетични стволови клетки създава динамична химера, чието проследяване се е превърнало във важен компонент на следтрансплантационния мониторинг на пациентите. 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 дискуссионен, относителните промени в кинетиката на заселването са сигурен предвестник за приемането или отхвърлянето на присадката. Различните количествени и полуколичествени 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.



Фигура 8. Алгоритъм за оценка на резултатите от PCR-STR платформата

Таблица 6. Сравняване на резултатите от двата метода с консенсусните резултати от ВОК схемата.

Проба	PCR-STR	RQ-PCR	ВОК	
			% 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%**

* $\pm 2 SD$

** $2,5^{mu}$ - $97,5^{mu}$ перцентил

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. 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. 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 Маррег софтуера и определяне на информативните локуси. Приложението автоматично изчислява различните параметри, прави качествен контрол по заложили 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. 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. 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 показва и много добра възпроизводимост, като при оценените 215 локуса, разпределени в 24 пациента, стойността на изчисления химеризъм е $51.4 \pm 0.9\%$.

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 резултати 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

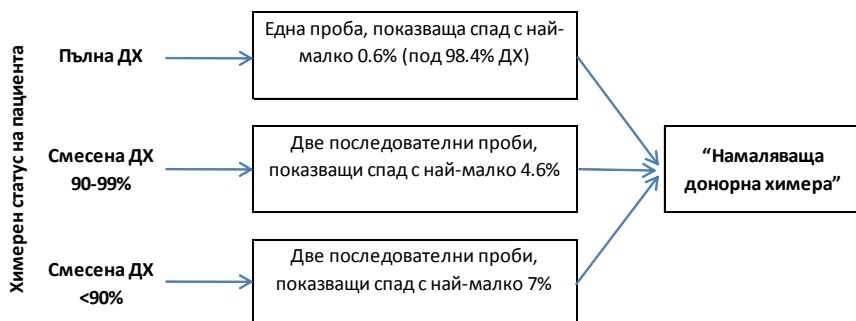
Много проучвания засягат значението на проследяването на химеризма след алогенна ТХСК, но резултатите са противоречиви. Изследването му при пациенти с МА кондициониране се смята за ниско информативно и ненужно, тъй като се разчита, че агресивната предтрансплантационна подготовка на пациентните води до 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 ТВ1 (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-прецизна 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 $\geq 99\%$. 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 $\geq 99\%$), са класифицирани в група „От смесена към ПДХ” (n=26); пациентите, които имат смесен ДХ през целия период на проследяване, са класифицирани 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 $\geq 99\%$ 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 взема под внимание единичните промени в химерния статус (фиг. 9). Ако при пациент с ПДХ е установена

дори една проба със спад в ДХ $\geq 0.6\%$ (до 98.4%), той попада в групата с „Намаляваща ДХ”. Ако пациент има ДХ $\geq 90\% < 99\%$ 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 флукуациите, дължащи се на представянето на платформата от реалните хематологични промени.



Фигура 9. Критерии за класификация на пациентите спрямо динамиката в химерния им профил.

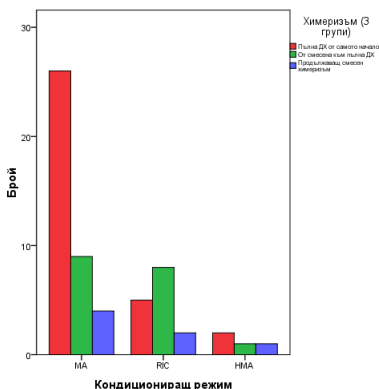
II.2.1. Роля на кондициониращия режим

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).

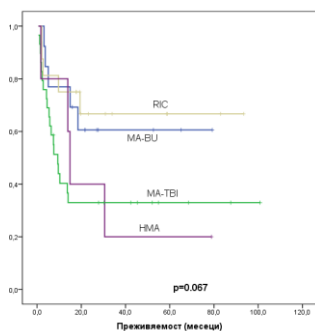
В групата на МА само 10.3% не са успели да достигнат пълен донорен химеризъм, сравнено с 13.3% от пациентите с RIC и 25% от тези с НМА (фиг. 10). Като цяло трите кондициониращи режима показват малко различия помежду си, относно следтрансплантационния профил на химеризма – по-голям процент от пациентите 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 наблюдавани 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 ТВ1. Оказа се, че пациентите на които е даван ВU 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 ТВІ (126 ± 85.6 дена; обхват 47 - 270; $P=0.032$).

Изследвахме влиянието на предтрансплантационната подготовка на пациентите върху тяхната преживяемост, като



Фигура 10. Наблюдаван химеризъм според използвания протокол за кондициониране



Фигура 11. Роля на кондициониращия режим върху преживяемостта

резултатите показаха различие между отделните протоколи ($P=0.067$; фиг. 11). 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-TBI. След края на втората година процентите са съответно 40%, 59%, 67% и 33%. Ниската преживяемост при пациентите, кондиционирани с ТВІ, 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.

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 показва 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).

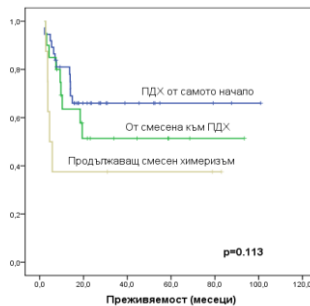
II.2.2. Роля на проследяването на нивата на химеризма

Вида заболяване – малигнено или немалигнено, показва много различен профил по отношение на наблюдавания химеризъм ($P<0.000$). Поради тази причина последващите анализи, отнасящи се до значението на мониторинга на ДХ са извършени в групата на пациентите, диагностицирани със злокачествено заболяване ($n=78$). Допълнително е отчетено и влиянието на HLA системата, като оценката на химеризма е оценено и в групата на HLA 10/10 съвместимите трансплантации. 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 предтрансплантационни 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%) 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).



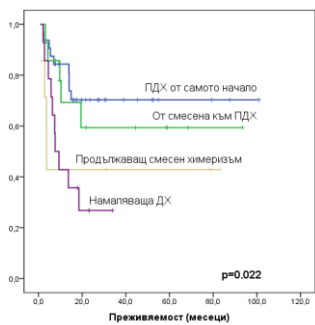
Фигура 12. Прогностична роля на статичните профили на химеризма спрямо преживяемостта.

II.2.2.2. Връзка на химеризма със следтрансплантационни събития

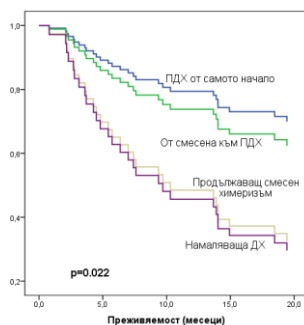
Използването на статичен профил на химеризма не показва сигнификантна връзка със следтрансплантационни събития като релапс (P=0.364), остра или хронична GvHD (P=0.706 и P=0.276, съответно), преживяемост (P=0.113; фиг. 12). Обратно, динамичният химерен профил се оказва силно предиктивен по отношение на 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. 13). 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, $P=0.057$; фиг. 14). 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.



Фигура 13. Прогностична роля на динамичните профили на химеризма спрямо преживяемостта.

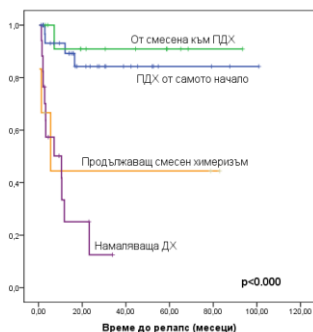


Фигура 14. Предиктивен модел за преживяемостта при отделните групи (“time-to-event” модел)

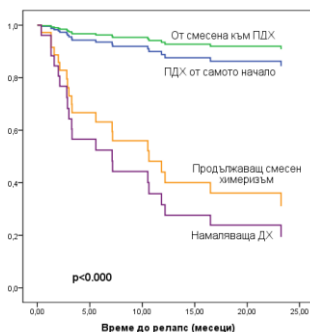
Единичните спадове на донорната химера са силно предиктивни и по отношение на релапс на първичното заболяване ($F=10.84$, $P<0.000$). Използвахме Bonferroni post hoc тест, за да специфицираме сигнификантните различия между групите. Анализът показва, че пациентите от групата „Намаляваща ДХ” силно се различават 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. 15 и 16)

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 15. Вероятност за релапс на болестта при различните профили на химеризъм.



Фигура 16. 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 7. Средният период, с който диагностицирането на спад в ДХ предхожда диагностицирането на релапс е 18 дена (6 – 26).

II.1.1. Обсъждане

Днес са разработени различни протоколи за подготвително 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. 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. Това до известна степен се потвърждава и от нашите резултати в групата на пациентите с хематологични неоплазии - при повечето пациенти НМА кондиционирането не се различава сигнификантно от МА и RIC по отношение на скоростта на заселване на присадката. Пълна ерадикация на лимфохематопоеичната 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,

Таблица 7. 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 <i>Aspergillus</i> 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% (ден 261)	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	

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

Установихме сигнификантна разлика между начина на аблация – ВU или ТВI 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. Пациентите с малигнено заболяване, които са кондиционирани с НМА, впоследствие са по-податливи на aGVHD.

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. Недостатък на този модел е, че не взема под внимание ролята на индивидуалните спадове, а разглежда информативността на химеризма спрямо статични групи, базирани 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. 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.

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.

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 нямаше 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 флукуации 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 висока пролиферативна способност в сравнение с нормалните клетки и бавно намаляващият донорен химеризъм може да е отражение на

пролиферация на нормални хематопоеични клетки на гостоприемника, а не на злокачествени такива.

Границите между различните предтрансплантационни подготвителни протоколи са неясни и е трудно да се разграничат пострасплантационните последствия и да се предвиди хода на възстановяването на имунната система. Въпреки ретроспективния характер на нашето изследване, малкият 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 тестват 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 хематопоеични 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 $\beta 2$ 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 сенсibiliзиращи 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 контактира с общоприетото мнение, че ПК води до по-висока заболяемост 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 Identifier 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 ретроспективния 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 хематопоеични 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 флукуациите 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 хематопоеични 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, подпомогнаха изработването на алгоритъм за намиране на подходящ донор.
4. В настоящата работа за пръв път у нас е направената 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 надежността 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).

Публикации, свързани с темата на дисертационния труд:

1. Върбанова В., Михайлов Г., Михайлова Сн., Иванова М., Георгиева А., **Луканов Цв.**, Наумова Е., Михайлова А., Ганева П., Арнаудов Г., Лозенов С., Тошков С., Селекция на донор за алогенна трансплантация на хемопоеични стволови клетки и роля на HLA за терапевтичния изход. Клинична хематология, 2014, L (1-2): 23-30.
2. **Луканов Цв.**, Наумова Е., Място на анализа на химеризъм при ТХСК. Медицински преглед, 2015, 51(1): 15-19
3. **Луканов Цв.**, Наумова Е., Имунгенетични маркери - роля при ТХСК. Клинична хематология, 2015, под печат.
4. **Lukanov Ts.**, Shivarova-Ivanova M., Naumova E., Chimerism Analysis after Allogeneic Stem Cell Transplantation: Quantitative real-time or Short Tandem Repeat PCR? Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci, 2015, 68(4): 521-528.

Участия в научни проекти, свързани с темата на дисертационния труд:

Грант 2011, Медицински Университет София, секция Млад изследовател – Договор № 20-Д/2011г. „Проучване на информативността на ДНК методи за изследване на химеризъм при трансплантация на хемопоеични стволови клетки”, МУ-София 2011, водещ изследовател Цветелин Иванов Луканов и базова организация Медицински факултет, Катедра по Клинична лаборатория и клинична имунология, УМБАЛ „Александровска” ЕАД.

Участия в конгреси и научни прояви, свързани с темата на дисертационния труд:

1. **Lukanov Ts.** et al., Does Level of Chimerism Predict Graft Rejection and Graft Failure in HSCT - Single Centre Experience? 37th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, 3-6.04.2011, Paris, France (постер).
2. **Lukanov Ts.** et al., The Impact of Chimerism Analysis for the Evaluation of HSCT Outcome – Single Centre Experience. 25th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, 4-7.05.2011, Prague, The Czech Republic. *Tissue Antigens*, 2011, 77(5): p.406, P25 (постер).
3. Naumova E., **Lukanov Ts.** et al., The Impact of chimerism analysis for the evaluation of HSCT – our experience. EFI-Workshop: “Updates in Immunogenetics and Histocompatibility”, 2-3.12.2011, Bucharest, Romania (доклад).
4. Ivanova M., **Lukanov Tz.** et al., How rare are “rare alleles” in the Bulgarian Bone Marrow Donor Registry? Joint 16th International HLA and Immunogenetics Workshop. 26th European Federation for Immunogenetics Conference and 23rd British Society of Histocompatibility and Immunogenetics Conference, 31.05-03.06 2012, Liverpool, U.K. *Tissue Antigens*, 2012, 79(6): p.557, P304 (постер).
5. **Lukanov Ts.** et al., How to choose the most suitable method for chimerism analysis? The 27th EFI European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, 11-14.05.2013, Maastricht, the Netherlands. *Tissue Antigens*, 2013, 81(5), P38 (постер).
6. Ivanova M., **Lukanov Ts.** et al., Is a special donor search required for patients with rare HLA alleles? The 27th EFI European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, 11-14.05.2013, Maastricht, the Netherlands. *Tissue Antigens*, 2013, 81(5), P8 (постер).
7. Varbanova V., Georgieva A., **Lukanov Ts.** et al., Influence of donor and recipient KIR and HLA class I ligand gene polymorphism on allogeneic hematopoietic stem cell transplantation outcome. The 27th EFI European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, 11-14.05.2013, Maastricht, the Netherlands. *Tissue Antigens*, 2013, 81(5), P30 (постер).

8. **Lukanov Ts.** et al., How to get EFI accreditation for Haematopoietic Chimaerism and Engraftment Monitoring. Annual EFI Region 8 EPT Meeting, 30.11.2013, Belgrade, Serbia (доклад).
9. Atanasova V., Atanasova M., Slavov S., Nikolov A., **Lukanov Ts.** et al., Development of Cord Blood Banking in Bulgaria. Annual EFI Region 8 EPT Meeting, 30.11.2013, Belgrade, Serbia (доклад).
10. **Lukanov Ts.** et al., HLA Compatibility and Chimerism Analysis as Important Tools for Post-Hematopoietic Stem Cell transplantation. 28th European Federation for Immunogenetics Conference, 25-28.06.2014, Stockholm, Sweden. Tissue Antigens, 2014, 84(5): p.38, P3 (постер).
11. **Lukanov Ts.** et al., The role of HLA-DPB1 and donor chimerism in hematopoietic stem cell transplantation outcome. 4th National Congress of Immunology, 2-5.10.2014, Varna, Bulgaria (доклад).
12. Quin L., Ivanova M., Atanasova V., **Lukanov Ts.**, et al. Activities of the National Bone Marrow Donor Registry and Cord Blood Bank. 4th National Congress of Immunology, 2-5.10.2014, Varna, Bulgaria (постер).
13. **Луканов Цв.**, Акредитация по категория “Мониториране на хематопоеитичен химеризъм”. 9-та Конференция за оценка на качеството в имунологията, 11.12.2014, София, България (доклад).
14. Varbanova V., Mihaylova A., Ivanova M., **Lukanov Tz.** et al., The Inherited Repertoire of KIRs and HLA Ligands may be Relevant to Leukemia Pathogenesis. 29th European Federation for Immunogenetics Conference, 26-29.04.2015, Geneva, Switzerland. Tissue Antigens 85(5): p.322, O58 (доклад).
15. **Lukanov Ts.** et al., Individual drop-downs in the chimerism status after allogeneic HSCT are predictive for disease relapse and mortality in patients with hematological malignancies. 29th European Federation for Immunogenetics Conference, 26-29.04.2015, Geneva, Switzerland. Tissue Antigens 85(5): p.314, O37 (доклад).