

Monitorowanie kinetyki zmian wczesnego chimeryzmu hematopoetycznego i charakterystyka wszczepienia molekularnego za pomocą metody STR-PCR u pacjentów poddanych alloHSCT

Early hematopoietic chimerism monitoring and molecular engraftment characteristic by STR-PCR method in patients after alloHSCT

Sylwia Czekalska, Beata Piątkowska-Jakubas, Tomasz Sacha, Magdalena Zawada, Izabela Florek, Dorota Link-Lenczowska, Aleksander B. Skotnicki

STRESZCZENIE

Allogeniczna transplantacja komórek hematopoetycznych jest jednym ze sposobów leczenia nowotworowych i nienowotworowych schorzeń hematologicznych. Po przeszczepieniu komórki hematopoetyczne dawcy osiedlają się w niszach szpikowych biorcy, co skutkuje powstaniem prawidłowego układu krwiotwórczego i immunologicznego o genotypie dawcy – całkowity chimeryzm dawcy. Wszczepienie molekularne (ME) poprzedza wystąpienie wszczepienia hematologicznego. Wczesna ocena chimeryzmu może mieć istotne znaczenie dla dalszego przebiegu procesu przyjmowania się przeszczepienia i warunkuje możliwość podjęcia wczesnej interwencji leczniczej.

Do badania włączono 38 pacjentów, u których wykonano 43 allogeniczne transplantacje (alloHSCT). Przyjmowanie się przeszczepu śledzono we krwi obwodowej od 2. do 14. doby po transplantacji, następnie w 21. i 28. dobie. W 30. dobie poziom chimeryzmu oznaczano we krwi obwodowej i w szpiku kostnym. Chimeryzm hematopoetyczny oceniano przy zastosowaniu metody molekularnej STR-PCR.

Wykazano, że zmiany poziomu chimeryzmu we wczesnym okresie po transplantacji w grupie pacjentów poddanych alloSCT (alloHSCT poprzedzona kondycjonowaniem mieloablacyjnym) przebiegają zgodnie z zależnością liniową ($R^2=0,996$), natomiast w grupie pacjentów poddanych alloNMSCT (alloHSCT poprzedzona kondycjonowaniem niemieloablacyjnym) są zgodne z zależnością logarytmiczną ($R^2=0,959$). Poziom chimeryzmu hematopoetycznego jest wyższy w grupie pacjentów poddanych alloSCT, w 2. dobie różnicę tę cechuje znamienność statystyczna ($p=0,0048$).

Wszczepienie molekularne poprzedza wystąpienie wszczepienia hematologicznego (pacjenci poddani alloSCT $p=1,44 \times 10^{-12}$, pacjenci poddani alloNMSCT $p=2,12 \times 10^{-6}$).

W grupach pacjentów poddanych alloSCT i alloHSCT, którzy otrzymali więcej niż 3×10^6 komórek CD34+/kg masy ciała różnica w czasie wystąpienia ME w porównaniu z grupą chorych, którzy otrzymali mniej niż 3×10^6 komórek CD34+/kg, była znamienna statystycznie (alloSCT $p=0,0013$, alloHSCT $p=0,021$).

Słowa kluczowe: wczesny chimeryzm hematopoetyczny, wszczepienie molekularne, STR-PCR

ABSTRACT

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloHSCT) is a curative treatment for proportion of patients suffering from malignant and non-malignant hematological disorders. Successful transplantation is a process that requires the engraftment of pluripotent hematopoietic stem cells which can re-establish normal hemopoiesis and immune system. Distinguishing between donor and host origin of bone marrow and blood cells is crucial for monitoring of engraftment process. One of the

© by Polskie Towarzystwo Hematologów
i Transfuzjologów
i Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Otrzymano: 24.10.2012
Zaakceptowano: 26.11.2012

Katedra Hematologii Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie
Kierownik: prof. dr hab. n. med Aleksander B. Skotnicki

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesu

Adres do korespondencji:
Sylwia Czekalska
Katedra Hematologii UJCM Kraków
ul. Kopernika 17
31-501 Kraków
szczekalska@gmail.com

Praca finansowana ze środków projektu statutowego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie nr K/ZDS/001506.

Praca uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie KBET/126/B/2009.

Acta
Haematologica
Polonica;
43 (4): 361–368

most useful tools for engraftment monitoring is the assessment of hematopoietic chimerism after alloSCT that describes the percentage of donor hematopoietic in a transplant recipient.

Thirty eight adult patients after alloHSCT were included into the study. In total 43 allogeneic stem cell transplantations were performed. Hematopoietic chimerism was assessed by STR-PCR technique. The analysis of early chimerism were performed starting from 2nd to 14th day on every 2 days than to 28 days weekly and on day +30 after alloHSCT.

Early hematopoietic chimerism assessment demonstrated that the kinetics of chimerism in patients after alloSCT was compatible with linear trend ($R^2=0.996$) and in patients after alloNMSCT was compatible with logarithmic trend ($R^2=0.959$). The hematopoietic chimerism level was higher in alloSCT on day 2 the difference was statistically significant ($p=0.0048$).

Molecular engraftment preceded hematological engraftment in patients after either myeloablative or non-myeloablative conditioning regimens (alloSCT patients $p=1.44 \times 10^{-12}$, alloNMSCT $p=2.12 \times 10^{-6}$).

Earlier ME was observed in patients after alloHSCT and alloSCT who received more than 3×10^6 CD34+ cells/kg (alloSCT $p=0.0013$, alloHSCT $p=0.021$). The difference was statistically significant.

Key words: Early hematopoietic chimerism, Molecular engraftment, STR-PCR

Wstęp

Allogeniczna transplantacja macierzystych komórek hematopoetycznych (alloHSCT) jest terapią pierwszego wyboru dla wielu pacjentów, u których rozpoznano nowotworowe i nienowotworowe schorzenia hematologiczne. Pierwotnie źródłem hematopoetycznych komórek macierzystych był szpik kostny (alloBMT). Po wykryciu obecności komórek macierzystych CD34+ we krwi obwodowej oraz po przeprowadzeniu badań dowodzących, że zastosowanie czynników wzrostu i cytostatyków powoduje efektywny wzrost liczby komórek CD34+ we krwi obwodowej stała się ona alternatywnym źródłem komórek macierzystych (alloPBSCT). Przeszczepienie allogeniczne jest złożonym procesem obejmującym wszczepienie pluripotentjalnych komórek macierzystych pochodzących od dawcy, które następnie odbudowują prawidłowo funkcjonujący układ krwiotwórczy i immunologiczny. Dochodzi do tego stopniowo poprzez fazę równowagi ilościowej populacji komórek biorcy i dawcy (mieszany chimeryzm hematopoetyczny MC), aż do całkowitego przejęcia funkcji krwiotworzenia przez komórki hematopoetyczne pochodzące od dawcy (całkowity chimeryzm hematopoetyczny CC). Całość tego zjawiska nosi nazwę chimeryzmu hematopoetycznego [1]. Po przeprowadzeniu transplantacji bardzo istotne jest określenie, czy komórki szpiku kostnego i krwi obwodowej pacjenta pochodzą z resztkowych komórek macierzystych biorcy przetrwałych po kondycjonowaniu, czy też z komórek hematopoetycznych dawcy. Chimeryzm powstający po transplantacji jest procesem dynamicznym i jedynie badania wykony-

wane często i regularnie mogą przynieść informacje o koegzystencji komórek dawcy i biorcy. Wykrycie sekwencji DNA (namnożonych w reakcji PCR), pochodzących w głównej części od dawcy, zazwyczaj poprzedza kliniczne oznaki przemawiające za przyjęciem się przeszczepu. Prawidłowość ta została zdefiniowana (definicja: pierwsze wystąpienie dominacji wzoru allelicznego charakterystycznego dla dawcy w całkowitych leukocytach pochodzących z krwi obwodowej) i określona mianem wszczepienia molekularnego (*molecular engraftment*; ME) [2].

Kluczowe dla oceny procesu powstawania chimeryzmu jest określenie, czy u danego pacjenta stwierdzono sukcesywnie zmniejszający się udział komórek autologicznych, stopniowo zwiększający się udział komórek biorcy w krwiotworzeniu, czy też całkowity chimeryzm dawcy, a także rozpoznanie tych, u których doszło do pojawienia się ponownie resztkowej hematopoezy biorcy [3, 4]. Ponadto istotne jest rozstrzygnięcie, czy mieszany chimeryzm (MC) jest powodowany przez dojrzałe komórki biorcy bez zdolności do samoodnowy, czy też wynika on z obecności komórek progenitorowych biorcy, które dadzą początek uporczywemu mieszanemu chimeryzmowi [2]. Według danych literaturowych [2], wykrycie ME poprzedza, w zależności od rodzaju schorzenia, o około 7 do 12 dni wszczepienie hematologiczne. Przeprowadzone obserwacje wykazały, że u pacjentów, u których stwierdzono brak wszczepienia molekularnego w 14. dobie po transplantacji, nie uzyskiwano później wszczepienia hematologicznego. W konsekwencji poziom chimeryzmu w 14. dobie po

transplantacji może być czynnikiem predykcijnym dla uzyskania wszczepienia hematologicznego. Do oceny poziomu chimeryzmu we wczesnym okresie po transplantacji zastosowano metodę STR-PCR. Jest to ilościowa polimerazowa reakcja łańcuchowa oparta na amplifikacji sekwencji STR (*short tandem repeats* – krótkie powtórzenia tandemowe) o wysokim stopniu polimorfizmu. Wybrana metoda pozwala na ocenę chimeryzmu u pacjentów niezależnie od układu płci w parze biorca–dawca, a także umożliwia wiarygodną ocenę badanego parametru we krwi obwodowej, gdy poziom leukocytów jest niższy niż 200/ μ l. Celem niniejszej pracy było określenie znaczenia badania wczesnego chimeryzmu hematopoetycznego, czyli do 30. doby po alloH SCT, dla przewidywania czasu i możliwości wszczepienia materiału przeszczepowego po alloH SCT.

Materiał i metody

Badaniem objęto 38 osób z nowotworowymi i nienowotworowymi schorzeniami układu krwiotwórczego poddanych allogenicznej transplantacji macierzystych komórek hematopoetycznych wykonanej w Katedrze i Klinice Hematologii UJCM. Wszystkie przeszczepienia – łącznie 43 – przeprowadzono od dawców spokrewnionych (rodzeństwo). Pacjentów podzielono na dwie grupy, w zależności od zastosowanej chemioterapii warunkującej przyjęcie się przeszczepu (kondycjonowanie): pacjentów poddanych standardowemu kondycjonowaniu (alloSCT) i chorych, u których zastosowano kondycjonowanie o zmniejszonej toksyczności (alloNMSCT).

Poziom chimeryzmu hematopoetycznego oceniano w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej uzyskanych po wirowaniu w gradiencie gęstości (Histopaque-1077, SIGMA). DNA genomowe izolowano za pomocą zestawu kolumnkowego (QIAamp. Blood Mini Kit, Qiagen). Na matrycy uzyskanego DNA wykonywano reakcję STR-PCR (DNA Termocycler PTC-220 DYAD, MJ Research). Szczegółowe warunki reakcji PCR, charakterystykę zastosowanych sekwencji STR (*short tandem repeats*) o wysokim stopniu polimorfizmu, skład mieszaniny reakcyjnej i sekwencje starterów opisano wcześniej [5]. Przed wykonaniem allogenicznej transplantacji ustalano profile genetyczne biorcy i dawcy. Po przeprowadzeniu alloH SCT monitorowano chimeryzm hematopoetyczny co drugi dzień do 14. doby, a następnie w dobie 21., 28. i 30.

Ocenę zmian chimeryzmu hematopoetycznego we wczesnym okresie potransplantacyjnym, czyli od momentu podania materiału przeszczepowego do 30. doby po transplantacji, prowadzono we krwi obwodowej (ze względu na mniej inwazyjny charakter pobrania materiału) i wyrażano jako procentowy

udział hematopoezy dawcy w całości hematopoezy zachodzącej w organizmie biorcy. W 30. dobie po transplantacji wykonywano oznaczenie poziomu chimeryzmu również w szpiku kostnym.

Ze względu na brak jednoznacznych kryteriów pozwalających na ustalenie poziomu chimeryzmu hematopoetycznego, który jest wymagany do osiągnięcia wszczepienia molekularnego (ME), przeanalizowano dwa warianty: 1) doba osiągnięcia CC (ze względu na czułość metody STR-PCR szacowaną na 1–5% ustalono wartość 95% jako odpowiadającą CC); 2) pierwszy dzień, w którym stwierdzono dominację alleli dawcy (MC na poziomie minimum 51% udziału hematopoezy dawcy w krwiotworzeniu).

Analizie poddano również czas wystąpienia wszczepienia molekularnego w zależności od rodzaju materiału przeszczepowego: 1) komórki hematopoetyczne pochodzące ze szpiku kostnego (alloBMT); 2) komórki hematopoetyczne pochodzące z krwi obwodowej (alloPBSCT); 3) komórki uzyskane z obu źródeł (alloBMT+alloPBSCT). Porównanie przeprowadzono w grupie pacjentów: łącznie po alloH SCT (alloSCT i alloNMSCT), oddzielnie w grupach pacjentów poddanych alloSCT i alloNMSCT oraz niezależnie od typu przeszczepienia jako czynnik różnicujący przyjęto rodzaj materiału przeszczepowego (alloBMT lub alloPBSCT lub alloBMT+alloPBSCT).

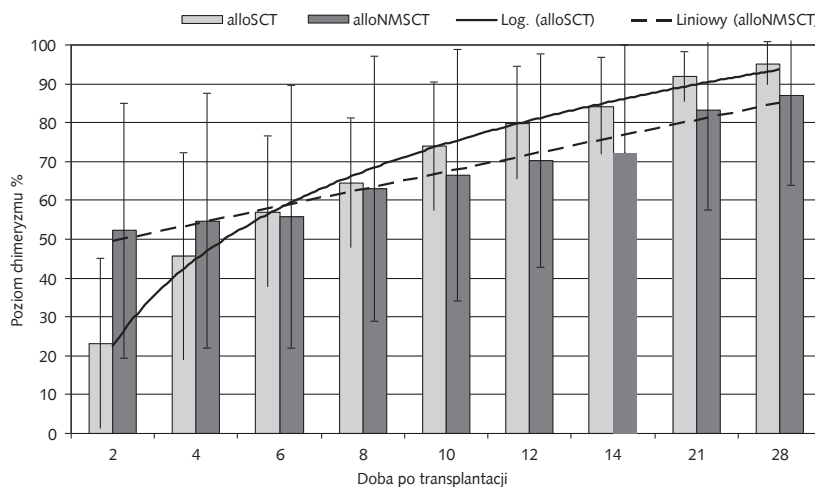
W celu przeprowadzenia oceny różnic we wszczepieniu molekularnym między pacjentami, którym niezależnie od źródła materiału przeszczepowego (alloBMT, alloPBSCT lub alloBMT+alloPBSCT) podano różną liczbę komórek macierzystych CD34+, podzielono ich na dwie grupy. Grupa I obejmowała pacjentów, którzy otrzymali 3×10^6 lub mniej komórek CD34+/kg masy ciała biorcy. Do grupy II zaliczono pacjentów, którym podano więcej niż 3×10^6 komórek CD34+/kg masy ciała biorcy. Różnice między grupą I i II analizowano oddzielnie wśród pacjentów poddanych alloSCT i alloNMSCT oraz łącznie w obu typach transplantacji (alloH SCT). Do opracowania statystycznego wyników zastosowano test t-Studenta.

Wyniki

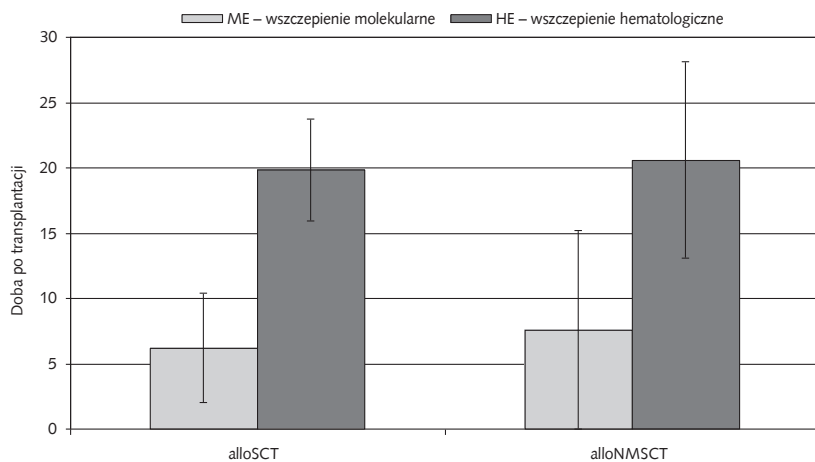
Kinetyka zmian wczesnego chimeryzmu hematopoetycznego

Zmiany chimeryzmu we wczesnym okresie po transplantacji w grupie pacjentów poddanych alloSCT przebiegają zgodnie z zależnością liniową ($R^2=0,996$), natomiast w grupie pacjentów poddanych alloNMSCT są zgodne z zależnością logarytmiczną ($R^2=0,959$) (Ryc. 1). Zastosowanie testu t-Studenta wykazało istotne statystycznie różnice w poziomie chimeryzmu hematopoetycznego między grupą pacjentów poddanych alloSCT i alloNMSCT w 2. dobie po transplantacji ($p=0,0048$).

Ryc. 1. Ocena wczesnego chimeryzmu hematopoetycznego
Fig. 1. Early hematopoietic chimerism assessment



Ryc. 2. Wszczepienie molekularne a wszczepienie hematologiczne – czas wystąpienia
Fig. 2. Molecular engraftment and hematological engraftment achievement



Wszczepienie molekularne

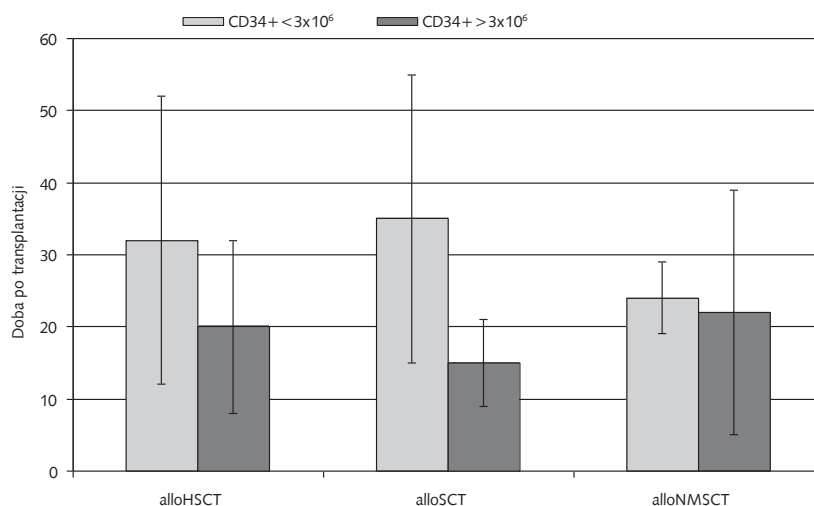
Na podstawie danych uzyskanych w czasie monitorowania wczesnego chimeryzmu hematopoetycznego dla każdego z pacjentów określono dobę wszczepienia molekularnego: wariant 1) – CC, wariant 2) – dominacja alleli dawcy.

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, że jeżeli przyjęto wariant 1), to pacjenci uzyskiwali ME później niż wszczepienie hematologiczne, jednak nie wykazano znamienności statystycznej uzyskanych różnic w żadnym z wybranych układów (pacjenci poddani alloSCT, alloNMSCT oddzielnie i zbiorczo).

Przyjęcie wariantu 2) umożliwiło wykazanie, że ME znacznie wyprzedza osiągnięcie wszczepienia hematologicznego (różnica jest istotna statystycznie). Odpowiednio dla pacjentów poddanych alloSCT ME wystąpiło w dniu 7. ($6,4 \pm 4,2$) natomiast wszczepienie hematologiczne w dniu 20. ($19,8 \pm 3,9$) ($p=1,44 \times 10^{-12}$). W grupie pacjentów poddanych alloNMSCT wartości przedstawiały się następująco: ME uzyskiwano średnio w dobie 8. ($7,6 \pm 7,7$) natomiast wszczepienie hematologiczne w dobie 21. ($20,6 \pm 7,5$) ($p=2,12 \times 10^{-6}$) (Ryc. 2).

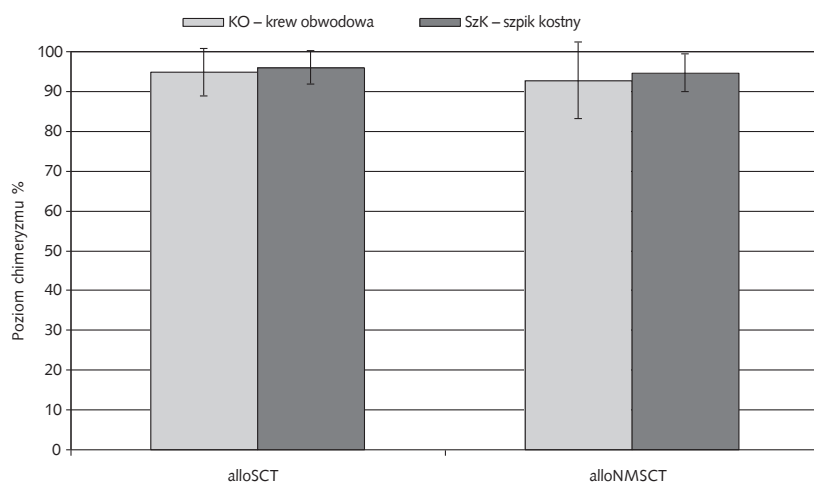
Analiza wpływu rodzaju zastosowanego materiału przeszczepowego na czas wystąpienia ME wykazała, że w żadnym z przyjętych układów (alloBMT, alloPBSCT oraz alloBMT+alloPBSCT) nie stwierdzono różnic znamiennych statystycznie w czasie wystąpienia ME w odniesieniu do typu materiału przeszczepowego, chociaż obserwowano zależność, że u pacjentów poddanych alloPBSCT wszczepienie następowało szybciej.

Analiza wpływu liczby podanych komórek CD34+ wykazała, że w grupach pacjentów poddanych alloH-SCT i alloSCT, którzy otrzymali co najmniej 3×10^6 komórek CD34+/kg, obserwowano istotne statystycznie szybsze wszczepienie molekularne. Dla alloSCT był to średnio dzień 17. ($16,8 \pm 4$) w grupie $>3 \times 10^6$ versus 36. ($35,7 \pm 20$) w grupie $<3 \times 10^6$ mediana 14. dzień versus 28. ($p=0,0013$). Dla alloH-SCT odpowiednio średnio dzień 21. ($20,7 \pm 13$) versus 33. ($32,9 \pm 18$); mediana dzień 21. versus 28. ($p=0,021$). W grupie pacjentów poddanych alloNMSCT nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie. Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinie 3.



Ryc. 3. Wpływ liczby komórek CD34+ podanych w materiale przeszczepowym na czas osiągnięcia ME

Fig. 3. Molecular engraftment achievement – influence of CD34+ cells amount



Ryc. 4. Poziom chimerizmu hematopoetycznego w 30. dobie po alloHSCT – szpik kostny vs krew obwodowa

Fig. 4. Hematopoietic chimerism assessment in bone marrow and peripheral blood – 30th day after alloHSCT

Analiza wyników uzyskanych w 30. dobie po transplantacji metodą STR-PCR wykazała, że nie ma istotnych statystycznie różnic między poziomem chimerizmu oznaczanym we krwi obwodowej i w szpiku kostnym ani w grupie pacjentów podanych alloSCT, ani w grupie pacjentów poddanych alloNMSCT (Ryc. 4).

Omówienie wyników

W okresie potransplantacyjnym można wyróżnić trzy fazy: okres od przeszczepienia do uzyskania wszczepienia hematologicznego, od wszczepienia do osiągnięcia całkowitego chimerizmu hematopoetycznego i późny okres potransplantacyjny. Każdy z nich ma inną kinetykę chimerizmu i inne znaczenie kliniczne [6]. Najbardziej gwałtowne zmiany w poziomie chimerizmu występują w najwcześniejszej fazie po przeprowadzonej transplantacji. Niewiele jest jednak doniesień związanych z zagadnieniami dotyczącymi monitorowania wczesnego chimerizmu hematopoetycznego.

Na zjawisko wystąpienia mieszanego chimerizmu po transplantacji ma wpływ wiele czynników związanych z procedurami transplantacyjnymi i cechami indywidualnymi pacjenta. Zalicza się do nich: rodzaj kondycjonowania, typ dawcy (rodzinny/niespokrewniony), poddanie materiału przeszczepowego deplecji limfocytów T czy też rodzaj zastosowanej profilaktyki choroby GvHD (choroba przeszczep–przeciwno–gospodarzowi), mniejsza liczba podanych w materiale przeszczepowym komórek CD34+, źródło komórek hematopoetycznych. Ze strony pacjenta decydujące dla stanu mieszanego chimerizmu znaczenie ma rodzaj schorzenia podstawowego [7]. Gardiner i wsp. [4] oraz Perez-Simon i wsp. [8] wskazują dodatkowo na czynniki, takie jak: stan zaawansowania choroby w momencie wykonywania allogenicznej transplantacji, czułość metody, za pomocą której oceniany jest poziom chimerizmu, oraz czas wykonywania badań.

Z zagadnieniem czułości oraz ograniczeń, którymi obarczone są metody oceny chimerizmu, wiąże się kwestia ustalenia poziomu chimerizmu hematopoetycznego granicznego dla rozróżnienia między CC

a MC. W niniejszej pracy określenie całkowitego chimeryzmu dawcy oceniano metodą STR-PCR przyjęto zgodnie z poglądem przedstawionym przez Gardinera [4], który uważa, że całkowity chimeryzm dawcy oznacza 95–100% komórek o genotypie dawcy, natomiast wynik poniżej tej wartości jest interpretowany jako mieszany chimeryzm. Taki pogląd znajduje zwolenników [8,9], którzy jako wartość graniczną dla różniczenia CC i MC przyjęli czułość metody i określili ją w zakresie 1–5%.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na występowanie we wczesnym okresie potransplantacyjnym – do 30. doby od wykonania przeszczepienia – stanu mieszanego chimeryzmu niemal u wszystkich pacjentów, niezależnie od rodzaju kondycjonowania. Porównanie poziomu chimeryzmu hematopoetycznego w poszczególnych dobach po transplantacji przeprowadzone między grupą pacjentów poddanych alloSCT i alloNMSCT wykazało, że istotnie statystycznie mniejszy udział hematopoetycznej dawcy w krwiotworzeniu w grupie pacjentów poddanych alloSCT, w porównaniu z analogicznym wynikiem uzyskanym w grupie pacjentów poddanych alloNMSCT, jest obserwowany tylko w 2. dobie po transplantacji. Od 6. doby po transplantacji udział hematopoetycznej dawcy był wyższy w grupie pacjentów poddanych alloSCT, jednak różnica nie była istotna statystycznie. Prawdopodobnym wyjaśnieniem różnic zaistniałych tuż po transplantacji może być rodzaj zastosowanego kondycjonowania. Być może bardziej intensywne kondycjonowanie mieloablacyjne uszkadza podścielisko szpiku kostnego i utrudnia zagnieżdżenie się podanych komórek macierzystych dawcy, co powoduje opóźnienie w pojawieniu się powstających *de novo* komórek dawcy [10]. Innym czynnikiem mogącym mieć wpływ na tę różnicę jest liczba komórek macierzystych CD34+ podanych w materiale przeszczepowym [3, 4, 11, 12]. Dane dla badanej grupy wskazują, że połowie pacjentów poddanych alloSCT podano liczbę komórek mniejszą niż zalecana, natomiast w grupie poddanej alloNMSCT 80% pacjentów otrzymało prawidłową liczbę komórek CD34+. Wykazano również odmienną kinetykę zmian udziału hematopoetycznej dawcy w krwiotworzeniu w grupie poddanej alloSCT i alloNMSCT. W grupie pacjentów poddanych alloSCT kinetyka przyrostu najlepiej koreluje z trendem logarytmicznym, a w grupie poddanych alloNMSCT kinetyka najlepiej odpowiada trendowi liniowemu charakteryzującemu wolniejszy przyrost. Logarytmiczny przebieg kinetyki uzyskany w grupie pacjentów poddanych alloSCT obrazuje początkowo gwałtowne wypieranie hematopoetyki biorcy, aby w późniejszej fazie osiągnąć *plateau* i pozostać w zakresie całkowitego chimeryzmu dawcy. Z powodu uszkodzeń wywołanych w komórkach hematopoetycznych biorcy przez chemioterapię mieloablacyjną komórki hema-

topoetyczne dawcy bardzo szybko dominują w układzie krwiotwórczym i immunologicznym biorcy [10]. Liniowy przebieg kinetyki uzyskany w grupie pacjentów poddanych alloNMSCT odzwierciedla stopniowe i równomierne zastępowanie hematopoetyki biorcy przez hematopoetę dawcy wywodzącą się z zagnieżdżających się komórek z materiału przeszczepowego. Stan mieszanego chimeryzmu u chorych poddanych alloNMSCT występuje dłużej niż w przypadku alloSCT, gdyż niemieloablacyjne warunki kondycjonowania umożliwiają przeżycie większej ilości mniej uszkodzonych komórek biorcy. Kondycjonowanie niemieloablacyjne ma działanie immunosupresyjne, indukuje immunotolerancję i nie powoduje nieodwracalnej aplazji szpiku kostnego [10].

W praktyce klinicznej możliwe jest wystąpienie czystego genotypu dawcy już w 1. dobie po transplantacji. W niniejszym opracowaniu obserwowano występowanie tego zjawiska u jednej pacjentki chorującej na ciężką anemię aplastyczną (vSAA). Chorooba ta objawia się ubogokomórkowym szpikiem bez występowania komórek nowotworowych. Można stąd wnioskować, że w tym konkretnym przypadku w pierwszych dniach po transplantacji komórki hematopoetyczne dawcy przejęły całkowicie funkcje układu krwiotwórczego i immunologicznego w organizmie biorcy.

Dubovsky i wsp. [2] stwierdzili, że próbki krwi obwodowej pobrane w czasie 1. doby po transplantacji i w okresie do wszczepienia hematologicznego, a nawet dłużej wykazują często mieszany chimeryzm hematopoetyczny wskazujący na obecność resztkowych komórek biorcy i krążących komórek dawcy. Dokładniejsza analiza prowadzona w subpopulacjach komórkowych wyizolowanych za pomocą cytometrii przepływowej dowiodła, że w większości przypadków mieszany chimeryzm był spowodowany uporczywą obecnością limfocytów T biorcy o fenotypie CD4+ lub/i CD8+. Komórki te są znane ze zdolności do przetrwania nawet intensywnej chemioterapii używanej podczas standardowego kondycjonowania. Stwierdzono również, że przyczyną powstawania MC są także komórki krwi obwodowej o fenotypie CD34+ pochodzące od biorcy, reprezentujące populację uszkodzonych komórek macierzystych. Różniły się one morfologicznie od prawidłowych komórek macierzystych i nie wykazywały zdolności do klonogenności. [6]

Wszczepienie molekularne (ME) jest definiowane jako pierwsze wystąpienie dominacji specyficznego dla dawcy wzoru allelicznego w materiale genetycznym uzyskanym z całkowitych leukocytów krwi obwodowej po alloHSCT [2, 13]. Definicja ta jednak nie określa jednoznacznie poziomu chimeryzmu dawcy potrzebnego do stwierdzenia ME. Zjawisko to może poprzedzać nawet o około 7 dni przyjęcie się przeszczepu oceniane według kryteriów hematologicznych (liczba

neutrofilii $>500/\mu\text{l}$, liczba płytek krwi $>20\,000/\mu\text{l}$ we krwi obwodowej). Badania wskazują, że u pacjentów, u których nie stwierdzono ME do 14. doby po transplantacji, nie dochodziło do wszczęcia hematologicznego, co w konsekwencji rodziło potrzebę wykonania ponownej transplantacji.

W badaniu przeprowadzono porównanie czasu występowania wszczęcia molekularnego i hematologicznego, posługując się definicją ME zaprezentowaną w literaturze [2]. W obu grupach (pacjenci poddani alloSCT i alloNMSCT) wykazano znacząco wcześniejsze wystąpienie ME niż wszczęcia hematologicznego, co było zgodne z danymi literaturowymi [2]. Jeżeli jako dobę ME przyjęto osiągnięcie CC, to nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w żadnej z grup. Uzyskany wynik w głównej mierze wskazuje na czułość metody STR-PCR zastosowanej do oznaczeń chimeryzmu hematopoetycznego, która jest dużo większa niż czułość metody używanej do oceny morfologii krwi, a ponadto pozwala na stwierdzenie, czy komórki pochodzą z komórek macierzystych dawcy, czy biorcy. Shimoni i wsp. [14] na podstawie swoich obserwacji uważają, że osiągnięcie CC następuje u osób dorosłych do 3 miesięcy po transplantacji.

W niniejszej pracy dobę osiągnięcia CC porównano z liczbą komórek CD34+ podanych w materiale przeszczepowym. W oparciu o dane literaturowe [3,4,11,12], jako wartość graniczną przyjęto 3×10^6 komórek CD34+/kg masy ciała biorcy. Z przeprowadzonych porównań wynika, że ME nastąpiło szybciej niezależnie od rodzaju transplantacji u chorych, którym podano zalecaną liczbę komórek CD34+. Uzyskane rezultaty nie różnią się od obserwacji przeprowadzonych w innych ośrodkach, które dowodzą, że zwiększenie liczby komórek CD34+ w materiale przeszczepowym przyspiesza odbudowę hematologiczną [11].

Porównanie wpływu typu źródła macierzystych komórek hematopoetycznych na czas wystąpienia ME nie wykazało istotnych statystycznie różnic, choć obserwowano szybsze wszczęcie molekularne w grupie pacjentów, u których wykonano alloPBSCT. Podanie hematopoetycznych komórek macierzystych uzyskanych z krwi obwodowej (alloPBSCT) skutkuje zwykle szybszym wszczęciem i szybszą odbudową immunologiczną, a także mniejszą częstością występowania mieszanego chimeryzmu [11]. Na ME ma wpływ także liczba komórek macierzystych podanych w materiale przeszczepowym [15]. Brak istotności statystycznej w przeprowadzonej analizie wynikał prawdopodobnie z różnic w liczbie podanych komórek CD34+.

Trzydziesta doba po alloHSCT kończy wczesny okres potransplantacyjny. Wyniki uzyskane w tej dobie po alloHSCT sugerują, że rodzaj przygotowania pacjenta do allogenicznej transplantacji (kondycjonowania) nie miał już wpływu na poziom chimeryzmu.

Porównanie wartości poziomu chimeryzmu uzyskanego we krwi obwodowej i szpiku kostnym wskazuje też, że badania z wykorzystaniem krwi obwodowej wykonywane we wczesnym okresie potransplantacyjnym są równie wiarygodne jak te przeprowadzane w szpiku kostnym, a fakt, że są one mniej obciążające dla pacjenta, czyni je bardziej przydatnymi na tym etapie. Szerzej zagadnienia związane z wyborem materiału do oceny chimeryzmu, zaletami i wadami oraz poziomem informatywności uzyskiwanych wyników omówiono wcześniej [5].

Przeprowadzone badania wskazują, że na dynamikę wszczęcia oraz na wytworzenie tolerancji objawiającej się występowaniem mieszanego chimeryzmu mają wpływ: zastosowane warunki kondycjonowania (MC utrzymuje się dłużej po alloNMSCT), intensywność leczenia immunosupresyjnego po przeszczepieniu [1], a także delecja potencjalnie alloreaktywnych limfocytów T dawcy z materiału przeszczepowego. Monitorowanie chimeryzmu hematopoetycznego jest więc niezbędnym narzędziem badawczym we wszystkich ośrodkach wykonujących allogeniczne transplantacje komórek hematopoetycznych.

P i ś m i e n n i c t w o

1. Bacigalupo A. Hematopoietic stem cell transplants after reduced intensity conditioning regimen (RI-HSCT): report of a workshop of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant.* 2000;25:803–5.
2. Dubovsky J, Daxberger H, Fritsch G. et al. Kinetics of chimerism during the post-transplant period in pediatric patients with malignant and non-malignant disorders: implications for timely detection of engraftment, graft failure and rejections. *Leukemia.* 1999;13:2060–9.
3. Thiede C, Bornhauser M, Oeschlagel U. et al. Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using Multiplex PCR amplification of short tandem repeat – markers. *Leukemia.* 2001;15:293–302.
4. Gardiner N, Lawler M, O'Riordan JM, De Arce M, Humpries P, McCan SR. Persistent donor chimerism in consistent with disease-free survival following BMT for chronic myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 1997;20:235–41.
5. Czekalska S, Sacha T, Piątkowska-Jakubas B. et al. Ocena chimeryzmu hematopoetycznego po allogenicznej transplantacji szpiku przy pomocy nowoczesnych metod molekularnych (STR-PCR i RQ-PCR) – doświadczenia własne. *Przegl. Lek.* 2010;67(12):1282–91.
6. Choi SJ, Lee KH, Kim S. et al. Prognostic value of hematopoietic chimerism in patients with acute leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: a prospective study. *Bone Marrow Transplant.* 2000; 26: 327–32.
7. Perez-Simon JA, Caballero D, Diez-Campello M. et al. Chimerism and minimal residual disease monitoring after

- reduced intensity conditioning (RIC) allogeneic transplantation. *Leukemia*. 2002;16:1423–31.
8. Gorner M., Kordelas L., Thalheimer L. et al. Stable mixed chimerism after T-cell depleted allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using conditioning with low-dose total body irradiation and fludarabine. *Bone Marrow Transplant*. 2002;29:621–4.
 9. Skotnicki AB, Zawirska D, Nowak W. Ogólna charakterystyka podstawy i procedury wysokodozowanej chemioterapii wspomaganą przeszczepieniem macierzystych komórek krwiotwórczych. *Przegl. Lek.* 1999;56 supl.1:10–16.
 10. Balana-Nowak A., Zdziłowska E., Szostek M., Skotnicki AB. Ocena materiału przeszczepowego w oparciu o immunofenotyp hemopoetycznych komórek macierzystych i progenitorowych oraz ich zdolności klonogenne w hodowlach *in vitro*. *Przegl. Lek.* 1999;56 supl.1:28–33.
 11. Chen YH, Huang XJ, Xu LP, et al. A comparative study of peripheral blood stem cell vs bone marrow transplantation from unrelated donors. *Zhonghua Nei Ke Za Zh.* 2006;45:624–7.
 12. Shimoni A, Nagler A. Non myeloablative stem cell transplantation (NST): chimersim testing as guidance for immunotherapeutic manipulations. *Leukemia*. 2001;15:1967–75.
 13. Cimino G, Rapanotti M.C, Ella L. et al. A prospective molecular study of chimaerism in patients with haematological malignancies receiving unrelated cord blood or bone marrow transplants: detection of mixed chimerism predicts graft failure with or without early autologous reconstitution in cord blood recipients. *Br J Haematol.* 1999;104:770–7.
 14. Martinelli G, Trabetti E, Frageboli T. et al. Early detection of bone marrow engraftment by hypervariable DNA regions. *Haematolog.* 1997;82:156–60.
 15. Savage WJ, Bleesing JJH, Douek D, et al. Lymphocyte reconstitution following non-myeloablative hematopoietic stem cell transplantation follows two patterns depending on age and donor/recipient chimerism. *Bone Marrow Transplant.* 2001;28:463–71.