

МЯСТОТО НА АНАЛИЗА НА ХИМЕРИЗЪМ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИЯТА НА ХЕМОПОЕТИЧНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ

Цв. Луканов и Е. Наумова

Клиника по клинична имунология, УМБАЛ „Александровска“ – София

THE ROLE OF CHIMERISM ANALYSIS IN HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

Ts. Lukanov and E. Naumova

Department of Clinical Immunology, University Hospital „Aleksandrovska“ – Sofia

<p>Резюме:</p> <p>Ключови думи:</p> <p>Адрес за кореспонденция:</p>	<p>В периода след трансплантацията на хематопоетични стволови клетки едно от най-важните събития е възстановяването на имунната система – процес, който се характеризира със значима динамика и по време на който пациентите са изложени на различни животозастрашаващи събития. В този литературен обзор разглеждаме нивата на химеризъм спрямо различните видове кондициониращи режими и вида на заболяването. Дискутираме и ролята на изследването на донорната химера за изготвянето на стратегии за следтрансплантационно лечение на пациентите и подпомагане на ранната диагностика на събития като GVHD, минимална резидуална болест, отхвърляне на присадката или нейното нефункциониране, релапс на болестта.</p> <p>химеризъм, алогенна трансплантация на хематопоетични стволови клетки, GVHD, релапс</p> <p><i>Д-р Цветелин Луканов, Клиника по клинична имунология, УМБАЛ „Александровска“, ул. „Св. Г. Софийски“ № 1, 1431 София, тел. 02 9230-690, GSM: 0886-86-96-20</i></p>
<p>Summary:</p> <p>Key words:</p> <p>Address for correspondence:</p>	<p>One of the most important events in the post-hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is the immune system restoration – a process characterized by a considerable dynamics. During this period patients are exposed to different life-threatening complications. In this review article we consider chimerism levels in relation to the conditioning regimens and disease type. Furthermore the predictive role of chimerism analysis as an important method in monitoring the early diagnosis of GVHD, MRD, graft failure or rejection, and disease relapse has been discussed.</p> <p>chimerism, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, GVHD, relapse</p> <p><i>Tsvetelin Lukanov, M.D., Clinic of Clinical Immunology, University Hospital „Aleksandrovska“, 1, Sv. G. Sofiyski St., Bg – 1431 Sofia, tel. +359 2 9230-690, GSM: +359 886-86-96-20</i></p>

През март 1969 г. проф. Е. Thomas заедно със своя екип извършват първата трансплантация на хемопоетични стволови клетки (ТХСК). Оттогава трансплантацията на костен мозък и периферни стволови клетки се е превърнала в рутинен метод за лечение на редица малигнени и немалигнени хематологични заболявания. Алогенната трансплантация на стволови клетки

е ефективна при възстановяването на нормалната хемопоеза и е предпочитан терапевтичен метод при злокачествените болести на кръвта. Периодът след заселването на стволовите клетки на донора в костния мозък на реципиента може да продължи месеци до години. Най-важното през това време е възстановяването на имунната система и предпазването от реакция

на присадката срещу гостоприемника. Всеки етап от трансплантационния процес потенциално излага пациента на компликации и животозастрашаващи събития, като много фактори, свързани с донора, реципиента, болестта и процеса на трансплантация могат да повлияят възникването и тежестта на последващите усложнения. Възстановяването на хемопоезата зависи главно от възможността донорните хемопоетични 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 хемопоезата се дължи на присадените донорни клетки и каква част – на собствените клетки на пациента. Определянето на генетичния ѝ произход се нарича изследване на химеризъм. Терминът „химера” е въведен в медицината за първи път от D. Anderson и сътр. [1] през 1951 г., а в областта на трансплантологията – от C. Ford [2] през 1956 г. Използва се за лица, които имат клетъчни популации, произхождащи от различни индивиди от същия или различен вид, които възникват инцидентно при бременност или кръвопреливания, или целево при трансплантация на тъкани, органи и клетки. Съвместното съществуване на клетки от два различни организма в едно тяло се обозначава с термина „химеризъм”.

Химеризмът е важен индикатор за рецидив на болестта, отхвърляне на присадката, минимална резидуална болест (МРБ) или реакция на присадката срещу гостоприемника (Graft vs. Host Disease – GvHD). Проследяването му подпомага свързаната с риска имунотерапия при профилактиката и интервенционалното лечение на GvHD или предстоящ релапс. Наличието на персистиращи или новопоявяващи се клетки на реципиента може да означава оцелели левкемични клетки, които да доведат до повторно възникване на малигнен клон чрез инхибиране на имунокомпетентните донорни клетки. По тази причина точното определяне нивата на химеризъм в кръвта или костния мозък на пациента предоставя критична информация за степента на заселване и спомага за по-адекватното лечение на реципиентите. Първоначално се е смятало, че пълната донорна хемопоеза е от съществено значение за оцеляване на присадката след алогенна трансплантация на стволови клетки, но през последните години стана ясно, че следтрансплантационният химеризъм е динамичен процес и пациенти с пълнен химеризъм

(донорни клетки > 99%) в даден период след трансплантацията, могат впоследствие да развият смесен химеризъм и обратното – пациенти със смесен могат да развият пълнен химеризъм.

ВРЪЗКА МЕЖДУ ХИМЕРИЗМА И РАЗЛИЧНИТЕ ТЕРАПЕВТИЧНИ СТРАТЕГИИ

Традиционният миелоаблативен подход включва токсична химиотерапия преди трансплантацията. За да се избегне миелоаблацията и да се постигнат по-добри резултати от ТХСК, е разработен немиелоаблативен подход, който включва супресия на реакцията на гостоприемника срещу присадката и подобряване на антилевкемичния ефект (Graft vs. Leukemia – GVL) за сметка на по-силна GVHD. Без значение от вида на терапията преди трансплантация, изследването на химеризма е от важно значение за следтрансплантационното проследяване на процеса на заселване на присадката и манипулирането му чрез инфузия на донорни лимфоцити или промяна на имуносупресията.

Агресивната предтрансплантационна терапия осигурява добра ефективност срещу заболяването, но използването ѝ е ограничено до по-млади и по-здрави пациенти, които биха могли да понесат съпътстващата лечение токсичност. Подготвителните схеми за миелоаблативно кондициониране (myeloablative conditioning – MAC) служат за улесняване на нормалната хемопоетична реконституция с пълнен лимфоцитен химеризъм към 30-ия ден след ТХСК. При неманипулираните присадки анализът на химеризма показва предимно пълна донорна химера, като ранното ѝ установяване може да е индикация за GVHD. Обратно, при трансплантации с Т-клетъчно изчерпан костен мозък се наблюдава смесен химеризъм. Изследване на колектив от Северна Америка показва значително повишен риск от развитие на остра или хронична GVHD при пациенти, които достигат нива на донорен химеризъм в Т-клетките > 90% (HR = 1.92, P = 0.08 и HR = 2.26, P = 0.07, съответно) [7].

ОЦЕНКА НА ХИМЕРИЗМА ПРИ НЕМИЕЛОАБЛАТИВНИ ТХСК

За разлика от алогенната трансплантация след миелоаблативно кондициониране, немиелоаблативната подготовка (reduced intensity conditioning – RIC) първоначално води до смесен химеризъм. Също така вероятността за развитие на остра GVHD е по-ниска, докато при хронична-

та GVHD реакция резултатите са съпоставими между различните протоколи за кондициониране. Смесеният химеризъм не означава непременно лоша прогноза, но неговата продължителност може да увеличи риска от рецидив. Изследване на екип от Центъра за изследване на рак „Fred Hutchinson”, САЩ ($n = 459$) показва по-висок риск от остра GVHD и смъртен изход без рецидив при пациенти с неутропения. Обратно, високият брой лимфоцити непосредствено преди трансплантация се свързва с намален риск от рецидив и добра цялостна преживяемост [11].

Комбинацията от предтрансплантационното кондициониране с нисък интензитет и първоначалния смесен химеризъм благоприятства възникването на толеранс между реципиента и присадката. Това от своя страна води до относително намалена честота и тежест на острата GVHD. При някои пациенти се наблюдава късно настъпване на остра GVHD, което съвпада с преминаването от смесена към пълна донорна химера в Т-лимфоцитите. Ако пациентът не развие GVHD, може да се извърши инфузия на донорни лимфоцити, които да доведат до пълен химеризъм, поради GVL ефекта. Затова при немиелоаблативните ТХСК е важно да се следи развитието на химеризма, за да се направи правилна преценка за необходимостта и времето на инфузията на донорни лимфоцити, както и да се следи ефектът от нея. Наличието на смесен химеризъм се свързва с подобрена преживяемост, като това наблюдение може да се обясни с персистиращите клетки на реципиента, които се свързват с участие в защитата от инфекции и цялостната преживяемост [6, 8, 10]. Нивата на химеризъм се различават в отделните клетъчни линии. Левкоцитните субпопулации се характеризират с разнородна динамика при възстановяването на хемопоезата и имат различно влияние в следтрансплантационния период. Така например нивата на донорната химера в гранулоцитите и моноцитите имат по-ниска информативна стойност по отношение на отхвърлянето на присадката, докато нивата на Т- и NK клетките пряко корелират с повишен риск от отхвърляне на присадката (ниски нива), остра GVHD, антитуморен отговор и преживяемост без прогресия на заболяването (високи нива). В изследване на Z. Y. Lim и колектив бързата конверсия към пълен донорен химеризъм се свързва с намалена обща преживяемост (43.5% спрямо 69.7%, $p < 0.03$), свободна от болест преживяемост (disease free survival – DFS; 43.7% спрямо 65.4%, $p < 0.03$) и повишена смъртност, свързана с трансплантацията (transplant related mortality; TRM) (37.2% спрямо 8.7%, $p < 0.01$) в

сравнение с наличието на смесен химеризъм. Не е установена разлика в честотата на релапс на болестта [6]. Пациенти с нисък абсолютен брой на дендритните клетки (DC) 1 месец след ТХСК имат по-висока TRM (60% спрямо 12%, $p < 0.02$) и понижена обща преживяемост (15% спрямо 45%, $p < 0.002$) [12]. Освен това се наблюдава връзка между намаления брой на CD16+ DC и по-високата честота на смъртност от инфекции (50% срещу 0%, $p < 0.05$). Възможността самата инфекция да е допринесла за намаляване броя на тези клетки не се изключва от авторите [12].

ХИМЕРИЗЪМ ПРИ ВЪВЕЖДАНЕ НА ДОНОРНИ ЛИМФОЦИТИ

Инфузията на донорни лимфоцити (donor lymphocyte infusion – DLI) се прилага основно при немиелоаблативни, Т-клетъчно изчерпани миелоаблативни ТХСК или хаплоидентични трансплантации, поради нейния GVL ефект. При тези пациенти се наблюдава забавяне в имунната реконституция, което повишава риска от релапс на болестта. Приложението на стандартната DLI е ограничено от GVHD ефекта и аплазията. Разработени са нови протоколи, използващи G-CSF стимулирани перифернокръвни прогениторни клетки, алоизчерпани донорни Т-клетки и mHag-специфични CD8⁺ цитотоксични Т-лимфоцити, които позволяват по-широкото приложение на тази терапия. Важен момент за успеха от терапията е определянето на точното време за DLI. Профилактични дози DLI в ранните етапи на релапс се свързват с по-благоприятен изход [13, 14]. Това налага както често изследване на химеризъм, за да се установи наличието на хемопоеза от реципиента, така и разграничаването на малигнените клетки от немалигнените чрез изследване на МРБ. Допълнително е необходимо изследването на химеризъм след това, за да се следи ефектът от манипулацията. Въведените лимфоцити се сенсibiliзират от повърхностни антигени – асоциирани с левкемията, или полиморфни второстепенни трансплантационни антигени – експресирани от левкемичните клетки. Това води до трансформацията им в цитотоксични лимфоцити, които убиват раковите клетки. Въвеждането на донорни лимфоцити е най-ефективно при пациентите с хронична миелогенна левкемия (ХМЛ), което може да се обясни с антиген-представящите клетки, които са част от малигнените клонове. Този вид терапия е по-неефективен при пациенти с остри миелоидни левкемии (ОМЛ) или с множествен миелом.

ХИМЕРИЗЪМ ПРИ НЕМАЛИГНЕНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

В днешно време много голяма част от наследствените или придобитите немалигнени заболявания, като таласемия, апластична анемия, различни имунодефицити и други, са лечими чрез трансплантация на стволови клетки. При този род трансплантации целта е да се постигне стабилно заселване на присадката, която да осигури необходимата хемопоетична функция, ензимна активност или имунокомпетентност. Пациентите с немалигнени заболявания нямат нужда от GVL ефект. Поради тази причина постигането на пълна донорна химера не е задължително и съответно подготовката на реципиента често се извършва с немиелоаблативна терапия. Това води до по-честото наличие на смесен химеризъм и увеличава риска от отхвърляне на присадката, но намалява вероятността от развитие на GVHD. От друга страна, бързото развитие на пълен химеризъм в НК и Т-клетките благоприятства успешното заселване на присадката, но повишава риска от развитие на остра GVHD. В някои случаи пациентите могат да поддържат с години стабилен смесен химеризъм, без това да се отразява на клиничното им състояние. Наблюдават се значително по-големи флукуации при CD3⁺ клетките в сравнение със CD19⁺, което предполага CD3⁺ медиран отговор между клетки на донора и реципиента поради непълно премахване на клетките на реципиента при кондиционирането [10].

ХИМЕРИЗЪМ ПРИ МАЛИГНЕНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

При тази група пациенти е важно да се следят МРБ и нивата на химеризъм. Минималната резидуална болест се мониторира чрез изследване на пренарежданията в гените за Т-клетъчния рецептор или имуноглобулините (при острата лимфобластна левкемия – ОЛЛ) и фузионните иРНК транскрипти на В-клетъчния рецептор (BCR) и ABL (при ХМЛ), като се използва PCR технология. Молекулярните доказателства за остатъчни или появяващи се клетки на реципиента могат да са отражение на оцелели левкемични или здрави клетки на гостоприемника, или и на двете. Това може да доведе до възстановяването на малигнена клетъчна линия, като инхибира имунокомпетентните ефекторни клетки на донора.

Измерване на BCR-ABL1 при ХМЛ осигурява отличен модел за следене на МРБ в следтрансплантационния период. При ОМЛ и миелодиспластичния синдром (МДС) се полагат усилия за прехвърляне на вече съществуващи МРБ мар-

кери от консервативното лечение към следтрансплантационния мониторинг, но за голяма част от тези пациенти химеризмът, перифернокръвните показатели и костномозъчната цитоморфология остават единствените варианти за следене на болестта след ТХСК. При пациентите с ХМЛ възстановяването на хемопоетични клетки на реципиента в моноклеарната клетъчна фракция води до рецидив. Това от своя страна води до намален GVL ефект при тази група пациенти. Комбинацията от анализ на химеризма и BCR-ABL анализ за детекция на минимална резидуална болест е силно предиктивна за рецидив на болестта.

При ХЛЛ след трансплантация се наблюдава забавен отговор към болестта както при MAC, така и при RIC, като максимален отговор може да се наблюдава след 3 и повече месеци [3]. Алогенната ТХСК е ефективно терапевтично средство както за нискорисковите, така и за високорисковите ХЛЛ пациенти. Наличието на смесен химеризъм в Т-лимфоцитите на 90-ия ден и хеморефракторна болест се свързват с повишен риск от прогресия на заболяването [4]. Постигането на пълна донорна химера и липсата на МРБ се свързват с продължителна DFS [3]. Конверсията от смесен към пълен донорен химеризъм предхожда или се асоциира с началото на GVHD [6, 9, 15].

При пациентите с остри левкемии (ОМЛ и ОЛЛ) на по-голяма опасност са изложени тези с високи нива на резидуални клетки и/или бързо покачване на нивата на клетките на реципиента. Изследване на В. Wiedemann и кол. при пациенти с ОМЛ (n = 75) показва по-бързо постигане на пълен химеризъм при MAC в сравнение с RIC (92% срещу 54%, p = 0.001). Спадът в нивото на донорната химера се асоциира с релапс (p = 0.04) [15]. Мониторингът на нивото на експресия на WT1 и проследяването на кинетиката на несепарирания химеризъм и CD34⁺ клетките дават възможност за ранна диагностика на релапс при пациенти с МДС и ОМЛ. При пациенти, които не показват значителен спад в CD34⁺ клетките и поддържат ниво на WT1 експресия под определени граници, почти сигурно може да се изключи релапс на болестта в следващите 28 дни [5].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нивата на химеризма след ТХСК зависят от редица фактори, включително интензитета на предтрансплантационната терапия, използването на Т-клетъчно изчерпани присадки, броят на трансплантираните стволови клетки, чувствителността на използваната техника за откриване

и интервалът на изследване, както и видът на болестта.

Основната цел при следтрансплантационния мониторинг е ранната диагностика на нежелани събития. Поради динамичната природа на развитието на химеризъм, се предпочита изследването да се извършва на кратки интервали, особено в първите 1-2 месеца след трансплантация, когато рискът от рецидив или отхвърляне на присадката е най-голям. В най-ранния следтрансплантационен период наличието на персистиращ смесен химеризъм или изчезването на донорни алели се асоциира както с отхвърляне на присадката, така и с ранен релапс. От друга страна, нарастващият брой на клетки на реципиента в по-късните периоди след трансплантацията се асоциира с релапс или късно отхвърляне на алогرافта. Все още механизмите, които насочват възстановяването на хемопоезата в различни посоки – към смесена при едни пациенти или пълна донорна химера при други, не са напълно изяснени. Анализът на кинетиката на химеризма позволява ранна диференциация между липсата на заселване и забавянето му, както и ранна диагностика на пациенти с висок риск от развитие на GVHD или предразположени към рецидив. В този контекст изследването на химеризма без съмнение е важен метод за проследяване на изхода от ТХСК.

Библиография

1. Anderson, D. et al. The use of skin grafting to distinguish between monozygotic and dizygotic twins in cattle. – *Heredity*, **5**, 1951, 379-397.
2. Ford, C. Cytological identification of radiation-chimeras. – *Nature*, **177**, 1956, 452-454.
3. Hallek, M. et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. – *Blood*, **111**, 2008, 5446-5456.
4. Khouri, I. F. et al. Graft-versus-leukaemia effect after non-myeloablative haematopoietic transplantation can overcome the unfavourable expression of ZAP-70 in refractory chronic lymphocytic leukaemia. – *Br. J. Hematol.*, **137**, 2007, 355-363.
5. Lange, T et al. Monitoring of WT1 expression in PB and CD34(1) donor chimerism of BM predicts early relapse in AML and MDS patients after hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity conditioning. – *Leukemia*, **25**, 2011, 498-505.
6. Lim, Z. Y. et al. Delayed attainment of full donor chimerism following alemtuzumab-based reduced-intensity conditioning haematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndromes is associated with improved outcomes. – *Br. J. Hematol.*, **138**, 2007, 517-526.
7. Mickelson, D. M. et al. Comparison of donor chimerism following myeloablative and nonmyeloablative allogeneic hematopoietic SCT. – *Bone Marrow Transplant.*, **46**, 2011, 84-89.
8. Poutsika, D. D. et al. Blood stream infection (BSI) and acute GVHD after hematopoietic SCT (HSCT) are associated. – *Bone Marrow Transplant.*, **46**, 2011, 300-307.
9. Shaffer, B. C. et al. Rapid complete donor lymphoid chimerism and graft-versus-leukemia effect are important in early control of chronic lymphocytic leukemia. – *Exp. Hematol.*, **41**, 2013, № 9, 772-778.
10. Stikvoort, A. et al. Chimerism patterns of long-term stable mixed chimeras posthematopoietic stem cell transplantation in patients with nonmalignant diseases: follow-up of long-term stable mixed chimerism patients. – *Biol. Blood Marrow Transplant.*, **19**, 2013, № 5, 838-844.
11. Storb, R. et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation following minimal intensity conditioning: predicting acute graft-versus-host disease and graft-versus-tumor effects. – *Biol. Blood Marrow Transplant.*, **19**, 2013, № 5, 729-798.
12. Talar, C. et al. Kinetics of recovery of dendritic cell subsets after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation and clinical outcome. – *Haematologica*, **92**, 2007, 1655-1663.
13. Wang, Y. et al. Prevention of relapse using DLI can increase survival following HLA-identical transplantation in patients with advanced-stage acute leukemia: a multi-center study. – *Clin. Transplant.*, **26**, 2012, 635-643.
14. Wang, Y. et al. Prevention of relapse using granulocyte CSF-primed PBPCs following HLA-mismatched/haploidentical, T-cell-replete hematopoietic SCT in patients with advanced-stage acute leukemia: a retrospective risk-factor analysis. – *Bone Marrow Transplant.*, **47**, 2012, 1099-1104.
15. Wiedemann, B. et al. Chimerism studies with quantitative real-time PCR in stem cell recipients with acute myeloid leukemia. – *Exp. Hematol.*, **38**, 2010, 1261-1271.

Постъпил за печат на 17 декември 2014 г.