

Genetické markery pro sledování potransplantačního chimerismu

M. Řehouňková, M. Beránek

Abstrakt

Cílem práce byla retrospektivní analýza dat o dynamice chimerismu v kostní dřeni pacientů po alogenní transplantaci krvetvorných buněk. Ze získaných dat se vyvozoval možný vztah mezi klinickými parametry a vybranými genetickými markery. V druhé části byl posuzován přínos zjištěných dat na predikci úspěšnosti léčby a úmrtnost v potransplantačním období. Monitorování potransplantačního chimerismu bylo provedeno pomocí metody, která využívá genetickou variabilitu mezi příjemcem a dárcem transplantovaného štěpu v patnácti hypervariabilních oblastech krátkých tandemových repetitivních (STR, short tandem repeats). Studie ukázala, že za významné negativní prognostické faktory z hlediska úspěšnosti léčby a úmrtnosti lze považovat diagnózu chronická lymfatická leukémie (CLL) a vyšší věk příjemce krvetvorných buněk.

Úvod

Alogenní transplantace krvetvorných buněk jsou v dnešní době velmi hojně využívanou metodou pro léčbu hematologických malignit (zejména akutních leukémií, myeloidních i lymfoblastických) i nemaligních onemocnění krvetvorby. Pacientova vlastní patologická krvetvorba je potlačena cytostatickou nebo radiací terapií a zárodečné buňky štěpu jsou potom schopné zahájit množení a diferenciaci. V období po transplantaci hematopoetických buněk je nutné sledovat, jak se štěp vyvíjí, jak je aktivní a jak ovlivňuje klinický stav transplantovaných osob.

Jako potransplantační chimerismus označujeme stav, kdy se v kostní dřeni a v cirkulaci objevují jak buňky příjemce, tak i buňky dárce (1-3). Může se jednat o kompletní chimerismus, kdy jsou v těle pacienta prokázány pouze buňky dárce. Pokud se zde objevují i původní buňky příjemce, jedná se o chimerismus smíšený, který je dále potřeba kvantifikovat, a vyšetření provádět vzhledem k dynamice aktivity štěpu v pravidelných intervalech. Cílem analýzy chimerismu je tedy zjistit původ buněk, které zajišťují krvetvorbu, tedy zda byly geneticky odvozeny z původních buněk štěpu dárce nebo reziduálních dřevných buněk příjemce. Zvyšující se podíl původních příjemcových buněk může vést k relapsu původního onemocnění.

Naopak velký podíl buněk ze štěpu může vypovídat o jeho vysoké aktivitě, která podmiňuje vznik akutní i chronické reakce štěpu proti hostiteli (GVHD, graft versus host disease). (4-6)

Hodnocení původu krvetvorných buněk je založeno na existenci hypervariabilních úseků v lidském genomu. Nejčastěji se využívá analýza tandemových repetitivních, a to zejména STR oblastí (short tandem repeats). Jde o úseky genomu, kde se určitá sekvence nukleotidů, nazývaná repetitivní jednotka, pravidelně opakuje. Počet jednotlivých opakování, a tím pádem i délka celého fragmentu, bývá mezi dvěma jedinci rozdílná, zejména pokud nejsou v pokrevním příbuzenském stavu. Jelikož nelze předem říci, které repetitivní oblasti dvou jedinců (v našem případě příjemce a dárce krvetvorných buněk) se budou lišit, vyšetřuje se těchto oblastí v rámci jednoho analytického běhu vždy více najednou (1,5,6,7). V případě, že v dané repetitivní oblasti byla shledána rozdílnost mezi alelami příjemce a dárce, je tato oblast označena jako informativní genetický marker pro analýzu chimerismu. Pokud byly alely dárce i příjemce ve vzájemně vhodné poloze s ohledem na možné předpiky alel dárce na elektroforeogramu, byl marker označen jako analyticky vhodný. Pro kvantifikaci chimerismu se používají pouze informativní a zároveň vhodné markery (IV markery) pro daný transplantační pár dárce a příjemce.

Metodická část

Pro hodnocení byla použita data 140 pacientů, kteří prodělali v období let 2010 - 2014 transplantaci hematopoetických buněk ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. Procentuálně tvořilo sledovaný soubor 55 % mužů a 45 % žen. Průměrný věk pacientů byl 50 let a věkové rozpětí pacientů se pohybovalo od 18 let do 72 let. Nepříbuzenských transplantací bylo provedeno celkem 110, což představuje 79 % všech transplantací za dané období, 30 transplantací bylo provedeno mezi příbuznými (21 %). Ve sledovaném souboru bylo 72 % párů, které se plně shodovaly v systému HLA znaků.

U sledovaných pacientů bylo prokázáno 25 různých diagnóz. Nejpochetnější skupinu tvořili pacienti s diagnostikovanou akutní myeloidní leukémií (AML), kterých bylo celkem 57. Druhou nejpochetnější skupinou byli 24 pacienti s akutní lymfatickou leukémií (ALL). Z celého souboru tvořili pacienti s akutní formou leukémie 57 %. Koláčový graf, který vyjadřuje zastoupení skupin diagnóz s absolutními počty pacientů, je uveden v obrázku 1.

Pro vyšetření chimerismu byl použit vzorek kostní dřeni, popřípadě vzorek nesrážlivé žilní krve (s EDTA). Pro analýzu informativity byla použita

nesrážlivá žilní krev příjemce a část progenitorových krvetvorných buněk dárce. DNA byla vyzolována pomocí kolonkové soupravy QIAmp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, SRN), požadované úseky amplifikovány soupravou s patnácti fluorescenčně značenými primery (AmpFlSTR Identifier Kit, Applied Biosystems, USA) v termocykléru Veriti 96-Well Fast ThermalCycler (Applied Biosystems). Amplikony byly po denaturaci rozděleny kapilární elektroforézou v genetickém analyzátoru ABI 3130 (Applied Biosystems). Migrační časy, velikost ampikonů, informativita markerů a relativní zastoupení alel příjemce a dárce (dle plochy pod křivkou) ve vzorcích z potransplantačního období byly hodnoceny programem GeneMapper ID-X v1.4 (Applied Biosystems).

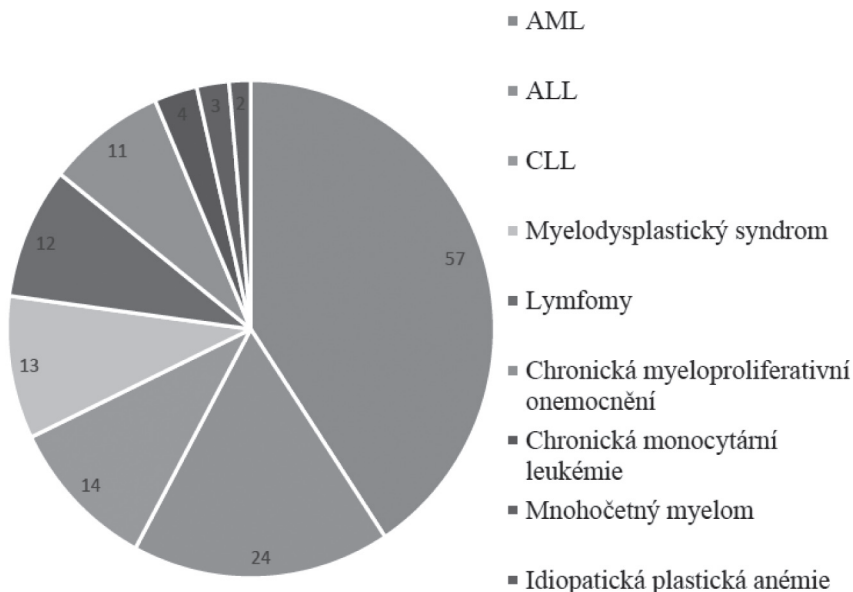
Hodnoty chimerismu 100-95 % byly určeny jako optimální, při kterých byl štěp považován za vysoce aktivní. Jako málo aktivní byl štěp klasifikován při kolísání chimerismu pod hranici 95 %. Pro hodnocení úspěšnosti léčby z hlediska aktivity štěpu byli pacienti rozděleni do tří skupin. Skupina A, určená jako referenční, čítala 66 pacientů, kteří dlouhodobě dosahovali optimálních hodnot chimerismu a skupinu B tvořilo 49 pacientů s nízkou aktivitou štěpu. Poslední skupina C zahrnovala 25 pacientů s vysokými hodnotami chimerismu, stejně jako ve skupině A, ale na rozdíl od nich byli pacienti po smrti nebo retransplantováni z důvodu výskytu GVHD.

Obdobně byli pacienti rozděleni do tří skupin pro hodnocení úmrtnosti v potransplantačním období v závislosti na dosažené aktivitě štěpu. Ve skupině D bylo 32 pacientů po smrti, u kterých byla prokázána nízká aktivita štěpu, a ve skupině E bylo 23 pacientů, kteří zemřeli při vysoké aktivitě štěpu. Poslední skupina F byla určena jako referenční skupina a čítala 66 pacientů, kteří byli naživu a jejich chimerismus byl v optimálním rozmezí 100-95 %.

Výsledky

U všech patnácti markerů byla nejprve vypočítána míra jejich informativity a analytické vhodnosti (označené jako IV markery) vztažená na celkový počet vyšetřených osob a vyjádřena v procentech. Žádný z markerů nedosáhl plné informativity a vhodnosti pro všechny pacienty. Plné informativity bylo pro náš soubor a v rámci palety 15 dostupných markerů možno dosáhnout při kombinaci pěti nej-informativnějších markerů. Tabulka jednotlivých markerů seřazených podle jejich informativity je přiložena v obrázku 2.

V další části byl hodnocen počet IV markerů v souboru pacientů rozdělených podle hodnocených klinických parametrů. Statisticky nižší počet IV markerů byl zjištěn u příbuzenských transplantací oproti nepříbuzenským (Studentův t-test, $p = 0,0005$), ale také u párů s 10 shodnými znaky v HLA systému



Obrázek 1: Koláčový graf zastoupení skupin diagnóz s počty pacientů

Pořadí	Marker	Počet IV párů	Informativita a vhodnost [%]
1.	D21S11	103	74
2.	D2S1338	103	74
3.	THO1	99	71
4.	FGA	96	69
5.	D3S1358	91	65
6.	D7S820	89	64
7.	D13S317	89	64
8.	D8S1179	87	62
9.	D18S51	86	61
10.	D19S433	85	61
11.	D16S539	82	59
12.	vWA	81	58
13.	TPOX	79	56
14.	D5S818	66	47
15.	CSF1PO	65	46

Obrázek 2: Tabulka použitých markerů, seřazených podle klesající informativity

oproti párům, které jich měli méně (Studentův t-test, $p = 0,0005$). Na počet IV markerů neměla vliv shoda pohlaví dárce a příjemce.

Při hodnocení úspěšnosti léčby z hlediska aktivity štěpu bylo u pacientů s CLL prokázáno vyšší riziko retransplantace z důvodu GVHD, či úmrtí s vysoce aktivním štěpem, protože byli statisticky častěji ve skupině C (Chí kvadrát test, $p = 0,025$). U skupiny B s nižší aktivitou byl prokázán statisticky vyšší věk příjemce (Studentův t-test, $p = 0,005$) oproti skupině A.

Ze souboru 140 pacientů zemřelo v potransplantačním období 55 osob (39 %). Při hodnocení úmrtnosti v potransplantačním období bylo prokázáno statisticky významnější riziko úmrtí při vysoce aktivním štěpu u pacientů s diagnózou CLL, kteří byli nejčastěji zařazeni ve skupině E, tedy s vysokou aktivitou štěpu, ale po smrti (Chí kvadrát test, $p = 0,025$). Toto riziko bylo naopak statisticky potvrzeno jako nižší (Chí kvadrát test, $p = 0,025$) u pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL), protože

vůbec nebyli zařazeni v uvedené skupině. Taktéž byli pacienti ve skupině E statisticky významně starší oproti referenční skupině F (Studentův t-test, $p = 0,0025$).

Při hodnocení úspěšnosti léčby a úmrtnosti z hlediska aktivity transplantovaného štěpu nebyla statisticky prokázána prediktivní hodnota ostatních vybraných klinických parametrů (příbuznost dárce a příjemce, shoda pohlaví, shoda v HLA systému znaků, variabilita genomů transplantačních párů vyjádřená počtem IV markerů)

Závěr

Mezi nejinformativnější markery při hodnocení potransplantačního chimerismu patřily markery D21S11, D2S1338, THO1, FGA a D3S1358. Významně méně IV markerů měly podle získaných dat páry se shodou 10 z 10 znaků v HLA systému a také příbuzenské páry. Ve studovaném souboru pacientů nebyla úspěšnost léčby a úmrtnost ovlivněna pohlavím, příbuzností, pohlavní shodou mezi

dárce a příjemcem, shodou v HLA systému ani genetickou variabilitou vyjádřenou počtem IV markerů. Jako negativní prognostický faktor z hlediska úspěšnosti léčby a úmrtnosti byl prokázán vyšší věk a diagnostikovaná CLL.

Zdroje

1. HANCOCK, J.P., GOULDEN, N.J., OAKHILL, A., et al. Quantitative Analysis of Chimerism after Allogenic Bone Marrow Transplantation Using Immunomagnetic Selection and Fluorescent Microsatellite PCR. *Leukemia*, 2003, vol. 17, s. 247-251.
2. TANG, X., ALATRASH, G., NING, J., et al. Increasing Chimerism after Allogenic Stem Cell Transplantation Is Associated with Longer Survival Time. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2014, vol. 20, no 8, S. 1139-1144.
3. BALONJ., HAŁABURDA K., BIENIASZEWSKA M., et al. Early Complete Donor Hematopoietic Chimerism in Peripheral Blood Indicates the Risk of Extensive Graft-versus-host Disease. *Bone Marrow Transplantation*, 2005, vol. 35, s. 1083-1088
4. SLOVÁČEK, L., JEBAVÝ, L., BLAŽEK, M., et al. Transplantace kostní dřeně. Přehled základních pojmů, typy transplantací, indikace, vlastní provedení. *Vojenské zdravotnické listy*, 2005, roč. 74, č. 3-4, s. 125-132
5. BADER, P., NIETHAMMER, D., WILLASCH, A., et al. Review: How and when we monitor chimerism after allogenic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplantation*. 2005, vol. 35, s. 107-119.
6. BERÁNEK, M. Molekulární genetika pro bioanalytiky. Praha: Karolinum - Univerzita Karlova v Praze, 2016. ISBN 978-80-246-3224-7.
7. ŠKODA, J., ŠKODOVÁ, H. *Molecular Genetics - An Outline for Food Chemists and Biotechnologists*. Praha: Elsevier, 1987. ISBN 0-444-41688-9.