

**ANNALES
ACADEMIAE MEDICAE
GEDANENSIS
TOM XLIII
2013
SUPPLEMENT 14**

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Maria Barbara Bieniaszewska

ZNACZENIE KLINICZNE MONITOROWANIA
CHIMERYZMU HEMATOPOETYCZNEGO
U CHORYCH PODDANYCH ALOGENICZNEMU
PRZESZCZEPIENIU KOMÓREK KRWIOTWÓRCZYCH

*Clinical impact of hematopoietic chimerism
in patients after allogeneic stem cells transplantation*

Katedra i Klinika Hematologii i Transplantologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: prof. dr hab. Andrzej Hellmann

Gdańsk 2013

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

REDAKTOR NACZELNY
EDITOR-IN-CHIEF
prof. dr Marek Grzybiak

KOMITET REDAKCYJNY
EDITORIAL BOARD
z-ca redaktora naczelnego – Adam Szarszewski
sekretarz redakcji – Włodzimierz Kuta
redaktor techniczny – Tadeusz Skowyrą
Tomasz Bączek, Zdzisław Bereznowski, Dariusz Kozłowski, Anna Grygorowicz,
Andrzej Hellmann, Jerzy Kuczkowski, Krzysztof Narkiewicz, Michał Obuchowski,
Zbigniew Kmieć, Julian Świerczyński, Aleksandra Żurowska

ADRES REDAKCJI
ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE
Annales Academiae Medicae Gedanensis
Zakład Anatomii Klinicznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Dębinki 1, 80-210 Gdańsk, Poland
e-mail: annales@gumed.edu.pl

Artykuły opublikowane w Annales Academiae
Medicae Gedanensis
są zamieszczane w bazie EMBASE
Articles published In Annales Academiae Medicae Gedanensis
are covered by the Excerpta Medica database (EMBASE)

PL ISSN 0303–4135

Gdański Uniwersytet Medyczny

Składam serdeczne podziękowania
Panu Profesorowi Andrzejowi Hellmannowi
za inspirację i życzliwość w trakcie realizacji pracy

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów.....	9
1. Wstęp.....	11
1.1. Przeszczepienie alogenicznych komórek krwiotwórczych	11
1.2. Przebieg procedury transplantacyjnej	14
1.2.1. Kondycjonowanie	14
1.2.2. Profilaktyka immunosupresyjna.....	16
1.2.3. Opieka potransplantacyjna	17
1.3. Chimeryzm hematopoetyczny.....	18
1.3.1. Chimeryzm polimorficznych sekwencji DNA	20
1.3.2. Chimeryzm erytropoetyczny	22
2. Założenia i cele podjętych badań.....	25
3. Materiał i metody.....	27
3.1. Protokół badania	27
3.2. Charakterystyka badanych grup pacjentów.....	30
3.2.1. Grupa poddana analizie.....	30
3.2.2. Grupy badane	43
3.3. Opis stosowanych metod badawczych.....	48
3.3.1. Chimeryzm STR	48
3.3.2. Chimeryzm erytropoetyczny	50
3.3.3. Metody analizy statystycznej	52
4. Wyniki	53
4.1. Chimeryzm STR	53
4.1.1. Ocena reprezentatywności badanej grupy.....	53
4.1.2. Ocena zgodności odsetka DNA biorcy wykazanego w badaniach szpiku i krwi obwodowej.....	57
4.1.3. Ocena częstości występowania postaci chimeryzmu w poszczególnych punktach obserwacji.....	59
4.1.4. Dynamika chimeryzmu STR.....	61
4.1.5. Zależność pomiędzy obserwowaną postacią chimeryzmu a wystąpieniem zdarzeń niekorzystnych	62
4.1.6. Występowanie wznów w grupie z modyfikacją immunosupresji na podstawie postaci chimeryzmu w 60 dobie w porównaniu z grupą z profilaktyką standardową oraz grupą chorych leczonych z powodu aGvHD w 60 dobie	65
4.1.7. Częstości rozległej przewlekłej postaci GvHD w grupie z modyfikacją immunosupresji na podstawie postaci chimeryzmu w 60 dobie w porównaniu z grupą z profilaktyką standardową oraz grupą chorych leczonych z powodu aGvHD w 60 dobie.....	67

4.1.8.	Dynamika chimeryzmu STR poprzez określenie podgrup ze stabilnym chimeryzmem (STAB), spadkowym (Dec), i wzrostowym (Inc) między 30 a 60, 60 a 100 oraz 100 a 180) w odniesieniu do niepowodzeń terapii	68
4.1.9.	Dynamika chimeryzmu STR (poprzez określenie podgrup ze stabilnym i zmieniającym się statusem) między 30 a 60, 60 a 100 oraz 100 a 180) w odniesieniu do niepowodzeń terapii	71
4.2.	Chimeryzm erytropoetyczny	77
4.2.1.	Analiza współwystępowania niezgodności w różnych układach grupowych krwi	77
4.2.2.	Zależność pomiędzy typem niezgodności AB0 a niepowodzeniem terapii	79
4.2.3.	Dynamika zmian chimeryzmu erytropoetycznego	85
4.2.4.	Zależność pomiędzy postacią echimeryzmu w 180 dobie po przeszczepie a typem niezgodności w zakresie układu AB0	87
4.2.5.	Zależność pomiędzy postacią echimeryzmu w 180 dobie po przeszczepie a oceną niezależności od przetoczeń KKCz	89
4.2.6.	Zależność pomiędzy postacią echimeryzmu w 180 dobie po przeszczepieniu a występowaniem niepowodzeń terapii	91
4.2.7.	Występowanie wznów a zmiany miana przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom na erytrocytach dawcy i biorcy	96
4.3.	Korelacja pomiędzy chimeryzmem erytropetycznym a chimeryzmem STR	97
5.	Omówienie wyników i dyskusja	98
6.	Wnioski	112
7.	Piśmiennictwo	113
8.	Streszczenie	125
9.	Summary	128

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ABMTR	- <i>American Society for Blood and Marrow Transplantation</i> Amerykańskie Towarzystwo Przeszczepiania Krwi i Szpiku
aCML	<i>atypic chronic myelocytic leukemia</i> / atypowa PBSz
ALL	- <i>acute lymphoblastic leukemia</i> / ostra białaczka limfoblastyczna
AML	<i>acute myeloblastic leukemia</i> / ostra białaczka szpikowa
APC	- <i>antigen presenting cells</i> / komórki prezentujące antygen
AR	- <i>autologous recovery</i> / odnowa autologiczna
BM	- <i>bone marrow</i> / szpik kostny
CC	- <i>complete chimerism</i> / chimeryzm całkowity
CEL	- <i>chronic eosinophilic leukemia</i> / przewlekła białaczka eozynofilowa
CLL	- <i>chronic lymphocytic leukemia</i> / przewlekła białaczka limfocytowa
CML	<i>chronic myelocytic leukemia</i> / przewlekła białaczka szpikowa – PBSz
CsA	- Cyklosporyna
DLI	- <i>donor lymphocyte infusion</i> / infuzja limfocytów dawcy
EBMT	- <i>European Group for Blood and Marrow Transplantation</i> Europejska Grupa ds Transplantacji Krwi i Szpiku
eCC	- <i>erythropoietic complete chimerism</i> / całkowity chimeryzm erytropoetyczny
eMC	- <i>erythropoietic mixed chimerism</i> / mieszany chimeryzm erytropoetyczny
FAM	- <i>match family donor</i> / dawca rodzinny
FISH	- <i>fluorescence in situ hybridization</i> / fluorescencyjna hybrydyzacja in situ
G-CSF	- <i>granulocyte–colony stimulating factor</i> / granulocytarny czynnik wzrostu
GvHD	- <i>graft versus host disease</i> / choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi
aGvHD	- <i>acute graft versus host disease</i> / ostra choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi
cGvHD	- <i>chronic graft versus host disease</i> / przewlekła choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi
GvL	- <i>graft versus leukemia</i> / przeszczep przeciwko białaczce
HD	- <i>Hodgkin lymphoma</i> / Chłoniak Hodgkina
HLA	- <i>human leukocyte antigens</i> / antygeny zgodności tkankowej
HSC	- <i>hematopoietic stem cells</i> / komórki krwiotwórcze
IAC	- <i>immunoablative conditioning</i> / immunoablacyjne postępowanie przygotowawcze
IBMTR	- <i>International Bone Marrow Transplant Registry</i> / Międzynarodowy Rejestr Przeszczepień Szpiku Kostnego
KKCz	- koncentrat krwinek czerwonych

MAC	- <i>myeloablative conditioning</i> / mieloablacyjne postępowanie przygotowawcze
MC	- <i>mixed chimerism</i> / chimeryzm mieszany
MF	- <i>myelofibrosis</i> / włóknienie szpiku
MDS	- <i>myelodysplastic syndrom</i> / zespół mielodysplastyczny
MM	- <i>multiple myeloma</i> / szpiczak plazmocytowy
MRD	- <i>minimal residual disease</i> / choroba resztkowa
MUD	- <i>match unrelated donor</i> / dawca niespokrewniony
MTX	- Metotreksat
NCI	- <i>National Cancer Institute</i> / Narodowy Instytut Raka
NHL	- <i>non-Hodgkin lymphoma</i> / Chłoniak niezziarniczny
NMDP	- <i>National Marrow Donor Program</i> / Narodowy Program Dawców Szpiku
PB	- <i>peripheral blood</i> / krew obwodowa
PBSz	- przewlekła białaczka szpikowa
PCR	- <i>polymerase chain re action</i> / reakcja łańcuchowa polimerazy
PNH	- <i>paroxysmal nocturnal hemoglobinuria</i> / nocna napadowa hemoglobinuria
PNM	- przewlekłe nowotwory mieloproliferacyjne
PV	- <i>polycythemia vera</i> / czerwienica prawdziwa
PRCA	- <i>pure red cell anemia</i> / czysta aplazja czerwonych krwinek
RIC	- <i>reduced intensity conditioning</i> / kondycjonowanie o zredukowanej toksyczności
RT PCR	- <i>reverse transcriptase PCR</i> / reakcja PCR z odwrotną transkryptazą
SAA	- <i>severe plastic anemia</i> / ciężka postać anemii aplastycznej
SNPs	- <i>single-nucleotide polymorfisms</i> / polimorfizmy pojedynczego nukleotydu
STR	- <i>short tandem repeats</i> / krótkie powtórzenia tandemowe
TBI	- <i>total body irradiation</i> / napromienianie całego ciała
VNTR	- <i>variable number of tandem repeats</i> / powtórzenia tandemowe o dużej zmienności

1. WSTĘP

1.1. Przeszczepienie alogenicznych komórek krwiotwórczych

Przeszczepienie alogenicznych komórek krwiotwórczych jest obecnie uznana metodą leczenia wielu schorzeń hematologicznych. Potrzeba było jednak ponad 50 lat doświadczeń klinicznych i wielu prac badawczych, aby metoda stała się rutynową i szeroko stosowaną. Przesłanką do rozwoju transplantacji szpiku stały się doświadczenia drugiej wojny światowej, a w szczególności potrzeba skutecznej ochrony przed skutkami napromieniowania. Pierwsze doświadczenia na zwierzętach przeprowadził w 1951 roku Lorenz [1], wykazując, że przetoczenie komórek szpiku lub śledziony pozwala na uniknięcie skutków letalnych dawek promieniowania jonizującego dotyczących hematopoezy. Sześć lat później wykazano, że przetoczenie komórek szpiku prowadzi u napromieniowanego letalnie człowieka do pełnej rekonstrukcji układu krwiotwórczego [2]. W pierwszej połowie lat sześćdziesiątych ubiegłego wieku przeprowadzono kolejne transplantacje szpiku pobranego od dawców rodzinnych, jednak wyniki oceniane długotrwałym przeżyciem po przeszczepieniu nie były zachęcające [3]. W 1965 r. Mathe [4] opisał chorego, u którego dokonano transplantacji szpiku od rodzeństwa uzyskując wszczepienie, efekt przeciwbiałaczkowy i chimeryzm hematopoetyczny. Pacjent zmarł po upływie 2 lat z powodu infekcji w przebiegu choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (*graft versus host disease* – GvHD) [5]. Epokowym krokiem w rozwoju transplantologii stało się pod koniec lat sześćdziesiątych odkrycie roli układu antygenów zgodności tkankowej (*human leukocyte antigens* – HLA) [6, 7]. Wybór dawcy rodzinnego w pełni zgodnego w HLA zmniejszył ryzyko zarówno braku wszczepienia, jak i ciężkich reakcji immunologicznych, które były głównymi przyczynami śmiertelności poprzyszczepowej [8–10]. Dalszą konsekwencją tego odkrycia stała się możliwość doboru dawców spoza kręgu rodzeństwa.

Lata siedemdziesiąte przyniosły wprowadzenie do farmakopei cyklosporyny A (CsA) – cyklicznego oligopeptydu o działaniu immunosupresyjnym. Cyklosporyna, jako inhibitor kalcyneuryny, silnie hamuje aktywację limfocytów T. Początkowe doświadczenia w przeszczepieniach narządowych wykazały niemal całkowity brak działania mielotoksycznego CsA, co uczyniło ją idealnym lekiem immunosupresyjnym w transplantacjach szpiku [11, 12]. Rola cyklosporyny w transplantologii hematologicznej praktycznie nie zmieniła się w ciągu dalszych lat, mimo pojawienia się zarówno nowych generacji leków tej samej grupy, jak i innych preparatów immunosupresyjnych o odmiennym mechanizmie działania. Profilaktyka złożona z cyklosporyny podawanej przewlekle i tzw. krótkiego kursu metotreksatu jest do chwili obecnej złotym standardem immunosupresji w mieloablacyjnych transplantacjach komórek krwiotwórczych [13].

Kolejnych 40 lat, to przede wszystkim rozwój metod diagnostycznych i terapeutycznych, systematycznie zwiększający szanse na przeżycie długotrwałego okresu aplazji szpiku we wczesnym przebiegu procedury transplantacyjnej. Nowoczesne narzędzia diagnostyczne i poszerzający się zasób leków pozwalały także na wczesne wykrywanie i skuteczne leczenie powikłań w okresie poregeneracyjnym. Nie sposób przecenić znaczenia rozwoju metod typowania HLA i wprowadzenie technik molekularnych do identyfikacji zgodności między dawcą a biorcą. W sposób istotny wpłynęło to na

zmniejszenie częstości występowania ciężkich postaci GvHD. Według danych Europejskiej Grupy ds Transplantacji Krwi i Szpiku (European Group for Blood and Marrow Transplantation – EBMT) z 2005 roku [14], typowanie HLA z zastosowaniem tzw. wysokiego stopnia rozdzielczości uczyniło przeszczepienia od dawców niespokrewnionych porównywalnymi pod względem ryzyka powikłań immunologicznych, z transplantacjami komórek krwiotwórczych pobranych od zgodnego w HLA rodzeństwa.

Wskaźniki demograficzne, zmniejszenie odsetka rodzin wielodzietnych, spowodowały, że obecnie mniej niż 25% pacjentów kwalifikowanych do przeszczepienia znajduje dawcę wśród rodzeństwa (dane własne). Spowodowało to rozwój rejestrów niespokrewnionych dawców szpiku, w ostatnich latach również rejestrów polskich [15, 16]. Obecnie głównym materiałem przeszczepowym, jest w większości ośrodków wykonujących alotransplantacje przeszczep pobrany od dawcy niespokrewnionego.

Do 1993 roku jedynym materiałem pobieranym od dawcy był szpik. W tymże roku Russel [17] i niezależnie Dreger [18] po raz pierwszy opisali pobranie komórek krwiotwórczych z krwi obwodowej dawcy rodzinnego po zastosowaniu stymulacji granulocytarnym czynnikiem wzrostu (*granulocyte – colony stimulating factor* – G-CSF) z pełną rekonstrukcją hematopoezy po przeszczepieniu. Tą metodę poboru stosowano wcześniej jedynie w przeszczepieniach autologicznych. Początkowo ostrożne podejście do tego sposobu donacji zmieniło się po opublikowaniu pierwszych podsumowań, dowodzących bezpieczeństwa metody [19–22]. Od 1996 r. liczba przeszczepień komórek krwiotwórczych pobranych z krwi obwodowej dawców (początkowo tylko rodzinnych, a od 2000 roku także niespokrewnionych) gwałtownie i systematycznie wzrasta. Obecnie jest to pierwszoplanowe źródło przeszczepów. Według danych amerykańskiego rejestru NMDP (*National Marrow Donor Program* – NMDP) procedurze stymulacji G-CSF i kolekcji komórek z krwi obwodowej poddawanych jest 72% amerykańskich dawców niespokrewnionych [23]. Decyduje o tym prostota metody i znacznie mniejsze obciążenie dla dawcy w porównaniu do pobierania krwi szpikowej. Notowana od 2010 r. większa częstość występowania przewlekłej GvHD [24, 25] może być w przypadku schorzeń nowotworowych o wysokim ryzyku wznowy zjawiskiem korzystnym.

Począwszy od pierwszych transplantacji, głównym założeniem było zastosowanie postępowania przygotowawczego (kondycjonowania), które miało wywierać efekt letalny na komórki hematopoezy i jednocześnie przełamywać barierę immunologiczną biorcy uniemożliwiającą wszczepienie komórek progenitorowych. Pierwotnie rolę tą odgrywało napromieniowanie całego ciała, w latach następnych także chemioterapia. Postępowanie takie zostało określone jako mieloablacyjne. Zarówno dawka promieniowania jonizującego konieczna do uzyskania założonego efektu, jak i dawki chemioterapeutyków charakteryzują się jednak uogólnioną toksycznością, co jest jedną z przyczyn śmiertelności okołoprzeszczepowej, a tym samym powodem dyskwalifikacji przeszczepowej osób starszych i obciążonych schorzeniami współistniejącymi. Próba rozwiązania tego problemu stały się badania nad zastosowaniem kondycjonowania o zredukowanej toksyczności (*reduced intensity conditioning* – RIC) [26, 27]. Przesłankami do konstruowania schematów RIC było uzyskanie wystarczającego efektu immunosupresyjnego pozwalającego na wszczepienie i proliferację komórek krwiotwórczych (i immunokompetentnych) dawcy w celu wywołania efektu przeszczep przeciwko białaczce (*graft versus leukemia* – GvL) [28]. Ostatnie dziesięciolecie przyniosło zdecydowane wzbogacenie schematów kondycjonowania stosowanych z coraz lepszym efektem w postaci

obniżenia toksyczności, a tym samym śmiertelności zależnej od procedury. Pozwoliło to również znacznie rozszerzyć populację pacjentów, u których przeszczepienie komórek krwiotwórczych mogło być zastosowane w terapii schorzenia podstawowego.

Szybki postęp w transplantologii hematologicznej nie byłby możliwy bez międzynarodowej współpracy. Wzajemną kooperację ułatwiło powołanie organizacji zajmujących się gromadzeniem danych i ich podsumowywaniem. Europejską Grupę ds Transplantacji Krwi i Szpiku powołała w 1974 roku grupa kilku badaczy, celem wymiany doświadczeń. EBMT jest obecnie dużą organizacją zrzeszającą i kontrolującą wszystkie liczące się europejskie ośrodki transplantacyjne i akredytującą aplikantów. Coroczne spotkania EBMT są nie tylko czasem edukacji młodych kadr i prezentacji najnowszych wyników i osiągnięć, ale także miejscem wypracowywania standardów opartych o dobrze potwierdzoną wiedzę, publikowanych cyklicznie jako podręczniki. Aktualna, 6 edycja ukazała się w 2012 r. The EBMT Handbook – Haematopoietic Stem Cell Transplantation jest powszechnie uznawany za podstawę protokołów przeszczepowych obowiązujących w europejskich ośrodkach transplantacyjnych.

Postępu transplantologii nie sposób oderwać od rozwoju hematologii w ogólności. Przełomowe odkrycia, takie jak np. wprowadzenie inhibitorów kinazy tyrozynowej do terapii przewlekłej białaczki szpikowej (PBSz) zmieniły istotnie standardy transplantologii [29, 30]. PBSz była do końca lat dziewięćdziesiątych ubiegłego stulecia głównym wskazaniem do przeszczepień alogenicznych. Skuteczna farmakoterapia pozwalająca uzyskać molekularną remisję choroby u dużej grupy chorych, ograniczyła zastosowanie transplantacji w PBSz jedynie do ściśle zdefiniowanych przypadków [31]. Podobnie – coraz lepsze zrozumienie biologii ostrych białaczek i zespołów mielodysplastycznych (MDS – *myelodysplastic syndrom*) oraz zmiany klasyfikacyjne, pozwoliły na wyodrębnienie grupy chorych, którzy odnoszą realne i udowodnione korzyści z przeszczepienia komórek krwiotwórczych [32, 33]. Zważywszy, że transplantacja, mimo kolosalnego postępu dokonanego w ciągu ostatnich 50 lat pozostaje nadal metodą terapii obciążoną śmiertelnością zależną od samej procedury, wnikliwe ustalanie wskazań do jej przeprowadzenia jest zagadnieniem pierwszoplanowym.

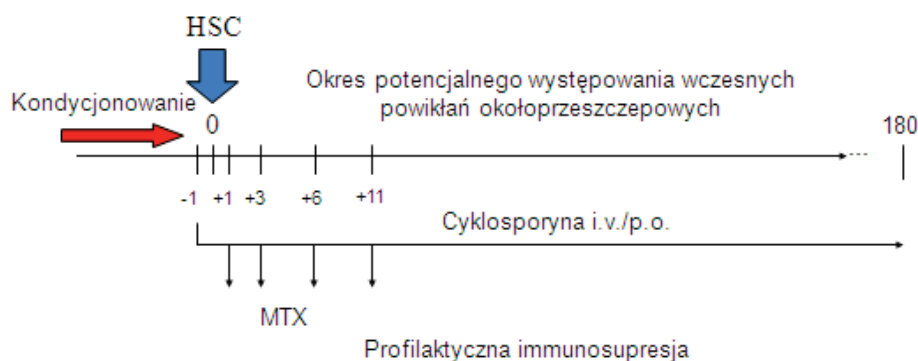
Ogromny wpływ na postęp w transplantologii miało także coraz lepsze poznanie skomplikowanych mechanizmów immunologicznych towarzyszących lub wywołanych przez ingerencję jaką jest przeszczepienie obcych (choć zgodnych w HLA) komórek. Poznanie patogenezы GvHD [34], odkrycie efektu GvL [28] oraz efektów promowania i hamowania tych procesów przez mechanizmy komórkowe i humoralne sprzyjało wprowadzaniu nowych leków immunosupresyjnych o różnych mechanizmach działania. Pozwala to na skuteczniejsze zwalczanie powikłań związanych z aktywacją układu immunologicznego. Z drugiej strony potransplantacyjne wznowy choroby stanowią istotny problem kliniczny. Celem transplantacyjnym jest więc uzyskanie „równowagi immunologicznej” [35]. Podejmowane są obecnie próby ingerencji polegające na wykorzystaniu tych elementów układu odpornościowego, które mogą zapobiegać niepożądaney i nadmiernej aktywacji immunologicznej, przy jednoczesnym promowaniu (lub braku hamowania) pożądaney funkcji elementów kontrolujących potencjalną wznowę choroby. Jednym z przykładów jest zastosowanie komórek regulatorowych [36, 37].

Mimo licznych zmian, jakie dokonały się wokół procesu transplantacji komórek krwiotwórczych, jej schematyczny przebieg pozostaje bez zmian. Po kwalifikacji pacjenta następuje proces doboru optymalnego dawcy. Znalezienie dawcy i jego zgoda na

donację skutkuje rozpoczęciem kondycjonowania, zakończonego podaniem przeszczepu. Następnie pacjent przechodzi okres aplazji szpiku, później regeneracji hematopoezy, aby ostatecznie być poddany długoterminowej opiece potransplantacyjnej. Każdy z tych etapów charakteryzuje się odrębnymi zagrożeniami, których znajomość, a w szczególności wiedza w zakresie szybkiego wykrywania lub zapobiegania stanowi o sukcesie, czyli ostatecznym, zamierzonym efekcie transplantacji. Jest nim długotrwałe przeżycie bez nawrotu choroby i powikłań transplantacyjnych. W związku z tym, każdy element wiedzy sprzyjający osiągnięciu celu wydaje się godny uwagi.

1.2. Przebieg procedury transplantacyjnej

Ideowy schemat przebiegu alotransplantacji przedstawia rycina zamieszczona poniżej.



Rycina 1 Schemat przebiegu alotransplantacji (MTX – metotreksat).

Figure 1 Allotransplantation – schema

HSC – *hematopoietic stem cells* – komórki krwiotwórcze; MTX – metotreksat; Doba „0” – dzień przetoczenia komórek krwiotwórczych. Doby po podaniu przeszczepu oznaczane są znakiem „+” poprzedzające „-”

1.2.1. Kondycjonowanie

Początkową fazę procedury przeszczepowej stanowi postępowanie przygotowawcze, określane inaczej kondycjonowaniem. Działanie to ma „przygotować” pacjenta do przyjęcia „nowych” komórek krwiotwórczych. Jak wspomniano wyżej, mimo rozwoju transplantacji o zredukowanej toksyczności, większość przeszczepień nadal przeprowadzana jest po przygotowaniu mieloablacyjnym (*myeloablative conditioning* – MAC). Kluczowym problemem tego typu kondycjonowania jest znalezienie równowagi między działaniami pożądanymi a akceptowalną toksycznością leczenia. Kondycjonowanie mieloablacyjne ma w założeniach do spełnienia 3 podstawowe zadania:

- Tworzenie miejsca dla pochodzących od dawcy komórek krwiotwórczych

- Zapobieganie reakcji immunologicznej ze strony biorcy mogącej spowodować odrzucenie przeszczepu (brak wszczepienia)
- Zlikwidowanie w największym możliwym stopniu komórek nowotworowych

Pierwsze zadanie związane jest z teorią nisz zajmowanych przez wczesne komórki progenitorowe [38]. Różnicowanie i proliferacja komórek macierzystych jest możliwa w określonej przestrzeni, nazwanej niszą, w której komórki te, w ścisłym kontakcie z podścieliskiem szpiku mogą pełnić swoje podstawowe funkcje. Funkcjonowanie komórek progenitorowych regulowane jest przez liczne szlaki sygnałowe, cytokiny i chemokiny oraz interakcje z komórkami podścieliska modulowane przez molekuly adhezyjne. Postępowanie przygotowawcze ma spowodować eradykację komórek macierzystych biorcy i zapewnić puste nisze dla komórek dawcy. Teoria ta nie znajduje obecnie ścisłego uzasadnienia w praktyce. W przypadku schematów RIC wszczepienie osiąga się równie łatwo, jak przy zastosowaniu postępowania mieloablacyjnego [27].

Działanie immunosupresyjne kondycjonowania ma za zadanie przełamanie bariery immunologicznej przetrwałych komórek immunokompetentnych biorcy, a więc zapobieganie odrzuceniu przeszczepu. Zjawisko to przejawia się brakiem regeneracji hematopoezy (*graft failure* – brak wszczepienia). Immunosupresja kondycjonowania ma szczególne znaczenie u chorych potencjalnie uczulonych na tzw. mniejsze antygeny zgodności tkankowej poprzez liczne przetoczenia preparatów krwiopochodnych w okresie poprzedzającym transplantację – np. u chorych z ciężką postacią anemii aplastycznej. W kondycjonowaniu mieloablacyjnym rolę immunosupresyjną spełniają w głównej mierze napromieniowanie i cyklofosfamid.

Ostatnim, ale nie najmniej ważnym aspektem kondycjonowania mieloablacyjnego jest zniszczenie w największym możliwym stopniu przetrwałych komórek nowotworowych (białaczkowych), tak by osiągnąć zaplanowany efekt trwałego wyleczenia. Odkrycie efektu immunologicznego wywieranego przez komórki dawcy na nieprawidłowe komórki gospodarza – GvL, zmniejszyło znaczenie tego aspektu kondycjonowania. Nadal jednak nie wiadomo, jaki poziom choroby resztkowej (*minimal residual disease* - MRD), może być zwalczony przez mechanizmy immunologiczne i czy dotyczy to w równym stopniu wszystkich schorzeń rozrostowych. Efekt mieloablacji nie jest konieczny w schorzeniach nienowotworowych. Klasycznym przykładem jest anemia aplastyczna.

Podobnie, jak w większości europejskich ośrodków transplantacyjnych standardowe mieloablacyjne postępowanie przygotowawcze w naszej klinice ujęte jest w 3 schematy [39]:

- Chemioterapii – schemat BuCy, na który składa się busulfan w dawce sumarycznej 16 mg/kg (od końca 2011 w postaci dożylniej) i cyklofosfamid w dawce 120 mg/kg wagi ciała biorcy. Schemat ten jest zwykle stosowany w schorzeniach mieloproliferacyjnych
- Napromieniowania całego ciała (*total body irradiation* – TBI) we frakcjonowanej dawce sumarycznej 12 Gy z dodatkiem cyklofosfamidu – sumarycznie 120 mg/kg wagi ciała. Schemat najczęściej stosowany w schorzeniach limfoproliferacyjnych

- Immunoablacji – cyklofosfamid w dawce sumarycznej 200 mg/kg wagi ciała z dodatkiem globuliny antylimfocytarnej (dawka jest zależna od stosowanego preparatu). Schemat jest stosowany w ciężkiej postaci anemii plastycznej.

1.2.2. Profilaktyka immunosupresyjna

Rutynowa profilaktyka immunosupresyjna ma za zadanie przeciwdziałać w początkowym okresie odrzucaniu przeszczepu, a w dalszym przebiegu zapobiegać rozwojowi choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi. Powikłanie to występuje w postaci ostrej i przewlekłej i mimo postępu wiedzy pozostaje główną przyczyną śmiertelności około-przeszczepowej – odpowiednio wczesnej i późnej. Do niedawna podział na ostrą (aGvHD – *acute GvHD*) i przewlekłą postać GvHD (cGvHD – *chronic GvHD*) oparty był o czas występowania objawów. Jeżeli pojawiły się przed setną dobą po transplantacji, rozpoznawano postać ostrą, a po dobie setnej - postać przewlekłą. Aktualny podział zlikwidował arbitralność czasową i wyodrębnił podgrupy oparte o obserwowany obraz kliniczny. Zmiana ta dokonała się w oparciu o coraz lepsze zrozumienie patomechanizmów rozwoju zaburzeń, szczególnie ostrej postaci GvHD [34]. Tabela 1 zawiera syntetyczne przedstawienie obowiązującego obecnie podziału obu postaci.

Tabela 1 Charakterystyka postaci GvHD
Table 1 GvHD types characteristics

Postać	Czas wystąpienia objawów	Objawy postaci ostrej	Objawy postaci przewlekłej
Ostra GvHD			
Klasyczna	≤ 100 dni	Tak	Nie
Przetrwiała, nawrotowa lub późna	> 100 dni	Tak	Nie
Przewlekła GvHD			
Klasyczna	Bez limitu czasu	Nie	Tak
Zespół nakładania	Bez limitu czasu	Tak	Tak

Objawy aGvHD związane są z uszkodzeniem komórek w wyniku toksyczności kondycjonowania i wynikają z uwolnienia szeregu prozapalnych cytokin – m.in. czynnika martwicy nowotworów alfa, interleukiny 1, które zapoczątkowują stymulację alogeniczną. W przypadku opóźnionego występowania aGvHD, rolę czynnika uszkadzającego może odgrywać infekcja. Następnym etapem jest aktywacja receptora limfocytów T dawcy poprzez zetknięcie ligandu prezentowanego przez przetrwałe komórki prezentujące antygen (*antigen presenting cells* – APC) biorcy. W procesie tym bierze udział szereg molekuł i innych subpopulacji limfocytów T wywierających działanie zarówno stymulujące, jak i hamujące aktywację. Aktywowane limfocyty migrują do tkanek docelowych (przewodu pokarmowego, dróg żółciowych i skóry) wywołując ich uszkodzenie przy współdziałaniu innych elementów komórkowych i wielu substancji aktywnych.

Istotą profilaktyki jest przeciwdziałanie potencjalnej aktywacji limfocytów T dawcy, a także rekrutacji APC biorcy. Efekt ten ma zapewnić podanie metotreksatu w dobach +1 (w dawce 15 mg/m² powierzchni ciała), +3, +6 i +11 (w dawce 10 mg/m² powierzchni ciała) oraz przewlekłe stosowanie cyklosporyny od doby -1 do doby +100, z następnym powolnym jej odstawianiem do doby +180. Schemat ten, opracowany w czasach

arbitralnej klasyfikacji GvHD względem czasu występowania, a nie rodzaju objawów wydaje się wymagać weryfikacji. Nowe podejście do profilaktyki utrudnia brak odpowiedzi na wiele pytań, w tym najważniejsze – dlaczego tylko część pacjentów cierpiących na to samo schorzenie podstawowe, mimo zastosowania tych samych schematów kondycjonowania i profilaktyki immunosupresyjnej rozwija objawy choroby.

Przewlekła postać GvHD jest plejotropowym zespołem, w którym patomechanizmy prowadzące do rozwoju wielu, zróżnicowanych objawów są znacznie mniej sprecyzowane, niż w przypadku choroby ostrej [40]. W obrazie klinicznym, cGvHD prezentuje się jako złożony proces autoimmunologiczny dotyczący wielu narządów i przypominający choroby z autoagresji. Mimo wielu badań, nie udowodniono jednak zaangażowania mechanizmów zależnych od przeciwciał [41].

U podłoża objawów leży aktywacja i reakcja limfocytów T podanych w materiale przeszczepowym lub rozwijających się z niego, skierowana przeciwko antygenom na komórkach biorecy. Kluczową rolę odgrywa tu grasica, która w wyniku uszkodzenia w procesie kondycjonowania lub ostrej GvHD traci zdolność selekcji autoreaktywnych limfocytów Th2. W efekcie zostają one uwolnione na obwód i zapoczątkowują reakcje na podłożu autoagresji. W procesie tym dochodzi do wtórnej aktywacji limfocytów B [42, 43].

Przewlekła GvHD stanowi ważny problem kliniczny, gdy stopień jej nasilenia upośledza w sposób istotny funkcję zajętego narządu. Obowiązujący do 2005 r. podział choroby wyróżniał postać ograniczoną i rozległą. W przypadku pierwszej postaci, do opanowania objawów ze strony zajętego narządu wystarczyło działanie miejscowe - np. zespół suchego oka leczony skutecznym nawilżaniem worka spojówkowego. W przypadku postaci rozległej, stopień uszkodzenia zajętych narządów wymagał systemowego leczenia immunosupresyjnego. Podział ten był jednak płynny i w dużej mierze uznaniowy, w szczególności w zakresie oceny stopnia nasilenia objawów. W 2005 roku podjęto próbę szczegółowej klasyfikacji objawów cGvHD [44]. Wskazano objawy diagnostyczne (patognomoniczne) dla poszczególnych narządów i dokonano podziału choroby w zależności od ilości zajętych organów i stopnia nasilenia zmian. Wyróżniono postać łagodną, umiarkowaną i ciężką. Ustalono jednocześnie kryteria konieczności włączenia leczenia systemowego, które jest jednoznacznie zalecane w postaci umiarkowanej i ciężkiej. W oparciu o skale punktowe podjęto także próbę ujednoczenia oceny klinicznej. Mają temu służyć formularze oceny zawierające kluczowe elementy diagnostyki cGvHD. Objawy przewlekłej GvHD pojawiają się najczęściej do trzeciego roku po przeszczepieniu, zwykle między 3 a 24 miesiącem. Przypada to więc na okres redukcji dawki cyklosporyny lub w okresie po całkowitym odstawieniu profilaktyki immunosupresyjnej.

1.2.3. Opieka potransplantacyjna

Czas występowania cGvHD, ale także najwyższe ryzyko wznowy przypada więc nie na wczesny, najbardziej burzliwy przebieg procesu transplantacji, ale na okres późniejszy. Jasne sprecyzowanie sytuacji klinicznych, w których wydłużenie lub skrócenie okresu profilaktyki, intensyfikacja leczenia lub szybkie odstawienie immunosupresji systemowej jest rzeczywiście konieczne i uzasadnione, ma istotne znaczenie ze względu na potencjalne ryzyko wznowy, a także ryzyko GvHD [45, 46]. Zarówno intensywność postępowania przygotowawczego, jak i zastąpienie hematopoezy „nowym” układem

krwiotwórczym dawcy nie są wystarczającymi elementami terapeutycznym przeszczepienia alogenicznego. Od czasu odkrycia, że zastosowanie przeszczepów całkowicie pozbawionych limfocytów dawcy (deplecja limfocytów) wiąże się z większym ryzykiem wznowy choroby [47, 48], elementem kluczowym wydaje się działanie przeszczepionych zdrowych, immunokompetentnych komórek dawcy skierowane przeciwko komórkom nowotworowym przetrwałym w organizmie biorcy – reakcja przeszczep przeciwko białaczce. Efekt ten ma szczególne znaczenie w przeszczepieniach dokonywanych w chorobach onkohematologicznych. Hamowanie niepożądanego efektu przeszczep przeciwko gospodarzowi może jednocześnie wygaszać pożądany efekt GvL. Znalezienie równowagi wyznaczającej niezbędny stopień tłumienia układu immunologicznego dawcy, taki by zachować jednocześnie pożądany stopień jego aktywności jest najtrudniejszym zadaniem długoterminowej opieki potransplantacyjnej, kiedy pacjent przebywa już w warunkach domowych, a kontakt z nim, czyli rutynowe kontrole ograniczone są do wizyt w ambulatorium. Problem jest szczególnie trudny ze względu na brak wypracowanych standardów odstawiania immunosupresji [46]. Istotą właściwej opieki potransplantacyjnej jest więc zaprogramowanie wizyt, a przede wszystkim właściwe wykorzystanie czasu kontroli, aby uzyskać pełną ocenę transplantacyjną. Poza szczegółowym wywiadem i badaniem przedmiotowym (z uwzględnieniem objawów GvHD) wykonywane są badania pozwalające ocenić stan przeszczepu, skuteczność immunosupresji, powikłania infekcyjne, a przede wszystkim obecność laboratoryjnych cech GvHD lub wznowy choroby. Istotne znaczenie ma tu czas uzyskania wyniku badania. Nie może on być zbyt długi, szczególnie jeśli związany jest z wymogiem reakcji – np. wdrożenia lub odstawienia leczenia. Drugim ważnym warunkiem badań monitorujących powinna być ich akceptowalna inwazyjność (szczególnie przy konieczności powtarzania badań) i łatwość uzyskania materiału do badań kontrolnych. Tych warunków nie spełnia np. pobieranie szpiku.

Na czas długoterminowej kontroli i okresowych wizyt przypadają więc kluczowe decyzje związane z ustaleniem równowagi między intensywnością immunosupresji – w celu zapobiegania lub leczenia GvHD, a wnikliwą oceną ryzyka wznowy choroby. Dodatkowy stres stanowi fakt, że ustalenie tej równowagi nie jest procesem wypracowywanym w wyniku długotrwałej obserwacji pacjenta i monitorowania codziennych trendów, ale ma charakter szybkiej decyzji na podstawie krótkotrwałego kontaktu i oceny aktualnych wyników. Dlatego tak ważnym jest kompleksowe podejście oraz obiektywne wskaźniki określające równowagę ryzyka i korzyści. Jednym z takich wskaźników jest wspomniana wyżej próba usystematyzowania różnorodnego obrazu GvHD (szczególnie postaci przewlekłej) i wyznaczenie punktów, które w sposób jednoznaczny wskazują na konieczność interwencji (leczenia immunosupresyjnego). Trudniej jednak znaleźć obiektywne wskaźniki określające pożądany nadzór immunologiczny.

1.3. Chimeryzm hematopoetyczny

Jednym z narzędzi diagnostycznych pozwalających na pośrednią ocenę nadzoru immunologicznego jest badanie chimeryzmu hematopoetycznego. Pojęcie chimera oznacza w mitologii greckiej stworzenie o głowie lwa, tułowiu kozy i ogonie w postaci węża. W mianownictwie biologicznym jest to organizm składający się z tkanek o różnych genotypach. Do pojęć medycznych wprowadził chimery w 1951 r. Anderson [49] defi-

niując ją jako organizm, którego komórki pochodzą z dwu lub więcej różnych linii zygocyticznych. W transplantologii pojęcie chimery i chimeryzmu funkcjonuje od 1956 r. [50]. Definicję tę spełnia organizm człowieka poddanego przeszczepieniu komórek macierzystych hematopoezy od innego osobnika. Wyjątek stanowią jedynie przeszczepy syngeniczne, a więc pochodzące od bliźniąt jednojajowych, które gwarantują pełną zgodność genotypową, a tym samym mogą być rozpatrywane jako autologiczne. W każdym innym przypadku przeszczepienia alogenicznego, mimo zgodności w badanych antygenach układu HLA, nie ma pełnej zgodności genotypów. Prowadzi to do sytuacji, w której każda komórka w organizmie poza układem krwiotwórczym charakteryzuje się inną sekwencją DNA niż komórki hematopoezy (lub ich część). Pozwala to na znalezienie różnic między dawcą a biorcą umożliwiającą monitorowanie procesu przeszczepienia.

Tabela 2 Definicje poszczególnych rodzajów chimeryzmu.
Table 2 Definitions of chimerism types.

Chimeryzm	Definicja
Chimeryzm całkowity (<i>complete chimerism</i> – CC)	W badanym materiale wykrywa się tylko komórki (DNA) pochodzące od dawcy
Chimeryzm mieszany (<i>mixed chimerism</i> – MC)	W próbkach stwierdza się zarówno komórki (DNA) dawcy, jak i biorcy
dynamika narastająca	W kolejnych badaniach stwierdza się wzrastającą ilość komórek pochodzących od biorcy
dynamika spadkowa	W kolejnych badaniach ilość komórek (DNA) pochodzenia biorcy obniża się
Chimeryzm rozszczepiony (<i>split chimerism</i>)	Komórki jednej lub kilku populacji (np. limfocyty T, NK) są pochodzenia biorcy, natomiast inne linie pochodzenia dawcy
Odnowa autologiczna (<i>autologous recovery</i> – AR)	Badanie próbek u chorego po przeszczepieniu wykazuje jedynie komórki pochodzenia biorcy

Po odkryciu, że w niektórych sytuacjach komórki pochodzące od dawcy i komórki przetrwałej hematopoezy biorcy mogą współistnieć w układzie krwiotwórczym, pojęcie chimeryzmu w transplantologii hematologicznej zostało rozszerzone [51, 52]. Wyróżnia się chimeryzm całkowity – kiedy wszystkie komórki układu hematopoezy pochodzą od dawcy, i chimeryzm mieszany – kiedy w układzie krwiotwórczym stwierdza się zarówno komórki pochodzące od dawcy, jak i od biorcy. Chimeryzm mieszany wyrażany jest w metodach półilościowych wartościami procentowymi, oznaczającymi odsetek DNA biorcy w badanej próbce. Ponieważ odsetek ten może zmieniać się w kolejnych oznaczeniach, stosowane są również określenia tendencji wzrostowej lub spadkowej ilości autologicznego DNA. Narastanie mieszanego chimeryzmu oznacza wzrost odsetka komórek autologicznych i może prowadzić do rekonstrukcji autologicznej hematopoezy. W większości przypadków oznacza to wznowę choroby. Ponadto, możliwa jest sytuacja, że jedynie komórki jednej, lub kilku (lecz nie wszystkich) subpopulacji mogą być pochodzenia dawcy, a pozostałe linie komórkowe pochodzą od biorcy. Zjawisko takie nosi określenie chimeryzmu rozszczepionego (*split chimerism*) [53].

Powyższy podział hematopoetycznego chimeryzmu poprzyszczepowego stał się możliwy dzięki wprowadzaniu metod diagnostycznych o coraz większej czułości, zawsze pozwalających na różnicowanie dawcy i biorcy [54–57].

Pierwotnie ocena chimeryzmu oparta była o badanie produktów polimorficznych genów [58] lub analizę heteromorfizmu chromosomów. Jedną z metod było określenie antygenów grupowych krwinek czerwonych [59], które ograniczało się jedynie do tych par biorca-dawca, które różniły się w zakresie grup głównych oraz badanie cytogenetyczne, ograniczone do par różniących się płcią lub obecnością aberracji u dawcy lub biorcy [60, 61]. Kolejną metodą było badanie metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH – *fluorescence in situ hybridization*) chromosomów Y [62]. W latach dziewięćdziesiątych rozpoczęto badania z wykorzystaniem technik molekularnych, co pozwoliło na monitorowanie chimeryzmu bez powyższych ograniczeń. Metody te oparte o techniki reakcji łańcuchowej polimerazy DNA (PCR – *polymerase chain reaction*) wykorzystują amplifikację tandemowych powtórzeń o dużej zmienności (VNTR – *variable number of tandem repeats*) lub krótkich powtórzeń tandemowych (STR – *short tandem repeats*) w strukturze DNA człowieka. VNTR i STR określane są czasami genetycznymi odciskami palców (*genetic fingerprints*) i pozwalają na jednoznaczną identyfikację materiału genetycznego [54]. Jeszcze większą czułość oferuje badanie polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNPs – *single-nucleotide polymorphisms*) do oznaczenia których wykorzystywana jest reakcja PCR z odwrotną transkryptazą (*reverse transcriptase PCR – RT PCR*). SNPs są bialelicznymi wariantami, które różnią się między sobą jedynie pojedynczym nukleotydem i występują w ludzkim genomie przeciętnie co 1,3 kB. Metoda ta, przy dużej czułości, jest jednak mniej specyficzna, niż badanie STR [63].

Tabela 3 Najczęściej stosowane metody do oceny chimeryzmu (objaśnienia w tekście)
Table 3 Most frequently used methods to assess chimerism [explanations in text]

Metoda	Czułość (%)
Badanie cytogenetyczne	5-10
Badanie antygenów czerwonych	5
FISH X /Y	0,1-0,001
STR PCR (metody fluorescencyjne i kapilarne)	1-5
RT PCR	0,001-0,0001

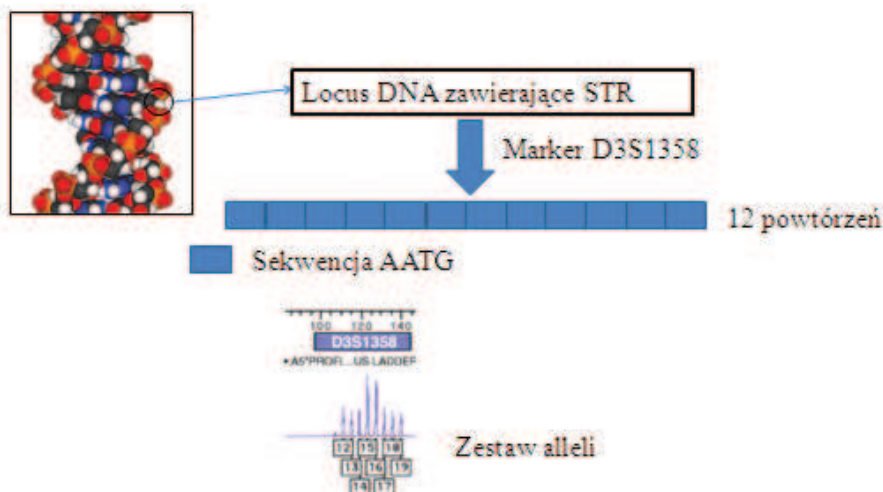
Czułość metody w przypadku oceny chimeryzmu definiowana jest przez możliwy do wykrycia odsetek komórek występujących w mieszaninie w mniejszej ilości (zwykle komórek biorcy). I tak czułość 1% oznacza, że metoda ta pozwala na zidentyfikowanie 1 komórki biorcy spośród 99 komórek dawcy.

Pod koniec ubiegłej dekady za złoty standard badania chimeryzmu w oparciu o metody molekularne uznano analizę STR lub VNTR [64].

1.3.1. Chimeryzm polimorficznych sekwencji DNA

Poszukiwania metod pozwalających na ocenę ilościową chimeryzmu zwróciły uwagę badaczy na metody stosowane w medycynie sądowej. Identyfikacja śladów biolo-

gicznych oraz ustalanie ojcostwa z zastosowaniem metod amplifikacji DNA były podstawą do rozwoju badań chimeryzmu potransplantacyjnego [65].



Rycina 2 Schemat STR markera D3S1358
 Figure 2 The schema of the D3S1358 STR marker

Strategia oceny molekularnej chimeryzmu polega na znalezieniu unikalnych fragmentów (sekwencji) DNA, charakterystycznych i różniących się u biorcy i dawcy, a tym samym pozwalających na jednoznaczną identyfikację pochodzenia DNA w badanej próbce [54]. W genetyce używa się określenia markery genetyczne - oznaczającego polimorficzne cechy jakościowe organizmu, które dają się analizować metodami laboratoryjnymi. Metody ich analizy, stosowane pierwotnie w medycynie sądowej, były implementowane do transplantologii. Najwcześniejszą była ocena polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych oparta o badanie punktowych mutacji (dotyczących 1 nukleotydu) w obrębie genu. Metoda ta, czaso- i pracochłonna, o stosunkowo niskiej czułości (5-10%), wymagająca zastosowania szerokiej palety enzymów restrykcyjnych była mało użyteczna do seryjnych oznaczeń [66, 67]. W latach 80. odkryto, że ok. 20% genomu człowieka stanowią powtarzające się, niekodujące sekwencje DNA. Ze względu na długość (ilość nukleotydów) podzielono je na mikro- i minisatelitarne DNA. Mikrosatelitarne DNA określane także mianem tandemowych powtórzeń o dużej zmienności (VNTR), stanowi powtarzane jedna za drugą (tandemowo) sekwencje składające się z 10-100 par zasad, natomiast minisatelity, nazywane krótkimi powtórzeniami tandemowymi (STR) nie przekraczają długości 7 par. Dotychczas odkryto ponad 10^6 STR w genomie człowieka. Sekwencje te, zlokalizowane na różnych chromosomach, mogą powtarzać się w danym locus allelicznym od 4 do 50 razy, co stwarza wysoce polimorficzny osobniczo układ. Kardynalną zaletą badań tych sekwencji jest więc fakt, że pozwalają na różnicowanie praktycznie każdej pary dawca – biorca niezależnie od płci, HLA, czy choroby podstawowej. Rycina 2 przedstawia schematycznie STR w określonym locus allelicznym, składający się z 4 nukleotydów i powtarzający się 12 razy. W dolnej części diagramu przedstawiono zestaw możliwych prezentacji allelicznych STR - markera locus klasyfikowanego w kodeksie medycyny sądowej jako D3S1358.

Wielkość amplifikowanego fragmentu jest dodatkową zaletą oceny STR. W przypadku VNTR, ze względu na dłuższy odcinek DNA może dochodzić do nierównomierności amplifikacji, co zmniejsza czułość tej metody. Produkt PCR jest następnie (lub równoczasowo) hybrydyzowany z radioaktywną lub fluorescencyjną sondą, a następnie poddany identyfikacji metodą elektroforezy [68]. Obecnie praktycznie zarzucono zastosowanie znaczników radioaktywnych oraz elektroforezę w żelu poliakrylamidowym. Zastąpił ją znacznie bardziej czuły system znaczników fluorescencyjnych, który pozwala na jednoczesne zastosowanie kilku sond sprzężonych z różnymi fluorochromami, a tym samym analizę kilku loci mikrosatelitarnych w tej samej próbce, w jednym czasie (multiplex PCR) [69]. Z kolei wprowadzenie elektroforezy kapilarnej i zautomatyzowanie procesu pozwala na pośrednią ocenę ilościową DNA poprzez ocenę pola pod krzywą pików. Obecnie dostępne i najczęściej używane są komercyjne zestawy multiplexowe zawierające 9-10 markerów loci STR, które pozwalają, nawet w bardzo spokrewnionych populacjach, na znalezienie przynajmniej jednego różnicującego dawcę i biorcę markera.

1.3.2. Chimeryzm erytropoetyczny

Kluczową rolę w powodzeniu przeszczepienia odgrywają antygeny HLA, których ekspresja stwierdzana jest już na wczesnych komórkach progenitorowych. Antygeny czerwonekrwinkowe pojawiają się na komórkach w późniejszej fazie dojrzewania, a brak ich zgodności między biorcą a dawcą nie stanowi przeciwwskazania do przeszczepienia. Ponieważ geny kodujące HLA i antygeny grupowe krwi dziedziczą się niezależnie, mimo pełnej zgodności HLA, u ok. 40-50% par biorca-dawca notuje się różnice w zakresie układu AB0 lub Rh. Odsetek ten jest nawet większy i może sięgać 80% par, jeżeli dokonuje się oznaczeń szerszych – obejmujących kilka lub kilkanaście antygenów grupowych, poza głównymi. W rutynowych badaniach wykorzystuje się oznaczenia w układzie AB0 i Rh oraz badanie miana przeciwciał naturalnych (izoaglutynin) w surowicy. Różnice między antygenami, a w szczególności obecność przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom u dawcy i biorcy są podstawą do podziału niezgodności na dużą, małą i mieszaną [70, 71]. Przedstawiony w tabeli 4 podział opiera się na rutynowo oznaczanych antygenach grup głównych AB0 oraz obecności naturalnych izoaglutynin.

Tabela 4 Charakterystyka poszczególnych typów niezgodności.
Table 4 Characteristics of incompatibility types

Niezgodność	Definicja	Układ AB0 u dawcy i biorcy
Duża	Obecność w surowicy biorcy izoaglutynin skierowanych przeciwko antygenom obecnym na krwinkach dawcy	Biorca grupy 0, -- dawca A, B lub AB Biorca A lub B, - dawca AB
Mała	Obecność w surowicy dawcy izoaglutynin skierowanych przeciwko antygenom na krwinkach biorcy	Biorca grupy A,B lub AB, - dawca grupy 0
Mieszana	Kombinacja obu niezgodności (w surowicy dawcy i biorcy obecność niezgodnych izoaglutynin skierowanych odpowiednio przeciwko antygenom na krwinkach biorcy i dawcy)	Biorca grupy A, - dawca B Biorca grupy B, - dawca A

Niezgodność w zakresie grup głównych i związana z tym obecność krzyżowo reagujących izoaglutynin niesie ze sobą ryzyko komplikacji już w momencie przetoczenia przeszczepu. Kluczową rolę odgrywa tu rodzaj materiału przeszczepowego. Preparaty uzyskane metodą cytaferazy z krwi obwodowej dawcy zawierają niewielką ilość erytrocytów (zwykle poniżej 10 ml objętości preparatu) oraz niewielką ilość osocza. W tym przypadku można problem niezgodności i ryzyka komplikacji praktycznie pominąć [72]. Inaczej, gdy materiałem przeszczepowym jest szpik. Ponieważ objętość przeszczepu wynosi zwykle ponad 1000 ml krwi szpikowej, może być to porównane z przetoczeniem w przybliżeniu 1 j. koncentratu krwinek czerwonych [73]. W przypadku niezgodności większej wiąże się to z wysokim ryzykiem ostrej reakcji hemolitycznej, wywołanej reakcją między izoaglutyninami biorcy a antygenami na erytrocytach dawcy. Istnieją dwie metody zapobiegania temu niepożądanemu efektowi. Pierwsza powszechnie stosowana w Europie polega na wykonaniu zabiegu lub zabiegów plazmaferazy u biorcy przed przetoczeniem materiału przeszczepowego. Ma to na celu usunięcie przeciwciał [74, 75]. Wskazania do zabiegu opiera się o określenia ich miana. Wytyczne zalecają przygotowawczą plazmaferazę u biorców, u których miano izoaglutynin jest wyższe lub równe 64. W przypadku miana 32 zabiegi prewencyjne uzależnione są od ilości erytrocytów w przeszczepie [76]. Inną metodą, częściej obecnie stosowaną w Stanach Zjednoczonych jest usunięcie erytrocytów z materiału przeszczepowego, zwykle przy pomocy separatora komórkowego lub innymi metodami laboratoryjnymi [72].

Innym powikłaniem niezgodności większej jest opóźnienie regeneracji układu czerwonekrwinkowego, a niekiedy głęboka depresja erytropoezy prowadząca do czystej aplazji czerwonekrwinkowej (PRCA – *pure red cell anaemia*) [77–79]. To ostatnie powikłanie, niejasne etiopatogenetycznie, tłumaczy się między innymi głębokim uszkodzeniem progenitorów erytropoezy zawartych w materiale dawcy oraz przetrwaniem elementów systemu immunologicznego biorcy – głównie limfocytów B i plazmocytów produkujących izoaglutyniny charakterystyczne dla biorcy [80].

W przypadku niezgodności mniejszej występuje ryzyko powikłań hemolitycznych; bezpośrednich, w trakcie przetoczenia, ale także opóźnionych [81–84]. Pierwsze związane są z oddziaływaniem izoaglutynin dawcy z erytrocytami biorcy, drugie z zawartymi w materiale przeszczepowym tzw. „limfocytami pasażerskimi”. W przypadku szczególnie wysokiego miana izoaglutynin u dawcy zaleca się redukcję osocza w przeszczepie lub modyfikację immunosupresji w początkowym okresie po przeszczepieniu [76, 85]. Opóźnione powikłania hemolityczne występują zwykle ok. 10-15 dnia po przeszczepieniu, w okresie regeneracji i związane są z obecnością w przeszczepie limfocytów B, z przetrwałą zdolnością syntezy izoaglutynin. Także w przypadku niezgodności mniejszej odnotowuje się w piśmiennictwie możliwość opóźnienia regeneracji hematopoezy [86].

Ze względu na czas przeżycia dojrzałych erytrocytów w pierwszych trzech miesiącach po przeszczepieniu obserwuje się występowanie dwóch populacji krwinek – przetrwałych erytrocytów biorcy oraz erytrocytów dawcy, co określa się mieszanym chimeryzmem erytropoetycznym (eMC – *erythropoietic mixed chimerism*). Powyżej doby +100 populacja erytrocytów biorcy ulega stopniowej degradacji, a we krwi obserwuje się jedynie erytrocyty o układzie antygenowym charakterystycznym dla dawcy. Zjawisko to – faktycznej zmiany grupy krwi – określa się mianem całkowitego chimeryzmu erytropoetycznego (eCC – *erythropoietic complete chimerism*) [71, 87, 88]. Zjawisko występowania dwóch populacji krwinek o odmiennych antygenach grupowych obserwuje się

w standardowo stosowanych testach do oznaczeń grup krwi. Pozwala to jedynie na ocenę jakościową zjawiska. Nie niesie natomiast informacji ilościowych. Podejmowano próby oznaczeń antygenów czerwonych przy pomocy cytometru przepływowego, co pozwalało na oceny półilościowe [89, 90]. Jednak metoda ta, kosztowna i czasochłonna, nie znalazła szerszego zastosowania.

Odrębnym zagadnieniem jest zjawisko zanikania izoaglutynin biorcy. Tempo zanikania przeciwciał naturalnych może być różne w zależności od typu niezgodności i osiągnięcia całkowitego chimeryzmu [91]. Za ich produkcję odpowiedzialne są przetrwałe, mimo zastosowanego kondycjonowania plazmocyty. Istnieją doniesienia, że na ich zanikanie może mieć wpływ występowanie GvHD, co, jak się postuluje, ma dowodzić występowania związanego z GvHD efektu przeszczep przeciwko plazmocytom [80].

Zjawisko to, jak wspomniano powyżej, może dowodzić przetrwania immunokompetentnych elementów komórkowych, których rola w długofalowym przebiegu przeszczepienia nie jest dokładnie określona.

2. ZAŁOŻENIA I CELE PODJĘTYCH BADAŃ

Mimo postępu w dziedzinie terapii zachowawczej, przeszczepienie komórek macierzystych hematopoezy nadal pozostaje w wielu chorobach układu krwiotwórczego jedyną metodą leczniczą pozwalającą na uzyskanie długotrwałego przeżycia bez cech choroby. Ryzyko procedury transplantacyjnej zostało w ostatnim dziesięcioleciu istotnie ograniczone. Stało się tak dzięki postępowi w dziedzinie terapii wspomagającej, skutecznemu leczeniu infekcji z zastosowaniem nowych generacji leków, rozwojowi metod diagnostycznych pozwalających na szybkie wykrywanie powikłań i skuteczne im przeciwdziałanie na zasadzie prewencji lub leczenia wyprzedzającego [39]. Wczesna śmiertelność potransplantacyjna w znacznie mniejszym stopniu decyduje obecnie o niepowodzeniu przeszczepienia. Ograniczenie śmiertelności związanej z toksycznością procedury, powikłaniami aplazji szpiku i dysfunkcją układu immunologicznego, a także coraz skuteczniejsze leczenie choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi zwiększyło populację długotrwałe przeżywających. Obserwacja tej populacji pozwala na stwierdzenie, że obecnie głównym problemem transplantacyjnym stała się wznowa choroby po przeprowadzonej transplantacji. Problem jest tym bardziej istotny, że leczenie wznowy choroby po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych jest najczęściej mało skuteczne, a większość chorych ginie mimo podjętej terapii. Biorąc pod uwagę, że chorzy z ostrymi białaczkami poddani transplantacji byli w przeszłości leczeni schematami wielolekowymi, możliwości skutecznej terapii jest bardzo ograniczona. Ważkość problemu dostrzegł w 2010 roku amerykański Narodowy Instytut Raka (NCI – National Cancer Institute) poświęcając problemom wznów potransplantacyjnych międzynarodowe spotkanie robocze, które w kilku podgrupach zajęło się kompleksowym opracowaniem szeregu zagadnień dotyczących wznowy choroby po przeszczepieniu [92]. Tematem opracowań stały się między innymi problem reakcji przeszczep przeciwko białaczce (guzowi) [93], monitorowanie poprzszczepowe i działania prewencyjne [94, 95]. Wskazano również na zasadnicze trudności w formułowaniu wniosków płynących z dostępnych badań.

Rola długotrwałe utrzymującego się mieszanego chimeryzmu jest do chwili obecnej przedmiotem kontrowersji. Zjawisko to może oznaczać wytworzenie mechanizmów stabilnej tolerancji, ale również wskazywać na zagrożenie wznową choroby [96, 97]. W przeszczepieniach niemieloablacyjnych i o zredukowanej toksyczności oznaczanie chimeryzmu we wczesnym okresie poprzszczepowym ma precyzyjnie określone znaczenie, ponieważ warunkuje decyzje terapeutyczne (m.in. zastosowanie DLI – *donor lymphocyte infusion*) [98]. Nie ma natomiast jednoznacznego stanowiska co do roli monitorowania chimeryzmu w przeszczepieniach mieloablacyjnych. Nowoczesne, molekularne metody podważyły wcześniejszą tezę, że przeszczepienia z kondycjonowaniem mieloablacyjnym prowadzą do całkowitego chimeryzmu już we wczesnym okresie potransplantacyjnym. A wobec tego rodzi się pytanie - jakie jest znaczenie mieszanego, szczególnie wzrostowego chimeryzmu w tego typu transplantacjach i czy zjawisko to powinno wpływać na postępowanie potransplantacyjne. W piśmiennictwie brak jest także przesłanek, które pozwoliłyby na jednoznaczną odpowiedź, czy w przypadku wybranych chorych wydłużenie profilaktyki pozwoliłoby na uniknięcie lub złagodzenie objawów cGvHD a także, czy chorzy ze zidentyfikowanymi czynnikami wysokiego ryzyka wznowy mogą odnieść korzyść z wcześniej podjętej redukcji profilaktyki immunosupresyjnej. Ze względu na różnorodność standardów odstawiania CsA po transplantacji i brak obiektywnych wskaźników mogących wspomóc klinicystę w zakresie planowania

czasu trwania profilaktyki, wydawało się uzasadnionym podjęcie badań dotyczących tego problemu. Własne dane dotyczące cGvHD oraz doniesienia dotyczące zwiększonego ryzyka wznowy u chorych z MC publikowane w literaturze [99, 100], stały się podstawą do zmian w obowiązującym w naszym ośrodku protokole profilaktyki immunosupresyjnej w oparciu o badanie chimeryzmu.

Podejmując badania, założono, że oznaczany metodami molekularnymi przetrwały do doby 60. MC, bez objawów GVHD wyodrębnia grupę chorych zagrożonych wznową i podjęto badania nad wpływem modyfikacji profilaktyki immunosupresyjnej na częstość jej występowania. Wysłano hipotezę, że wcześniejsza redukcja immunosupresji może przyczynić się do zmniejszenia odsetka wznów w porównaniu do grupy historycznej. Jednocześnie założono ściśle monitorowanie występowania zarówno ostrej jak i przewlekłej GvHD.

Wpływ niezgodności w układzie AB0 na występowanie powikłań okołoprzeszczepowych i ogólne przeżycie jest przedmiotem dość licznych, często sprzecznych publikacji [101–107]. Natomiast znaczenie monitorowania chimeryzmu erytropoetycznego i wpływ długotrwałego utrzymywania się własnej erytropoezy biorcy (eMC) ma niewyjaśnione znaczenie kliniczne. Nieliczne są również opracowania dotyczące monitorowania miana izoaglutynin i znaczenia klinicznego zmian.

Jako cele pracy postawiono:

1. Ocenę użyteczności systematycznych badań chimeryzmu metodami molekularnymi we krwi obwodowej i szpiku w zakresie prognozowania:
 - wystąpienia wznowy choroby
 - wystąpienia rozległej postaci przewlekłej choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi
2. Określenie strategii monitorowania chimeryzmu erytropoetycznego i jego użyteczności w:
 - zakresie prognozowania powikłań zależnych bezpośrednio od zaburzeń regeneracji układu hematopoezy
 - ryzyka wystąpienia innych powikłań
3. Modyfikację obowiązującego protokołu opieki potransplantacyjnej w zakresie strategii profilaktyki immunosupresyjnej

3. MATERIAŁ I METODY

Ze względu na to, że dobór grupy badanej musiał mieć charakter losowy (populacja poddana transplantacji) w rozdziale przedstawiono najpierw protokół badania, a następnie opracowanie dotyczące badanej populacji.

3.1. Protokół badania

Zgodnie z obowiązującym w ośrodku protokołem transplantacyjnym pacjenci po przeszczepieniu byli objęci długoterminową obserwacją po wypisie ze szpitala w warunkach ambulatoryjnych, z systematyczną kontrolą stanu ogólnego, obecności powikłań i monitorowaniem immunosupresji.

W okresie pierwszych 100 dni po przeszczepie pacjenci podlegali regularnym kontrolom stanu zdrowia w czasie cotygodniowych wizyt. W dalszym czasie wizyty rutynowe odbywały się w odstępach 2-4 tygodni. W ciągu 2 roku od przeszczepu pacjenci zgłaszali się na wizyty kontrolne wyznaczane w odstępach 1 miesiąca. W kolejnych latach wizyty odbywały się co 3 miesiące. Okres pomiędzy wizytami ulegał zmianie w przypadku zaobserwowania powikłań.

W czasie wizyt planowych przeprowadzano rutynowe badanie lekarskie oraz pobierano krew na badania:

- Badanie podmiotowe ze szczególnym uwzględnieniem objawów GvHD
- Badanie przedmiotowe z uwzględnieniem wagi ciała
- Ocena:
 - Morfologii krwi
 - Gospodarki wodno-elektrolitowej,
 - Funkcji nerek , wątroby
 - Profil wirusologiczny skrócony (CMV) – w okresie 1 roku po przeszczepie
 - Stężenia cyklosporyny – do czasu utrzymywania terapii

Po upływie 30, 60, 100, 180 i 360 dni od przeszczepu, a następnie co 6 miesięcy, w czasie tzw. wizyty podsumowującej pacjent poddawany był panelowi badań, których wyszczególnienie przedstawia (Tabela 5). Oznaczenia A i B zawarte w tej tabeli wskazują na szczególne postępowanie w odniesieniu do wybranej grupy pacjentów (A) lub monitorowania stężenia cyklosporyny (B).

Tabela 5 Zestawienie wykonywanych badań.
 Table 5 The summary of carried out examination

Badania	30	60	100	180	360	Następnie co 6 mcy
Badanie podmiotowe ze szczególnym uwzględnieniem objawów GvHD	+	+	+	+	+	+
Badanie przedmiotowe z uwzględnieniem wagi ciała	+	+	+	+	+	+
Pobranie krwi celem oceny:						
Morfologii krwi	+	+	+	+	+	+
Gospodarki wodno-elektrolitowej	+	+	+	+	+	+
Gospodarki żelazowej	+	+	+	+	+	+
Funkcji nerek, wątroby	+	+	+	+	+	+
Chimeryzmu metodami molekularnymi	+	+	+	+	+	+
Grupy krwi			+	+	+	A
Profilu wirusologicznego	+	+	+	+	+	+
Stężenia cyklosporyny	+	+	+	+	B	B
Pobranie szpiku do badania:						
Cytologicznego	+	+	+	+	+	+
Choroby resztkowej	+	+	+	+	+	+
Chimeryzmu metodą molekularną	+	+	+	+	+	
Cytogenetycznego	+	+	+	+	+	
Badanie spirometryczne	+	+	+	+	+	+
Badanie okulistyczne z testem Schirmera	+	+	+	+	+	+
Badanie echokardiograficzne u pacjentów po uprzednim leczeniu antracyklinami			+		+	

A – U pacjentów z niezgodnością w zakresie grup głównych krwi AB0 lub Rh między biorcą a dawcą monitorowano w trakcie wizyt podsumowujących obecność antygenów grupowych na krwinkach czerwonych i miano przeciwciał naturalnych w surowicy do czasu pełnej zmiany grupy krwi.

B – Stężenie cyklosporyny monitorowano do doby setnej co tydzień, następnie w zależności od redukcji dawki leku w odstępach co 3-4 tygodnie, aż do całkowitego odstawienia CsA.

W protokole opieki potransplantacyjnej stosowanym w okresie badania (1994-2004 i 2010-2011) wyniki badań chimeryzmu nie miały wpływu na postępowanie kliniczne. Protokół przewidywał następujące działania profilaktyczno-terapeutyczne w zakresie immunosupresji:

- u chorych bez cech choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD) kontynuowano podawanie cyklosporyny w dawkach utrzymujących stężenie terapeutyczne do doby +100, a następnie stopniowo zmniejszano jej dawkowanie, tak, aby odstawić lek w dobie +180
- chorzy z objawami ostrej lub przewlekłej GvHD byli w ramach I rzutu terapii leczeni sterydami kory nadnerczy (encorton doustnie lub metylprednisolon dożylnie) w zależności od obrazu klinicznego. W przypadku nieskuteczności leczenia I rzutu stosowano inne leki immunosupresyjne (mykofenolan mofetilu, takrolimus, metotreksat, azathioprynę, rituximab, sirolimus). U tych chorych odstawienie immunosupresji miało miejsce w przypadku całkowitego wygaszenia objawów choroby lub zmniejszenia nasilenia objawów do stopnia postaci ograniczonej.

Od lat 2005-2009 uzależniano strategię profilaktyki immunosupresyjnej od wyników badania chimeryzmu metodami molekularnymi z decydującym znaczeniem wyniku oznaczenia chimeryzmu we krwi obwodowej

- U pacjentów, którzy osiągnęli całkowity chimeryzm (CC) w dobie +30 lub +60 kontynuowano leczenie cyklosporyną ze szczególną starannością monitorując i utrzymując poziom terapeutyczny leku we krwi do doby +100, a następnie stopniowo, powolnie zmniejszano dawkę (o 25 mg co 2 tygodnie), co zwykle oznaczało wydłużenie immunosupresji poza dobę +180
- U pacjentów, u których w dobie +60 stwierdzano obecność chimeryzmu mieszanego (MC) rozpoczynano odstawianie cyklosporyny – 25 mg co 2 tygodnie, co oznaczało całkowite odstawienie leku przed dobą +180.
- Pacjenci prezentujący objawy GvHD byli leczeni zgodnie z wcześniejszym protokołem, niezależnie od wyników badań chimeryzmu

3.2. Charakterystyka badanych grup pacjentów

Materiałem badawczym wykorzystanym w pracy były dane dotyczące 320 alogenicznych przeszczepów szpiku przeprowadzonych w Klinice Hematologii i Transplantologii GUMed w latach 1994-2011.

W zakresie realizacji pierwszego celu badawczego (określenie znaczenia chimeryzmu STR oraz wpływu modyfikacji immunosupresji) materiał ten przedstawiono jako:

- Grupę poddaną analizie – dane dotyczące wszystkich analizowanych pacjentów, zawierające:
 - Dane pacjentów wykorzystane do analiz porównawczych – dotyczące zarówno pacjentów z oznaczanym, jak i nieoznaczanym chimeryzmem
 - Dane pacjentów poddanych protokołowi badawczemu, u których zgodnie z protokołem monitorowano systematycznie chimeryzm poprzyszczepowy
- Grupę badaną – dane dotyczące pacjentów, u których zgodnie z założeniami dokonywano modyfikacji profilaktyki immunosupresyjnej oraz grup porównawczych

W zakresie drugiego celu badawczego z grupy poddanej analizie wyodrębniono grupę badaną.

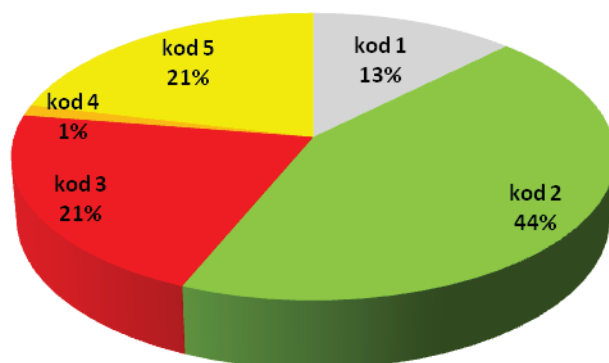
Obserwacje chorych zostały zamknięte na dzień 01-01-2013.

3.2.1. Grupa poddana analizie

Przedstawione cele pracy oraz związane z nimi analizy statystyczne wskazywały na potrzebę zawężenia i ujednoczenia całości materiału (obejmującego 320 chorych) jedynie do tych pacjentów, którzy mieli rutynowe wskazania do przeszczepu i jedynie mieli oablacyjne kondycjonowanie. Warunków tych nie spełniało 80 pacjentów spośród wszystkich poddanych transplantacji. Dokładne powody wykluczenia przedstawia Tabela 6.

Tabela 6 Powody wykluczenia z grupy poddanej analizie
Table 6 Exclusion criteria in analysed group

Kod	Opis	Liczba
1	Przeszczepienia z brakiem przyjęcia przeszczepu (graft failure) z następczym doszczepieniem	10
2	Przeszczepienie o charakterze ratunkowym – transplantacje przeprowadzane w niepełnej lub bez remisji choroby, co wiązało się z niestandardowym postępowaniem przygotowawczym	35
3	Przeszczepienia niemieloablacyjne	17
4	Przeszczepienie syngeniczne	1
5	Przeszczepienia w latach 1994-1996	17
	Łącznie liczba przeszczepień nieuwzględnionych	80



Rycina 3 Rozkład procentowy przyczyn wykluczenia chorych
 Figure 3 Percentage distribution of patients' exclusion reasons

Tabela 7 Grupa analizowana – liczba przeszczepień od dawców rodzinnych i niespokrewnionych w kolejnych latach

Table 7 The analyzed group – number of transplants from family donors and unrelated in following years

Rok przeszczepu	Rodzaj przeszczepu		Razem (% wszystkich)
	Od dawcy rodzinnego (FAM)	Od dawcy niespokrewnionego (MUD)	
1997	15		15 (100%)
1998	15		15 (100%)
1999	17		17 (94%)
2000	17		17 (89%)
2001	13	1	14 (82%)
2002	13	3	16 (70%)
2003	19	5	24 (83%)
2004	13	8	21 (72%)
2005	12	9	21 (70%)
2006	7	7	14 (82%)
2007	2	1	3 (43%)
2008	10	3	13 (68%)
2009	8	9	17 (68%)
2010	6	7	13 (93%)
2011	7	13	20 (77%)
Suma końcowa	174	66	240 (75%)

W kolejnych zestawieniach tabelarycznych przedstawiono dane dotyczące grupy poddanej analizie. Celem oceny, czy wykluczenia nie mają charakteru selektywnego zestawiono dane dotyczące grupy analizowanej z danymi dotyczącymi wszystkich wykonanych transplantacji.

Tabela 7 przedstawia liczby transplantacji wykonanych w kolejnych latach z podziałem na pochodzenie materiału przeszczepowego. Do 2000 roku przeszczepy stanowiły jedynie komórki progenitorowe pochodzące od dawców rodzinnych (FAM – *match family donor*). W 2001 r. dokonano pierwszego przeszczepienia komórek macierzystych układu krwiotwórczego pochodzących od dawcy niespokrewnionego (MUD – *match unrelated donor*). W 2010 roku liczba transplantacji MUD przekroczyła liczbę przeszczepień od dawców spokrewnionych. Rozkład wykluczeń w latach 1997 – 2006 był równomierny i wahał się od 0 do 28%. Rok 2007 i dwa następne lata był okresem wygaśnięcia, a następnie wznowienia działalności, po dokonaniu generalnego remontu oddziału przeszczepowego. Ze zrozumiałych względów, w roku 2007 i początkowym okresie 2008 dokonywano jedynie transplantacji ratunkowych.

Wskazaniem do przeszczepienia były głównie schorzenia onkohematologiczne, z wyjątkiem ciężkiej postaci anemii aplastycznej i nocnej napadowej hemoglobinurii w fazie aplastycznej.

Tabela 8 przedstawia wskazania oraz liczebność grup chorych w zależności od rodzaju transplantacji (FAM i MUD). Najliczniejszą była grupa chorych z ostrymi białaczkami – szpikową i limfoblastyczną. Transplantacje u chorych z przewlekłą białaczką szpikową były przeprowadzane głównie w latach 90-tych i na początku XXI wieku. Od roku 2003 liczba transplantacji wykonywanych u chorych z tym wskazaniem systematycznie spada. Trzecim pod względem liczby dokonanych transplantacji wskazaniem jest zespół mielodysplastyczny. Liczebności grup kształtują się podobnie w obu rodzajach transplantacji.

W zestawieniu rozpoznań największy odsetek wykluczeń dotyczył chłoniaków: Hodgkina i nieziarniczych oraz CLL. W schorzeniach tych przeprowadzano głównie przeszczepienia po kondycjonowaniu niemieloablacyjnym lub o zredukowanej toksyczności.

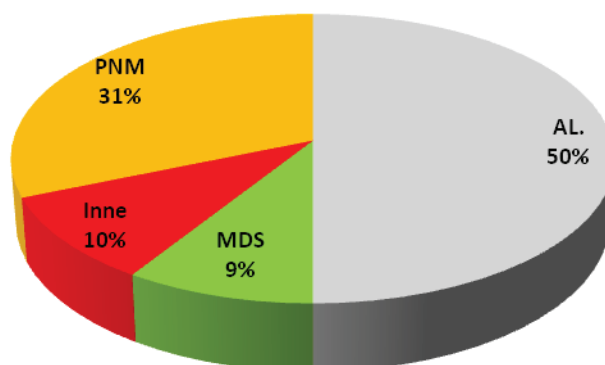
Tabela 8 Wskazania do przeszczepienia w grupie poddanej analizie.
 Table 8 Transplant indications in analyzed group

Rok przeszczepu	Rodzaj przeszczepu		Razem (% wszystkich)
	Od dawcy rodzinnego (FAM)	Od dawcy niespokrewnionego (MUD)	
aCML	2	1	3 (100%)
ALL	28	13	41 (80%)
AML	57	27	84 (77%)
CLL	3		3 (38%)
CML	58	13	71 (77%)
HL	1	2	3 (50%)
CEL	1		1 (100%)
MDS	14	8	22 (76%)
MF	1		1 (33%)
MM	2	2	4 (80%)
NHL	1		1 (20%)
PNH	1		1 (100%)
SAA	5		5 (83%)
Łącznie	174	66	240 (75%)

Ze względu na dalsze analizy oraz liczbę transplantacji w poszczególnych wskazaniach do przeszczepienia, całą grupę podzielono na 4 podgrupy wskazań, które przedstawia tabela 9. Pacjentów z ostrą białaczką szpikową i limfoblastyczną sklasyfikowano w obrębie jednej grupy. Do grupy „Inne” włączono pacjentów z grup o najmniejszej liczebności transplantacji.

Tabela 9 Podział wskazań do przeszczepienia na 4 podgrupy
 Table 9 Aggregation of indications for transplant into 4 subgroups

Podgrupa	Rozpoznanie
AL - ostre białaczki	Ostra białaczka szpikowa Ostra białaczka limfoblastyczna
MDS - zespoły mielodysplastyczne	
PNM - przewlekłe nowotwory mieloproliferacyjne	Przewlekła białaczka szpikowa Samoistne włóknienie szpiku Przewlekła białaczka eozynofilowa
Inne	Chłoniak nieziarniczny Szpiczak plazmocytowy Przewlekła białaczka limfocytowa Chłoniak Hodgkina Nocna napadowa hemoglobinuria Ciężka postać anemii aplastycznej



Rycina 4 Podgrupy chorych wydzielone wg wskazań do przeszczepienia
 Figure 4 Subgroups of patients according to transplant indications

Wiek pacjentów poddanych analizie w chwili transplantacji zwierzał się w przedziale od 16 do 68 lat, z przewagą mężczyzn. Tabela 10 przedstawia rozkład wieku oraz płci pacjentów poddanych obu rodzajom przeszczepienia w wydzielonych wcześniej podgrupach schorzeń. Średnia wieku pacjentów z ostrymi białaczkami była najniższa i wynosiła 37,6 lat. Grupa ta charakteryzowała się jednak największą rozpiętością wieku – od 18 do 68 lat. Najwyższy średni wiek zanotowano w grupie MDS. Pacjenci z grupy PNM (głównie z CML) byli poddawani przeszczepieniu około 40 roku życia (średnia wieku 39,3 lat). Wiek chorych z innymi wskazaniami do transplantacji mieścił się w szerokim zakresie od 16 do 60 lat. Średnia wieku całej analizowanej populacji poddanej transplantacji wynosiła 38,2 lat. Najmłodszy pacjent miał 16 lat w chwili przeszczepienia, najstarszy 68 lat.

Tabela 10 Wiek i płeć biorców przeszczepów od dawców rodzinnych i niespokrewnionych w grupie poddanej analizie z uwzględnieniem 4 podgrup wskazań.
 Table 10 The age and gender characteristics of recipients from family donors and unrelated in the analyzed group, taking account of 4 subgroups of indications

Rozpoznanie	Rodzaj przeszczepu		Razem
	Od dawcy rodzinnego (FAM)	Od dawcy niespokrewnionego (MUD)	
AL.	85	40	125
Proporcja K:M	37 : 48	15 : 25	52 : 73
Wiek średni	37,6	37,5	37,6
Zakres wieku	(18,2 - 59,2)	(20,1 - 68,0)	(18,2 - 68,0)
MDS	14	8	22
Proporcja K:M	8 : 6	4 : 4	12 : 10
Wiek średni	42,4	38,9	41,1
Zakres wieku	(27,3 - 56,2)	(27,5 - 46,0)	(27,3 - 56,2)

PNM	62	14	76
Proporcja K:M	22 : 40	6 : 8	28 : 48
Wiek średni	39,6	37,8	39,3
Zakres wieku	(16,5 - 60,6)	(20,9 - 56,1)	(16,5 - 60,6)
Inne	13	4	17
Proporcja K:M	3 : 10	2 : 2	5 : 12
Wiek średni	33,6	32,2	33,3
Zakres wieku	(16,0 - 57,0)	(21,6 - 49,6)	(16,0 - 57,0)
Łącznie	174	66	240
Proporcja K:M	104 : 27	27 : 39	97 : 143
Wiek średni	38,4	37,4	38,1
Zakres wieku	(16,0 - 60,6)	(20,1 - 68,0)	(16,0 - 68,0)

W analizowanej grupie 20% chorych mężczyzn otrzymało przeszczep od dawcy – kobiety. Dawca i biorca byli tej samej płci w 58% procentach par co nie różniło się od danych dla całej populacji poddanych transplantacji.

Tabela 11 Płeć biorcy i dawcy w analizowanej grupie.

Table 11 Gender of donors and recipients in the analyzed group

Rozpoznanie	Płeć biorcy / płeć dawcy				Razem
	K / K	K / M	M / K	M / M	
AL.	25	27	26	47	125
MDS	7	5	5	5	22
PNM	11	17	16	32	76
Inne	2	3	2	10	17
Łącznie	45	52	49	94	240

Preferowanym materiałem przeszczepowym była krew obwodowa (82% ogółu transplantacji). We wszystkich, poza PNM, podgrupach wskazań, przeszczepy krwi szpikowej stanowiły od 10-20%. Jedynie w PNM odsetek ten wynosił 28%. Rodzaj zastosowanego materiału przeszczepowego w zależności od podgrupy wskazań zawiera Tabela 12.

Tabela 12 Rodzaje przeszczepów w podgrupach wskazań

Table 12 Transplant types in subgroups of indications

Rozpoznanie	Materiał przeszczepowy		Razem
	BM	PB	
AL.	15	110	125
MDS	5	17	22
PNM	21	55	76

Rozpoznanie	Materiał przeszczepowy		Razem
	BM	PB	
Inne	2	15	17
Łącznie	43	197	240

Podana w przeszczepie liczba komórek CD34, podobnie jak w całej opisanej wcześniej grupie była niższa w przypadku zastosowania jako materiału przeszczepowego krwi szpikowej (średnio $2,57 \cdot 10^6$ /kg wagi ciała biorcy), niż w przypadku krwi obwodowej (średnio $5,88 \cdot 10^6$ /kg wagi ciała biorcy) (Tabela 13).

Tabela 13 Liczba komórek CD34 podana w materiale przeszczepowym (10^6 / kg wagi ciała biorcy)

Table 13 Number of CD34 cells in the graft (10^6 / kg recipient's weight)

Rozpoznanie	Materiał przeszczepowy		Razem
	BM	PB	
AL.			
wartość średnia	2,76	5,75	5,39
zakres wartości	(1,2 - 4,1)	(1,7 - 17,5)	(1,2 - 17,5)
liczba oznaczeń	15	110	125
MDS			
wartość średnia	2,86	5,30	4,75
zakres wartości	(1,7 - 4,0)	(1,7 - 8,2)	(1,7 - 8,2)
liczba oznaczeń	5	17	22
PNM			
wartość średnia	2,34	6,46	5,30
zakres wartości	(1,0 - 6,3)	(1,9 - 16,6)	(1,0 - 16,6)
liczba oznaczeń	21	55	76
Inne			
wartość średnia	2,76	5,47	5,15
zakres wartości	(2,6 - 2,9)	(2,4 - 8,5)	(2,4 - 8,5)
liczba oznaczeń	2	15	17
Łącznie			
wartość średnia	2,57	5,88	5,29
zakres wartości	(1,0 - 6,3)	(1,7 - 17,5)	(1,0 - 17,5)
liczba oznaczeń	43	197	240

Wszyscy chorzy z grupy analizowanej poddani byli kondycjonowaniu mieloablacyjnemu lub immunoablacyjnemu. W schorzeniach mieloproliferacyjnych mieloablację uzyskiwano stosując chemioterapię BuCy, natomiast w chorobach limfoproliferacyjnych preferowanym typem kondycjonowania było napromienianie całego ciała (TBI) w dawce sumarycznej 12 Gy podawanej w 6 frakcjach. W ciężkiej postaci anemii aplastycznej uzyskiwano immunoablację z zastosowaniem wysokich dawek cyklofosfamidu i globuliny antylimfocytarnej. Rodzaje kondycjonowania zastosowanego w 4 podgrupach wskazań do przeszczepienia przedstawia tabela 14.

Tabela 14 Typ postępowania przygotowawczego zastosowany w podgrupach wskazań w analizowanym materiale. MAC – kondycjonowanie mieloablacyjne z zastosowaniem BuCy, MAC_TBI – napromieniowanie całego ciała, IAC – immunoablacja)

Table 14 Conditioning type used in subgroups of indications in the analyzed patients

Rozpoznanie	Typ kondycjonowania			Razem
	IAC	MAC	MAC_TBI	
AL		98	27	125
MDS		17	5	22
PNM		67	9	76
Inne	5	9	3	17
Łącznie	5	191	44	240

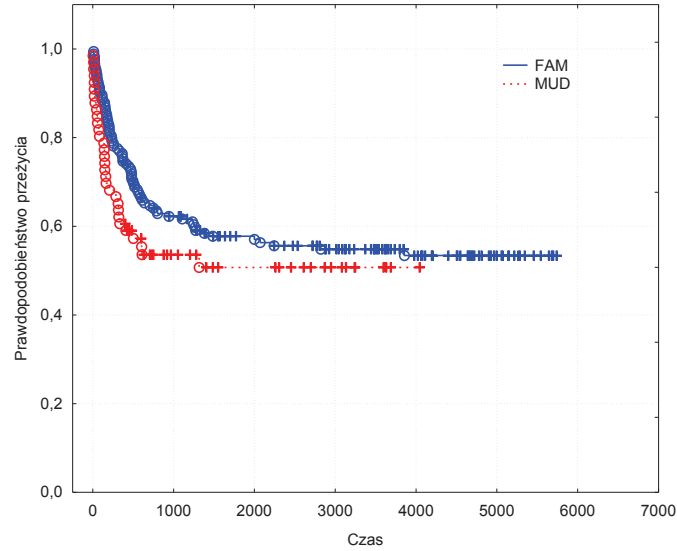
Obserwację zakończył zgon w 48,8% przypadkach u pacjentów poddanych przeszczepieniu z powodu ostrej białaczki, w 54,5% w grupie chorych z MDS, 34,2% w PNM i 52,9% w innych rozpoznaniach. Tabela 15 przedstawia średni czas i zakres czasu obserwacji do zgonu lub zamknięcia obserwacji w podgrupach wskazań do transplantacji. Średni czas obserwacji żyjącej populacji wyniósł 2957 dni (374-5737); średni czas do zgonu 442 dni (4-3854).

Tabela 15 Średni czas obserwacji do zgonu lub zamknięcia obserwacji w analizowanej grupie w zależności od podgrupy wskazań do przeszczepienia

Table 15 Average observation time until death or end of observation in the analyzed group depending on subgroup of indications

Rozpoznanie	Przeżycie	Zgon	Razem
AL	64	61	125
Średni czas obserwacji	2410	386	1422
Zakres obserwacji	(374 - 5696)	(10 - 2821)	(10 - 5696)
MDS	10	12	22
Średni czas obserwacji	2955	422	1573
Zakres obserwacji	(1063 - 5142)	(4 - 1485)	(4 - 5142)
PNM	50	26	76
Średni czas obserwacji	3718	474	2608
Zakres obserwacji	(424 - 5681)	(12 - 2245)	(12 - 5681)
Inne	8	9	17
Średni czas obserwacji	2588	749	1615
Zakres obserwacji	(496 - 5737)	(12 - 3854)	(12 - 5737)
Łącznie	132	108	240
Średni czas obserwacji	2957	442	1825
Zakres obserwacji	(374 - 5737)	(4 - 3854)	(4 - 5737)

Na rycinie 5 zilustrowano krzywą przeżycia dla całej grupy analizowanej z podziałem na przeszczepienia od dawców spokrewnionych i niespokrewnionych. Dziesięcioletnie przeżycie w analizowanej grupie wynosiło 54,1%. Nie odnotowano różnic w ogólnym przeżyciu dla przeszczepień od MUD i FAM.



Rycina 5 Krzywa przeżycia pacjentów poddanych przeszczepieniu od dawców niespokrewnionych i spokrewnionych
Figure 5 Survival curve for patients after FAM and MUD transplant

W tabeli 16 przedstawiono liczbę obserwacji zakończonej zgonem przed upływem roku po transplantacji (zgony wczesne) i po roku (zgony późne) – w analizowanej grupie. Podobnie jak w całej poddanej transplantacji populacji, we wszystkich czterech grupach rozpoznania dominowały zgony wczesne – 62,0% wszystkich zgonów.

Tabela 16 Liczba zgonów wczesnych i późnych oraz czas do zgonu w grupie poddanej analizie
Table 16 Number of early and late deaths and time to death in the analyzed group

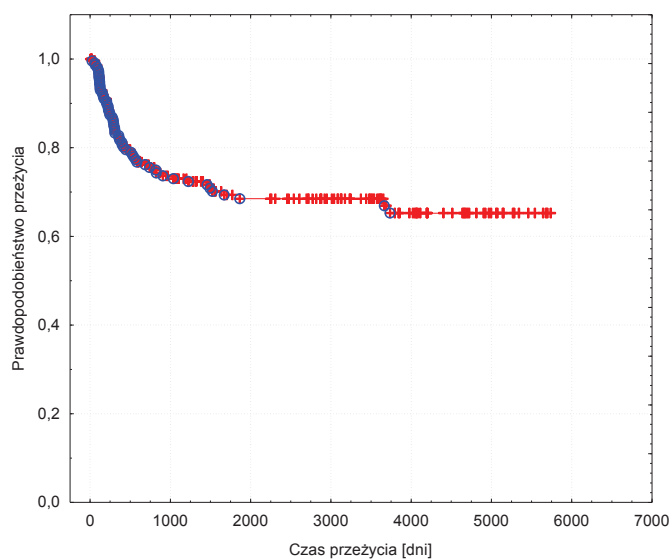
	Zgony po przeszczepieniu		
	Do 1 roku	Powyżej 1 roku	Razem
AL.	36	25	61
Średni czas przeżycia	129	757	386
Zakres czasu przeżycia	(10 - 363)	(366 - 2821)	(10 - 2821)
MDS	7	5	12
Średni czas przeżycia	123	840	422
Zakres czasu przeżycia	(4 - 321)	(371 - 1485)	(4 - 1485)
PNM	19	7	26
Średni czas przeżycia	162	1319	474
Zakres czasu przeżycia	(12 - 335)	(441 - 2245)	(12 - 2245)
Inne	5	4	9
Średni czas przeżycia	56	1616	749
Zakres czasu przeżycia	(12 - 149)	(609 - 3854)	(12 - 3854)
Razem	67	41	108
Średni czas przeżycia	132	947	442
Zakres czasu przeżycia	(4 - 363)	(366 - 3854)	(4 - 3854)

Jedną z głównych przyczyn śmiertelności poprzyszczepowej była wznowa choroby podstawowej. Odsetek wznów różnił się w zależności od wskazań i wynosił 27,2% u pacjentów podanych transplantacji z powodu ostrych białaczkach, 22,3% w przewlekłych nowotworach mieloproliferacyjnych (głównie w przewlekłej białaczce szpikowej) i 18,1% w zespołach mielodysplastycznych. W schorzeniach sklasyfikowanych w grupie „Inne” był najwyższy i wynosił 29,4%. W ostrych białaczkach i zespołach mielodysplastycznych dominowały wznovy wczesne (do roku po transplantacji) – odpowiednio 76 i 100% wszystkich wznów, natomiast w przewlekłych nowotworach mieloproliferacyjnych średni czas do wznowy wynosił 1043 dni, a wznovy wczesne stanowiły 29,4% wszystkich zanotowanych w tej grupie. Ilość wznów, wznów wczesnych i późnych oraz czas do wystąpienia wznowy przedstawiają tabele 17 i 18. Ryciny 6, 7 i 8 przedstawiają krzywe przeżycia wolnego od choroby dla całej analizowanej grupy oraz z uwzględnieniem rodzaju transplantacji (FAM, MUD) i wskazań do jej wykonania.

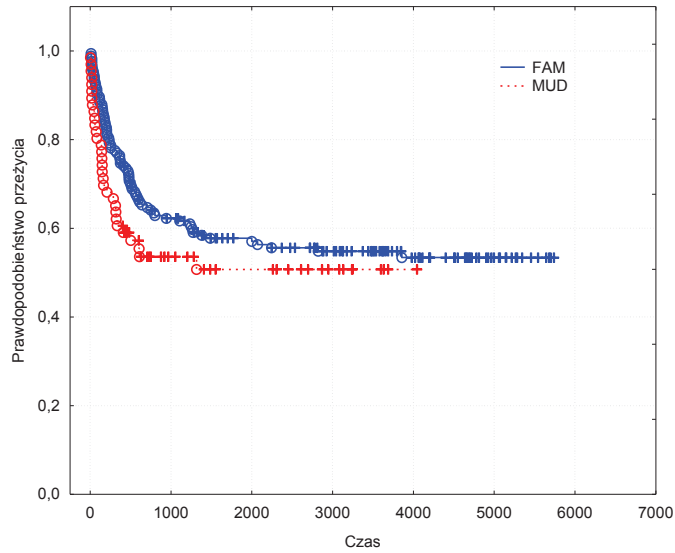
Prawdopodobieństwo 10-letniego przeżycia wolnego od choroby wynosi 63,7% i nie wykazuje istotnych statystycznie różnic dla przeszczepień od dawców rodzinnych i niespokrewnionych.

Tabela 17 Liczba wznów i średni czas do wznowy w podgrupach wskazań
 Table 17 Number of relapses and time to relapse in subgroups of indications

Rozpoznanie	Bez wznowy	Wznowa	Razem
AL.	91	34	125
Czas do wznowy	---	295	---
Zakres czasu do wznowy	---	(24 - 1222)	---
MDS	18	4	22
Czas do wznowy	---	187	---
Zakres czasu do wznowy	---	(90 - 308)	---
PNM	59	17	76
Czas do wznowy	---	1043	---
Zakres czasu do wznowy	---	(112 - 3736)	---
Inne	12	5	17
Czas do wznowy	---	943	---
Zakres czasu do wznowy	---	(208 - 1671)	---
Razem	180	60	240
Czas do wznowy	---	553	---
Zakres czasu do wznowy	---	(24 - 3736)	---

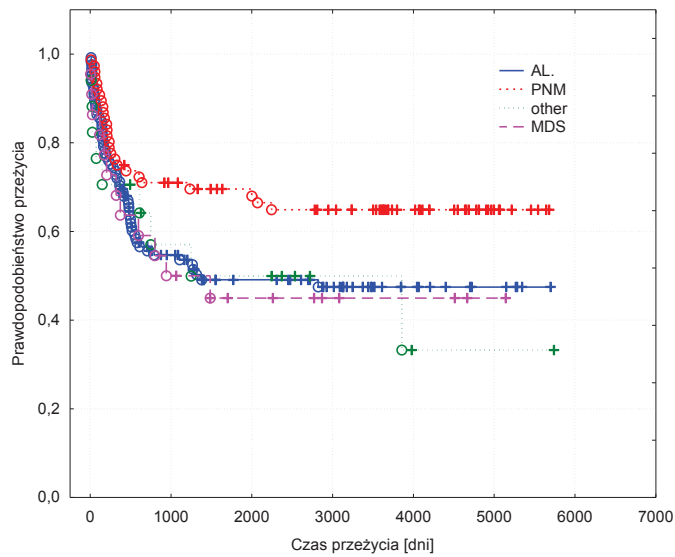


Rycina 6 Krzywa przeżycia wolnego od choroby dla całej analizowanej grupy
 Figure 6 Disease-free survival curve for the analyzed group



Rycina 7 Krzywa przeżycia wolnego od choroby po uwzględnieniu rodzaju transplantacji (FAM i MUD)

Figure 7 Disease-free survival curve with type of transplant considered [FAM and MUD]



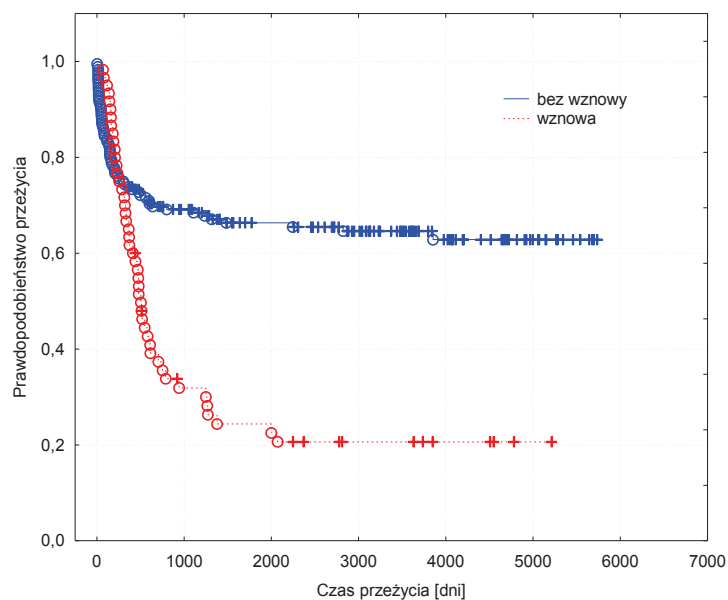
Rycina 8 Krzywa przeżycia wolnego od choroby w zależności od wskazań do transplantacji

Figure 8 Disease-free survival curve according to transplant indications

Tabela 18 Wznowy wczesne i późne w analizowanej grupie oraz średni czas do wznowy w zależności od wskazań do transplantacji

Table 18 Early and late relapses in the analyzed group and average time to relapse depending on transplant indications

	Wznowa po przeszczepieniu		
	Do 1 roku	Powyżej 1 roku	Razem
AL	26	8	34
Średni czas do wznowy	191	631	295
Zakres czasu do wznowy	(24 - 361)	(370 - 1222)	(24 - 1222)
MDS	4	0	4
Średni czas do wznowy	187	0	187
Zakres czasu do wznowy	(90 - 308)	(-)	(90 - 308)
PNM	5	12	17
Średni czas do wznowy	175	1404	1043
Zakres czasu do wznowy	(112 - 305)	(397 - 3736)	(112 - 3736)
Inne	1	4	5
Średni czas do wznowy	208	1126	943
Zakres czasu do wznowy	(208 - 208)	(402 - 1671)	(208 - 1671)
Razem	36	24	60
Średni czas do wznowy	189	1100	553
Zakres czasu do wznowy	(24 - 361)	(370 - 3736)	(24 - 3736)



Rycina 9 Krzywa przeżycia dla chorych analizowanych w zależności od wystąpienia wznowy choroby

Figure 9 Survival curve for patients analyzed according to relapse occurrence

Prawdopodobieństwo 10-letniego przeżycia wolnego od choroby było najwyższe w grupie chorych z PNM (ryc. 8), najniższe dla pacjentów z grupy „Inne”.

Rycina 9 przedstawia krzywą przeżycia dla chorych, u których nie zanotowano nawrotu choroby i chorych ze wznową. Prawdopodobieństwo 3 letniego przeżycia dla pacjentów wolnych od choroby wynosi 64% dla chorych, u których doszło do wznowy choroby – 27%

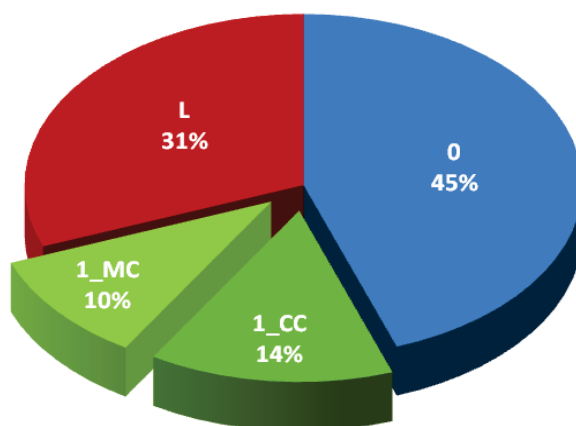
3.2.2. Grupy badane

3.2.2.1. Grupa wykorzystana w realizacji pierwszego celu badawczego

Ze względu na strategię postępowania określoną protokołami transplantacyjnymi możliwe było wydzielenie następujących grup pacjentów:

- Grupa 0 – profilaktyka immunosupresyjna prowadzona standardowo, niezależnie od oznaczeń chimeryzmu – 107 pacjentów.
- Grupa 1 – profilaktyka immunosupresyjna modyfikowana zależnie od postaci stwierdanego chimeryzmu – 59 pacjentów. W obrębie tej grupy rozróżniono 2 dalsze podgrupy:
 - Podgrupa 1_CC – z intensywną profilaktyką immunosupresyjną wynikającą z wczesnego (do doby 60 po przeszczepieniu) uzyskania CC – 34 pacjentów.
 - Podgrupa 1_MC z osłabionym profilaktycznym postępowaniem immunosupresyjnym, wynikającym z utrzymującego się MC do doby 60 po transplantacji MC – 25 pacjentów
- Grupa L – pacjenci leczeni immunosupresyjnie z powodu objawów GvHD w dobie 60 po przeszczepieniu 74 pacjentów.

Diagram 10 przedstawia odsetkowy podział analizowanej grupy na grupy badawcze.



Rycina 10 Podział grupy analizowanej na grupy i podgrupy badawcze
Figure 10 The subgroups within analyzed group

Ponieważ wszystkie analizowane przeszczepienia wykonywano po postępowaniu przygotowawczym mieloablacyjnym, nie różnicowano grup w zależności od schorzenia podstawowego.

Założono zastosowanie dwóch pierwotnych, podstawowych kryteriów oceny:

- Powodzenia transplantacji – określanego jako
 - brak wznowy,
 - brak objawów rozległej postaci cGvHD wymagających aktywnego postępowania immunosupresyjnego
- Niepowodzenia transplantacji – określanego jako:
 - wznowa choroby
 - aktywna, rozległa postać cGvHD wymagająca przewlekłego, ogólnego leczenia immunosupresyjnego

Pacjenci do podgrup badawczych 1_CC i 1_MC, z rutynowymi wskazaniami do przeszczepienia, byli rekrutowani po oznaczeniu chimeryzmu w dobie 60. po przeszczepieniu. Większość w obu podgrupach (64,7 i 68% odpowiednio w grupach 1_CC i 1-MC) stanowili chorzy z ostrymi białaczkami wysokiego ryzyka wznowy. W grupach porównawczych 0 i L odsetek chorych z AL był podobny i wynosił 50,4% i 52,1%, odpowiednio. Średnia wieku we wszystkich grupach mieściła się w przedziale między 35 a 40 rokiem życia. Jedynie w grupie 0 przeważały biorcy – kobiety. Proporcja przeszczepień od dawców rodzinnych i niespokrewnionych wynosiła od 70,6 do 77%, jedynie w podgrupie 1-MC odsetek przeszczepień od dawców rodzinnych wynosił poniżej 70% (64%). We wszystkich grupach przeważały przeszczepy pochodzące z krwi obwodowej, zawierające średnio $5,3 \cdot 10^6$ komórek CD34 na kilogram wagi ciała biorcy. Średni czas obserwacji we wszystkich grupach i podgrupach wynosił ponad 2 lata. Szczegółową charakterystykę grup badanych przedstawia tabela 19.

Tabela 19 Charakterystyka badanych grup i podgrup

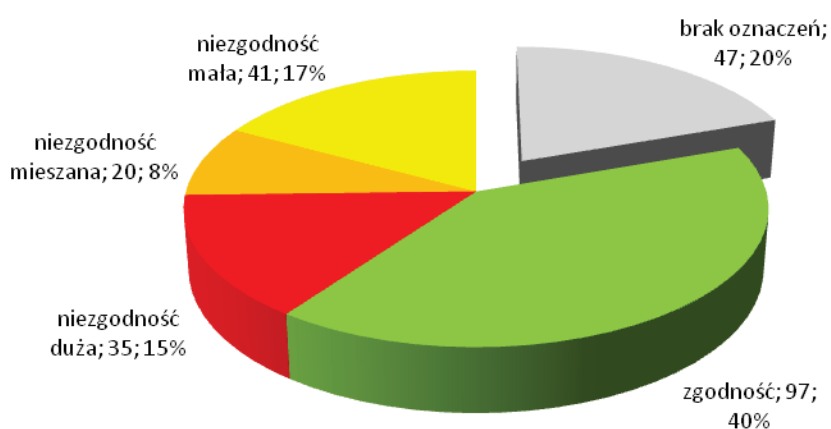
Table 19 Analyzed subgroups characteristics

Element charakterystyki	Podgrupa				Razem
	0	1 CC	1 MC	L	
Liczność	107	34	25	74	240
Rozpoznanie					
AL	54	22	17	32	125
MDS	8	3	2	9	22
PNM	35	8	3	30	76
Inne	10	1	3	3	17
dane biorcy					
proporcja K : M	52 : 55	13 : 21	8 : 17	24 : 50	97 : 143
wiek średni (lata)	39,2	35,5	38,6	37,5	38,1
zakres wartości wieku	(16,0-60,6)	(19,3-56,1)	(18,7-55,0)	(18,4-68,0)	(16,0-68,0)
rodzaj kondycjonowania					
IAC	3	0	1	1	5
MAC	93	23	18	58	191
MAC_TBI	11	11	6	15	43
typ przeszczepienia					
proporcja FAM : MUD	77 : 30	24 : 10	16 : 9	57 : 17	174 : 66
odsetek FAM	72,0%	70,6%	64,0%	77,0%	72,5%
materiał przeszczepowy					
proporcja PB : BM	92 : 15	27 : 7	19 : 6	59 : 15	197 : 43
odsetek PB	86,0%	79,4%	76,0%	79,7%	82,1%
Ilość komórek CD34 ($\cdot 10^6$ /kg wagi biorcy)					
wartość średnia	5,2	4,7	4,7	5,9	5,3
zakres wartości	(1,2-13,0)	(1,7-9,8)	(1,8-7,3)	(1,0-17,5)	(1,0-17,5)
czas obserwacji (miesiące)					
wartość średnia	1892,3	1991,3	1380,5	1802,2	1825,2
zakres wartości	(4-5737)	(59-4064)	(163-2923)	(51-5646)	(4-5737)

3.2.2.2. Grupa badawcza wykorzystana w realizacji drugiego celu badawczego

W zakresie drugiego celu badawczego grupę badawczą stanowiło 193 pacjentów poddanych transplantacji z mieloablacyjnym postępowaniem przygotowawczym, u których przeprowadzono badanie grup krwi zarówno u biorcy, jak i u dawcy z zastosowaniem metod opisanych w kolejnym podrozdziale pracy.

Diagram przedstawia odsetkowy udział podgrup w całym analizowanym materiale. W 47 przypadkach (20% grupy analizowanej), grupę krwi oznaczono innymi metodami. Byli to chorzy poddani transplantacji przed rokiem 1999.



Rycina 11 Podział opisywanej grupy w zależności od oznaczeń grupy krwi w układzie AB0 u dawcy i biorcy

Figure 11 Division of the described group according to determined blood group in AB0 donor's and recipient's system

Uwzględniając jedynie układ AB0 zgodność grup głównych między dawcą a biorcą stwierdzono u 97 par, co stanowiło 50,2% grupy badanej. Niezgodność dużą, mieszaną i małą stwierdzono odpowiednio u 18,1%, 10,4% i 21,2% par. W podgrupie par zgodnych w zakresie AB0 dominowały przeszczepienia od dawców rodzinnych (84,5%). Podobną sytuację odnotowano w grupie z niezgodnością dużą. Grupa ta charakteryzowała się również najkrótszym średnim czasem obserwacji, przy czym zakres obserwacji był zbliżony do innych grup. Rozkład rozpoznań, płci i rodzaju kondycjonowania przedstawiał się podobnie do poprzednich opisów.

Tabela 20 przedstawia szczegółową charakterystykę grupy wykorzystanej w realizacji drugiego celu badawczego.

Tabela 20 Charakterystyka grupy badanej w zależności od oceny zgodności w zakresie grup ABO
 Table 20 Analyzed group characteristics depending on compatibility in ABO groups

Element charakterystyki	Zgodność	Niezgodność			Razem
		mała	mieszana	duża	
Liczność	97	41	20	35	193
Rozpoznanie					
AL	50	28	12	18	108
MDS	5	5	1	5	16
PNM	33	7	7	9	56
Inne	9	1	0	3	13
Dane biocy					
proporcja K : M	43 : 54	21 : 20	6 : 14	13 : 22	83 : 110
wiek średni (lata)	38,9	36,5	34,7	41,1	38,4
zakres wartości wieku	(16,0-58,0)	(18,2-52,2)	(19,3-55,0)	(18,8-68,0)	(16,0-68,0)
Rodzaj kondycjonowania					
IAC	4	0	0	0	4
MAC	80	32	11	29	152
MAC_TBI	13	8	9	6	36
Typ przeszczepienia					
proporcja FAM : MUD	82 : 15	22 : 19	10 : 10	24 : 11	138 : 55
odsetek FAM	84,5%	53,7%	50,0%	68,6%	71,5%
Materiał przeszczepowy					
proporcja PB : BM	79 : 18	34 : 7	16 : 4	30 : 5	159 : 34
odsetek PB	81,4%	82,9%	80,0%	85,7%	82,4%
Czas obserwacji					
wartość średnia	2016,3	1880,9	2001,2	1123,1	1824,0
zakres wartości	(12-5696)	(12-5282)	(10-4703)	(4-5541)	(4-5696)

3.3. Opis stosowanych metod badawczych

3.3.1. Chimeryzm STR

Krew do badania chimeryzmu była pobierana u biorcy i dawcy przed rozpoczęciem procedury i przekazywana do dalszych oznaczeń w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Izolacja DNA

Izolacji DNA dokonywano stosując komercyjne zestawy Blood DNA Prep Plus (A@A Biotechnology, Gdańsk). Do 100 µl świeżej lub mrożonej krwi dodawano 200 µl uniwersalnego buforu liofilizującego LT i 20 µl proteiny K w stężeniu 20 mg/ml. Po wymieszaniu inkubowano w temperaturze 37°C, w łaźni wodnej przez 20 minut. Następnie próbkę wortexowano przez 20 s i наносono na mikrokolumnę do oczyszczania genomowego DNA. Po odwirowaniu (1 minuta przy 10-15 RPM) próbkę wraz z mikrokolumną wyjmowano i dodawano roztworu płuczającego A1. Próbkę ponownie wirowano (1 min przy 10-15 RPM). Po odwirowaniu mikrokolumnę przenoszono do nowej próbki 2 ml i dodawano 400 µl roztworu płuczającego A1. Próbkę ponownie wirowano przez 2 minuty (10-15 RPM). Do osuszonej mikrokolumny, umieszczonej w nowej próbce 1,5 ml dodawano 90 µl buforu TIS.HCl (pH 8,5). Probówkę inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej, a następnie ponownie wirowano przez 1 min. Mikrokolumnę usuwano i badano stężenie oczyszczonego DNA metodą fluorymetryczną.

Amplifikacja DNA

Amplifikację otrzymanych próbek DNA wykonywano z zastosowaniem metody multiplex PCR przy użyciu komercyjnych zestawów Profiler Plus (Perkin-Elmer, USA) zawierających markery 9 loci STR (D3S1358, VWA, FGA, D8S1179, D21S11, D5D818, D13S317, D7S820) oraz marker amelogeniny. Procedurę przeprowadzano zgodnie ze wskazówkami producenta, przy użyciu termocyklera 2400 firmy Perkin-Elmer. Do amplifikacji używano jednakowego, optymalnego stężenia DNA – 1,25 ng/25 µl mieszaniny PCR. Produkty amplifikacji, znakowane fluorescencyjnie analizowano metodą elektroforezy kapilarnej przy użyciu automatycznego sekwenatora DNA ABI PRISM 310 (Perkin-Elmer). Produkty rozdzielano w kapilarze o długości 47 cm wypełnionej denaturującym nośnikiem POP4 przez 24 minuty, przy stałym napięciu 15 kV oraz 9mW i 8 mA. Standardem wewnętrznym wielkości DNA był marker ILS 400 znakowany CXR (Promega, USA). Analizę wielkości fragmentów DNA przeprowadzano posługując się tzw. „drabiną alleli” zawierającą zsekwencjonowane allele wszystkich loci występujących w zestawie.

Ustalanie profilu genetycznego dawcy i biorcy do analiz

U każdej pary dawca-biorca określano locus lub loci, w których dawcy i biorcy występowały różne allele. O ile było to możliwe, wybierano takie locus, w którym zarówno dawca, jak i biorca byli heterozygotami i żaden z alleli nie mógł być interpretowany jako „stutter peak” względem kolejnego. W takim przypadku wynik oceny chimeryzmu, mierzonego odsetkiem DNA biorcy w próbce, uzyskiwano stosując następującą formułę:

$$\%MC = (B1 + B2 / B1 + B2 + D1 + D2) \times 100\%$$

gdzie %MC oznacza odsetek DNA biorcy, a B1 i B2 to powierzchnia pola pod pikami poszczególnych alleli biorcy, D1 i D2 pola powierzchni pod pikami dawcy.

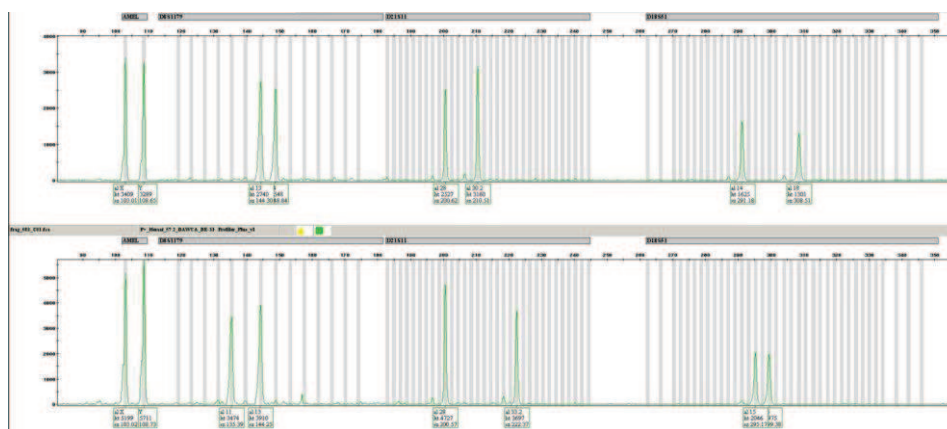
W przypadku, gdy w danym locus heterozygotyczni dawca i biorca mieli jeden wspólny allel, oceny chimeryzmu dokonywano w oparciu o wzór:

$$\%MC = B1 / D2 \times 100\%$$

gdzie B1 to pole powierzchni pod pikiem biorcy, a D2 - dawcy.

W dalszym monitorowaniu oceny chimeryzmu dokonywano zawsze w oparciu o wybrany locus lub loci.

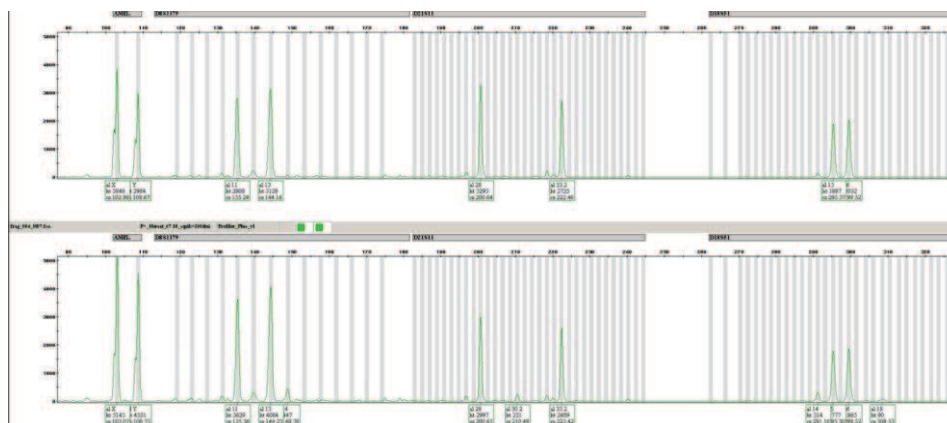
Całkowity chimeryzm (obecność wyłącznie DNA dawcy) rozpoznawano jedynie w sytuacji, gdy w badanej próbce znaleziono poniżej 1% DNA biorcy. Diagramy przedstawiają obrazy uzyskane w trakcie monitorowania chimeryzmu u jednego z pacjentów.



Rycina 12 Badanie chimeryzmu STR przed przeszczepieniem. Górny panel – biorca, dolny – dawca

Figure 12 STR analysis before transplantation. Upper panel – recipient

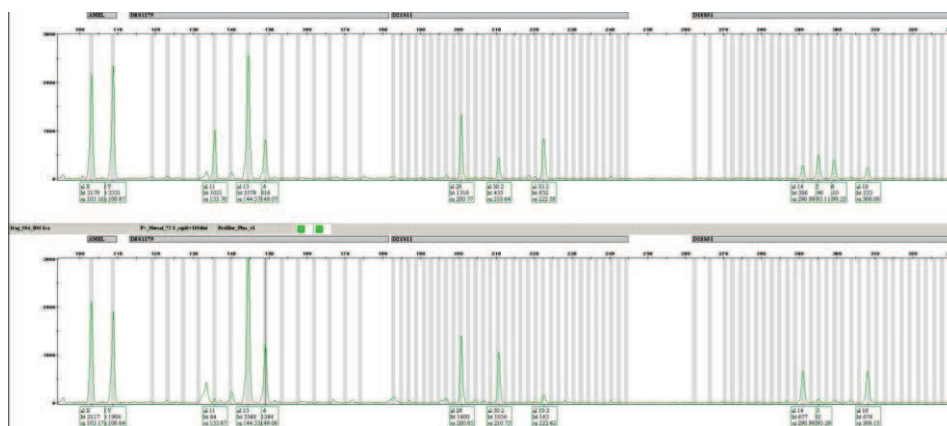
Na rycinie 12 przedstawiono wynik badania opisaną metodą profilu STR biorcy (górny panel) i dawcy (dolny) oznaczonego przed przeszczepieniem. Jako marker chimeryzmu wybrano D18S1 pozwalający na pełne różnicowanie pary. Kolejna rycina przedstawia badanie wykonane w dobie 100. po przeszczepieniu. Panel górny przedstawia badanie krwi obwodowej, dolny – szpiku. Analiza wybranego markera wskazuje na całkowity chimeryzm we krwi obwodowej i częściowy w szpiku.



Rycina 13 Badanie chimeryzmu wykonane w dobie 100. po przeszczepieniu. Górny panel – krew, dolny – szpik.

Figure 13 Chimerism analysis on day 100 after transplantation

Kolejna rycina przedstawia wynik badania wykonanego w dobie +180 po przeszczepieniu. Analiza markera D18S51 wykazuje częściowy chimeryzm we krwi obwodowej i wznowę (autologiczną odnowę) w szpiku.



Rycina 14 Badanie chimeryzmu w dobie 180 po przeszczepieniu. We krwi obwodowej widoczne zarówno sekwencje dawcy, jak i biorcy; w szpiku – jedynie sekwencje DNA biorcy: odnowa autologiczna - wznowa

Figure 14 Chimerism analysis on day 180 after transplantation - relapse

3.3.2. Chimeryzm erytropoetyczny

U zakwalifikowanego do przeszczepienia biorców oraz u dawców rodzinnych, w trakcie wizyty przygotowawczej pobierano do oznaczeń grupy krwi 4 ml krwi na EDTA oraz 5 ml krwi na skrzep. Krew niezwłocznie przesyłano do Pracowni Konsultacyjnej

Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (RCKiK) w Gdańsku celem dalszych badań. W przypadku dawców niespokrewnionych proszono o przekazanie takiej samej ilości krwi pobranej od dawcy w trakcie klirensu w ośrodku, który nadzorował donację. Po otrzymaniu próbek – zwykle następnego dnia po pobraniu, przekazywano krew do RCKiK.

Badania antygenów grupowych wykonywano w RCKiK w Gdańsku zgodnie z obowiązującymi tam standardowymi procedurami operacyjnymi. Oznaczano antygeny układu AB0 i Rh oraz antygeny układów Kell, Duffy, Kidd, Ss, MN i P.

W przypadku układu AB0 i antygenów układu Rh stosowano metodę probówkową i mikroplytkową. Pozostałe antygeny oznaczane były metodą mikroplytkową, jedynie w przypadku antygenów układu Kidd stosowano metodę probówkową. Monoklonalne mysie przeciwciała IgM różnych linii komórkowych firmy Bioscot były stosowane w oznaczeniu antygenów grup: AB0, Rh, Kell, Duffy, Ss, Mn i P. Do oznaczenia antygenów grupowych Duffy stosowano ludzkie przeciwciała poliklonalne firmy ALBSera.

Metoda probówkowa

Do przygotowanej, odpowiednio oznakowanej próbki dodawano 40 µl właściwego odczynnika oraz 40 µl 3-5% zawiesiny krwinek badanych w soli fizjologicznej. Roztwór mieszano. W przypadku badania antygenów układu AB0 roztwór odwirowywano, a następnie po uruchomieniu krwinek oceniano aglutynację makroskopowo. W przypadku wyniku o słabszym nasileniu niż oczekiwano zestaw inkubowano przez 1 minutę w temperaturze pokojowej, a następnie ponownie odwirowywano. Aglutynację oceniano makroskopowo.

Metoda mikroplytkowa

Do właściwych studzienek U mikroplytki dodawano 40 µl właściwego odczynnika oraz 40 µl 3-5% zawiesiny krwinek badanych w soli fizjologicznej. Zawartość mieszano przy użyciu mieszadła do mikroplytek. Następnie mikroplytki inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15-20 minut, odwirowywano z prędkością 40 rcf przez 40 sekund i mieszano. Wynik odczytywano makroskopowo.

Testy serologiczne stosowane do oznaczania miana przeciwciał z układu AB0.

Miano przeciwciał klasy IgM oznaczano w temperaturze pokojowej, w teście mikrokolumnowym na karcie obojętnej (bez odczynnika antyglobulinowego), wykonując szereg rozcieńczeń surowicy badanej w roztworze NaCl w postępie geometrycznym. Kolumny na karcie opisywano kolejnymi numerami rozcieńczeń surowicy (2,4,8,16,...,256 z pozostawieniem możliwości dalszego rozcieńczenia). Do wszystkich mikrokolumn dodawano odpowiednią ilość 0,8% zawiesiny krwinek grupy A lub B w roztworze LISS (Diluent 2 firmy DiaMed), a następnie odpowiednią ilość rozcieńczonej surowicy (zgodnie z metodyką badania zaleconą przez producenta użytej karty). Karty z mieszaniną krwinek i rozcieńczeń surowicy inkubowano 15 minut w temperaturze pokojowej (od 18 do 22°C). Po odwirowaniu kart protokołowano wyniki reakcji.

Mianem przeciwciał IgM określa się najwyższe rozcieńczenie surowicy, w którym występuje reakcja serologiczna z krwinkami odpowiedniej grupy (A lub B), oceniana co najmniej na 1+. Wynik miana jest liczbą będącą odwrotnością rozcieńczenia surowicy (np. rozcieńczenie 1:32, miano określa się liczbą 32).

3.3.3. *Metody analizy statystycznej*

Do analizy danych użyto programu Statistica w wersji 9.0. Charakterystyki grup przedstawiano przy użyciu wartości średniej oraz zakresu przyjmowanych wartości. Wartości grupowe porównywano przy pomocy testów nieparametrycznych. Istotność statystyczną różnic w częstości występowania badanej cechy oceniano przy pomocy testu χ^2 .

Czas przeżycia charakteryzowano za pomocą krzywych Kaplana-Meyera a istotność różnic międzygrupowych badano przy pomocy testu Gehana.

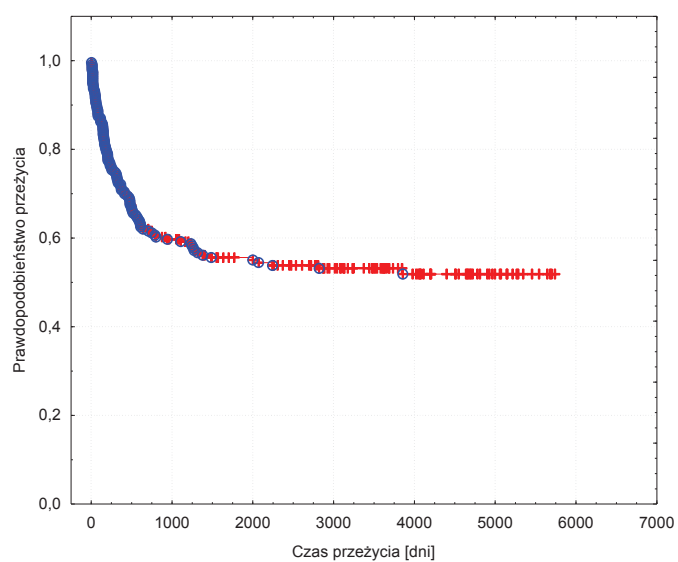
Wartością progową dla testowania hipotez statystycznych była wartość 0,05.

4. WYNIKI

4.1. Chimeryzm STR

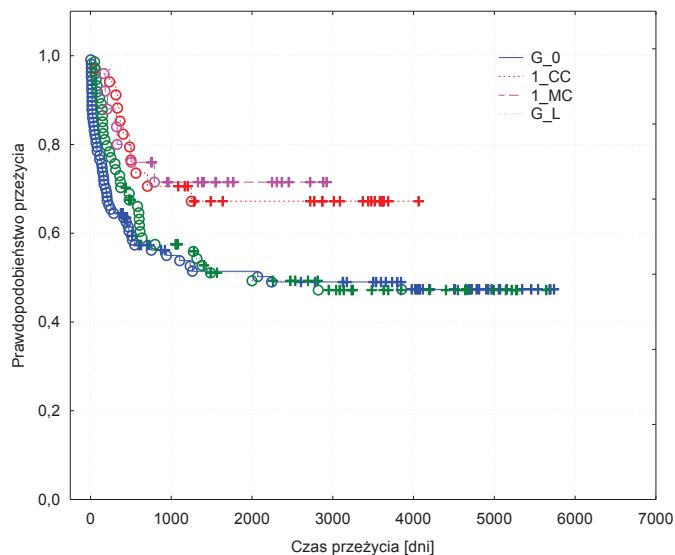
4.1.1. Ocena reprezentatywności badanej grupy

W celu oceny reprezentatywności grup badanych porównano krzywe przeżycia całej analizowanej populacji oraz grup badawczych. Ryciny 15 i 16 przedstawiają je odpowiednio dla całej analizowanej grupy, grup i podgrup badawczych. Prawdopodobieństwo 10-letniego przeżycia pacjentów z grupy poddanej analizie wynosiło 51,7%.



Rycina 15 Krzywa przeżycia grupy poddanej analizie

Figure 15 Survival curve for the analyzed group



Rycina 16 Krzywe przeżycia dla grup i podgrup badawczych
 Figure 16 Survival curves for analyzed subgroups

Stwierdzono istotną statystycznie różnicę w ogólnym przeżyciu dla badanych 4 wyznaczonych populacji (test Gehana, $p=0,02$).

Ponieważ w grupie analizowanej, a także w grupach badawczych 0 i L, których krzywe przeżycia były zbliżone, znaleźli się zarówno chorzy u których wykonywano badania chimeryzmu, jak i chorzy u których nie dokonywano analiz, w celu oceny różnic porównano grupę chorych, u których oznaczono chimeryzm (STR60) – w 60. dobie, z całą grupą analizowaną (240 chorych) Analiza uwzględniała wiek, płeć, rodzaj przeszczepu (dawca FAM lub MUD) oraz podgrupę rozpoznań. Dane przedstawia tabela 21.

Tabela 21 Porównanie charakterystyk podgrup z oraz bez wykonanych oznaczeń chimeryzmu w dobie +60 (STR60)

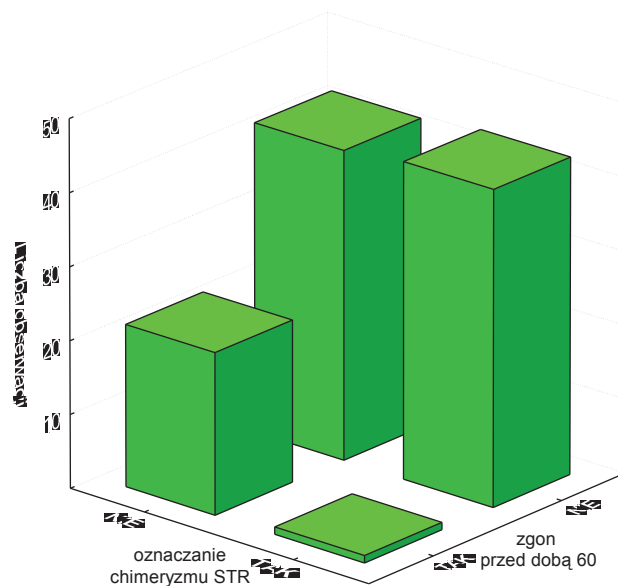
Table 21 Comparison of subgroups characteristics with and without chimerism marking on day 60 after transplantation

Element charakterystyki	Oznaczenia STR		Razem	P
	Brak	Wykonane		
Liczność	96	144	240	
Rozpoznanie				
AL.	55	70	125	Ns
MDS	10	12	22	
PNM	23	53	76	
Inne	8	9	17	

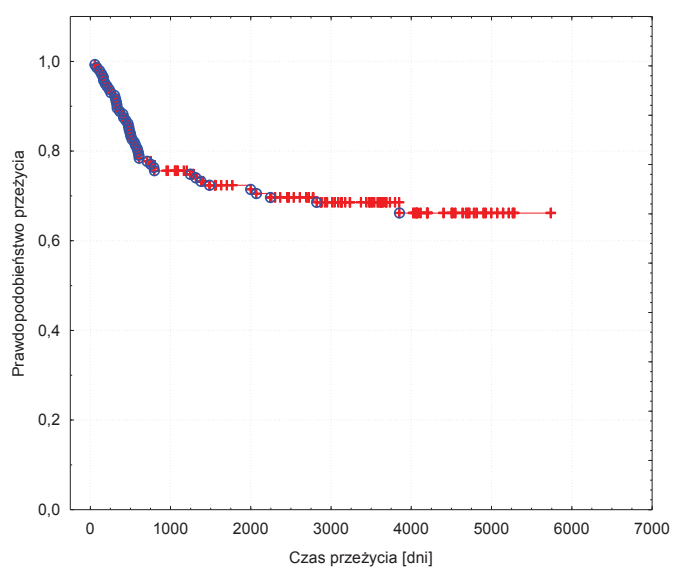
Element charakterystyki	Oznaczenia STR		Razem	P
	Brak	Wykonane		
Dane biocy				
proporcja K : M	40 : 56	57 : 87	97 : 143	
wiek średni (lata)	38,3	38,0	38,1	Ns
zakres wartości wieku	(16,0-60,6)	(16,5-68,0)	(16,0-68,0)	
Rodzaj kondycjonowania				
IAC	1	4	5	
MAC	84	108	191	Ns
MAC_TBI	11	32	43	
Typ przeszczepienia				
proporcja FAM : MUD	64 : 32	110 : 34	174 : 66	Ns
odsetek FAM	66,7%	76,4%	72,5%	
Materiał przeszczepowy				
proporcja PB : BM	84 : 12	113 : 31	197 : 43	Ns
odsetek PB	87,5%	78,5%	82,1%	
Ilość CD34 ($\cdot 10^6$ /kg masy biocy)				
wartość średnia	5,7	5,0	5,3	Ns
zakres wartości	(1,0-16,6)	(1,2-17,5)	(1,0-17,5)	
Czas obserwacji (miesiące)				
wartość średnia	1028,9	2356,1	1825,2	<0,001
zakres wartości	(4-5696)	(59-5737)	(4-5737)	

Nie stwierdzono statystycznych różnic dotyczących wieku, płci, rozpoznania, typu przeszczepienia i rodzaju zastosowanego materiału przeszczepowego. Grupy różniły się jedynie czasem obserwacji, który w grupie z oznaczonym chimeryzmem był średnio ponad dwa razy dłuższy, niż w grupie bez oznaczeń.

Ze względu na zbliżony zakres czasu obserwacji w obu grupach porównano ilość zgonów przed dobą sześćdziesiątą po transplantacji. Analiza wykazała istotną różnicę między porównywanymi grupami. W grupie bez oznaczeń chimeryzmu odsetek zgonów w okresie pierwszych dwóch miesięcy po przeszczepieniu był istotnie wyższy ($p < 0,001$) (Rycina 17)



Rycina 17 Rozkład liczby zgonów w podgrupach z oraz bez wykonanych oznaczeń chimeryzmu
Figure 17 Distribution of deaths within subgroups with or without chimerism marking

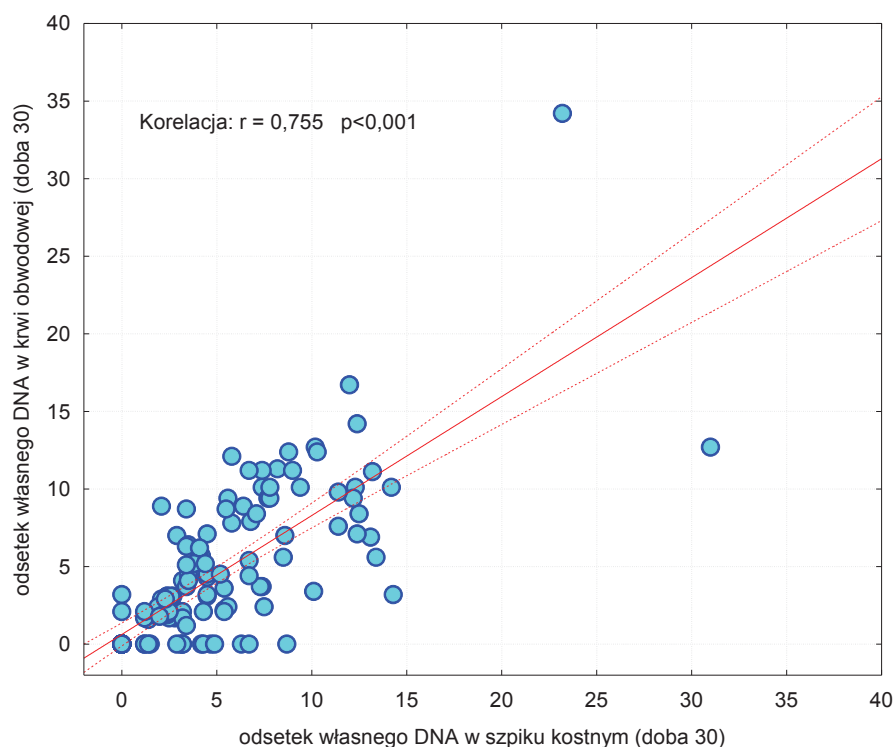


Rycina 18 Krzywa przeżycia chorych z oznaczonym chimeryzmem w dobie +60
Figure 18 Survival curve for patients with marked chimerism in day +60

Na rycinie 18 przedstawiono krzywą przeżycia dla całej grupy chorych, u których oznaczono chimeryzm w dobie 60. Grupa eliminuje pacjentów, u których nastąpił zgon przed tą dobą. W grupie tej znaleźli się zarówno pacjenci z 2 podgrup badawczych, jak i pacjenci z grupy 0 i L. Krzywa ta miała podobny przebieg, jak krzywe dla podgrup badawczych.

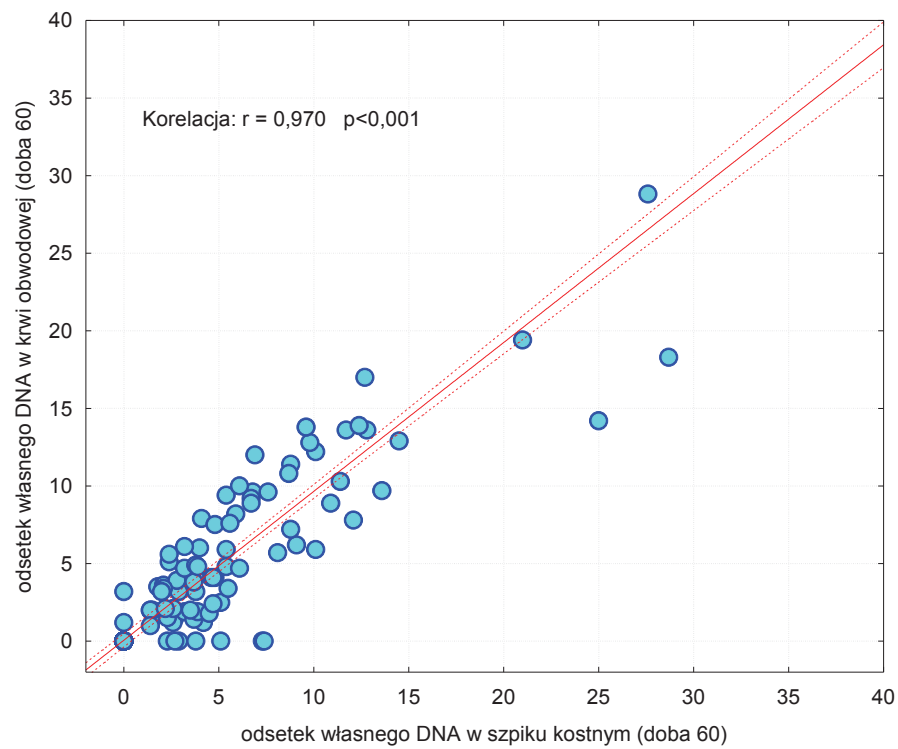
4.1.2. Ocena zgodności odsetka DNA biorcy wykazanego w badaniach szpiku i krwi obwodowej

Zgodnie z protokołem, w okresie pierwszego roku po przeszczepieniu oznaczeń chimeryzmu dokonywano w niefrakcjonowanym szpiku i krwi obwodowej. Po upływie pierwszego roku, do oznaczeń chimeryzmu pobierano jedynie krew obwodową. W celu sprawdzenia korelacji oznaczeń w obu materiałach porównano wyniki badań szpiku i krwi obwodowej w dobie 30 i 60 po transplantacji. Wykazano wysoki stopień korelacji obu oznaczeń w ocenianych punktach czasowych (Rycina 19 i 20). Dla doby 30 wartość korelacji Spearmana wynosiła $r = 0,755$, $p < 0,001$, zaś dla porównywanych próbek z doby 60 – $r = 0,970$, $p < 0,001$.



Rycina 19 Porównanie odsetka własnego DNA oznaczonego w dobie +30 w szpiku kostnym i krwi obwodowej

Figure 19 The comparison of recipients DNA percentage marked in day +30 in bone marrow and peripheral blood



Rycina 20 Porównanie odsetka własnego DNA oznaczonego w dobie +60 w szpiku kostnym i krwi obwodowej

Figure 20 The comparison of recipients DNA percentage marked in day +60 in bone marrow and peripheral blood

4.1.3. Ocena częstości występowania postaci chimeryzmu w poszczególnych punktach obserwacji

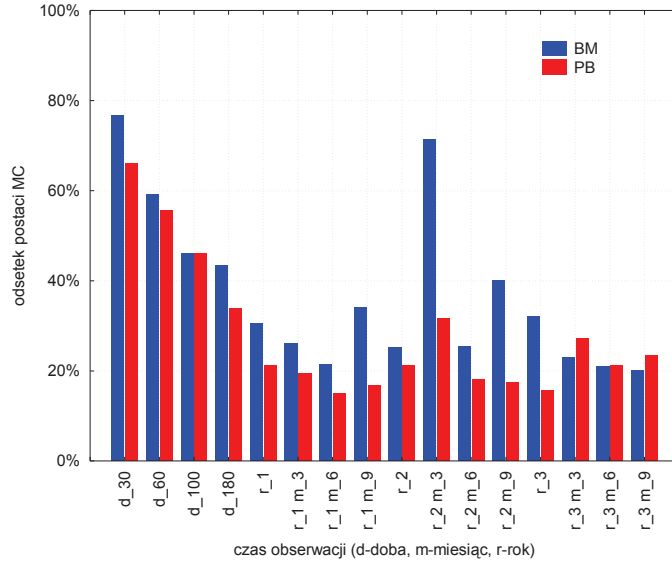
Utrzymywanie się własnego DNA biorcy w hematopoezie szpikowej obserwowano u 76,6% chorych i w 66% analiz wykonanych z krwi obwodowej w dobie 30. po transplantacji. W kolejnych oznaczeniach odsetek ten wykazywał tendencje spadkową w obu badanych materiałach. Odsetek pacjentów z MC w dobie +180 wynosił 43,3% dla oznaczeń w szpiku i 33,8% dla oznaczeń we krwi obwodowej. Dwa lata po przeszczepieniu mieszany chimeryzm wykazywało nadal odpowiednio w szpiku i krwi obwodowej 25,3 i 21,1% chorych. Odsetek chorych z mieszanym chimeryzmem w szpiku i krwi obwodowej, w kolejnych punktach czasowych przedstawiono w Tabeli 22 i na Rycinie 21.

Tabela 22 Odsetek postaci MC oraz ilość oznaczeń wykonanych w szpiku oraz krwi obwodowej w kolejnych punktach czasowych obserwacji

Table 22 MC types percentage and number of markings carried out in marrow and peripheral blood throughout following time points

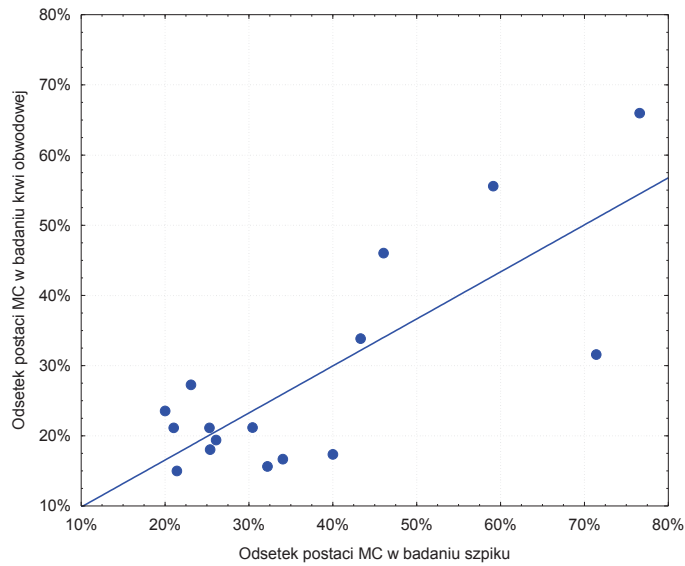
Czas	BM		PB	
	odsetek MC	ilość oznaczeń	odsetek MC	ilość oznaczeń
1 - 30D	76,6%	141	66,0%	141
2 - 60D	59,2%	142	55,6%	144
3 - 100D	46,0%	139	46,0%	139
4 - 180D	43,3%	127	33,8%	130
5 - 1R	30,4%	115	21,2%	118
6 - 1R3M	26,1%	92	19,4%	98
7 - 1R6M	21,4%	98	15,0%	100
8 - 1R9M	34,0%	47	16,7%	72
9 - 2R	25,3%	87	21,1%	90
10 - 2R3M	71,4%	21	31,6%	38
11 - 2R6M	25,4%	67	18,1%	72
12 - 2R9M	40,0%	10	17,4%	23
13 - 3R	32,2%	59	15,6%	64
14 - 3R3M	23,1%	13	27,3%	22
15 - 3R6M	21,1%	38	21,2%	52
16 - 3R9M	20,0%	5	23,5%	17

Porównując wyniki oznaczeń chimeryzmu we krwi obwodowej i szpiku znaleziono ścisłą korelację między oznaczeniami w obu materiałach ($r=0,52$, $p<0,05$). Korelację przedstawia Rycina 22.



Rycina 21 Rozkład czasowy odsetka postaci chimeryzmu mieszanego (MC).
(oznaczenia: d – doba, m – miesiąc, r – rok)

Figure 21 Time distribution of percentage of mixed chimerism [MC]
[legend: d-day, m-month, r-year]

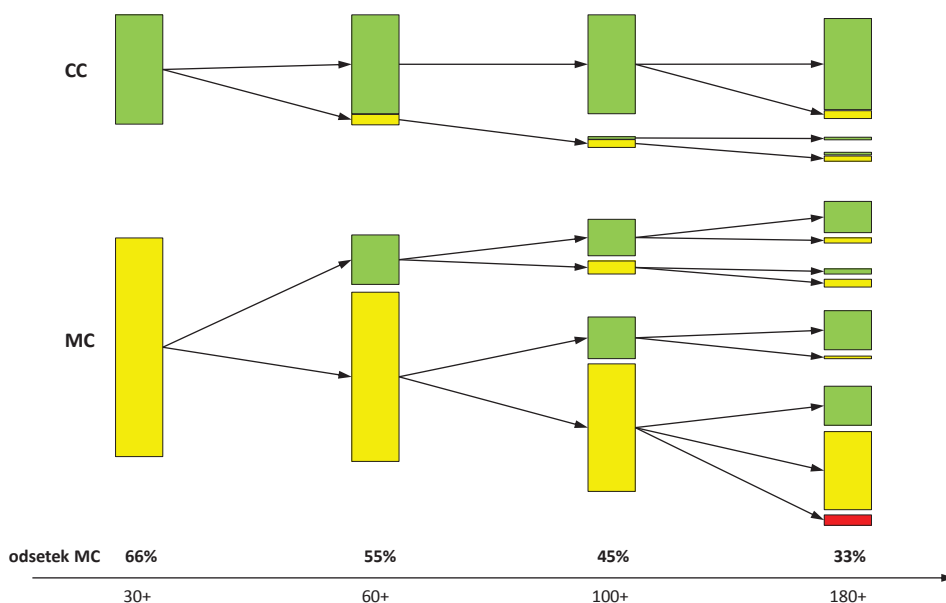


Rycina 22 Zależność pomiędzy odsetkami postaci chimeryzmu stwierdzanymi jednocześnie na podstawie badania szpiku kostnego i krwi obwodowej

Figure 22 Correlation between percentage of simultaneously stated chimerism types on basis of bone marrow and peripheral blood analysis

4.1.4. Dynamika chimeryzmu STR

Uwzględniając opisane wcześniej korelacje, w dalszych analizach wzięto pod uwagę jedynie wyniki badań chimeryzmu we krwi obwodowej. Analizując dane grupy chorych, u których dokonano kompletu oznaczeń chimeryzmu od doby +30 do doby +180 po transplantacji (126 pacjentów) prześledzono szlaki zmiany obu stanów (MC i CC) obserwowane w kolejnych punktach czasowych oceny. Wyodrębniło to grupę chorych z wczesnym i stabilnym całkowitym chimeryzmem, grupę z utrzymującym się długotrwałe chimeryzmem mieszanym oraz grupy, w których dochodziło do zmian obserwowanego odsetka własnego DNA – bądź w postaci jego eliminacji, bądź powtórnej jego detekcji po wcześniejszym zaniku. Graficzny obraz zmian chimeryzmu przedstawia Rycina 23.



Rycina 23 Szlaki zmian chimeryzmu STR w okresie 180 dni
 Figure 23 Paths of STR chimerism changes within 180 days

Tabela 23 Szlaki zmian chimeryzmu STR w okresie 180 dni – zestawienie tabelaryczne
 Table 23 STR chimerism changing paths within 180 days – tabular summary

dość 30	dość 60	dość 100	dość 180	liczba chorych
CC	CC	CC	CC	35
CC	CC	CC	MC	3
CC	MC	CC	CC	1
CC	MC	MC	CC	1
CC	MC	MC	MC	2
MC	CC	CC	CC	12
MC	CC	CC	MC	2
MC	CC	MC	CC	2
MC	CC	MC	MC	3
MC	MC	CC	CC	15
MC	MC	CC	MC	1
MC	MC	MC	AR	4
MC	MC	MC	CC	15
MC	MC	MC	MC	30
Razem				126

Największą liczebnie grupą byli chorzy ze stabilnym, uzyskanym już w dobie 30. CC i pacjenci z opóźnionym CC - uzyskanym w dobie 60, 100 lub dopiero w 180 dalszych – w sumie 62,6% pacjentów. Grupa z utrzymującym się w okresie analizowanym MC stanowiła 23,8%.

4.1.5. Zależność pomiędzy obserwowaną postacią chimeryzmu a wystąpieniem zdarzeń niekorzystnych

W grupie pacjentów z oznaczonym chimeryzmem przeanalizowano występowanie zjawisk niepożądanych – ostrej GvHD w stopniu wyższym lub równym 2, przewlekłej GvHD, wznowy choroby oraz zgonów w odniesieniu do statusu chimeryzmu (CC, MC) w poszczególnych dobach oznaczeń.

4.1.5.1. Wystąpienie ostrej postaci choroby przeszczep przeciw gospodarzowi

Odsetek chorych z objawami ostrej GvHD wymagających terapii immunosupresyjnej (w stopniu 2 lub wyższym) był porównywalny w obu analizowanych grupach grupach. Ani osiągnięcie całkowitego chimeryzmu, ani utrzymywanie się własnego DNA (MC) we wszystkich analizowanych punktach czasowych nie korelowało z wystąpieniem ostrej GvHD (Tabela 24). Analogicznie stopień osiągniętego chimeryzmu w dobach późniejszych (analizowano okres do 2 lat po transplantacji) nie korelował z faktem wcześniejszego wystąpienia aGvHD i włączenia leczenia immunosupresyjnego.

Tabela 24 Występowanie ostrej choroby przeszczep przeciw gospodarzowi w stopniu ≥ 2 u pacjentów z MC i CC w kolejnych dobach po przeszczepieniu
 Table 24 Acute graft versus host disease grade II or higher occurrence for patients with MC and CC in following days after transplant

aGvHD	Chimeryzm				P
	CC		MC		
Obserwacja	Liczba badań	aGvHD	Liczba badań	aGvHD	
doba 30	48	16 (33,3%)	93	25 (26,9%)	0,424
doba 60	63	19 (30,2%)	80	23 (28,8%)	0,854
doba 100	72	24 (33,3%)	64	17 (26,6%)	0,390
doba 180	82	27 (32,9%)	44	13 (29,5%)	0,697
1 rok	92	28 (30,4%)	25	9 (36,0%)	0,596
1 rok 3m	79	24 (30,4%)	19	5 (26,3%)	0,728
1 rok 6m	82	28 (34,1%)	15	3 (20,0%)	0,280
1 rok 9m	60	20 (33,3%)	12	3 (25,0%)	0,572
2 lata	70	24 (34,3%)	19	6 (31,6%)	0,825

4.1.5.2. Wystąpienie przewlekłej choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi

Tabela 25 Występowanie przewlekłej, rozległej postaci cGvHD u pacjentów z MC i CC w kolejnych dobach po przeszczepieniu (podano występowanie i odsetek grupy) zaobserwowanej cGvHD

Table 25 Extensive cGvHD occurrence in patients with MC and CC after transplant

cGvHD	Chimeryzm				P
	CC		MC		
Obserwacja	Liczba badań	cGvHD	Liczba badań	cGvHD	
doba 30	48	30 (62,5%)	93	45 (48,4%)	0,112
doba 60	63	37 (58,7%)	80	40 (50,0%)	0,299
doba 100	72	42 (58,3%)	64	34 (53,1%)	0,541
doba 180	82	46 (56,1%)	44	28 (63,6%)	0,413
1 rok	92	52 (56,5%)	25	19 (76,0%)	0,077
1 rok 3m	79	48 (60,8%)	19	11 (57,9%)	0,819
1 rok 6m	82	51 (62,2%)	15	9 (60,0%)	0,872
1 rok 9m	60	38 (63,3%)	12	8 (66,7%)	0,826
2 lata	70	42 (60,0%)	19	13 (68,4%)	0,503

Podobnie jak w przypadku ostrej postaci GvHD nie stwierdzono korelacji między rodzajem osiągniętego w kolejnych dobach chimeryzmu a występowaniem przewlekłej GvHD (tabela 25). Różnica w odsetkach pacjentów, u których wystąpiła cGvHD między grupą CC i MC jest największa w obie 30. (62,5 i 48,4%, odpowiednio), jednak różnica ta nie ma charakteru istotności statystycznej. W kolejnych dobach, przed upływem 2 lat

po przeszczepieniu różnice te wynoszą poniżej 10% z większą częstością cGvHD w grupie CC. Jedynie w dwa lata po transplantacji odsetek cGvHD jest wyższy w grupie z MC.

4.1.5.3. Występowanie wznowy choroby w zależności od stwierdzonego MC i CC w kolejnych dobach po transplantacji

Tabela 26 przedstawia ilość zanotowanych wznów choroby w zależności od statusu chimeryzmu w kolejnych dobach obserwacji. Stwierdzono istotną zależność między występowaniem MC a wznową choroby dla każdego punktu badania chimeryzmu poza badaniem w 18 i 21 miesięcy po przeszczepieniu. Odsetek wznów był istotnie wyższy u pacjentów bez całkowitej eliminacji własnego DNA (grupa MC).

Tabela 26 Występowanie wznowy u pacjentów z MC i CC w kolejnych dobach po przeszczepieniu

Table 26 Relapse occurrence for patients with MC and CC in following days after transplant

Wznowy	Chimeryzm				P
	CC		MC		
Obserwacja	Liczba badań	Wznowy	Liczba badań	Wznowy	
doba 30	48	7 (14,6%)	93	29 (31,2%)	0,032
doba 60	63	10 (15,9%)	80	26 (32,5%)	0,023
doba 100	72	10 (13,9%)	64	23 (35,9%)	0,003
doba 180	82	8 (9,8%)	44	16 (36,4%)	0,000
1 rok	92	11 (12,0%)	25	7 (28,0%)	0,049
1 rok 3m	79	9 (11,4%)	19	5 (26,3%)	0,095
1 rok 6m	82	13 (15,9%)	15	1 (6,7%)	0,352
1 rok 9m	60	10 (16,7%)	12	3 (25,0%)	0,493
2 lata	70	5 (7,1%)	19	6 (31,6%)	0,004

4.1.5.4. Zgony

W analizie zgonów po przeszczepieniu nie znaleziono korelacji między statusem chimeryzmu do 18 miesiąca po transplantacji, a występowaniem zgonów. Zależność taka pojawia się w okresie późniejszym. Utrzymywanie się MC w oznaczeniach 21 miesięcy i 2 lata po transplantacji silnie korelują z odnotowanym zgonem chorego. Stwierdzono silną korelację między długotrwałym (do 2 lat po przeszczepieniu) utrzymywaniem się własnego DNA biorcy a wystąpieniem zgonu w dalszej obserwacji.

Tabela 27 Zgony pacjentów odnotowane w zależności od statusu MC i CC w kolejnych dobach po przeszczepieniu

Table 27 Deaths recorded, depending on MC and CC status in following days after transplant

Zgon	Chimeryzm				P
	CC		MC		
Obserwacja	Liczba badań	Zgony	Liczba badań	Zgony	
doba 30	48	15 (31,3%)	93	29 (31,2%)	0,993
doba 60	63	20 (31,7%)	80	23 (28,8%)	0,698
doba 100	72	19 (26,4%)	64	19 (29,7%)	0,669
doba 180	82	16 (19,5%)	44	12 (27,3%)	0,318
1 rok	92	16 (17,4%)	25	5 (20,0%)	0,763
1 rok 3m	79	11 (13,9%)	19	3 (15,8%)	0,835
1 rok 6m	82	11 (13,4%)	15	1 (6,7%)	0,466
1 rok 9m	60	4 (6,7%)	12	4 (33,3%)	0,007
2 lata	70	3 (4,3%)	19	7 (36,8%)	0,000

4.1.6. Występowanie wznów w grupie z modyfikacją immunosupresji na podstawie postaci chimeryzmu w 60 dobie w porównaniu z grupą z profilaktyką standardową oraz grupą chorych leczonych z powodu aGvHD w 60 dobie

Tabela poniżej przedstawia ilość wznów zanotowanych w podgrupach badawczych. Podstawą kwalifikacji do podgrupy 1_MC i 1_CC był status chimeryzmu w dobie 60. Podgrupa 0 uwzględnia pacjentów z profilaktyką niezależną od postaci chimeryzmu, grupa L leczonych w dobie 60 z powodu GvHD. Do dwóch ostatnich podgrup włączono także pacjentów bez oznaczeń chimeryzmu. W podgrupach 1_CC i 1_MC dokonano opisanej powyżej modyfikacji profilaktyki immunosupresyjnej. W nawiasach podano liczebność podgrupy oraz odsetek wznów.

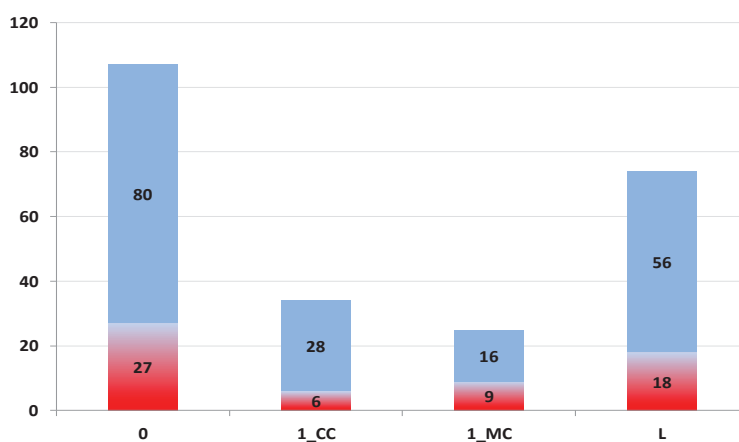
Tabela 28 Występowanie wznów w trakcie obserwacji w podgrupach badawczych (opis w tekście)

Table 28 Relapse occurrence recorded during observation in research subgroups (see text)

Wznowy	Postać chimeryzmu				Razem
	AR	CC	MC	Brak oznaczenia	
0	1 (1; 100%)	3 (10; 30%)	11 (32; 34%)	12 (64; 19%)	27 (107; 25%)
1_CC		6 (34; 18%)			6 (34; 18%)
1_MC			9 (25; 36%)		9 (25; 36%)
L		1 (19; 5%)	6 (23; 26%)	11 (32; 34%)	18 (74; 24%)
Razem	1 (1;100%)	10 (63;16%)	26 (80; 33%)	23 (96;24%)	60 (240;25%)

Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w częstości obserwowanych wznów pomiędzy wydzielonymi grupami badawczymi (

Rycina 24). Nie stwierdzono statystycznej różnicy w występowaniu wznów między grupą 1_CC i 1_MC.



Rycina 24 Porównanie rozkładów występowania wznowy choroby w grupach badawczych z uwzględnieniem statusu chimeryzmu w dobie 60

Figure 24 Comparison of occurrence distribution of disease's relapse within research groups taking account of chimerism status in day60

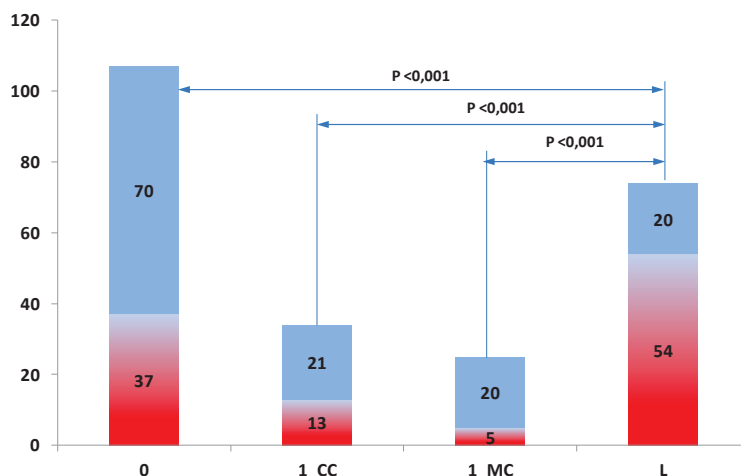
4.1.7. Częstości rozległej przewlekłej postaci GvHD w grupie z modyfikacją immunosupresji na podstawie postaci chimeryzmu w 60 dobie w porównaniu z grupą z profilaktyką standardową oraz grupą chorych leczonych z powodu aGvHD w 60 dobie

W tabeli 29 oraz na rycinie 25 przedstawiono występowanie przewlekłej choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi w postaci rozległej w grupach badawczych w grupach badawczych. Nie odnotowano istotnie wyższego odsetka cGvHD w grupie ze skróconą (1-MC) i przedłużoną (1-CC) profilaktyką. W grupie z profilaktyką standardową (niezależną od statusu chimeryzmu) odsetek cGvHD był wyższy, niż w grupach z modyfikacją profilaktyki immunosupresyjnej.

Tabela 29 Występowanie cGvHD u pacjentów w grupach badawczych
Table 29 cGvHD occurrence in research subgroups

cGvHD	Postać chimeryzmu				Razem
	AR	CC	MC	Brak oznaczenia	
0	0 (1; 0%)	6 (10; 60%)	16 (32; 50%)	15 (64; 23%)	37 (107; 35%)
1_CC		13 (34; 38%)			13 (34; 38%)
1_MC			5 (25; 20%)		5 (25; 20%)
L		18 (19; 95%)	19 (23; 83%)	17 (32; 53%)	54 (74; 73%)
Razem	0 (1;0%)	37 (63;58%)	40 (80;50%)	32 (96;33%)	109 (240;45%)

Nie wykazano korelacji między częstością występowaniem cGvHD a modyfikacją immunosupresji (porównanie grup 1_CC i 1_MC). Przewlekła postać GvHD występowała istotnie częściej u pacjentów leczonych w dobie 60 z powodu aGvHD w porównaniu z pozostałymi analizowanymi grupami. Wyniki korelacji przedstawiono na rycinie 25.



Rycina 25 Porównanie rozkładów występowania cGVHD w grupach badawczych z uwzględnieniem statusu chimeryzmu w dobie 60.

Figure 25 Comparison of occurrence distribution of GvHD within research groups taking account of chimerism status in day 60

4.1.8. Dynamika chimeryzmu STR poprzez określenie podgrup ze stabilnym chimeryzmem (STAB), spadkowym (Dec), i wzrostowym (Inc) między 30 a 60, 60 a 100 oraz 100 a 180) w odniesieniu do niepowodzeń terapii

Określenie wpływu zmian (dynamiki) chimeryzmu definiowanej poprzez:

- wzrost odsetka DNA biorcy (dynamika wzrostowa – INC)
- spadek odsetka własnego DNA biorcy (dynamika spadkowa – DEC)
- utrzymywanie się stałego odsetka DNA biorcy lub jego brak (STAB)

wymagało zawężenia analizowanej grupy do pacjentów u których dysponowano oznaczeniami chimeryzmu w branych pod uwagę dobach (30, 60, 100 i 180). Grupę taką stanowiło odpowiednio 140 chorych dla porównania doby 30 i 60, 139 chorych dla porównania doby 60 i 100 oraz 129 chorych w przypadku porównywania doby 100 i 180. W tabelach 30, 31, 32 i 33 przedstawiono ilość analizowanych obserwacji (liczba zmian), ilość (wyrażoną wartością bezwzględną i odsetkiem grupy) zanotowanych wznów, aGVHD i cGVHD i zgonów w odniesieniu do liczby pacjentów prezentujących zdefiniowane powyżej zmiany chimeryzmu między dobą 30 a 60, 60 i 100 oraz 100 i 180.

4.1.8.1. Dynamika chimeryzmu STR a występowanie wznów w okresie obserwacji

Nie zanotowano istotnych różnic w częstości wznów w zależności od zmian odsetka własnego DNA między dobą 30 a 60. W grupie ze wzrostowym i spadkowym chimeryzmem odsetek wznów wynosił 29 i 27% odpowiednio i nie różnił się od odsetka wznów zanotowanych w grupie ze stabilnym chimeryzmem.

Tabela 30 Występowanie wznów choroby w podgrupach określonych na podstawie porównania postaci chimeryzmu

Table 30 Relapse occurrence in subgroups defined on basis of chimerism type comparison

Okres porównania	Typ zmiany chimeryzmu	Liczba zmian	Ilość obserwowanych wznów
- doba 30 i 60	Razem	140	36 (26%)
	DEC	22	6 (27%)
	INC	7	2 (29%)
	STAB	111	28 (25%)
- doba 60 i 100	Razem	139	36 (26%)
	DEC	20	6 (30%)
	INC	7	4 (57%)
	STAB	112	26 (23%)
- doba 100 i 180	Razem	129	28 (22%)
	DEC	22	5 (23%)
	INC	8	3 (38%)
	STAB	99	20 (20%)

Różnica istotna statystycznie wystąpiła natomiast przy porównaniu dynamiki chimeryzmu między dobą 60 a 100. W grupie chorych ze wzrostowym chimeryzmem odnotowano istotnie wyższy ($p < 0.05$) odsetek wznów. Różnica występuje również między grupami INC, DEC i STAB (38%, 23% i 20% odpowiednio) po porównaniu doby 100 i 180, nie ma jednak charakteru statystycznego.

4.1.8.2. Dynamika chimeryzmu STR a występowanie ostrej choroby przeszczep przeciw gospodarzowi w stopniu ≥ 2

W grupie ze wzrostowym chimeryzmem między dobą 60 a 100 odnotowano niższy, bez znamienności statystycznej odsetek aGvHD.

Tabela 31 Występowanie aGvHD w podgrupach określonych na podstawie porównania postaci chimeryzmu

Table 31 aGvHD occurrence in subgroups defined on basis of chimerism type comparison

Okres porównania	Typ zmiany chimeryzmu	Liczba zmian	Ilość obserwowanych aGvHD
- doba 30 i 60	Razem	140	41 (29%)
	DEC	22	5 (23%)
	INC	7	2 (29%)
	STAB	111	34 (31%)
- doba 60 i 100	Razem	139	41 (29%)
	DEC	20	6 (30%)
	INC	7	1 (14%)
	STAB	112	34 (30%)
- doba 100 i 180	Razem	129	40 (31%)
	DEC	22	7 (32%)
	INC	8	3 (38%)
	STAB	99	30 (30%)

4.1.8.3. Dynamika chimeryzmu STR a występowanie rozległej postaci cGvHD

Nie odnotowano potencjalnego wpływu zmian odsetka własnego DNA pomiędzy badanymi punktami czasowymi na częstość występowania cGvHD.

Tabela 32 Występowanie cGvHD w podgrupach określonych na podstawie postaci chimeryzmu.

Table 32 cGvHD occurrence in subgroups defined on basis of chimerism type comparison

Okres porównania	Typ zmiany chimeryzmu	Liczba zmian	Ilość obserwowanych cGvHD
- doba 30 i 60	Razem	140	75 (54%)
	DEC	22	10 (45%)
	INC	7	4 (57%)
	STAB	111	61 (55%)
- doba 60 i 100	Razem	139	76 (55%)
	DEC	20	7 (35%)
	INC	7	2 (29%)
	STAB	112	67 (60%)
- doba 100 i 180	Razem	129	75 (58%)
	DEC	22	11 (50%)
	INC	8	6 (75%)
	STAB	99	58 (59%)

4.1.8.4. Dynamika chimeryzmu STR a występowanie zgonów w okresie obserwacji

U pacjentów ze wzrostowym chimeryzmem między doбами 30 a 60 oraz dalszych stwierdzono istotnie wyższy ($p < 0,05$) odsetek zgonów, niż w pozostałych grupach.

Tabela 33 Liczba zgonów w podgrupach określonych na podstawie postaci chimeryzmu
 Table 33 Number of deaths in subgroups defined on basis of chimerism type comparison

Okres porównania	Typ zmiany chimeryzmu	Liczba zmian	Ilość obserwowanych zgonów
- doba 30 i 60	Razem	140	43 (31%)
	DEC	22	12 (55%)
	INC	7	5 (71%)
	STAB	111	26 (23%)
- doba 60 i 100	Razem	139	41 (29%)
	DEC	20	6 (30%)
	INC	7	4 (57%)
	STAB	112	31 (28%)
- doba 100 i 180	Razem	129	31 (24%)
	DEC	22	5 (23%)
	INC	8	4 (50%)
	STAB	99	22 (22%)

4.1.9. Dynamika chimeryzmu STR (poprzez określenie podgrup ze stabilnym i zmieniającym się statusem) między 30 a 60, 60 a 100 oraz 100 a 180) w odniesieniu do niepowodzeń terapii

W dalszej analizie prześledzono, czy uzyskany stabilny chimeryzm CC, w odniesieniu do stabilnego MC i zmieniającego się statusu chimeryzmu wpływa na występowanie czterech wymienionych zjawisk niekorzystnych. W tym celu prześledzono szlaki zmian obserwowane w badanej grupie. W zestawieniach 34-37 przedstawiono zaobserwowane kombinacje zmian zanotowane u badanych pacjentów w kolejnych dobach. Pacjentów, u których jedynie w 30. dobie stwierdzono odmienny, niż w dalszych dobach typ chimeryzmu zaliczono do grupy z uzyskany w 60. dobie i utrzymanym rodzajem chimeryzmu.

4.1.9.1. Dynamika chimeryzmu STR a występowanie wznów w okresie obserwacji

Tabela 34 Szlaki zmian chimeryzmu w dobach 30 -180 oraz liczba wznów u chorych z daną charakterystyką zmian

Table 34 Chimerism changing ways within days 30-180 and number of relapses for patients with the given change characteristics

Szlak zmian	doba 30	doba 60	doba 100	doba 180	Liczba wznów	Liczba chorych
CC*	CC	CC	CC	CC	3	35
Pozostałe*	CC	CC	CC	MC	1	3
Pozostałe*	CC	MC	CC	CC	0	1
Pozostałe*	CC	MC	MC	CC	0	1
MC*	CC	MC	MC	MC	1	2
CC*	MC	CC	CC	CC	1	12
Pozostałe*	MC	CC	CC	MC	1	2
Pozostałe*	MC	CC	MC	CC	0	2
Pozostałe*	MC	CC	MC	MC	2	3
Pozostałe*	MC	MC	CC	CC	3	15
Pozostałe*	MC	MC	CC	MC	0	1
Pozostałe*	MC	MC	MC	AR	4	4
Pozostałe*	MC	MC	MC	CC	1	15
MC*	MC	MC	MC	MC	10	30
Razem					27	126

4.1.9.2. Dynamika chimeryzmu STR a występowanie ostrej choroby przeszczep przeciw gospodarzowi w stopniu ≥ 2

Tabela 35 Szlaki zmian chimeryzmu w dobach 30 -180 i występowanie aGvHD u chorych z daną charakterystyką zmian

Table 35 Chimerism changing ways within days 30-180 and aGvHD occurrence with the given change characteristics

Szlak zmian	doba 30	doba 60	doba 100	doba 180	Liczba aGvHD	Liczba chorych
CC*	CC	CC	CC	CC	12	35
Pozostałe*	CC	CC	CC	MC	1	3
Pozostałe*	CC	MC	CC	CC	1	1
Pozostałe*	CC	MC	MC	CC	1	1
MC*	CC	MC	MC	MC	0	2
CC*	MC	CC	CC	CC	4	12
Pozostałe*	MC	CC	CC	MC	0	2
Pozostałe*	MC	CC	MC	CC	0	2
Pozostałe*	MC	CC	MC	MC	1	3
Pozostałe*	MC	MC	CC	CC	3	15

Szlak zmian	doba 30	doba 60	doba 100	doba 180	Liczba aGvHD	Liczba chorych
Pozostałe*	MC	MC	CC	MC	1	1
Pozostałe*	MC	MC	MC	AR	0	4
Pozostałe*	MC	MC	MC	CC	6	15
MC*	MC	MC	MC	MC	9	30
Razem					39	126

4.1.9.3. Dynamika chimeryzmu STR a występowanie rozległej postaci przewlekłej choroby przeszczep przeciw gospodarzowi

Tabela 36 Szlaki zmian chimeryzmu w dobach 30-180 oraz występowanie cGvHD u chorych z daną charakterystyką zmian

Table 36 Chimerism changing ways within days 30-180 and cGvHD occurrence with the given change characteristics

Szlak zmian	doba 30	doba 60	doba 100	doba 180	Liczba aGvHD	Liczba chorych
CC*	CC	CC	CC	CC	23	35
Pozostałe*	CC	CC	CC	MC	3	3
Pozostałe*	CC	MC	CC	CC	1	1
Pozostałe*	CC	MC	MC	CC	0	1
MC*	CC	MC	MC	MC	2	2
CC*	MC	CC	CC	CC	8	12
Pozostałe*	MC	CC	CC	MC	0	2
Pozostałe*	MC	CC	MC	CC	1	2
Pozostałe*	MC	CC	MC	MC	1	3
Pozostałe*	MC	MC	CC	CC	4	15
Pozostałe*	MC	MC	CC	MC	1	1
Pozostałe*	MC	MC	MC	AR	1	4
Pozostałe*	MC	MC	MC	CC	9	15
MC*	MC	MC	MC	MC	19	30
Razem					73	126

4.1.9.4. Dynamika chimeryzmu STR a występowanie zgonów w okresie obserwacji

Tabela 37 Szlaki zmian chimeryzmu w dobach 30-180 oraz liczba zgonów chorych z daną charakterystyką zmian

Table 37 Chimerism changing ways within days 30-180 a number of deaths for patients with the given change characteristics

Szlak zmian	doba 30	doba 60	doba 100	doba 180	Liczba aGvHD	Liczba chorych
CC*	CC	CC	CC	CC	5	35
Pozostałe*	CC	CC	CC	MC	2	3

Szlak zmian	doza 30	doza 60	doza 100	doza 180	Liczba aGvHD	Liczba chorych
Pozostałe*	CC	MC	CC	CC	1	1
Pozostałe*	CC	MC	MC	CC	0	1
MC*	CC	MC	MC	MC	1	2
CC*	MC	CC	CC	CC	6	12
Pozostałe*	MC	CC	CC	MC	1	2
Pozostałe*	MC	CC	MC	CC	1	2
Pozostałe*	MC	CC	MC	MC	1	3
Pozostałe*	MC	MC	CC	CC	2	15
Pozostałe*	MC	MC	CC	MC	0	1
Pozostałe*	MC	MC	MC	AR	3	4
Pozostałe*	MC	MC	MC	CC	1	15
MC*	MC	MC	MC	MC	6	30
Razem					30	126

Monitorowanie szlaków pozwoliło na wyodrębnienie podgrup pacjentów:

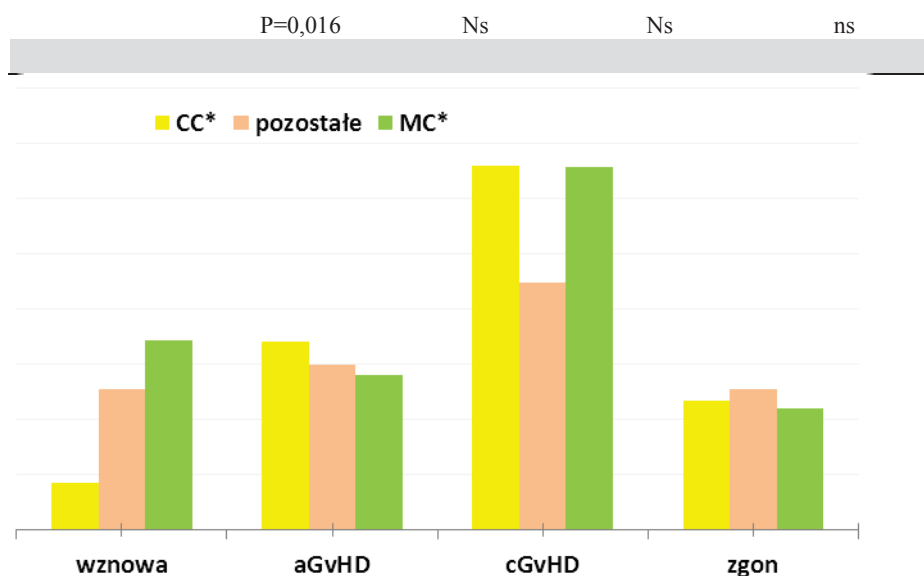
- z wczesnym i dalej stabilnym (utrzymującym się przez cały okres badania) – CC (grupa CC*)
- z utrzymującym się przez cały okres obserwacji stabilnym MC (grupa MC*)
- ze zmianami statusu chimeryzmu w okresie obserwacji (grupa Pozostałe*), bez uwzględnienia wzrostu lub spadku odsetka własnego DNA.

Porównanie tak wyłonionych grup wykazało istotną różnicę w występowaniu wznów choroby między grupami CC*, MC* i Pozostałymi*. Odsetek wznów był istotnie niższy w grupie CC* ($p=0,016$). Uwzględniając dynamikę spadkową i wzrostową odsetka własnego DNA biorcy do grupy CC* dołączono pacjentów z pojedynczym oznaczeniem MC jedynie w dobie 30, a następnie prezentujących CC przez cały okres obserwacji (2 chorych). Analogicznie – grupę MC* powiększono o 12 pacjentów z CC jedynie w dobie 30, następnie pozostających w statusie MC. Taka modyfikacja grup jedynie nasiliła istotność różnic w występowaniu wznów w zależności od statusu chimeryzmu. Nie stwierdzono natomiast różnicy w występowaniu aGvHD, cGvHD i zgonów w badanych grupach. Uzyskane wyniki podsumowuje tabela 38 i wykres 26.

Tabela 38 Dynamika chimeryzmu, a częstość występowania wznowy choroby, aGvHD, cGvHD i zgonów w badanych grupach

Table 38 Comparison between chimera dynamics and relapse occurrence frequency, aGvHD, cGvHD and deaths in researched groups

Szlak zmian chimeryzmu	Niepowodzenie terapii			
	Wznowa	aGvHD	cGvHD	Zgon
CC*	8,5%	34,0%	66,0%	23,4%
Pozostałe*	25,5%	29,8%	44,7%	25,5%
MC*	34,4%	28,1%	65,6%	21,9%



Rycina 26 Odsetek wznów, aGvHD, cGvHD i zgonów w grupach z odnotowaną dynamiką chimeryzmu CC*, MC* i Pozostałych*

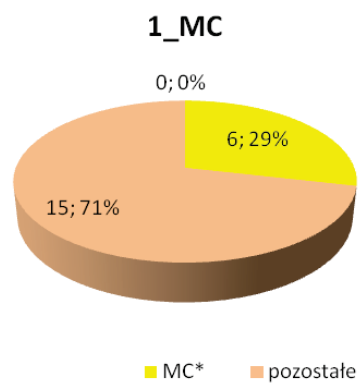
Figure 26 Percentage of relapses, aGvHD, cGvHD, and deaths in groups with recorded chimerism dynamics CC*, MC* and Remaining*

Oceny zmian dynamiki chimeryzmu dokonano również dla podgrup badawczych z modyfikacją immunosupresji. Analiza wyników wykazała, że w grupie 1_MC uzyskano wysoki odsetek zmian statusu chimeryzmu w dalszych dobach badania (po modyfikacji immunosupresji). Natomiast w grupie 0, gdzie nie modyfikowano immunosupresji, przeważający odsetek pacjentów pozostawał nadal w grupie stabilnego MC. Zestawienie wyników przedstawia tabela 39. Porównanie grup 1-MC i 1_CC wykazało statystycznie istotną różnicę ($p < 0,001$) w zmianie dalszego statusu chimeryzmu pomiędzy grupami. Pacjenci w grupie 1_MC zmieniali status chimeryzmu w dalszych dobach istotnie częściej, niż pacjenci z grupy 1_CC, którzy zachowali stabilną postać CC w przeważającym odsetku. Wykresy 27 i 28 pokazują zmiany chimeryzmu w grupach z modyfikacją immunosupresji.

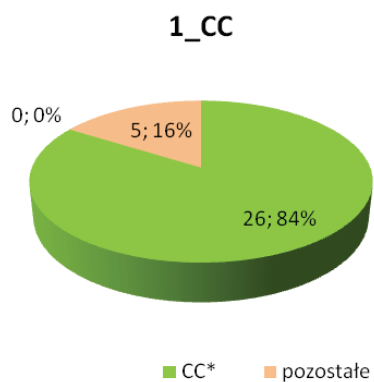
Tabela 39 Określenie częstości występowania zdefiniowanych szlaków zmian chimeryzmu w badanych podgrupach

Table 39 Evaluating occurrence frequency of defined chimerism changing paths in selected groups

Szlak zmian chimeryzmu	Wydzielona podgrupa terapeutyczna			
	L	1_MC	1_CC	0
CC*	16	0	26	5
Pozostałe*	14	15	5	13
MC*	9	6	0	17
$P < 0,001$				



Rycina 27 Zmiany w statusie chimeryzmu w dalszych dobach obserwacji w grupie 1_MC
Figure 27 Chimerism status changes in group 1_MC



Rycina 28 Zmiany w statusie chimeryzmu w dalszych dobach badania w grupie 1_CC
Figure 28 Chimerism status changes in group 1_CC

4.2. Chimeryzm erytropoetyczny

4.2.1. Analiza współwystępowania niezgodności w różnych układach grupowych krwi

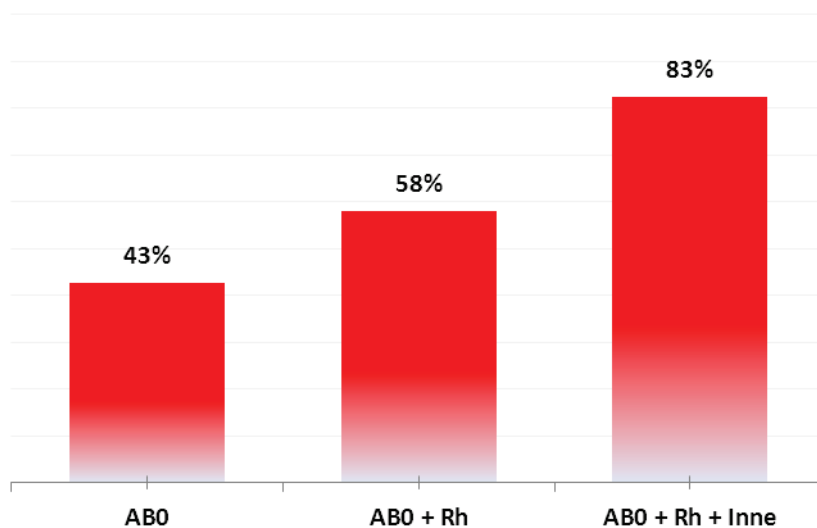
Analizę niezgodności w zakresie antygenów grupowych krwi przeprowadzono na podstawie wyników badań układu AB0, Rh oraz 6 innych układów. Biorąc pod uwagę jedynie układ AB0 w badanym materiale znaleziono 57,3% zgodnych par dawca-biorca, 18,2% z niezgodnością małą, 8,4% z niezgodnością mieszaną i 16,1% z niezgodnością dużą. Odsetek par zgodnych zmniejszył się do 42% po analizie różnic w zakresie antygenów układu Rh, a badanie dalszych antygenów grupowych pozwoliło na wskazanie jedynie 17,5% par w pełni zgodnych w każdym z badanych układów. Wyniki analizy przedstawiono w tabeli 40.

Tabela 40 Analiza zgodności par biorca-dawca w zakresie wielu układów grupowych krwi
Table 40 Compatibility analysis in pairs donor-recipient for many blood group systems

Ocena zgodności w zakresie układu			
AB0	Rh	Pozostałe	liczba oznaczeń
Zgodność	zgodny	Zgodny	25 (17,5%)
		Niezgodny	35 (24,5%)
	niezgodny	Zgodny	--
		Niezgodny	22 (15,3%)
Nie zgodność mała	zgodny	Zgodny	8 (5,6%)
		Niezgodny	11 (7,7%)
	niezgodny	Zgodny	--
		Niezgodny	7 (4,9%)
Nie zgodność mieszana	zgodny	Zgodny	3 (2,1%)
		Niezgodny	6 (4,2%)
	niezgodny	Zgodny	--
		Niezgodny	3 (2,1%)
Nie zgodność duża	zgodny	Zgodny	9 (6,3%)
		Niezgodny	10 (7,0%)
	niezgodny	Zgodny	--
		Niezgodny	4 (2,8%)
Razem			143

Pozwalało to na monitorowanie chimeryzmu erytropoetycznego w zakresie przynajmniej jednego układu grupowego krwi u znacznie większego odsetka chorych niż wskazywały niezgodności w układzie AB0. Rycina 29 wskazuje, jak odsetkowo zwiększyły się

szala się możliwość znalezienia markera różnicującego po rozważeniu niezgodności poza układem AB0.



Rycina 29 Możliwość monitorowania chimeryzmu po uwzględnieniu różnic w wielu układach antygenowych krwi

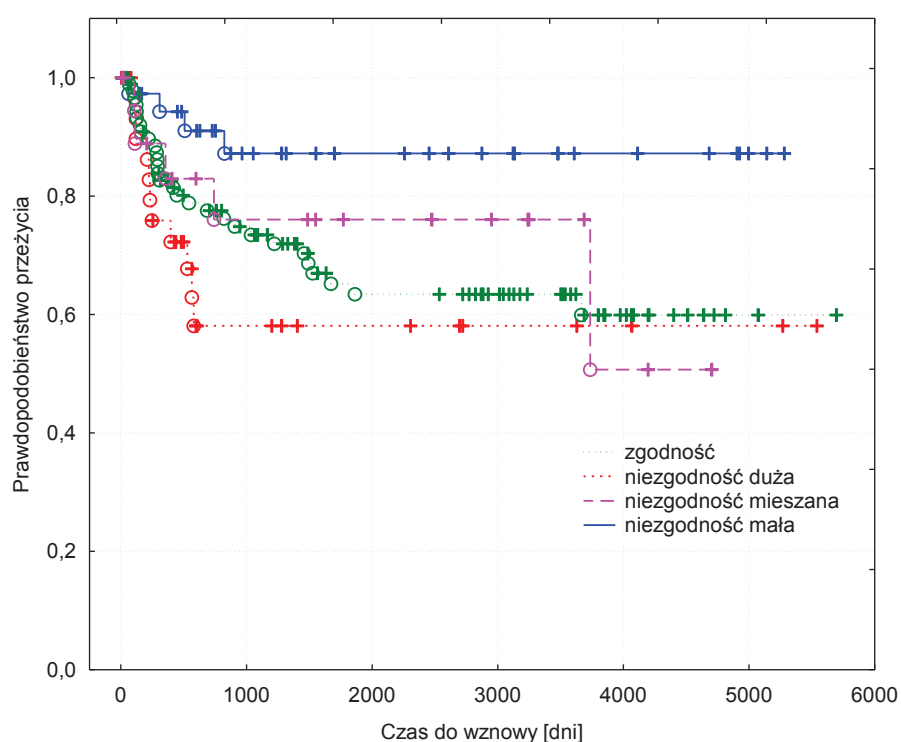
Figure 29 Possibility of chimerism monitoring after taking into account differences in multiple blood antigen systems

Oznaczenie dodatkowych antygenów grupowych krwi, poza rutynowo oznaczonym układem AB0 i Rh zwiększyło populację, u której możliwe było monitorowanie chimeryzmu do 83% całej populacji, u której dokonano oznaczeń. Oznaczenie jedynie antygenów układu Kell, co w wielu ośrodkach jest standardem, zwiększa odsetek niezgodności do 61%.

4.2.2. Zależność pomiędzy typem niezgodności AB0 a niepowodzeniem terapii

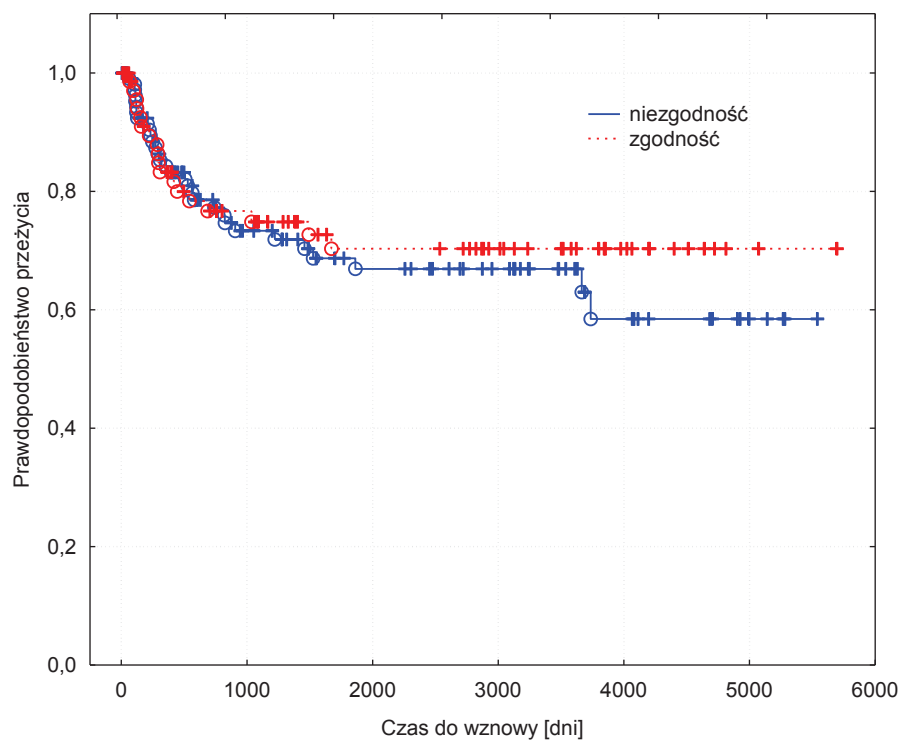
4.2.2.1. Zależność pomiędzy typem niezgodności AB0 a występowaniem wznów w okresie obserwacji

Nie znaleziono zależności między zgodnością i poszczególnymi typami niezgodności w zakresie oceny jedynie układu AB0, a częstością występowania wznów ($P=0,069$). Czas wolny od choroby dla pacjentów poddanych przeszczepieniu od dawców zgodnych i niezgodnych w układzie AB0 prezentuje wykres 30.



Rycina 30 Krzywe przeżycia wolnego od choroby dla pacjentów poddanych przeszczepieniu od dawców zgodnych oraz z niezgodnością małą, mieszaną i dużą w zakresie układu AB0
 Figure 30 Disease-free survival curves for patients after transplant from corresponding donor's, or with small, mixed and large inconsistency in the area of ABO system

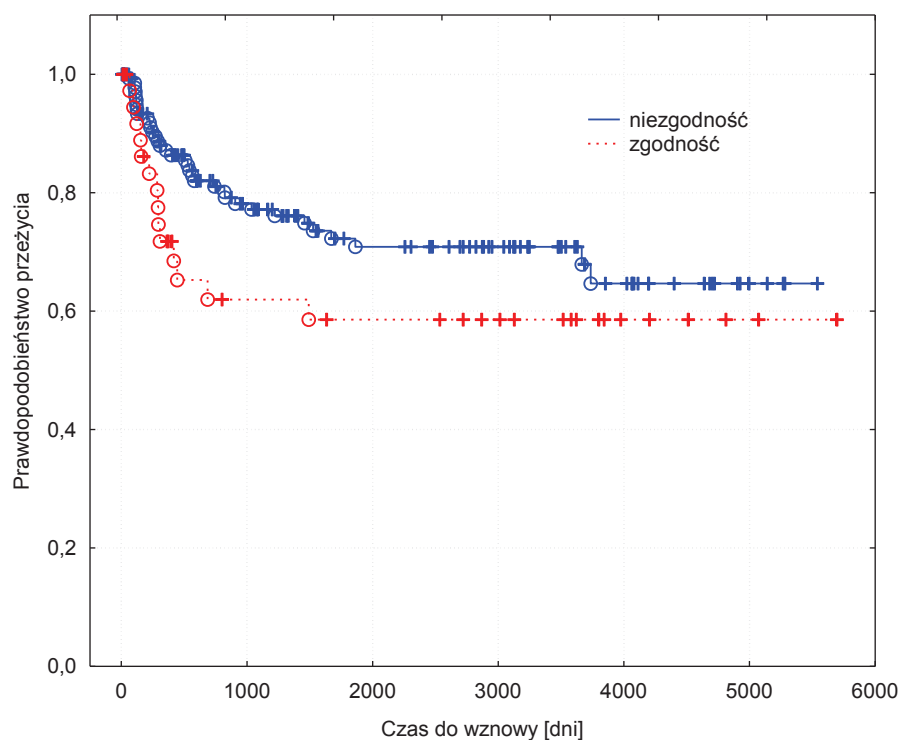
Także analiza zależności między niezgodnością zarówno w układzie AB0, jak i Rh, i zgodnością w obu układach nie wykazała istotnych różnic między obiema grupami w zakresie występowania wznów choroby ($p=0,812$). Krzywe przeżycia wolnego od choroby dla pacjentów zgodnych i niezgodnych w zakresie układów AB0 i Rh prezentuje wykres 31.



Rycina 31 Krzywe przeżycia wolnego od choroby dla pacjentów zgodnych i niezgodnych w zakresie układów AB0 i Rh

Figure 31 Disease-free survival curves for patients corresponding and those who do not correspond in the area of ABO and Rh systems

Czas do wznowy był natomiast istotnie krótszy dla pacjentów w pełni zgodnych w zakresie wszystkich badanych układów grupowych krwi ($p=0,049$), a więc w 17-procentowej populacji wyłonionej na podstawie rozszerzonego badania antygenów grupowych (rycina 32).

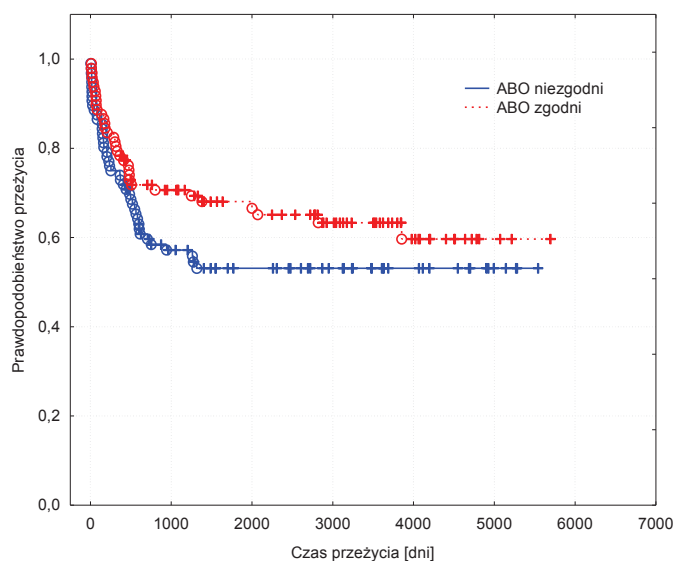


Rycina 32 Krzywe przeżycia wolnego od choroby dla pacjentów w pełni zgodnych w zakresie wszystkich badanych układów i z wykazaną przynajmniej jedną niezgodnością w antygenach grupowych krwi

Figure 32 Disease-free survival curves for patients completely corresponding in the area of all systems and with at least one inconsistency in blood group antigen recognized

4.2.2.2. Zależność pomiędzy typem niezgodności AB0 a odsetkiem zgonów w okresie obserwacji

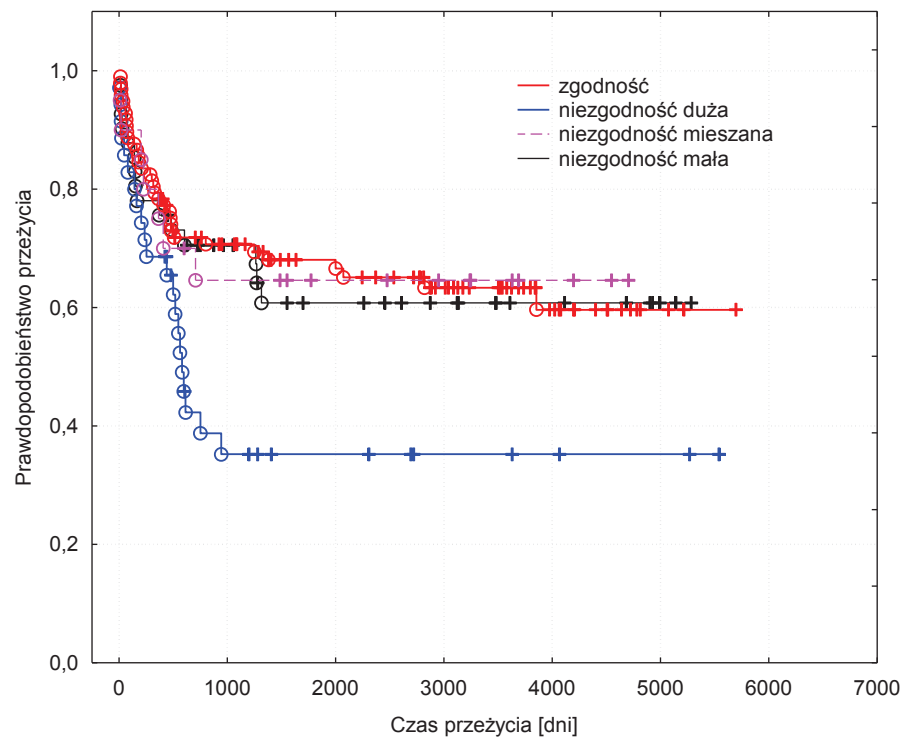
Rycina 33 przedstawia krzywe przeżycia chorych poddanych przeszczepieniu od dawców zgodnych i niezgodnych w zakresie układu AB0, bez różnicowania na podtyp niezgodności. Nie wykazano różnic w przeżyciu zależnych od zgodności w zakresie grup AB0 (test Gehana, $p=0,125$).



Rycina 33 Krzywe przeżycia chorych zgodnych z dawcą w zakresie grupy krwi AB0 oraz chorych z niezgodnością.

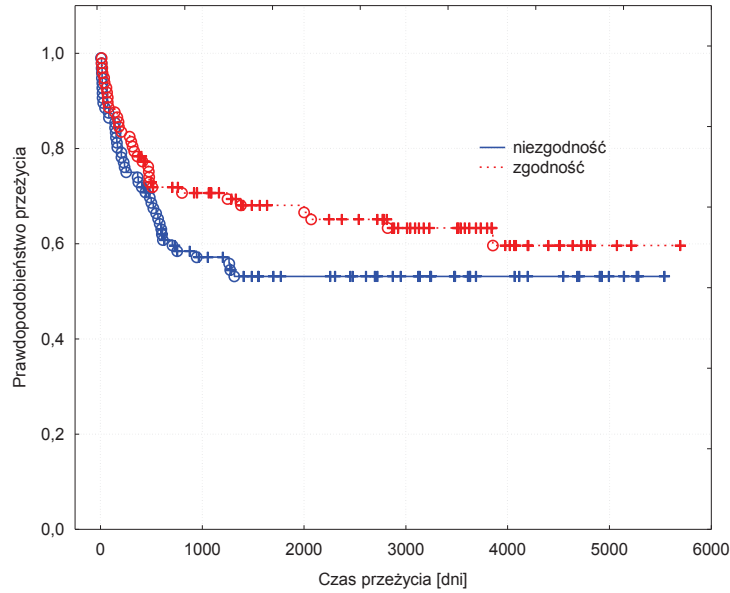
Figure 33 Survival curve of patients matching in the area of blood group AB0 with donor, and patients who do not match

Długość przeżycia wyrażona ilością zgonów zanotowanych w okresie obserwacji nie różniła się ($p=0,081$) dla żadnego z typów niezgodności i była niezależna od ilości stwierdzonych niezgodności (w AB0, Rh i innych układach grupowych). Krzywe przeżycia ilustrują wykresy 34, 35, 36 i 37.

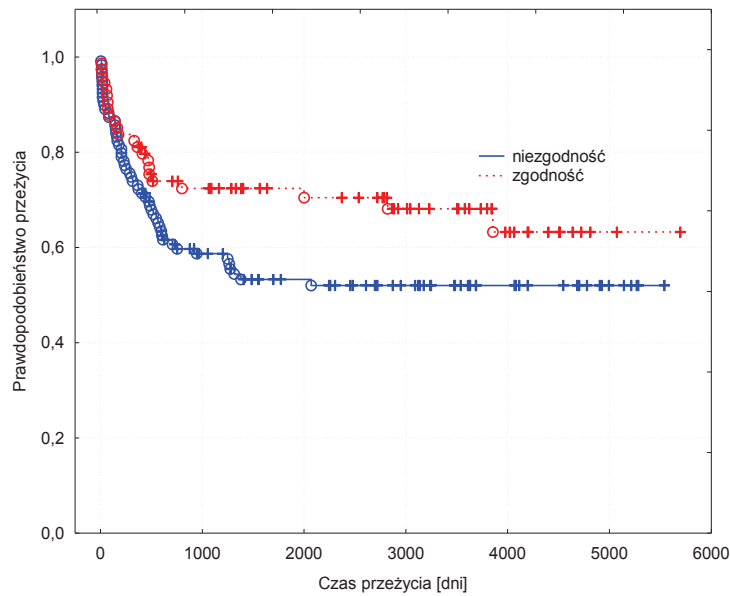


Rycina 34 Krzywe przeżycia pacjentów zgodnych w układzie ABO oraz z trzema typami niezgodności

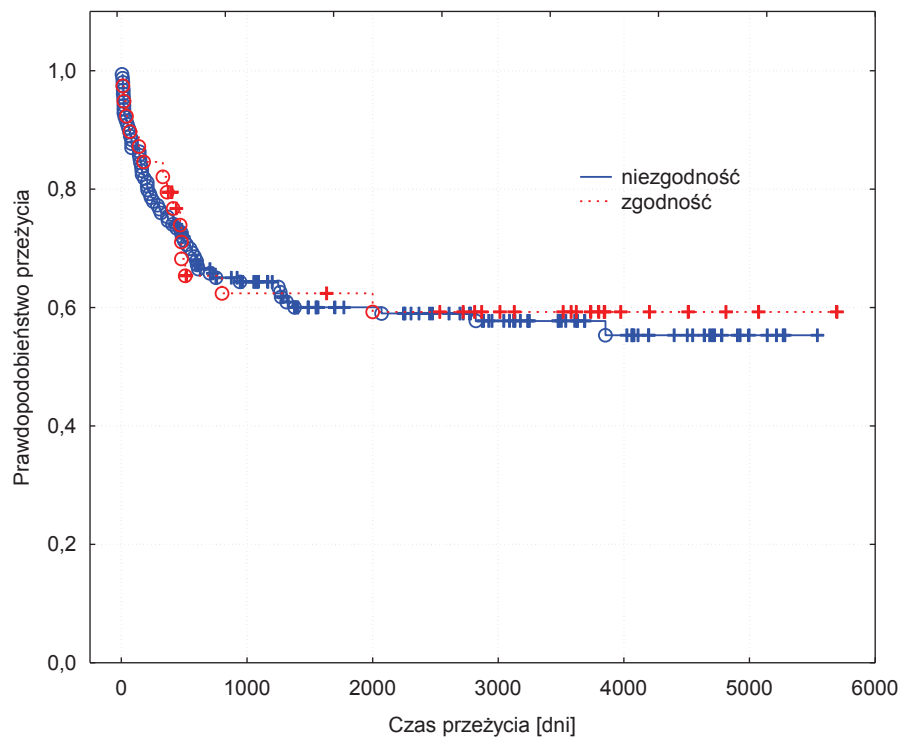
Figure 34 Survival curves for patients corresponding in ABO system and with 3 types of incompatibilities



Rycina 35 Krzywe przeżycia pacjentów zgodnych i niezgodnych w AB0 ($p=0,125$)
 Figure 35 Survival curves for patients corresponding and those who do not correspond in ABO system [$p=0,125$]



Rycina 36 Krzywe przeżycia pacjentów zgodnych i niezgodnych w dwóch układach grupowych AB0 i Rh ($p=0,064$)
 Figure 36 Survival curves for patients corresponding and those who do not correspond in 2 blood groups antigen: ABO and Rh [$p=0,064$]

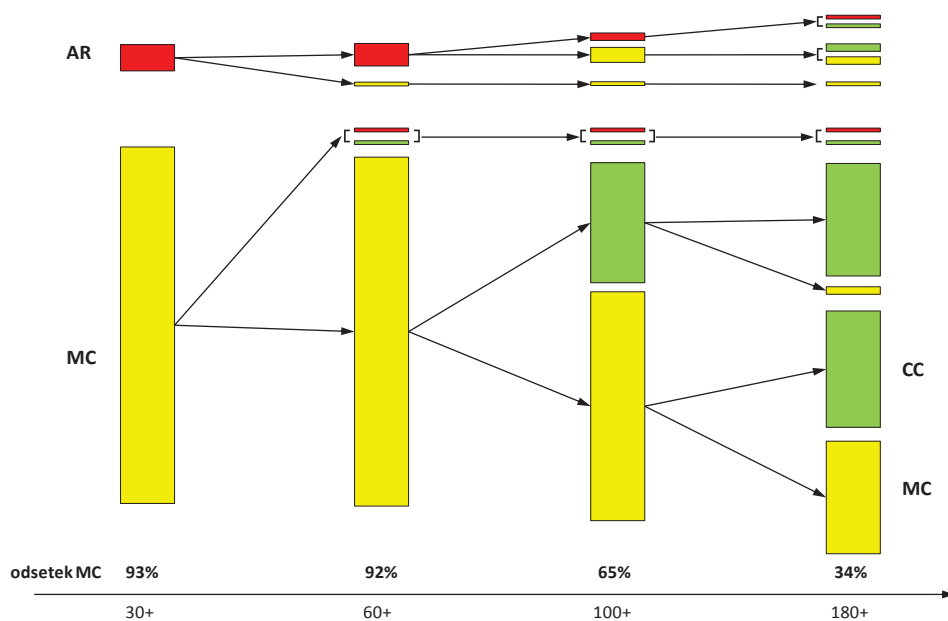


Rycina 37 Krzywe przeżycia dla pacjentów w pełni zgodnych i niezgodnych w przynajmniej jednym antygenie grupowym krwi ($p=0,846$)

Figure 37 Survival curves for patients completely corresponding and those who do not correspond in at least one blood group antigen [$p=0,846$]

4.2.3. Dynamika zmian chimeryzmu erytropoetycznego

Na rycinie 38 przedstawiono szlaki zmian echimeryzmu u pacjentów z co najmniej jedną niezgodnością w zakresie antygenów grupowych krwi, śledzone od doby +30 do +180 po przeszczepieniu. Odsetek erytrocytów biorcy systematycznie spadał. Populacja krwinek własnych biorcy utrzymywała się jednak u około jednej trzeciej pacjentów także w dobie 180. U niewielkiego odsetka pacjentów zanotowano także występowanie do doby 180. jedynie autologicznych erytrocytów. Nie było to jednak równoznaczne ze wznową choroby. W tabeli 41 zaprezentowano rodzaje zmian chimeryzmu oraz odsetek pacjentów, u których zanotowano MC.



Rycina 38 Szlaki zmian chimeryzmu erytropoetycznego w okresie 180 dni
 Figure 38 Erythropoietic chimerism changing paths within 180 days

Tabela 41 Szlaki zmian chimeryzmu erytropoetycznego w okresie 180 dni
 -przedstawienie tabelaryczne

Table 41 Erythropoietic chimerism changing ways within 180 days – tabular summary

doba 30	doba 60	doba 100	doba 180	liczba chorych
AR	AR	AR	AR	1
AR	AR	AR	CC	1
AR	AR	MC	CC	2
AR	AR	MC	MC	2
AR	MC	MC	MC	1
MC	AR	AR	AR	1
MC	CC	CC	CC	1
MC	MC	CC	CC	30
MC	MC	CC	MC	2
MC	MC	MC	CC	31
MC	MC	MC	MC	30
Razem				102

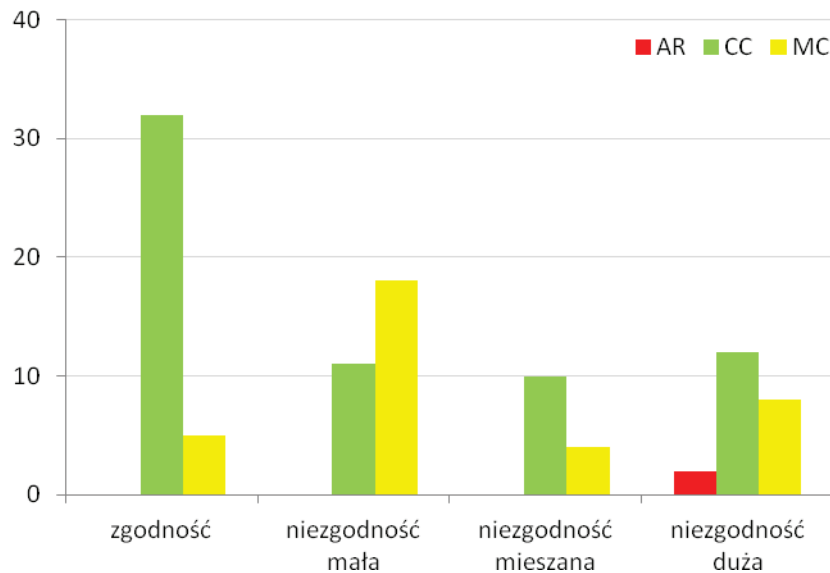
4.2.4. Zależność pomiędzy postacią echimeryzmu w 180 dobie po przeszczepie a typem niezgodności w zakresie układu AB0

Poddano analizie postać chimeryzmu stwierdzoną u pacjentów w 180. dobie po przeszczepieniu i typ niezgodności w układzie AB0 między biorcą i dawcą. Wśród pacjentów zgodnych z dawcami w układzie AB0 86,4% osiągnęło CC (oceniane na podstawie innych układów grupowych), co stanowiło 49% wszystkich pacjentów z tym typem chimeryzmu. W grupie MC dominowali chorzy z niezgodnością małą (50% pacjentów z MC). Obecność wyłącznie populacji erytrocytów biorcy zanotowano jedynie w przypadku niezgodności dużej. Liczbę chorych z poszczególnymi rodzajami chimeryzmu w zależności od zgodności lub jej braku w układzie AB0 przedstawia tabela 42.

Tabela 42 Rozkład postaci chimeryzmu w dobie 180 po transplantacji u chorych zgodnych i niezgodnych z dawcą w układzie AB0

Table 42 Chimerism type division in day "180" after transplant for patients compatible and incompatible in ABO system

Układ AB0	AR	CC	MC	Razem
Zgodność		32	5	37
Niezgodność mała		11	18	29
Niezgodność mieszana		10	4	14
Niezgodność duża	2	12	8	22
Razem	2	65	35	102



Rycina 39 Rozkład postaci chimeryzmu w dobie 180 po transplantacji u chorych zgodnych i niezgodnych z dawcą w układzie AB0

Figure 39 Distribution of chimerism types in day "180" after transplant for patients corresponding and those who do not correspond with a donor in ABO system

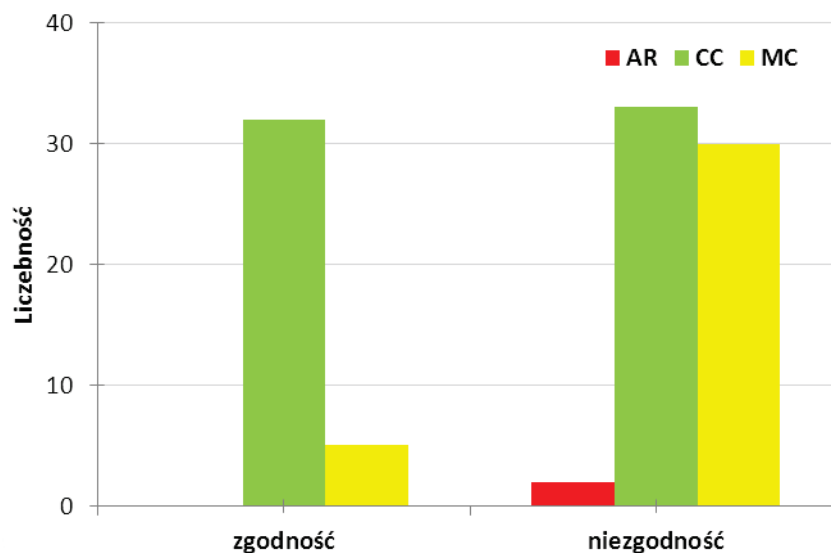
W grupie pacjentów z niezgodnością małą stwierdzono dominację mieszanego chimeryzmu w dobie 180. W przypadku pozostałych niezgodności pacjenci z całkowitym echimeryzmem stanowili przeważający odsetek badanych. Odsetek chorych prezentujących MC, CC i AR w dobie 180 po przeszczepieniu z podziałem na niezgodności prezentuje Rycina 39.

Uwzględniając jedynie podział pacjentów na grupę z pełną zgodnością w układzie AB0 (i chimeryzmem monitorowanym niezgodnościami w innych układach) oraz niezgodnych, przeanalizowano postać osiągniętego w dobie 180 chimeryzmu. Całkowity chimeryzm osiągnęła połowa pacjentów niezgodnych i 86,4% pacjentów w pełni zgodnych w układzie AB0. W tabeli 43 przedstawiono liczbę chorych z AR, CC i MC, a na Rycinie 40 zestawienie stwierdzanych rodzajów chimeryzmu w obu grupach.

Tabela 43 Postaci chimeryzmu osiągniętego w dobie 180 po przeszczepieniu przez chorych w pełni zgodnych i z niezgodnością w układach grupowych krwi

Table 43 Chimerism type reached in day "180" after transplant for patients fully compatible and incompatible in blood group systems

Układ AB0	AR	CC	MC	Razem
Zgodność		32	5	37
Niezgodność	2	33	30	65
Razem	2	65	35	102



Rycina 40 Występowanie postaci chimeryzmu w grupie ze zgodnością i niezgodnością w układzie ABO

Figure 40 Distribution of chimerism type for patients with full consistency and inconsistency in ABO group antigens

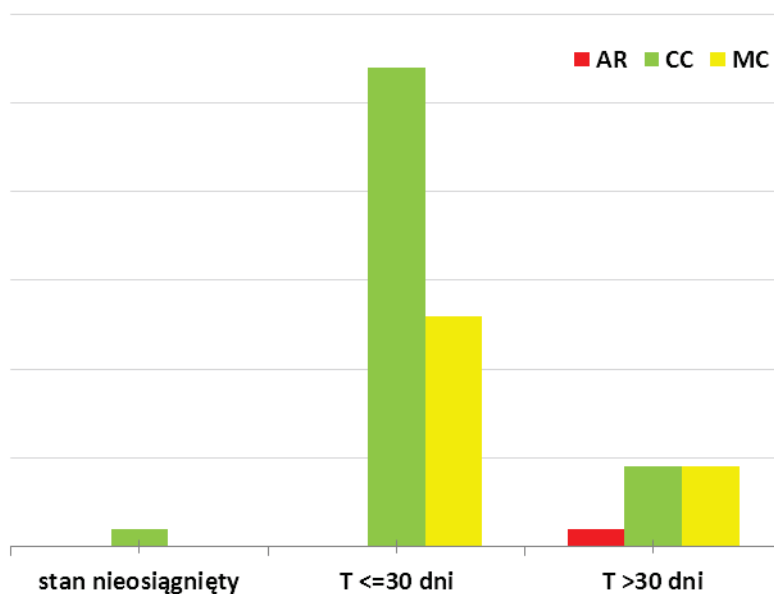
4.2.5. Zależność pomiędzy postacią echimeryzmu w 180 dobie po przeszczepie a oceną niezależności od przetoczeń KKCz

Zbadano związek między osiągniętą w dobie 180 postacią echimeryzmu a uzyskaną niezależnością od przetoczeń przed i po dobie +30 po transplantacji. Pacjenci z wczesną (przed dobą 30) niezależnością od przetoczeń stanowili 86% w grupie osiągającej CC i 74% w grupie z MC. Nie stwierdzono zależności obu badanych parametrów. Liczebność grup oraz zestawienie postaci chimeryzmu i stanu osiągniętej niezależności przedstawia tabela 44 i Rycina 41.

Tabela 44 Osiągnięcie niezależności od przetoczeń w grupach chorych z AR, CC i MC w dobie +180

Table 44 Reached transfusion independencies in groups of patients with AR, CC and MC in day +180

Niezależność od KKCz	AR	CC	MC	Razem
Stan nieosiągnięty		2		2
T ≤ 30 dni		54	26	80
T > 30 dni	2	9	9	20
Suma końcowa	2	65	35	102



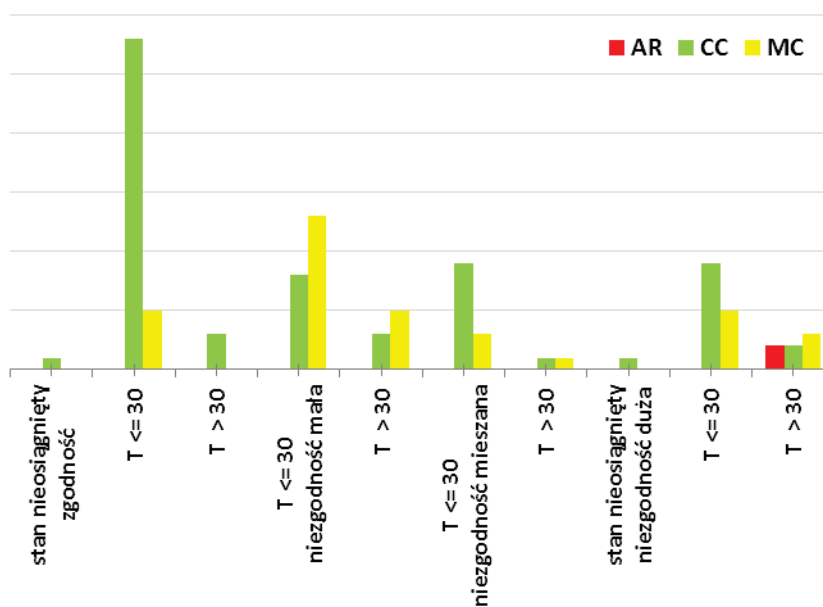
Rycina 41 Rodzaj osiągniętego chimeryzmu w grupie chorych długotrwale zależnych od przetoczeń oraz niezależnych przed dobą 30 po transplantacji

Figure 41 Chimerism type in the group of patients chronically depended on transfusions, and those who are independent from transfusions before day 30 after transplantation

Tabela 45 Czas osiągnięcia niezależności od przetoczeń w odniesieniu do niezgodności w układzie AB0

Table 45 Time to reach transfusion independency from transfusions depending on incompatibility in AB0 system

AB0	Niezależność od KKCz	AR	CC	MC	Razem
Zgodność	stan nieosiągnięty		1		1
	T ≤ 30		28	5	33
	T > 30		3		3
Niezgodność mała	T ≤ 30		8	13	21
	T > 30		3	5	8
Niezgodność mieszana	T ≤ 30		9	3	12
	T > 30		1	1	2
Niezgodność duża	stan nieosiągnięty		1		1
	T ≤ 30		9	5	14
	T > 30	2	2	3	7
Razem		2	65	35	102



Rycina 42 Czas osiągnięcia niezależności w typach niezgodności a rodzaj chimeryzmu w dobie 180

Figure 42 Comparison of time required to achieve independency in inconsistency types, with a chimerism type in day 180

Tabela 45 przedstawia czas osiągnięcia niezależności od przetoczeń w zależności od typu niezgodności w układzie AB0. Wczesną (przed dobą 30) niezależność od przetoczeń stwierdzono w najwyższym odsetku w grupie chorych zgodnych z dawcami w układzie AB0 i całkowitym chimeryzmem w dobie +180.

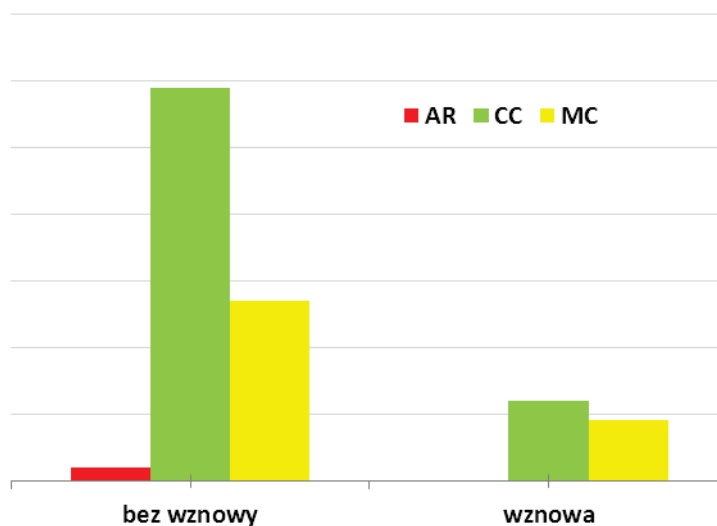
4.2.6. Zależność pomiędzy postacią echimeryzmu w 180 dobie po przeszczepieniu a występowaniem niepowodzeń terapii

4.2.6.1. Zależność pomiędzy postacią echimeryzmu w 180 dobie po przeszczepieniu a występowanie wznów w okresie obserwacji

Tabela 46 Liczba odnotowanych wznów wczesnych i późnych w zależności od rodzaju chimeryzmu erytropoetycznego w dobie 180

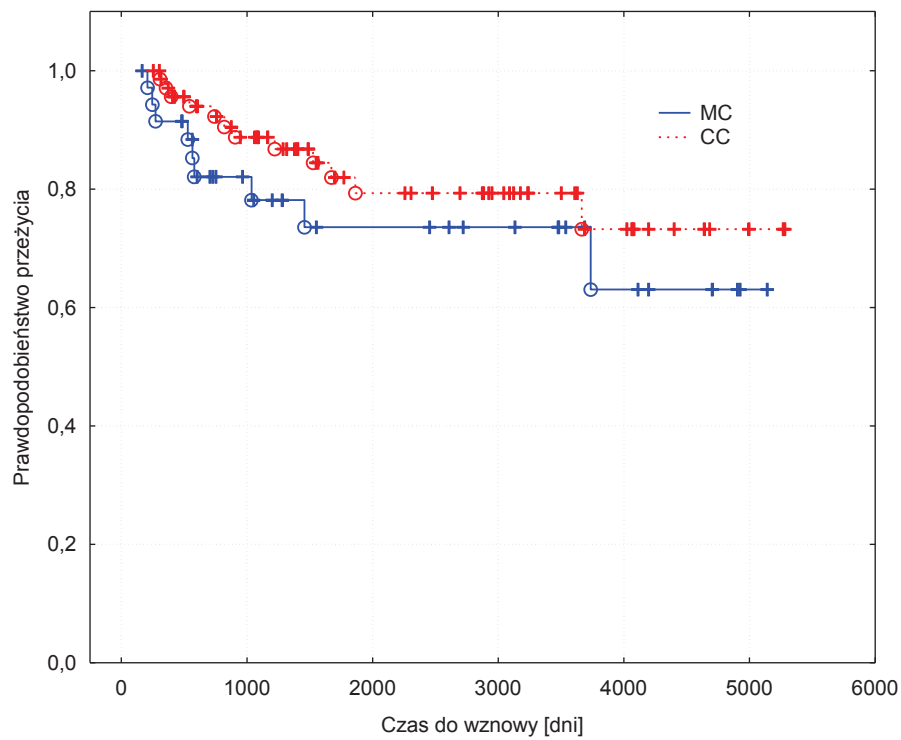
Table 46 Number of recorded early and late relapses depending on erythropoietic chimerism type in day 180

	Chimeryzm erytropoetyczny doba 180			Razem
	AR	CC	MC	
Bez wznowy	2	59	27	88
Wznowa		12	9	21
w tym:				
- wznowa wczesna		5	6	11
- wznowa późna		7	3	10
Razem	2	71	36	109



Rycina 43 Występowanie rodzajów chimeryzmu erytropoetycznego w dobie +180 u pacjentów z i bez wznowy choroby

Figure 43 Distribution of erythropoietic chimerism types in day "180" for patients with and without disease's relapse



Rycina 44 Czas do wznowy w grupie chorych z CC i MC erytropoetycznym w dobie 180.
($P=0,194$)

Figure 44 Time until relapse for patients with erythropoietic CC and MC in day +180 ($P=0,194$)

Nie stwierdzono zależności między rodzajem chimeryzmu osiągniętego w dobie 180. po przeszczepieniu a wystąpieniem wznowy (tabela 46, wykres 43 i 44).

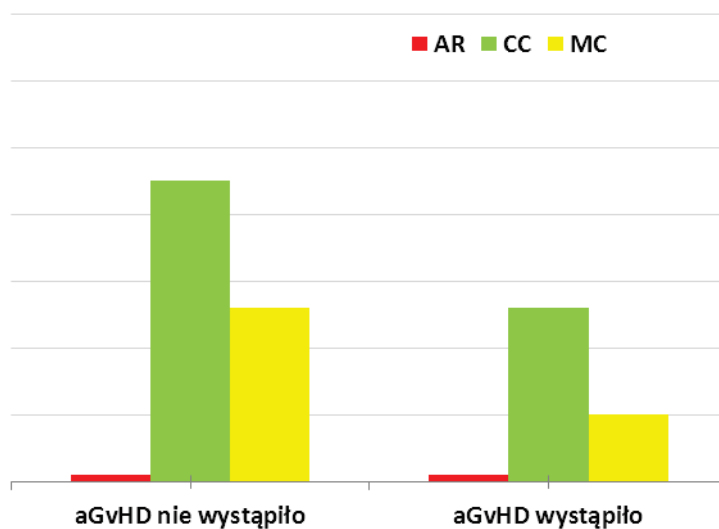
4.2.6.2. Zależność pomiędzy postacią echimeryzmu w 180 dobie po przeszczepieniu a występowanie ostrej choroby przeszczep przeciw gospodarzowi w stopniu ≥ 2

Nie stwierdzono także zależności między osiągniętym rodzajem chimeryzmu a wystąpieniem ostrej GvHD (tabela 47 i wykres 45)

Tabela 47 Zależność pomiędzy wystąpieniem ostrej GvHD a rodzajem chimeryzmu erytropoetycznego w dobie 180

Table 47 Correlation between occurrence of acute GvHD and erythropoietic chimerism type in day 180

	Chimeryzm erytropoetyczny doba 180			Razem
	AR	CC	MC	
aGvHD nie wystąpiło	1	45	26	72
aGvHD wystąpiło	1	26	10	37
Razem	2	71	36	109



Rycina 45 Rozkład postaci chimeryzmu erytropoetycznego w dobie 180 w grupach z i bez objawów ostrej GvHD

Figure 45 Distribution of erythropoietic chimerism types in day "180" for groups with and without symptoms of acute GvHD

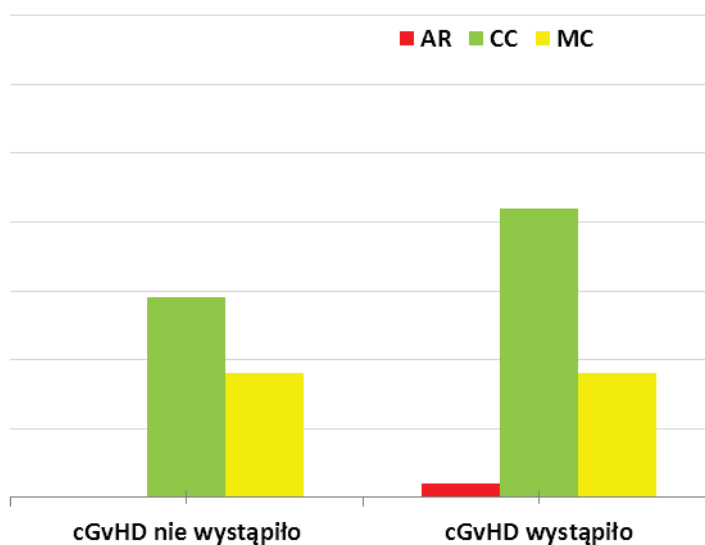
4.2.6.3. Zależność pomiędzy postacią echimeryzmu w 180. dobie po przeszczepieniu a występowanie rozległej postaci przewlekłej choroby przeszczep przeciw gospodarzowi

Nie wykazano zależności między osiągniętym w dobie 180 chimeryzmem erytropoetycznym a występowaniem cGvHD (tabela 48 i wykres 46)

Tabela 48 Zależność pomiędzy występowaniem przewlekłej GvHD a rodzajem chimeryzmu erytropoetycznego w dobie 180

Table 48 Correlation between occurrence of chronic GvHD and erythropoietic chimerism type in day 180

	Chimeryzm erytropoetyczny doba 180			Razem
	AR	CC	MC	
cGvHD nie wystąpiło		29	18	47
cGvHD wystąpiło	2	42	18	62
Razem	2	71	36	109



Rycina 46 Zależność pomiędzy wystąpieniem przewlekłej GvHD a rodzajem chimeryzmu erytropoetycznego w dobie 180

Figure 46 Correlation between occurrence of chronic GvHD and erythropoietic chimerism type in day 180

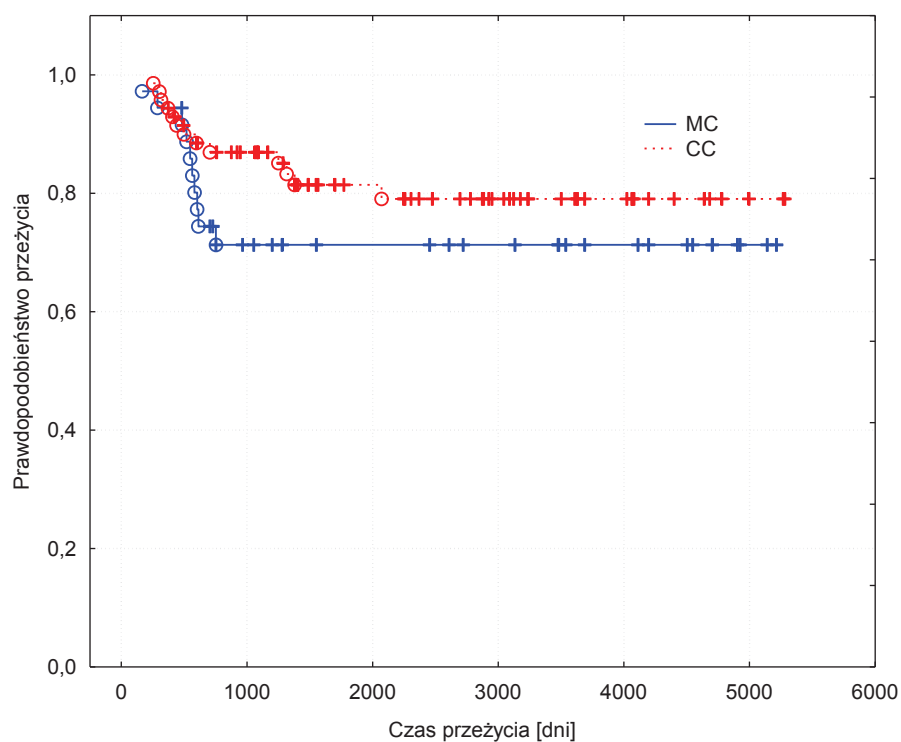
4.2.6.4. Zależność pomiędzy postacią echimeryzmu w 180. dobie po przeszczepieniu a występowanie zgonów w okresie obserwacji

Rodzaj osiągniętego chimeryzmu erytropoetycznego nie miał wpływu na odsetek zgonów stwierdzonych w okresie obserwacji (tabela 49, Rycina 47)

Tabela 49 Zależność pomiędzy liczbą zgonów a rodzajem chimeryzmu erytropoetycznego w dobie 180

Table 49 Correlation between number of deaths and erythropoietic chimerism type in day 180

	Chimeryzm erytropoetyczny doba 180			Razem
	AR	CC	MC	
Przeżycie	2	58	26	86
Zgon		13	10	23
Razem	2	71	36	109



Rycina 47 Krzywe przeżycia dla podgrup wyznaczonych na podstawie chimeryzmu erytropoetycznego w dobie +180 (P=0,217)

Figure 47 Survival curves for subgroups appointed on basis of erythropoietic chimerism type in day +180 [P=0,217]

4.2.7. Występowanie wznów a zmiany miana przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom na erytrocytach dawcy i biorcy

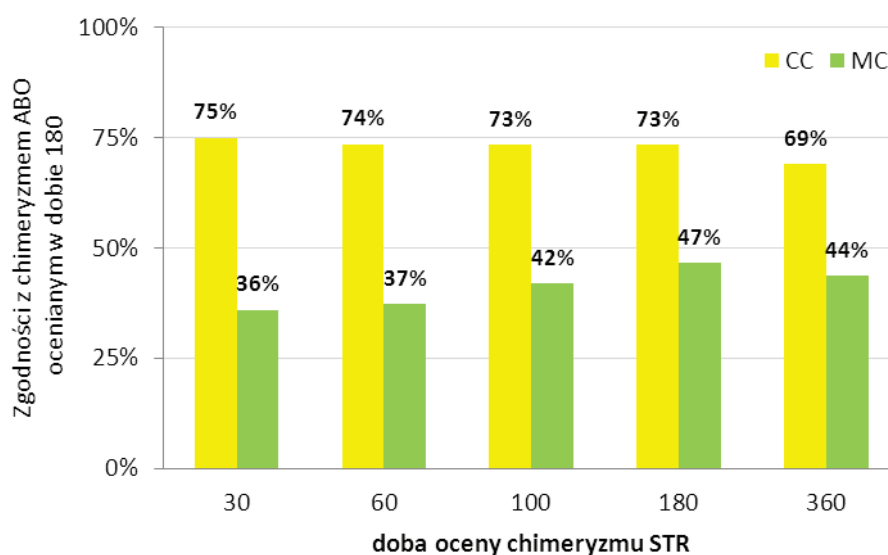
W przypadku niezgodności dużej obserwuje się przetrwanie izoaglutynin (P) lub ich zanik (Z). W przypadku niezgodności małej występuje zanik przeciwciał, bez (PP-) lub z (PP+) ponownym pojawieniem się przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom na eliminowanych krwinkach biorcy. Największą ilość wznów odnotowano w grupie niezgodności dużej przy zaobserwowanym zaniku miana przeciwciał.

Tabela 50 Zestawienie rozkładów występowania postaci chimeryzmu w zależności od występowania wznowy choroby oraz charakteru zmiany miana przeciwciał

Table 50 Chimerism type occurrence division summary, depending on relapse occurrence and antigen value change characteristics

Charakter zmiany miana przeciwciał	Bez wznowy Chimeryzm			Wznowa Chimeryzm			Razem
	AR	CC	MC	AR	CC	MC	
P	1	1	1			1	4
Z	1	18	7		2	5	33
PP-		4	15				19
PP+		2					2
Suma końcowa	2	25	23	0	2	6	58

4.3. Korelacja pomiędzy chimeryzmem erytropoetycznym a chimeryzmem STR



Rycina 48 Zgodność oceny chimeryzmu erytropoetycznego ocenianego w dobie 180 z kolejnymi ocenami występowania postaci chimeryzmu STR

Figure 48 Correspondence between assessment of erythropoietic chimerism in day 180 with further assessments of STR chimerism occurrence

W celu oceny, czy wyniki oznaczeń chimeryzmu STR i echimeryzmu są ze sobą skorelowane porównano obserwacje dokonane w okresie pierwszego roku po transplantacji. W przypadku całkowitego chimeryzmu stwierdzono zgodność (CC zarówno w metodzie STR, jak i w badaniu grup krwi) w około 70% oznaczeń (od 75% w dobie 30. do 69% w dobie 360). W przypadku MC zbieżność ta wahała się w granicach 36 – 44%, wykazując narastanie w kolejnych dobach. Nie stwierdzono korelacji między obu parametrami. Osiąganie całkowitego echimeryzmu przebiegało niezależnie od chimeryzmu DNA.

5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Zgodnie z założonymi wstępnie celami badań, ich oś koncentrowała się wokół problemu potransplantacyjnej wznowy choroby. Postrzegając go jako jedną z najważniejszych przyczyn niepowodzenia transplantacji podjęto próbę wykorzystania dobrze opisanego narzędzia diagnostycznego do przeprowadzenia badań nad oceną ryzyka wznowy, ale także nad zastosowaniem oceny chimeryzmu, jako podstawy do działań profilaktycznych. Badania nad chimeryzmem hematopoetycznym rozpoczęto bowiem w naszym ośrodku już w drugiej połowie lat dziewięćdziesiątych [68, 108]. Podjęte badania miały przede wszystkim na celu wykazanie, że ocena chimeryzmu jest użytecznym narzędziem w zidentyfikowaniu grupy chorych szczególnie zagrożonych wznową. Dla grupy tej, modyfikacja profilaktyki immunosupresyjnej była podjęciem środków zmierzających w efekcie odległym, zapobieganiu wznowie choroby, przy zminimalizowaniu ryzyka rozwoju choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi. Z drugiej strony stała się konieczną odpowiedzią na pytanie, czy podjęte działania w postaci modyfikacji profilaktyki immunosupresyjnej nie wpłyną na zwiększenie odsetka powikłań ze strony układu immunologicznego. Wybór metod badawczych oraz podejmowanych środków profilaktycznych był limitowany możliwościami finansowymi. O ile bowiem sama procedura transplantacyjna do 30 doby po przeszczepieniu jest finansowana odrębnie, to długoterminowa opieka potransplantacyjna i jej specyfika pozostaje do chwili obecnej nieoszacowana, a co za tym idzie niedoszacowana. Dobór grupy badanej był z oczywistych względów losowy.

Ponieważ skład grupy analizowanej i badanej nie był wynikiem celowego doboru lub randomizacji, a konsekwencją planowej działalności transplantacyjnej ośrodka już sama analiza danych populacyjnych przynosiła szereg informacji i wymagała opracowania. Trzeba w tym miejscu podkreślić, że zasadniczym problemem dotyczącym badania wznowy poprzyszczepowej jest konieczność długotrwałej, systematycznej obserwacji [92]. Jak wykazano, większość wznów występuje w okresie pierwszych 2 lat po transplantacji, szczególnie u chorych z ostrymi białaczkami. Jednak szczegółowa analiza wykazuje, że także w tej grupie chorych wznowy mogą występować w okresie późniejszym. Najdłuższy zanotowany w analizowanej grupie chorych czas do wznowy ostrej białaczki wynosił 1222 dni. W grupie pacjentów z przewlekłymi nowotworami mieloproliferacyjnymi wznowy późne są zjawiskiem dominującym. Badania muszą więc być planowane i obliczane na wiele lat, co wymaga wnikliwej kontroli dużej populacji chorych. Przyjęty protokół badawczy, będący jednocześnie standardową procedurą operacyjną, zakładał pozostawianie wszystkich chorych pod opieką Poradni Transplantacyjnej w naszym ośrodku przez cały okres obserwacji, co w praktyce oznaczało przejście nadzoru nad całością opieki medycznej. Liczba doniesień w literaturze dotyczących tego typu obserwacji jest ograniczona [100, 109, 110], a publikacje opisujące duże, jednorodne grupy pacjentów ukazują się w ostatnich latach [111–113]. Większość doniesień dotyczy okresu 2-3 lat po transplantacji [114]. Analizy przeprowadzane na dużych grupach pacjentów często dotyczą populacji chorych przekazywanych pod opiekę ośrodków macierzystych i jedynie referowanych do ośrodka transplantacyjnego [110]. Tworząc protokół badawczy opieki potransplantacyjnej założono także, że nie będzie on różnicowany w zależności od schorzenia podstawowego, ponieważ wcześniejsze obowiązujące w ośrodku postępowanie również nie podlegało zmianom uzależnionym od schorzenia będącego wskazaniem do transplantacji. Wyjątek stanowili pacjenci poddani przeszczep-

pieniu w niepełnej lub przy braku remisji choroby. Przypadki te wykluczono z analiz. Ubiegła dekada przyniosła ponadto radykalną zmianę we wskazaniach do transplantacji. Od 2005 roku znacznie spadła ilość przeszczepień w przewlekłej białaczce szpikowej, co dodatkowo zróżnicowało objętą analizą populację. Ostatecznie wśród przeszczepień dokonanych w naszym ośrodku dominowały ostre białaczki [39]. Dopiero drugą pod względem liczebności grupę stanowili chorzy z CML, u których dokonywano przeszczepień głównie w pierwszym pięcioleciu ubiegłej dekady i wcześniej [29].

Planując podsumowanie badań założono wykonywanie około 25-30 przeszczepień alogenicznych w ciągu roku, co stanowiło maksymalne wykorzystanie istniejącego oddziału przeszczepowego i do roku 2006 utrzymywano działalność przeszczepową na takim poziomie, włączając do badania wszystkich pacjentów poddanych transplantacji. W roku 2007 narastająca ilość ciężkich powikłań infekcyjnych (głównie grzybiczych) zmusiła do podjęcia decyzji o wstrzymaniu działalności i przeprowadzeniu kapitalnego remontu urządzeń klimatyzacyjnych. W kolejnych dwóch latach, stopniowo (z powodu konieczności kontroli) powracano do wcześniejszej aktywności i kontynuowano realizację protokołu. W sposób losowy wpłynęło to na populację badaną. Od 2010 roku, z przyczyn proceduralnych, wstrzymano w naszym ośrodku oznaczenia chimeryzmu. Dla uzyskania jednolitej grupy porównawczej zdecydowano o powrocie do wcześniej stosowanej zasady odstawienia profilaktyki immunosupresyjnej od doby setnej.

Ze względu na spadający z przyczyn demograficznych odsetek chorych posiadających dawcę rodzinnego, od 2001 roku rozpoczęto w ośrodku przeszczepianie komórek krwiotwórczych od dawców niespokrewnionych [115]. Podobnie jak w całej Europie [1], liczba tego typu przeszczepień wzrastała w kolejnych latach, aby w 2011 roku przekroczyć ilość transplantacji od dawców rodzinnych. Rodzaj przeszczepienia nie wpływał na przyjęty protokół opieki potransplantacyjnej. Kolejną cechą różnicującą badanych chorych był użyty materiał przeszczepowy. Dominującym materiałem był przeszczep komórek progenitorowych pobranych z krwi obwodowej.

Prawdopodobieństwo długotrwałego (10-letniego) przeżycia na podstawie krzywej Kaplana - Meyera dla analizowanej populacji pacjentów poddanych transplantacji, niezależnie od schorzenia i rodzaju przeszczepu wynosiło 51,7%. Porównanie ogólnego przeżycia biorców poddanych transplantacji od dawców rodzinnych i niespokrewnionych nie wykazało istotnej różnicy. Analiza materiału pod względem występowania wznów potwierdziła istotność kliniczną tego problemu. Prawdopodobieństwo 10-letniego przeżycia dla analizowanej populacji wolnej od choroby wzrastała bowiem do 61%. W grupie poddanych badaniu pacjentów, dla której średni czas obserwacji wynosił ponad 8 lat (zakres 4-5737 dni) do wznowy choroby doszło u 25% chorych. W zależności od wskazania dominowały wznowy wczesne – w ostrych białaczkach lub późne – w przewlekłych nowotworach mieloproliferacyjnych (głównie przewlekłej białaczce szpikowej). Krzywe przeżycia pacjentów, u których doszło do wznowy i pacjentów wolnych od choroby radykalnie się różnią. Prawdopodobieństwo 3-letniego i 10-letniego przeżycia dla populacji wolnej od choroby wynosi odpowiednio 64% i 61%, dla pacjentów ze wznową choroby 27% i 17%.

Przeprowadzenie analiz porównawczych w obrębie zebranego materiału obserwacyjnego wymagało ujednoczenia grupy. Założono, że do analizy zostaną włączeni jedynie chorzy poddani przeszczepieniu z kondycjonowaniem mieloablacyjnym z powodu rutynowych wskazań do transplantacji. Spowodowało to wykluczenie z dalszych ocen

80 pacjentów. Do grupy analizowanej włączono chorych, u których dokonano przeszczepienia przed wprowadzeniem protokołu opieki potransplantacyjnej. Była to bowiem grupa, której wyniki analizy chimeryzmu metodami molekularnymi stały się jedną z podstaw protokołu. Wykluczono natomiast pacjentów, u których dokonano przeszczepienia w pierwszych latach działalności ośrodka, uznając je za lata zdobywania doświadczenia transplantacyjnego. W kolejnych latach odsetek przeszczepień wykluczonych z analiz nie przekroczył 30%. Wyjątek stanowią lata 2007-2009. Jak wspomniano wyżej, były to lata wygaszenia i wznowienia działalności, co wiązało się z wykonywaniem, w pierwszym okresie powrotu aktywności, przede wszystkim procedur ratunkowych. Grupa nie różniła się od całej populacji pod względem wskazań do transplantacji (poza przewlekłymi schorzeniami limfoproliferacyjnymi, gdzie stosowano głównie kondycjonowanie niemieloablacyjne i większość chorych została wykluczona z analiz), rodzaju przeszczepu, średniego wieku biorców i ich płci, a także różnic płci dawcy i biorcy. Prawdopodobieństwo 10-letniego przeżycia dla chorych z PNM przekraczało 60%, natomiast dla pozostałych grup schorzeń wynosiło między 40 a 50%. Różnica ta może wynikać m.in. ze skutecznego leczenia wznowy poprzyszczepowej CML z zastosowaniem inhibitorów kinazy tyrozynowej. Wykazane ogólne przeżycie pozostaje w całkowitej zbieżności z danymi literaturowymi [30].

Grupa poddana analizie z przytoczonych powyżej względów nie była w całości monitorowana w zakresie oceny chimeryzmu. Przed rokiem 2004 badania te były wykonywane okresowo, podobnie jak po roku 2009. Nie oznaczało to jednak selektywności oznaczeń. W latach pełnego prowadzenia prac badawczych wszyscy poddani przeszczepieniu chorzy byli monitorowani z zastosowaniem obu metod oceny chimeryzmu i wszyscy byli włączani do procedury badawczej.

Ze względu na etapową i wielokierunkową analizę zebranego materiału do badania poszczególnych zagadnień wykorzystywano wybrane z grupy poddanej analizie populacje. W pierwszej kolejności zbadano wpływ MC na rozwój powikłań potransplantacyjnych – w szczególności na występowanie GvHD i wznowy choroby. Ta część analiz obejmowała wszystkich pacjentów, u których monitorowano chimeryzm. Drugi etap analiz zogniskował się na wpływie modyfikacji immunosupresji na dalszy przebieg potransplantacyjny. Do tej części analiz w celach porównawczych włączono także grupę chorych, u których profilaktyka immunosupresyjna była redukowana po osiągnięciu doby setnej po transplantacji, niezależnie statusu chimeryzmu (i niezależnie od tego, czy był on oznaczony) oraz grupę chorych z objawami ostrej GvHD, leczonych zgodnie z protokołem transplantacyjnym, którzy z oczywistych względów nie mogli być brani pod uwagę w kwalifikacji do modyfikacji immunosupresji. Sprawdzając warunki porównywalności grup przeanalizowano krzywe przeżycia dla grupy ze standardową profilaktyką i grupy poddanej badaniu. Stwierdzono istotną różnicę w prawdopodobieństwie przeżycia grup badanych (z modyfikacją immunosupresji) i grup porównawczych (leczoną z powodu GvHD i ze standardową profilaktyką). Różnica między grupą leczoną (L) a pozostałymi wydawała się uzasadniona brakiem skuteczności leczenia GvHD. Niższe prawdopodobieństwo przeżycia w grupie ze standardową immunosupresją stało się przedmiotem dalszych dociekań. Podstawę do wyjaśnienia zjawiska dawała analiza obrazująca prawdopodobieństwo przeżycia chorych, u których wykonano oznaczenie chimeryzmu w dobie 60. po transplantacji (punkcie decyzyjnym modyfikacji), a więc eliminująca wczesne (przed dobą 60.) zgony. Krzywe przeżycia pacjentów przeżywających 60 dni po transplantacji i krzywe przeżycia podgrup badawczych nie różniły się.

Stanowiło to również potwierdzenie braku intencyjnej selekcji chorych podczas kwalifikacji do badania. W trzecim etapie analizy chimeryzmu STR, podjęto badanie dynamiki chimeryzmu i wpływu tego zjawiska na przebieg potransplantacyjny. Ta część analiz obejmowała jedynie populację pacjentów, u których dysponowano kolejnymi oznaczeniami chimeryzmu, co najmniej do doby 180. Wyniki te odniesiono w głównej mierze do problemu wznowy.

Wybór metody oceny chimeryzmu w oparciu o którą podejmowano decyzje terapeutyczne podyktowany był kilkoma względami. Pierwszym była możliwość oznaczenia chimeryzmu we wczesnym okresie potransplantacyjnym, drugim możliwość objęcia badaniami wszystkich poddanych przeszczepieniu pacjentów, trzecim – ilościowy (półilościowy) charakter wyników. Warunek pierwszy spełniały zasadniczo wszystkie trzy metody dostępne w naszym ośrodku – analiza molekularna – badanie STR, badanie antygenów krwinek czerwonych oraz badanie metodą FISH. Ostatnie dwie metody nie spełniały jednak warunku drugiego. Oparta o badanie chromosomu Y metoda genetyczna pozwalała na ocenę chimeryzmu jedynie u biorców, których dawcy różnili się płcią [116, 117]. W naszym materiale warunek ten spełniało jedynie 42% pacjentów. Drugiego ze wspomnianych kryteriów nie spełniało także oznaczanie antygenów krwinek czerwonych. Wprowadzenie we współpracę z Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Gdańsku w ubiegłym dziesięcioleciu do rutynowych badań przedprzeszczepowych, a następnie do protokołu opieki potransplantacyjnej oznaczeń antygenów grupowych krwi rozszerzonych poza układ ABO znacznie zwiększyło populację (do 83%), u której możliwe było monitorowanie chimeryzmu erytropoetycznego. Pozostawało jednak 17% populacji, w której zgodność dawcy i biorcy w zakresie antygenów grupowych krwi była całkowita. Ponadto, ze względu na fizjologiczny czas przeżycia erytrocytów istniała obawa, że większość pacjentów będzie prezentowała w dobie 60. mieszany chimeryzm. Badanie echimeryzmu nie spełniało również warunku ilościowych wyników. Wszystkie założone warunki spełniała jedynie metoda oceny STR. Metoda ta stwarzała również możliwość oceny półilościowej, co pozwalało na określenie dynamiki chimeryzmu. Wybór ten był zgodny z zaleceniami wydanymi w 2001 roku po wspólnym spotkaniu roboczym ABMTR i IBMTR (*International Bone Marrow Transplant Registry*), które uznało oznaczenia STR (VNTR) za złoty standard w monitorowaniu chimeryzmu poprzyszczepowego [118]. Ze względu na uzupełnianie się badań (pełna ocena hematopoezy) i potrzebę określenia znaczenia chimeryzmu erytropoetycznego w opiece potransplantacyjnej, szczególnie oznaczanego w sposób rozszerzony, kontynuowano w ramach protokołu badawczego oznaczanie antygenów grupowych krwi.

Decyzje terapeutyczne w grupie badanych pacjentów były podejmowane w oparciu o stwierdzony całkowity lub mieszany chimeryzm STR w dobie 60 po transplantacji. Sposób oceny chimeryzmu był jednolity dla całej grupy, wykonywany w ciągu całego badania w jednym ośrodku. Porównanie wyników badania chimeryzmu STR we krwi obwodowej i szpiku wykazało pełną korelację obu oznaczeń zarówno we wczesnym, jak i późnym okresie potransplantacyjnym. Wyniki te są zgodne z innymi opublikowanymi danymi [118]. Nie wykazano przewagi któregośkolwiek materiału. Z nieprezentowanych wyników własnych wynika, że w przypadku postępującego procesu wznowy choroby, w okresie bezpośrednio ją poprzedzającym, zmiany statusu chimeryzmu wcześniej można odnotować w szpiku, niż we krwi obwodowej. Obserwacje to mają jednak charakter jednostkowy. Do monitorowania chimeryzmu, szczególnie przy dużej częstotliwości badań, analizy oparte o badanie krwi obwodowej są wystarczające.

Wprowadzenie badań molekularnych [55–57] do oceny chimeryzmu wykazało, że wbrew wcześniejszym wynikom badań, najczęściej z zastosowaniem innych metod, odsetek pacjentów, u których obserwuje się długotrwałe utrzymywanie się własnej hematopoezy w koegzystencji z hematopoezą dawcy (MC) jest większy niż pierwotnie przypuszczano, co wynika z większej czułości metod opartych o analizę DNA [119]. W badaniach własnych wykazano, że w dobie sześćdziesiątej po przeszczepieniu ponad połowa pacjentów prezentuje MC, w dobie 100. odsetek ten wynosi 45%. W pół roku po transplantacji u jednej trzeciej pacjentów nadal stwierdza się w badaniu STR własne DNA biorcy. Wszyscy badani pacjenci poddani byli kondycjonowaniu mieloablacyjnemu. Nie można więc zgodzić się z poglądem, że badanie chimeryzmu w tego typu przeszczepieniach nie jest zasadne [118]. Szczególnie, jeśli uzasadnieniem takiego poglądu jest stwierdzenie, że przeszczepienia mieloablacyjne prowadzą do wczesnego całkowitego chimeryzmu. Badacze opierający analizy o techniki molekularne (VNTR, STR) uzyskali wyniki podobne do zaprezentowanych [120]. Mimo ukazania się do chwili obecnej wielu raportów dotyczących roli mieszanego chimeryzmu i jego znaczenia (lub braku znaczenia) dla występowania powikłań, czasu przeżycia i występowania wznowy kwestie te nie mają dotychczas jednoznacznego rozstrzygnięcia. Zautomatyzowane, fluorescencyjne metody oceny STR, które pozwoliły na seryjne wykonywanie oznaczeń zostały wprowadzone do praktyki klinicznej pod koniec lat 90-tych [54]. Od tego czasu datują się podsumowania obejmujące coraz większe grupy pacjentów i coraz dłuższy czas obserwacji, co pozwala na prawidłowe wnioskowanie o wznowach i wpływie chimeryzmu poprzyszczepowego na ogólne przeżycie. Ponadto pierwszy okres stosowania tych metod był okresem standaryzacji i porównań, stąd analizy oparte o techniki VNTR/STR, których wartość jest niepodważalna datowane są po roku 2000. Według uzyskanych wyników badań własnych obecność mieszanego chimeryzmu w kolejnych, punktowych dobach badania ściśle korelowała z częstością występowania wznów choroby. Wyniki te pozostają w sprzeczności z uzyskanymi przez Mossalam i wsp. [110]. Oceniając retrospektywnie grupę ponad 1000 pacjentów poddanych transplantacji z kondycjonowaniem mieloablacyjnym, podobnie zróżnicowaną pod względem wskazań do transplantacji, rodzaju przeszczepu i typu dawcy jak w prezentowanym badaniu nie stwierdzili korelacji między występowaniem mieszanego chimeryzmu a wznową choroby i długością przeżycia. Częstość występowania wznów odniesiono do pojedynczego oznaczenia chimeryzmu wykonanego między 2 a 6 miesiącem po transplantacji, przed przekazaniem pacjenta pod opiekę lekarza referującego. W różnych okresach czasu stosowano różne metody do oceny chimeryzmu (FISH, VNTR, STR). W pierwszych latach analizowanego okresu badano wyłącznie szpik, od 2004 roku wyłącznie krew. Ponadto autorzy zaznaczają w opisie, że część obserwacji została odcięta na podstawie daty ostatniego kontaktu, bez informacji o wznowie choroby lub śmierci. Mimo faktu, że analizowano grupę ponad tysiąca pacjentów powyższe zastrzeżenia ograniczają wartość tego badania. Druga praca pozostająca w sprzeczności z zaprezentowanymi wynikami pochodzi z tego samego ośrodka (Seattle) i dotyczy grupy 89 pacjentów z ALL badanych w tym samym schemacie [121]. Podobne do Mossalam i wsp. wyniki uzyskał także Choi [114], badając grupę 30 pacjentów z ostrymi białaczkami. W badaniu tym wykonywano oznaczenia w miesięcznych odstępach czasu metodami molekularnymi. Nie znaleziono korelacji między oznaczeniami w kolejnych dobach w częstością wznów. Należy jednak podkreślić, że średni czas obserwacji w badaniu wynosił 10 miesięcy, a najdłuższy 22 miesiące. Nawet biorąc pod uwagę, że w prezentowanej przez nas grupie

wczesne wznovy (do roku po transplantacji) dominowały u chorych z ostrymi białaczkami, to czas obserwacji w tym badaniu ogranicza wartość wnioskowania. Obserwacje zbieżne z naszymi opublikowali natomiast Barrios i wsp. [100] na podstawie badania grupy 133 pacjentów z ostrymi białaczkami. Średni czas obserwacji w tym badaniu wynosił 44,8 miesiące, co czyni bardziej wiarygodnym ocenę występowania wznovy choroby. Lamba i wsp. [99] opisali korelację między mieszanym chimeryzmem w dobie dziewięćdziesiątej po transplantacji a częstością wznów, badając 80 pacjentów o podobnie zróżnicowanych rozpoznaniach, jak w naszej grupie, przy medianie czasu obserwacji wynoszącym 24 miesiące. Populacja pacjentów z ostrą białaczką szpikową poddanych przeszczepieniu z częściową deplecją limfocytów T (96 chorych) była badana przez Huisman i wsp. [111]. Oznaczeń dokonywano odrębnie w limfocytach T i pozostałych komórkach. Stwierdzono, że utrzymywanie się stabilnego i wzrastającego MC jest silnie skorelowane z wystąpieniem wznovy. Korelacja nie zależała od badanej subpopulacji komórkowej. Wyniki badania Huisman są całkowicie zbieżne z naszymi analizami przeprowadzonymi na populacji zróżnicowanej co do rozpoznań. Wiele doniesień potwierdzających związek mieszanego chimeryzmu i zwiększonego ryzyka wznovy pochodzi z ośrodków pediatrycznych [122–126]. Część badaczy sugeruje jednak różnicę w mechanizmach immunologicznych wznovy u dzieci i dorosłych [127].

Innym czynnikiem mogącym wpływać na korelację między MC a wznową choroby wykazaną w naszym badaniu jest stosunkowo duża grupa chorych z CML włączona do analizy. CML jest typowym przykładem schorzenia w którym efekt transplantacyjny GvL odgrywa istotną rolę [28], potwierdzony wysoką skutecznością DLI w przypadku wznovy [128, 129]. Mieszany chimeryzm może wpływać na rozwój tolerancji immunologicznej, a tym samym redukować efekt GvL [130]. Hipotezę tę potwierdzają badania Badera i wsp. [131]. Wykazali oni, że we wczesnym okresie po transplantacji mieszany chimeryzm jest spowodowany głównie obecnością prawidłowej hematopoezy biorcy. Daje to przesłankę do wnioskania o aloreaktywności lub indukcji tolerancji przeszczepu i wzmacnia hipotezę, że mieszany chimeryzm redukuje efekt GvL, a tym samym jest niezależnym czynnikiem prognostycznym wznovy. Odnotowując powyższe trzeba jednak zauważyć, że grupa pacjentów z PNM (głównie z CML) nie była najliczniejszą w naszym badaniu grupą, a częstość wznów nie przekraczała odnotowanej w grupie ostrych białaczek. Zdecydowanie więcej doniesień dotyczy analiz chimeryzmu i jego korelacji z powikłaniami immunologicznymi i wznową (progresją) choroby w przeszczepieniach niemieloablacyjnych i o zredukowanej toksyczności [98, 132–136]. W wyniku zastosowanego kondycjonowania dochodzi tam do ograniczonej eliminacji hematopoezy biorcy, a efekt terapeutyczny jest zależny od uzyskanej reakcji GvL. W przeszczepieniach tego typu, mieszany chimeryzm we wczesnym okresie po transplantacji jest zjawiskiem typowym i zwykle dłużej utrzymującym się, niż w przeszczepieniach mieloablacyjnych. Monitorowanie jego dynamiki jest warunkiem podejmowania działań indukujących efekt GvL. Mickelson i wsp. [98], nie stwierdzili jednak istotnych korelacji między różnymi typami kondycjonowania (mielo- i niemieloablacyjnym) a tempem osiągnięcia CC i występowaniem powikłań. Przyjęte przez nich kryterium podziału między grupą CC, a MC (powyżej i poniżej 90% DNA dawcy) wydaje się jednak zbyt mało precyzyjne, przy ogólnie przyjętym określeniu czułości metody STR metody na 1-5%. Wyciąganie wniosków na podstawie uwspólniania obserwacji dotyczących transplantacji mieloablacyjnych i o zredukowanej toksyczności nie jest wystarczająco uzasadnione.

Wychodząc z tego założenia z analizowanej przez nas grupy wykluczaliśmy pacjentów, u których zastosowano kondycjonowanie niemieloablacyjne.

Innym aspektem badawczym była częstość występowania ostrej i przewlekłej postaci GvHD w zależności od stwierdzonego statusu chimeryzmu. W całej grupie badawczej odnotowano jedynie trend, bez istotności statystycznej do większej częstości występowania przewlekłej, rozległej (umiarkowanej i ciężkiej) GvHD u pacjentów z wczesnym, uzyskanym już w 30 dobie CC. Tym samym nie potwierdzono wstępnych wyników badań opublikowanych w 2005 roku [108], które na znacznie mniejszej grupie analizowanych pacjentów wykazały zależność statystyczną. Trzeba jednak podkreślić, że przygotowując materiał do obecnej analizy zaktualizowano wcześniejsze obserwacje. W przypadku cGvHD oznaczało to również weryfikację dotyczącą ostatecznego rozpoznania postaci umiarkowanej i ciężkiej zgodnie z kryteriami przyjętymi w 2005 roku [44]. W aktualnej analizie uwzględniono jedynie postać cGvHD wymagającą przewlekłego (co najmniej trzymiesięcznego), systemowego leczenia immunosupresyjnego. Odpowiadało to postaci umiarkowanej i ciężkiej według nowej klasyfikacji i w podjętej analizie było uznane za jedną z przyczyn niepowodzeń. Obserwacja ta wskazuje również na konieczność formułowania wniosków dotyczących przewlekłego GvHD na podstawie długoterminowych obserwacji. Średni czas obserwacji w poprzednio opublikowanych badaniach wynosił 2 lata. Inni badacze stwierdzili korelację między CC określonym w subpopulacji limfocytów T (CD3) w dobie 30, a częstością występowania cGvHD [98]. Badania opublikowane przez Rupa-Matyssek i wsp. [137] obejmują podobny do poprzednio uwzględnionego przez nas okres obserwacji, co może świadczyć o bardziej informatywnym, co do GvHD, charakterze chimeryzmu oznaczanego w subpopulacjach limfocytów. Sugerują to również inne doniesienia [132, 138–140]. Należy jednak podkreślić, że badanie subpopulacji czyni oznaczenia chimeryzmu znacznie bardziej czasochłonnymi i kosztochłonnymi. Badanie może być przeprowadzane jedynie w laboratoriach wyposażonych w wysokiej klasy sortery. Z tego powodu wydaje się, że tego typu analiz nie można uznać za rutynowe, do zastosowania w praktyce klinicznej. Ponadto badania Svenber i wsp. [141] dotyczące pacjentów poddanych przeszczepieniu z powodu schorzeń nieonkologicznych i obejmujące znacznie dłuższy czas obserwacji odnotowujące związek między cGvHD, a wczesnym CC, nie potwierdzają istotnych różnic w chimeryzmie ocenianym w populacjach i w krwi niefrakcjonowanej, poza kilkoma przypadkami anemii Fanconiego. Podobne wyniki uzyskano w badaniu Huisman i wsp. [111].

Ani mieszany, ani całkowity chimeryzm osiągniany w kolejnych badaniach od doby 30. do setnej nie stanowił czynnika prognostycznego dla występowania ostrej GvHD. Nie wykonywano jednak oznaczeń przed upływem miesiąca po transplantacji. Jaksch i wsp. [138] sugerują wartość prognostyczną mieszanego chimeryzmu w badaniu pomiędzy dobą 7. a 10. po przeszczepieniu dla późniejszego występowania aGvHD.

Nie stwierdzono zależności między występowaniem mieszanego chimeryzmu do doby 180, a występowaniem zgonów w dalszej obserwacji. Zależność taka pojawia się dopiero między MC stwierdzonym w 18 miesięcy i 2 lata po przeszczepieniu. Nie znaleziono w literaturze podobnych obserwacji. Mogą one wynikać z faktu, że średni czas do wznowy w analizowanej populacji wynosił 553 dni. Mieszany chimeryzm w tak późnym okresie potransplantacyjnym jest zapewne wynikiem utraty kontroli immunologicznej i większego zagrożenia wznową choroby.

Kluczowym zagadnieniem brany pod uwagę przy konstrukcji protokołu badawczego w opiece potransplantacyjnej była modyfikacja profilaktyki immunosupresyjnej, akceptowalna z punktu widzenia zalecanych przez EBMT standardów. Jedynym dostępnym lekiem do stosowania w profilaktyce po przeszczepieniu szpiku była w Polsce cyklosporyna. Kwestia czasu i tempa redukcji dawek tego leku stosowanego w profilaktyce nie była w piśmiennictwie dostatecznie sprecyzowana i znacznie różniła się między ośrodkami zrzeszonymi w EBMT, co obrazuje badanie ankietowe Ruutu [45]. Doniesienia porównujące wpływ czasu profilaktyki na częstość występowania GvHD także nie były jednoznaczne [45, 142, 143] i pozostają takie nadal [144, 145]. Prezentują one skrajnie odmienne wyniki badań. Od korzyści wynikających z wydłużenia profilaktyki, do negatywnego wpływu przedłużonego stosowania immunosupresji. Badania porównawcze grup z różnym czasem trwania profilaktyki były oparte o arbitralne decyzje randomizacyjne, a nie przesłanki oceny ryzyka powikłań immunologicznych lub wznowy. Problem ten nie znalazł rozwiązania do chwili obecnej, co wykazał Pidala i wsp. [46] przeprowadzając w 2011 badania ankietowe wśród lekarzy ośrodków transplantacyjnych, członków amerykańskiego Towarzystwa Przeszczepiania Krwi i Szpiku (*ABMTR - American Society for Blood and Marrow Transplantation*). Na ankietę odpowiedziało 1100 transplantologów. Jednym z pytań był czas rozpoczęcia odstawiania profilaktyki immunosupresyjnej u zaprezentowanego w ankiecie hipotetycznego chorego poddanego przeszczepieniu. Badani wskazali aż 9 zakresów czasowych rozpoczęcia redukcji dawki cyklosporyny: od poniżej 50 dni po transplantacji do powyżej 350 dni. Największa grupa wskazała okres między setną a 149 dobą. Najwcześniej, bo przed upływem dwóch miesięcy chętniej rozpoczynali redukcję dawek pediatrzy, kolejny interwał czasowy wskazywali nieliczni lekarze opierający swoją decyzję o ocenę ryzyka wznowy choroby.

Poszukując uwarunkowań i podstaw dla decyzji o czasie trwania profilaktyki immunosupresyjnej zwrócono uwagę na doniesienia dotyczące badań chimeryzmu, a w szczególności roli mieszanego chimeryzmu w prognozowaniu wznowy i innych powikłań oraz zastosowania adoptywnej immunosupresji w przypadku mieszanego chimeryzmu. [105, 106, 114, 123, 124, 146]. W tym czasie podsumowano wstępną część badań nad chimeryzmem przeprowadzonych w naszym ośrodku od 1999 roku, które wykazały, że wczesne występowanie (w dobie 30 lub 60 po transplantacji) całkowitego chimeryzmu hematopoetycznego wiąże się z większym ryzykiem wystąpienia cGvHD [147]. Jednocześnie, założono w oparciu o dane z literatury [148–150] oraz niepublikowane obserwacje własne, że mieszany chimeryzm, szczególnie narastający może być czynnikiem prognostycznym dla potencjalnej wznowy choroby. W oparciu o powyższe przesłanki zaproponowano w protokole uzależnienie długości profilaktyki i czasu rozpoczęcia odstawienia cyklosporyny od wyniku badania chimeryzmu w dobie 60 po transplantacji, a więc w okresie, kiedy spada ryzyko wystąpienia aGvHD [34]. We własnych obserwacjach aGvHD występowało po 60 dobie u 11 z 92 pacjentów (11%), u których to powikłanie zaobserwowano. Zamierzona w badaniu interwencja w profilaktykę immunosupresyjną nie obejmowała działań niestandardowych. Oznaczała jedynie wcześniejsze, ale nadal stopniowe odstawianie cyklosporyny. Wyniki analizy nie wykazały istotnego zmniejszenia odsetka wznów w grupie badanych z MC i wcześniejszym, ale powolnym odstawianiem cyklosporyny. Należy jednak zauważyć, że odsetek wznów w tej grupie nie przewyższył odsetka wznów u pacjentów z CC, czego można by oczekiwać, gdyby modyfikacja nie miała żadnego wpływu. Ponadto w grupie 1_MC

wykazano większy odsetek zmian statusu chimeryzmu z następczą redukcją odsetka własnego DNA. Może to świadczyć o konieczności radykalizacji działań w celu uzyskania szybszej konwersji chimeryzmu. W 1999 roku Bader i wsp. [146] opublikowali pierwszy raport wykazujący korzyść w postaci zmniejszenia odsetka wznów choroby po transplantacji w wyniku podejmowanej interwencji opartej o badanie chimeryzmu. Interwencja polegała na odstawieniu immunosupresji u chorych z MC, z następczym podaniem DLI w przypadku wzrostowej tendencji MC. W kolejnych latach badania takie podejmowano w wielu ośrodkach, głównie pediatrycznych [124, 151–153], ale także u dorosłych u wybranych grup pacjentów [154, 155]. W każdym przypadku interwencji te polegały na radykalnym zmniejszeniu immunosupresji lub zwiększeniu efektu GvL przez podanie DLI. W najmniej radykalnym badaniu Horn i wsp. [152] immunosupresję (dawkę leku) zmniejszono o 50% w przypadku wzrostowej tendencji MC. W naszym badaniu redukcja ta wynosiła 25% dawki CsA w przypadku stwierdzenia MC w 60. dobie po transplantacji. Większość badań wykazała korzyści płynące z takiego postępowania. W dwóch badaniach przeprowadzonych u dorosłych chorych modyfikacja również polegała na profilaktycznym podaniu DLI. W badaniu Schaap i wsp. [155] protokół taki obowiązywał po zastosowaniu przeszczepu z częściową deplecją limfocytów T w zróżnicowanej pod względem rozpoznania grupie pacjentów. Lutz i wsp. [154] badali pacjentów z ALL po tradycyjnym postępowaniu kondycjonującym, przy standardowej profilaktyce GvHD (CsA i Mtx). Wykazali, że stosując profilaktycznie DLI u pacjentów z mieszanym chimeryzmem uzyskano trwałe CC i niski odsetek wznów choroby.

Uzyskane wyniki własne wykazały również, że wcześniejsze odstawienie immunosupresji nie wiąże się ze statystycznie wyższym ryzykiem wystąpienia GvHD zarówno w postaci ostrej jak i przewlekłej, co potwierdza bezpieczeństwo takiej modyfikacji. Daje to istotne przesłanki do dalszej rekonstrukcji protokołu potransplantacyjnego. Szczególnie wobec faktu, że najnowsza edycja *The EBMT Handbook* z 2012 również nie zawiera standardu redukcji immunosupresji w przeszczepieniach mieloablacyjnych.

Badania dotyczące MC, interwencji w układ immunologiczny i występowania wznowy wprowadzały do oceny chimeryzmu nowe obserwacje świadczące o konieczności monitorowania jego dynamiki. Określenie trendu – wzrastającego lub obniżającego się odsetka własnego DNA biorcy może w sposób bardziej jednoznaczny identyfikować grupę wysokiego ryzyka wznowy. We własnym materiale prześlędzono szlaki zmiany chimeryzmu u pacjentów z kompletnymi oznaczeniami do 6 miesięcy po przeszczepieniu. Ocena przebiegu zmian wykazała, że odsetek chorych z MC zmniejsza się w kolejnych dobach obserwacji. Odnotowano także, podobnie, jak Huisman i wsp., że autologiczna odnowa hematopoezy (AR), równoznaczna ze wznową choroby, zaobserwowana u 4 pacjentów miała miejsce jedynie w szlaku utrzymującego się (i wzrostowego) mieszanego chimeryzmu. Dalsze analizy pozwoliły na stwierdzenie, że najwyższy odsetek wznów (ponad 50%) stwierdza się w grupie pacjentów ze wzrostowym mieszanym chimeryzmem pomiędzy dobą 60. a setną po przeszczepieniu. Odsetek ten jest istotnie wyższy od odsetka wznów obserwowanych w przypadku stabilnego i spadkowego mieszanego chimeryzmu. Zależności takiej nie zanotowano dla zmian między dobowymi 30. a 60. oraz między setną a 180. Okres między dobą sześćdziesiątą a setną i zachodzące w tym okresie zmiany w postaci eliminacji lub wzrostu ilości własnego DNA biorcy wydają się kluczowe dla dalszego przebiegu poprzyszczepowego, a w szczególności wystąpienia wznowy. Może mieć to związek z postępującą w tym okresie rekonstytucją immunokompetentnych komórek dawcy i ich stopniem aktywacji. Nie można wykluczyć,

że w tym okresie dochodzi do wyzwolenia efektu GvL, a tym samym eradykacji choroby resztkowej. W badaniach własnych wykazano również, że jedynie stabilny CC wiąże się z niskim ryzykiem wznowy. Grupa pacjentów ze stabilnym CC była istotnie mniej zagrożona wznową choroby, niż pozostałe dwie grupy. Wzrostowa tendencja MC między dobą 60. a 100. wiązała się również z niższym odsetkiem ostrej GvHD (choć bez istotności statystycznej), co może potwierdzać związek między procesami GvH i GvL. Wzrastający mieszany chimeryzm między dobą 30. a 60. wiązał się z istotnie wyższym odsetkiem zgonów w grupie pacjentów prezentujących ten typ dynamiki. Analiza dynamiki chimeryzmu nie wykazała wpływu zmian odsetka własnego DNA biorcy na rozwój przewlekłej GvHD w żadnym z analizowanych okresów. Analizując wyniki w grupach z modyfikacją immunosupresji stwierdzono, że podjęte działania miały istotny wpływ na szlak zmian chimeryzmu. W grupie pacjentów z MC w dobie sześćdziesiątej, u których rozpoczynano redukcję dawek CsA wcześniej, uzyskiwano zmianę statusu chimeryzmu istotnie częściej, niż w grupie z CC. Podobny okres potransplantacyjny analizowali Mossalam i wsp. [110]. Dokonywali oni pojedynczego oznaczenia chimeryzmu między 2 a 6 miesiącem po przeszczepieniu, jednak bez sprecyzowania doby badania. Nie znaleźli zależności między pojedynczym oznaczeniem chimeryzmu a częstością wznów. Grupa badana składała się z bardzo zróżnicowanej pod względem czasu od przeszczepienia (między 60. a 180. dobą) populacji, co mogło zaważyć na wyniku. Pojedyncze oznaczenie nie dawało również żadnych podstaw do analizy dynamiki chimeryzmu. Jednocześnie, w badaniu tym wykazano związek przetrwałego mieszanego chimeryzmu i niższej częstości występowania cGvHD. Nie uwzględnienie dynamiki przy stosunkowo krótkim okresie obserwacji populacji badanej mogło być także w badaniu Choi i wsp. [114] elementem maskującym rzeczywisty wpływ MC na dalszy przebieg przeszczepienia. Badanie dynamiki chimeryzmu w okresie pierwszych 6 miesięcy po transplantacji przeprowadzili Huisman i wsp. [111] znajdując korelację między stabilnym i wzrostowym MC w tym okresie a częstością wznów. Lamba i wsp. [99] wskazali dobę 90 jako kluczową w ocenie dalszego ryzyka wznowy. Badania te stanowią kontrapunkt dla tezy wysuniętej w rekomendacjach przez Antin i wsp [118]. W dziale poświęconym transplantacjom mieloablacyjnym stwierdzono tam, że przeważająca większość pacjentów osiąga wczesny całkowity chimeryzm, co warunkuje brak użyteczności klinicznej oznaczeń chimeryzmu po zastosowaniu tego typu kondycjonowania. Tezie tej przeczą zaprezentowane wyniki własne i innych grup badaczy. Wiąże się to przede wszystkim z większą czułością metody. Antin i wsp. rekomendują monitorowanie chimeryzmu w przeszczepieniach mieloablacyjnych jedynie w przypadku zmian w kondycjonowaniu lub w trybie immunosupresji. Nasz protokół spełniał więc warunki rekomendacji. Nie mniej jednak, ograniczenie badań tylko do takich sytuacji w świetle uzyskanych, własnych wyników i zaprezentowanych danych z literatury wydaje się nieuzasadnione. Ponad połowa analizowanych przez nas pacjentów była leczona tradycyjnym, niezależnym od oceny chimeryzmu protokołem. Również w tej grupie stwierdziliśmy zależność między występowaniem stabilnego MC i zmian statusu chimeryzmu na częstość występowania wznowy. Oznacza to, że monitorowanie chimeryzmu poprzyszczepowego ma uzasadnienie u wszystkich pacjentów. Niezależnie od uznania jego precyzyjnej wartości prognostycznej wyłania on grupę pacjentów, u których monitorowanie choroby resztkowej bardziej specyficznymi dla określonego schorzenia metodami lub jednoczesnym monitorowaniem kilkoma metodami [156] powinno być zdecydowanie bardziej restrykcyjne i wykonywane w mniejszych interwałach czasowych. Taka opinia pozostaje w

zgodzie z innymi podsumowaniami [53, 64, 95, 119] oraz doniesieniami dotyczącymi specyfiki chimeryzmu w określonych jednostkach chorobowych [112, 157]. Aktualizacji rekomendacji i standaryzacji metod można obecnie oczekiwać po inicjatywie określonej jako EuroChimerism [158].

Reasumując tą część wyników badań można stwierdzić, że przyjęte założenia badawcze znalazły istotne potwierdzenie w przeprowadzonej analizie. Badanie chimeryzmu, szczególnie między dobą 30. a 100. po transplantacji pozwala na wskazanie grupy szczególnie zagrożonej wznową choroby. Podjęcie próby modyfikacji immunosupresji w celu indukcji efektu GvL u pacjentów z MC w tym okresie, było uzasadnione zwiększonym ryzykiem wznowy, szczególnie wysokim przy wzrostowej dynamice mieszanego chimeryzmu. Jednocześnie nie zwiększyło ryzyka powikłań immunologicznych w postaci indukcji eGvHD. Modyfikacja profilaktyki wpływała istotnie na zmianę statusu chimeryzmu z MC na CC, co przełożyło się na porównywalny w obu grupach odsetek wznów, co było oczekiwanym efektem. Analiza pozwoliła również na wskazanie okresu między 60 a 100. dobą po przeszczepieniu jako kluczowego zarówno w zakresie monitorowania dynamiki chimeryzmu w celach prognostycznych, jak i okresu na podejmowanie działań zapobiegawczych.

Jedną z przesłanek do badań nad chimeryzmem erytropoetycznym i jego znaczeniem w opiece potransplantacyjnej była publikacja włoskiej grupy roboczej ds. transplantacji szpiku (GITMO – Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo) z 2004 roku [159]. Prezentowała ona wyniki ankiety przeprowadzonej we włoskich ośrodkach transplantacyjnych, dotyczącej zagadnień polityki transfuzyjnej i monitorowania niezgodności. Już na etapie przedtransplantacyjnym zarysowały się duże rozbieżności między protokołami ośrodków. Dotyczyły one badania grupy krwi dawcy niespokrewnionego w ośrodku transplantacyjnym, oznaczania miana izoaglutynin, ilości badanych antygenów grupowych oraz ich monitorowania po transplantacji. Poza stwierdzeniem ogromnej różnorodności zasad postępowania w ośrodkach zrzeszonych w GITMO i konieczności ujednoczenia praktyki, autorzy dokonali przeglądu piśmiennictwa nie znajdując jednolitych zaleceń. Podkreślili także różnice w ocenie niezgodności, jako czynnika ryzyka powikłań transplantacyjnych.

Geny kodujące glikoproteiny antygenów układu AB0, zlokalizowane na chromosomie szóstym (6q24), dziedziczą się niezależnie od antygenów HLA. Dawca w pełni HLA-zgodny z biorcą, może mieć różną grupę krwi w zakresie wielu antygenów grupowych. Ani niezgodność w układzie AB0, ani w innych układach nie stanowi przeciwwskazania do transplantacji komórek progenitorowych układu krwiotwórczego. Inaczej sytuacja przedstawia się w przeszczepach narządowych, gdzie niezgodność grup głównych krwi jest istotnym czynnikiem ryzyka odrzucenia przeszczepu w mechanizmie humoralnym. Nie oznacza to jednak, że niezgodności w układzie AB0 pozostają bez wpływu na przebieg transplantacji szpiku, komórek pobranych z krwi obwodowej lub pepowinowej. Wpływ ten był w ostatnim dziesięcioleciu przedmiotem badań w wielu ośrodkach. Brano pod uwagę zarówno okres przedtransplantacyjny, badając czynniki ryzyka powikłań, okres okołotransplantacyjny – z określeniem optymalnej polityki przetoczeniowej oraz okres potransplantacyjny z oceną zależności od przetoczeń, zmian miana przeciwciał i chimeryzmu erytropoetycznego. Nie było dotąd kompleksowej oceny w zakresie wielu parametrów i ich potencjalnego związku z występowaniem powi-

kłań. Drugą płaszczyzną badań na niezgodnościach była ocena ewolucji naturalnych izoaglutynin biorcy, jak i dawcy [91, 103].

W zakresie oceny chimeryzmu erytropoetycznego badania wykonano u 193 pacjentów i ich dawców, co stanowiło 80% grupy poddanej analizie. Brak oznaczeń wynikał z włączenia do grupy analizowanych 240 biorców, także chorych z lat poprzedzających wprowadzenie jednolitego protokołu badawczego. Biorąc pod uwagę niezgodności jedynie w układzie AB0 wśród 193 biorców z wykonanymi oznaczeniami brak możliwości badania chimeryzmu, uwarunkowany zgodnością w tym układzie między biorcą i dawcą, stwierdzono u 50% pacjentów. Niezgodność duża występowała u 18% par, mała i mieszana odpowiednio u 21% i 11%. Biorcy w grupach z niezgodnościami i zgodni z dawcą w układzie AB0 nie różnili się w zakresie ocenianych parametrów związanych z procedurą. Nie wykazano również różnicy w prawdopodobieństwie przeżycia między grupą biorców zgodnych i niezgodnych w układzie AB0 z dawcami. Dane w literaturze dotyczące wpływu niezgodności na długość przeżycia są niejednoznaczne – zarówno zgodne z naszymi obserwacjami [83, 101, 105, 160, 161], jak i sprzeczne [104, 106, 162].

W konstrukcji badań własnych założono monitorowanie rozszerzonego panelu antygenów erytrocytarnych celem zwiększenia możliwości monitorowania chimeryzmu oraz oznaczenie miana przeciwciał. Analizę wyników zaplanowano dwukierunkowo. Z jednej strony zamierzano ocenić wpływ wyjściowej niezgodności i jej rodzaju na proces przeszczepienia, z drugiej – zbadać czy stopień eliminacji własnej erytropoezy, a więc chimeryzm erytropoetyczny może oddziaływać na przebieg potransplantacyjny, a tym samym ustalić własne, ostateczne zalecenia protokołów – transplantacyjnego i opieki potransplantacyjnej.

Wykonując oznaczenia w panelu rozszerzonym o 6 tzw. mniejszych antygenów grupowych i antygeny układu Rh stwierdzono, że stopień zgodności grupowej między dawcą a biorcą w analizowanej populacji nie przekracza 20%, co pozwala na znacznie szersze monitorowanie eliminacji własnej erytropoezy, niż badanie wyłącznie układu AB0. Analizując ostatni układ znaleziono 57,3% par zgodnych, oznaczenie antygenów układu Rh zmniejszyło ten odsetek do 42%. Podobne wyniki uzyskali inni badacze [163, 164]. W grupie naszych pacjentów nie wykazano wpływu niezgodności na ogólne przeżycie i występowanie aGvHD i cGvHD, zarówno dla niezgodności w układzie AB0, jak i w innych układach. Odnotowano jednak istotnie krótszy (ze znamiennością statystyczną) czas do wznowy u pacjentów, u których stwierdzono pełną zgodność w zakresie wszystkich badanych układów (również Rh i pozostałych „mniejszych” antygenów). Dane dotyczące układu AB0 pozostają zgodne z wynikami dużego badania, dotyczącego ponad 1000 pacjentów, opublikowanego w 2005 roku przez Seebach i wsp. [101]. Badania mniejszych, zwykle niejednorodnych grup wskazywały na wpływ niezgodności w tym układzie na częstość wznów i przeżycie po transplantacji [106, 165], występowanie GvHD [166, 167] lub nie stwierdzały takiego wpływu [105, 160, 168]. W badaniu Yildirim i wsp. [163], wykorzystano „mniejsze” antygeny grupowe jedynie do monitorowania wszczepienia. Nie odniesiono się do wpływu niezgodności w tych układach na inne aspekty transplantacji. Dotychczas nie opublikowano innych badań nad wpływem „rozszerzonej” zgodności w antygenach grupowych krwi. Wyższy odsetek wznów w grupie pacjentów z pełną zgodnością w zakresie rozszerzonego panelu badanych grup krwi może dowodzić pośrednio braku lub nisko wyrażonej aktywności GvL, analogicznie do przeszczepień syngenicznych. Uzyskane wyniki

pozwalają na stwierdzenie, że rozszerzenie oznaczeń antygenów grupowych może być kolejną przesłanką wskazującą grupę pacjentów o wyższym ryzyku wznowy poprzyszczepowej.

Analiza chimeryzmu erytropoetycznego wykazała znacznie wyższy odsetek pacjentów w naszej grupie, którzy prezentowali obecność erytrocytów biorcy w 30. i 60. dobie po transplantacji, niż wykazali to inni badacze. Yildirim i wsp. wykazali eMC u 65% pacjentów w 30. dobie (vs 93% w badaniach własnych) i 100% pacjentów z eCC (vs 35%) w 6 miesięcy po transplantacji. Ciekawą informacją wynikającą z prześledzenia szlaków chimeryzmu erytropoetycznego było utrzymywanie się jedynie własnych erytrocytów przez pierwsze pół roku (do 14 miesiąca) po przeszczepieniu, mimo CC w badaniu metodą PCR i braku cech wznowy choroby. Fizjologiczny czas przeżycia erytrocytów warunkuje obecność krwinek czerwonych biorcy do około 3 miesięcy. Jednak u ponad 30% pacjentów erytrocyty biorcy utrzymują się ponad 6 miesięcy. Analiza tych danych pod kątem niezgodności AB0 wykazała, że największy odsetek utrzymującej się erytropoezy biorcy przypada na niezgodność małą. Wyniki te są odmienne od uzyskanych przez Lee i wsp. [169], którzy badając grupę 36 pacjentów z niezgodnością małą stwierdzili, że erytrocyty biorcy zanikają u nich porównywalnie – mediana 97 dni, zakres 8-157 dni z pacjentami z niezgodnością dużą – mediana 89 dni, zakres 25-449 dni. Jednocześnie, badając miano przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom krwinkowym biorcy wykazali, że jedynie u 5 chorych w badanej grupie z niezgodnością małą przejściowo pojawiały się izoaglutyniny skierowane przeciwko antygenom krwinkowym biorcy. Prawdopodobieństwo pojawienia się przeciwciał w pierwszym roku po transplantacji autorzy określili na 17,5%. W obserwowanej przez nas grupie pojawienie się przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom krwinkowym biorcy zanotowaliśmy jedynie u 2 spośród 21 badanych pacjentów. W obu przypadkach do pojawienia się przeciwciał doszło powyżej roku po transplantacji i w okresie pełnego chimeryzmu erytropoetycznego.

W założonym protokole pierwsze oznaczenie chimeryzmu i miana przeciwciał po transplantacji wyznaczaliśmy na dobę 30. Opisy masywnej hemolizy w przypadku niezgodności małej dotyczą okresu wcześniejszego – przed dobą trzydziestą, zwykle między 7 a 14 dniem po przeszczepieniu [82, 170]. Wystąpienie hemolizy wiąże się z tzw. zespołem limfocytów pasażerskich, przetoczonych wraz z materiałem przeszczepowym i podejmujących produkcję izoaglutynin. W badanym materiale nie obserwowaliśmy klinicznie istotnie wyrażonej hemolizy. W 5 przypadkach przejściowy wzrost bilirubiny, niezależny od innych powikłań i toksyczności mógl odpowiadać przejściowej, łagodnej hemolizie. W żadnym z powyższych przypadków nie stwierdzono dodatniego odczynu antyglobulinowego, nie oznaczano również miana przeciwciał. Podobnie jak autorom opracowań opublikowanych w ostatnich 2 latach [72, 85], oznaczanie miana izoaglutynin we wczesnym okresie potransplantacyjnym nie wydaje się uzasadnione. W przypadku niezgodności dużej oznaczenie miana izoaglutynin w dobie 30 może mieć znaczenie prognostyczne dla rozwoju PRCA. Brak redukcji wyjściowego miana przeciwciał, szczególnie w przypadkach izoaglutynin anty A, gdy było ono wyjściowo wysokie, może zapowiadać rozwój tego powikłania. Wnioski te wymagają jednak potwierdzenia na większej grupie pacjentów. Obserwacje dotyczące zmiany miana przeciwciał u pacjentów z niezgodnością dużą wykazały, że u przeważającej większości badanych dochodzi do stopniowego (zróżnicowanego co do tempa) zaniku miana przeciwciał naturalnych. Według Mielcarka i wsp. [80] może to dowodzić reakcji przeszczep przeciwko

plazmocytom, a pośrednio występowania reakcji GvL. W badaniach własnych wykazano jednak, że w grupie pacjentów z eliminacją przeciwciał naturalnych biorcy odsetek wznów jest największy i dotyczy głównie pacjentów z utrzymującym się eMC. Zanik przeciwciał naturalnych i zanik własnej erytropoezy nie były u tych pacjentów procesem równoległym. Także te obserwacje wymagają potwierdzenia na większej grupie pacjentów.

Podsumowując badania porównano wyniki oznaczeń chimeryzmu metodą oznaczeń rozszerzonego panelu grup krwi (echimeryzmu) oraz oznaczeń STR, dotyczących krwinek jądrzastych (badania DNA). Stwierdzono, że eliminacja erytropoezy biorcy i osiągnięcie całkowitego chimeryzmu erytropoetycznego przebiega odmiennym torem, niż pozostałych układów. Zgodność oznaczeń w 180 dobie, kiedy można oczekiwać pełnego zaniku przetrwałych erytrocytów biorcy wynosiła 73% dla CC i 47% dla MC. Metody te można więc uznać za uzupełniające się, ale nie porównywalne. Jednak badanie antygenów grupowych w panelu rozszerzonym pozwala na wyłonienie grupy pacjentów z wysokim stopniem zgodności w zakresie wszystkich badanych układów. Populacja ta powinna być dołączona do grupy pacjentów szczególnie zagrożonych wznową, u których uzasadnione jest wnikliwe monitorowanie chimeryzmu metodą STR, modyfikowanie immunosupresji i ścisłe monitorowanie parametrów choroby resztkowej, tam gdzie taka możliwość istnieje. Osiągany rodzaj echimeryzmu w kolejnych dobach monitorowania nie ma istotnego związku z występowaniem powikłań o charakterze immunologicznym.

6. WNIOSKI

1. Mieszany chimeryzm oznaczony metodami molekularnymi (STR) jest czynnikiem prognostycznym wznowy choroby. Monitorowanie dynamiki chimeryzmu pozwala na wskazanie grupy pacjentów szczególnie zagrożonych wznową, u których należy podjąć działania profilaktyczne.
2. Modyfikacja profilaktyki immunosupresyjnej polegająca na skróceniu okresu stosowania cyklosporyny:
 - a. powoduje istotne zmiany w obserwowanym rozkładzie postaci chimeryzmu (MC,CC) w porównaniu do profilaktyki standardowej, a tym samym może zmniejszać ryzyko wznowy
 - b. nie wpływa na częstość występowania ostrej i przewlekłej choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi
3. U pacjentów ze wzrostową dynamiką chimeryzmu między dobą 30 i 60 (szczególnie z ostrymi białaczkami), przy braku cech GvHD, należy rozpocząć odstawianie immunosupresji w dobie 60. i dokonać modyfikacji protokołu opieki potransplantacyjnej polegającej na:
 - a. zwiększeniu częstotliwości kontroli po dobie 100
 - b. ścisłym monitorowaniu choroby resztkowej, tam gdzie jest to możliwe
 - c. rozważeniu bardziej radykalnej modyfikacji profilaktyki immunosupresyjnej (odstawienie immunosupresji)
4. Badanie chimeryzmu erytropoetycznego nie pozwala na prognozowanie przebiegu potransplantacyjnego w zakresie GvHD i wznowy choroby. Jednak oznaczanie rozszerzonego (ponad układ AB0 i Rh) panelu grup krwi przed przeszczepieniem jest wysoce uzasadnione. Pełna zgodność jest czynnikiem ryzyka wznowy choroby.

7. PIŚMIENNICTWO

1. Lorenz E., Congdon C.C. Modification of lethal irradiation injury in mice by injection of homologous or heterologous bone J Natl Cancer Inst 1954;14(4):955-965
2. Thomas E.D., Lichte H.L., Jr., Lu W.C., Ferrebee J.W. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy N Engl J Med 1957;257(11):491-496
3. Bortin M.M., Saltzstein E.C., Waisbren B.A., Kay S.A., Hong R., Bach F.H. Bone marrow transplantation for aplastic anemia. Establishment of chimerism using multiple HL-A identical donors following pretreatment with cyclophosphamide Transplantation 1971;11(6):573-575
4. Mathe G., Amiel J.L., Schwarzenberg L., Cattani A., Schneider M. Haematopoietic chimera in man after allogenic (homologous) bone-marrow transplantation. (control of the secondary syndrome. Specific tolerance due to the chimerism) Br Med J 1963;2(5373):1633-1635
5. Mathe G., Amiel J.L., Schwarzenberg L., Cattani A., Schneider M., Devries M.J., Tubiana M., Lalanne C., Binet J.L., Papiernik M. i wsp. Successful allogenic bone marrow transplantation in man: chimerism, induced specific tolerance and possible anti-leukemic effects Blood 1965;25:179-196
6. van Rood J.J., Eernisse J.G., van Leeuwen A. Leucocyte antibodies in sera from pregnant women Nature 1958;181(4625):1735-1736
7. Dausset J. [Iso-leuko-antibodies] Acta Haematol 1958;20(1-4):156-166
8. Bach F.H., Albertini R.J., Joo P., Anderson J.L., Bortin M.M. Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome Lancet 1968;2(7583):1364-1366
9. Gatti R.A., Meuwissen H.J., Allen H.D., Hong R., Good R.A. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency Lancet 1968;2(7583):1366-1369
10. Buckner C.D., Epstein R.B., Rudolph R.H., Clift R.A., Storb R., Thomas E.D. Allogeneic marrow engraftment following whole body irradiation in a patient with leukemia Blood 1970;35(6):741-750
11. Hellman A., Goldman J.M. Effects of cyclosporin A on human granulopoiesis in vitro Transplantation 1980;30(5):386-387
12. Powles R.L., Barrett A.J., Clink H., Kay H.E., Sloane J., McElwain T.J. Cyclosporin A for the treatment of graft-versus-host disease in man Lancet 1978;2(8104-5):1327-1331
13. Storb R., Deeg H.J., Whitehead J., Appelbaum F., Beatty P., Bensinger W., Buckner C.D., Clift R., Doney K., Farewell V. i wsp. Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia N Engl J Med 1986;314(12):729-735
14. Gratwohl A., Baldomero H., Frauendorfer K., Urbano-Ispizua A., Niederwieser D. Results of the EBMT activity survey 2005 on haematopoietic stem cell transplantation: focus on increasing use of unrelated donors Bone Marrow Transplant 2007;39(2):71-87
15. Kernan N.A., Bartsch G., Ash R.C., Beatty P.G., Champlin R., Filipovich A., Gajewski J., Hansen J.A., Henslee-Downey J., McCullough J. i wsp. Analysis of 462 transplantations from unrelated donors facilitated by the National Marrow Donor Program N Engl J Med 1993;328(9):593-602
16. Lange A., Dera-Joachimik D., Madej S., Polak M., Koscińska K., Pietraszek E., Skurjat L. Activity of the National Polish Bone Marrow Donor Registry--analysis of the matching process successfully completed with hematopoietic stem cell transplantation Transplant Proc 2010;42(8):3316-3318

17. Russell N.H., Hunter A., Rogers S., Hanley J., Anderson D. Peripheral blood stem cells as an alternative to marrow for allogeneic transplantation *Lancet* 1993;341(8858):1482
18. Dreger P., Suttorp M., Haferlach T., Loffler H., Schmitz N., Schroyens W. Allogeneic granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells for treatment of engraftment failure after bone marrow transplantation *Blood* 1993;81(5):1404-1407
19. Spitzer T.R. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation *J Infus Chemother* 1996;6(1):33-38
20. Mifflin G., Charley C., Stainer C., Anderson S., Hunter A., Russell N. Stem cell mobilization in normal donors for allogeneic transplantation: analysis of safety and factors affecting efficacy *Br J Haematol* 1996;95(2):345-348
21. Anderlini P., Korbling M., Dale D., Gratwohl A., Schmitz N., Stroncek D., Howe C., Leitman S., Horowitz M., Gluckman E. i wsp. Allogeneic blood stem cell transplantation: considerations for donors *Blood* 1997;90(3):903-908
22. Zaucha J.M., Knopinska-Posluszny W., Lewandowski K., Bieniaszewska M., Halaburda K., Hellmann A. [Allogeneic blood stem cell transplants: characteristics of transplantation material and clinical transplantation course] *Pol Merkur Lekarski* 1998;4(21):130-133
23. Miller J.P., Perry E.H., Price T.H., Bolan C.D., Jr., Karanes C., Boyd T.M., Chitphakdithai P., King R.J. Recovery and safety profiles of marrow and PBSC donors: experience of the National Marrow Donor Program *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14(9 Suppl):29-36
24. Bensinger W.I., Storb R. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation *Rev Clin Exp Hematol* 2001;5(2):67-86
25. Gallardo D., de la C.R., Nieto J.B., Espigado I., Iriando A., Jimenez-Velasco A., Vallejo C., Martin C., Caballero D., Brunet S. i wsp. Is mobilized peripheral blood comparable with bone marrow as a source of hematopoietic stem cells for allogeneic transplantation from HLA-identical sibling donors? A case-control study *Haematologica* 2009;94(9):1282-1288
26. Giralt S., Estey E., Albitar M., van Besien K., Rondon G., Anderlini P., O'Brien S., Khouri I., Gajewski J., Mehra R. i wsp. Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy *Blood* 1997;89(12):4531-4536
27. Slavin S., Nagler A., Naparstek E., Kapelushnik Y., Aker M., Cividalli G., Varadi G., Kirschbaum M., Ackerstein A., Samuel S. i wsp. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases *Blood* 1998;91(3):756-763
28. Kolb H.J., Schattenberg A., Goldman J.M., Hertenstein B., Jacobsen N., Arcese W., Ljungman P., Ferrant A., Verdonck L., Niederwieser D. i wsp. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients *Blood* 1995;86(5):2041-2050
29. Hellmann A., Bieniaszewska M., Zaucha J.M., Halaburda K., Balon J. Allogeniczne transplantacje komórek progenitorowych hematopoezy w przewlekłej białaczce szpikowej: doświadczenia ośrodka gdańskiego *Współcz Onkol* 2002;6(10):670-675
30. Pavlu J., Szydlo R.M., Goldman J.M., Apperley J.F. Three decades of transplantation for chronic myeloid leukemia: what have we learned? *Blood* 2011;117(3):755-763
31. Gratwohl A., Schmid O., Baldomero H., Horisberger B., Urbano-Ispizua A. Haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in Europe 2002. Changes in indication and impact of team density. A report of the EBMT activity survey *Bone Marrow Transplant* 2004;34(10):855-875
32. Hellmann A. [Transplantation of haemopoietic precursor cells in myelodysplastic syndromes] *Pol Arch Med Wewn* 1998;99(2):150-154

33. Bacher U., Schnittger S., Haferlach T. Molecular genetics in acute myeloid leukemia *Curr Opin Oncol* 2010;22(6):646-655
34. Socie G., Blazar B.R. Acute graft-versus-host disease: from the bench to the bedside *Blood* 2009;114(20):4327-4336
35. Wolf D., Lilienfeld-Toal M., Wolf A.M., Schleuning M., Bergwelt-Baildon M., Held S.A., Brossart P. Novel treatment concepts for graft-versus-host disease *Blood* 2012;119(1):16-25
36. Trzonkowski P., Bieniaszewska M., Juscinska J., Dobyszyk A., Krzystyniak A., Marek N., Mysliwska J., Hellmann A. First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+C *Clin Immunol* 2009;133(1):22-26
37. Trzonkowski P., Dukat-Mazurek A., Bieniaszewska M., Marek-Trzonkowska N., Dobyszyk A., Juscinska J., Dutka M., Mysliwska J., Hellmann A. Treatment of Graft-versus-Host Disease with Naturally Occurring T Regulatory Cells *BioDrugs* 2013;
38. Thomas E.D., Blume K.G. Historical markers in the development of allogeneic hematopoietic cell transplantation *Biol Blood Marrow Transplant* 1999;5(6):341-346
39. Bieniaszewska M., Prejzner W., Knopińska-Posłuszny W., Piekarska A., Moszkowska G., Taszner M., Hellmann A. Allogeniczne transplantacje komórek progenitorowych hematopoety w ośrodku gdańskim w latach 1994-2009 *Ann Acad Med Gedan* 2009;39:9-21
40. Anderson B.E., McNiff J.M., Jain D., Blazar B.R., Shlomchik W.D., Shlomchik M.J. Distinct roles for donor- and host-derived antigen-presenting cells and costimulatory molecules in murine chronic graft-versus-host disease: requirements depend on target organ *Blood* 2005;105(5):2227-2234
41. Dignan F.L., Amrolia P., Clark A., Cornish J., Jackson G., Mahendra P., Scarisbrick J.J., Taylor P.C., Shaw B.E., Potter M.N. Diagnosis and management of chronic graft-versus-host disease *Br J Haematol* 2012;158(1):46-61
42. Martin P.J., Pavletic S.Z. Biology and management of chronic graft-versus-host disease *Cancer Treat Res* 2009;144:277-298
43. Arora M., Klein J.P., Weisdorf D.J., Hassebroek A., Flowers M.E., Cutler C.S., Urbano-Ispizua A., Antin J.H., Bolwell B.J., Boyiadzis M. i wsp. Chronic GVHD risk score: a Center for International Blood and Marrow Transplant Research analysis *Blood* 2011;117(24):6714-6720
44. Arai S., Jagasia M., Storer B., Chai X., Pidala J., Cutler C., Arora M., Weisdorf D.J., Flowers M.E., Martin P.J. i wsp. Global and organ-specific chronic graft-versus-host disease severity according to the 2005 NIH Consensus Criteria *Blood* 2011;118(15):4242-4249
45. Ruutu T., Niederwieser D., Gratwohl A., Apperley J.F. A survey of the prophylaxis and treatment of acute GVHD in Europe: a report of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Chronic Leukaemia Working Party of the EBMT *Bone Marrow Transplant* 1997;19(8):759-764
46. Pidala J., Lee S.J., Quinn G., Jim H., Kim J., Anasetti C. Variation in management of immune suppression after allogeneic hematopoietic cell transplantation *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17(10):1528-1536
47. Bunin N.J., Davies S.M., Aplenc R., Camitta B.M., DeSantes K.B., Goyal R.K., Kapoor N., Kernan N.A., Rosenthal J., Smith F.O. i wsp. Unrelated donor bone marrow transplantation for children with acute myeloid leukemia beyond first remission or refractory to chemotherapy *J Clin Oncol* 2008;26(26):4326-4332
48. Schots R., Van R., I, Ben Othman T., Trullemans F., De Waele M., Van Camp B. The impact of partial T cell depletion on overall transplant-related toxicity, graft function and sur-

- vival after HLA-identical allogeneic bone marrow transplantation in standard risk adult patients with leukemia *Bone Marrow Transplant* 2001;28(10):917-922
49. Anderson D., Billingham R.E., Lampkin G.H. The use of skin grafting to distinguish between monozygotic and dizygotic twins in cattle *Heredity* 1951;5(1):379-397
50. FORD C.E., HAMERTON J.L., BARNES D.W., LOUITT J.F. Cytological identification of radiation-chimaeras *Nature* 1956;177(4506):452-454
51. McCann S.R., Lawler M. Mixed chimaerism; detection and significance following BMT *Bone Marrow Transplant* 1993;11(2):91-94
52. Bader P., Holle W., Klingebiel T., Handgretinger R., Niethammer D., Beck J. Quantitative assessment of mixed hematopoietic chimerism by polymerase chain reaction after allogeneic BMT *Anticancer Res* 1996;16(4A):1759-1763
53. Bader P., Niethammer D., Willasch A., Kreyenberg H., Klingebiel T. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant* 2005;35(2):107-119
54. Scharf S.J., Smith A.G., Hansen J.A., McFarland C., Erlich H.A. Quantitative determination of bone marrow transplant engraftment using fluorescent polymerase chain reaction primers for human identity markers *Blood* 1995;85(7):1954-1963
55. Lawler M., Humphries P., McCann S.R. Evaluation of mixed chimerism by in vitro amplification of dinucleotide repeat sequences using the polymerase chain reaction *Blood* 1991;77(11):2504-2514
56. Ugozzoli L., Yam P., Petz L.D., Ferrara G.B., Champlin R.E., Forman S.J., Koyal D., Wallace R.B. Amplification by the polymerase chain reaction of hypervariable regions of the human genome for evaluation of chimerism after bone marrow transplantation *Blood* 1991;77(7):1607-1615
57. van Leeuwen J.E., Van Tol M.J., Bodzinga B.G., Wijnen J.T., van der K.M., Joosten A.M., Tanke H.J., Vossen J.M., Khan P.M. Detection of mixed chimaerism in flow-sorted cell subpopulations by PCR-amplified VNTR markers after allogeneic bone marrow transplantation *Br J Haematol* 1991;79(2):218-225
58. Petz L.D., Yam P., Wallace R.B., Stock A.D., de Lange G., Knowlton R.G., Brown V.A., Donis-Keller H., Hill L.R., Forman S.J. i wsp. Mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation for hematologic malignancies *Blood* 1987;70(5):1331-1337
59. Schattenberg A., Bar B., Vet J., Van Dijk B., Smeets D., de Witte T. Comparison of chimerism of red cells with that of granulocytes, T-lymphocytes, and bone marrow cells in recipients of bone marrow grafts depleted of lymphocytes using counterflow centrifugation *Leuk Lymphoma* 1991;5(2-3):171-177
60. Offit K., Burns J.P., Cunningham I., Jhanwar S.C., Black P., Kernan N.A., O'Reilly R.J., Chaganti R.S. Cytogenetic analysis of chimerism and leukemia relapse in chronic myelogenous leukemia patients after T cell-depleted bone marrow transplantation *Blood* 1990;75(6):1346-1355
61. Halaburda K., Bieniaszewska M., Brozek I., Limon J., Hellmann A. Diagnosis of Klinefelter syndrome in the donor after peripheral blood stem cell transplantation *Bone Marrow Transplant* 2000;25(4):461
62. Buno I., Nava P., Simon A., Gonzalez-Rivera M., Jimenez J.L., Balsalobre P., Serrano D., Carrion R., Gomez-Pineda A., Diez-Martin J.L. A comparison of fluorescent in situ hybridization and multiplex short tandem repeat polymerase chain reaction for quantifying chimerism after stem cell transplantation *Haematologica* 2005;90(10):1373-1379
63. Hochberg E.P., Miklos D.B., Neuberg D., Eichner D.A., McLaughlin S.F., Mattes-Ritz A., Alyea E.P., Antin J.H., Soiffer R.J., Ritz J. A novel rapid single nucleotide polymorphism

- (SNP)-based method for assessment of hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation *Blood* 2003;101(1):363-369
64. Kristt D., Stein J., Yaniv I., Klein T. Assessing quantitative chimerism longitudinally: technical considerations, clinical applications and routine feasibility *Bone Marrow Transplant* 2007;39(5):255-268
65. Baron F., Sandmaier B.M., Storer B.E., Maris M.B., Langston A.A., Lange T., Petersdorf E., Bethge W., Maziarz R.T., McSweeney P.A. i wsp. Extended mycophenolate mofetil and shortened cyclosporine failed to reduce graft-versus-host disease after unrelated hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13(9):1041-1048
66. Casarino L., Carbone C., Capucci M.A., Izzi T., Ferrara G.B. Analysis of chimerism after bone marrow transplantation using specific oligonucleotide probes *Bone Marrow Transplant* 1992;10(2):165-170
67. Knowlton R.G., Brown V.A., Braman J.C., Barker D., Schumm J.W., Murray C., Takvorian T., Ritz J., Donis-Keller H. Use of highly polymorphic DNA probes for genotypic analysis following bone marrow transplantation *Blood* 1986;68(2):378-385
68. Hellmann A., Zaucha J.M., Pawłowski R., Welz A., Hałaburda K. Amplification of the VNTR systemd HUMACTBP2 and HUMTHO1 by the polymerase chain reaction for documentation of residual recipient cells after allogeneic bone marrow transplantation *Applied Biology Communication* 1996;6(Suppl.1):127-134
69. Jolkowska J., Wachowiak J., Lange A., Kwissa M., Witt M. Molecular assessment of post-BMT chimerism using various biologic specimens and automated DNA sizing technology *J Hematother Stem Cell Res* 2000;9(2):263-268
70. Hershko C., Gale R.P., Ho W., Fitchen J. ABH antigens and bone marrow transplantation *Br J Haematol* 1980;44(1):65-73
71. Bensinger W.I., Buckner C.D., Thomas E.D., Clift R.A. ABO-incompatible marrow transplants *Transplantation* 1982;33(4):427-429
72. Daniel-Johnson J., Schwartz J. How do I approach ABO-incompatible hematopoietic progenitor cell transplantation? *Transfusion* 2011;51(6):1143-1149
73. Gajewski J.L., Johnson V.V., Sandler S.G., Sayegh A., Klumpp T.R. A review of transfusion practice before, during, and after hematopoietic progenitor cell transplantation *Blood* 2008;112(8):3036-3047
74. Bensinger W.I., Buckner C.D., Clift R.A., Thomas E.D. Plasma exchange and plasma modification for the removal of anti-red cell antibodies prior to ABO-incompatible marrow transplant *J Clin Apher* 1987;3(3):174-177
75. Stussi G., Halter J., Bucheli E., Valli P.V., Seebach L., Gmur J., Gratwohl A., Schanz U., Passweg J.R., Seebach J.D. Prevention of pure red cell aplasia after major or bidirectional ABO blood group incompatible hematopoietic stem cell transplantation by pretransplant reduction of host anti-donor isoagglutinins *Haematologica* 2009;94(2):239-248
76. Rowley S.D., Donato M.L., Bhattacharyya P. Red blood cell-incompatible allogeneic hematopoietic progenitor cell transplantation *Bone Marrow Transplant* 2011;46(9):1167-1185
77. Selleri C., Raiola A., De Rosa G., Luciano L., Pezzullo L., Picardi M., Rotoli B. CD34+-enriched donor lymphocyte infusions in a case of pure red cell aplasia and late graft failure after major ABO-incompatible bone marrow transplantation *Bone Marrow Transplant* 1998;22(6):605-607
78. Bolan C.D., Leitman S.F., Griffith L.M., Wesley R.A., Procter J.L., Stroncek D.F., Barrett A.J., Childs R.W. Delayed donor red cell chimerism and pure red cell aplasia following major ABO-incompatible nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation *Blood* 2001;98(6):1687-1694

79. Aung F.M., Lichtiger B., Bassett R., Liu P., Alousi A., Bashier Q., Ciurea S.O., de Lima M.J., Hosing C., Kebriaei P. i wsp. Incidence and natural history of pure red cell aplasia in major ABO-mismatched haematopoietic cell transplantation *Br J Haematol* 2013;160(6):798-805
80. Mielcarek M., Leisenring W., Torok-Storb B., Storb R. Graft-versus-host disease and donor-directed hemagglutinin titers after ABO-mismatched related and unrelated marrow allografts: evidence for a graft-versus-plasma cell effect *Blood* 2000;96(3):1150-1156
81. Bolan C.D., Childs R.W., Procter J.L., Barrett A.J., Leitman S.F. Massive immune hemolysis after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with minor ABO incompatibility *Br J Haematol* 2001;112(3):787-795
82. Salmon J.P., Michaux S., Hermanne J.P., Baudoux E., Gerard C., Sontag-Thull D., Fillet G., Beguin Y. Delayed massive immune hemolysis mediated by minor ABO incompatibility after allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation *Transfusion* 1999;39(8):824-827
83. Stussi G., Muntwyler J., Passweg J.R., Seebach L., Schanz U., Gmur J., Gratwohl A., Seebach J.D. Consequences of ABO incompatibility in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation *Bone Marrow Transplant* 2002;30(2):87-93
84. Madlon-Kay D.J. The clinical significance of ABO blood group incompatibility *Arch Fam Med* 1993;2(3):285-287
85. Booth G.S., Gehrie E.A., Bolan C.D., Savani B.N. Clinical Guide to ABO-Incompatible Allogeneic Stem Cell Transplantation *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19(8):1152-1158
86. Dahl D., Hahn A., Koenecke C., Heuft H.G., Dammann E., Stadler M., Buchholz S., Krauter J., Eder M., Sykora K.W. i wsp. Prolonged isolated red blood cell transfusion requirement after allogeneic blood stem cell transplantation: identification of patients at risk *Transfusion* 2010;50(3):649-655
87. Reviron J., Schenmetzler C., Bussel A., Frappaz D., Devergie A., Gluckman E. Obstacle to red cell engraftment due to major ABO incompatibility in allogeneic bone marrow transplants (BMT): quantitative and kinetic aspects in 58 BMTs *Transplant Proc* 1987;19(6):4618-4622
88. Wennerberg A., Backman K.A., Gillerlain C., Robertson V., Jones C., Joyner T. Mixed erythrocyte chimerism: implications for tolerance of the donor immune system to recipient non-ABO system red cell antigens *Bone Marrow Transplant* 1996;18(2):433-435
89. Boval B. [Flow cytometry: applications in transfusion medicine] *Transfus Clin Biol* 2000;7 Suppl 1:63s-68s
90. Hendriks E.C., De Man A.J., van Berkel Y.C., Stienstra S., de Witte T. Flow cytometric method for the routine follow-up of red cell populations after bone marrow transplantation *Br J Haematol* 1997;97(1):141-145
91. Stussi G., Huggel K., Schanz U., Passweg J.R., Seebach J.D. Levels of anti-A/B antibodies after ABO-incompatible hematopoietic stem cell transplantation *Transplant Proc* 2005;37(2):1385-1387
92. Kroger N. Approaches to relapse after allogeneic stem cell transplantation *Curr Opin Oncol* 2011;23(2):203-208
93. Miller J.S., Warren E.H., van den Brink M.R., Ritz J., Shlomchik W.D., Murphy W.J., Barrett A.J., Kolb H.J., Giralt S., Bishop M.R. i wsp. NCI First International Workshop on The Biology, Prevention, and Treatment of Relapse After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Report from the Committee on the Biology Underlying Recurrence of Malignant Disease following Allogeneic HSCT: Graft-versus-Tumor/Leukemia Reaction *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16(5):565-586

-
94. Kroger N., Bacher U., Bader P., Bottcher S., Borowitz M.J., Dreger P., Khouri I., Olavarria E., Radich J., Stock W. i wsp. NCI first international workshop on the biology, prevention, and treatment of relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: report from the committee on disease-specific methods and strategies for monitoring relapse following allogeneic stem cell transplantation. part II: chronic leukemias, myeloproliferative neoplasms, and lymphoid malignancies *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16(10):1325-1346
95. Kroger N., Bacher U., Bader P., Bottcher S., Borowitz M.J., Dreger P., Khouri I., Macapinlac H.A., Olavarria E., Radich J. i wsp. NCI First International Workshop on the Biology, Prevention, and Treatment of Relapse after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: report from the Committee on Disease-Specific Methods and Strategies for Monitoring Relapse following Allogeneic Stem Cell Transplantation. Part I: Methods, acute leukemias, and myelodysplastic syndromes *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16(9):1187-1211
96. Wekerle T. Transplantation tolerance induced by mixed chimerism *J Heart Lung Transplant* 2001;20(8):816-823
97. Wekerle T., Blaha P., Koporc Z., Bigenzahn S., Pusch M., Muehlbacher F. Mechanisms of tolerance induction through the transplantation of donor hematopoietic stem cells: central versus peripheral tolerance *Transplantation* 2003;75(9 Suppl):21S-25S
98. Mickelson D.M., Sproat L., Dean R., Sobecks R., Rybicki L., Kalaycio M., Pohlman B., Sweetenham J., Andresen S., Bolwell B. i wsp. Comparison of donor chimerism following myeloablative and nonmyeloablative allogeneic hematopoietic SCT *Bone Marrow Transplant* 2011;46(1):84-89
99. Lamba R., Abella E., Kukuruga D., Klein J., Savasan S., Abidi M.H., Mohamed A., Peres E. Mixed hematopoietic chimerism at day 90 following allogeneic myeloablative stem cell transplantation is a predictor of relapse and survival *Leukemia* 2004;18(10):1681-1686
100. Barrios M., Jimenez-Velasco A., Roman-Gomez J., Madrigal M.E., Castillejo J.A., Torres A., Heiniger A. Chimerism status is a useful predictor of relapse after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia *Haematologica* 2003;88(7):801-810
101. Seebach J.D., Stussi G., Passweg J.R., Loberiza F.R., Jr., Gajewski J.L., Keating A., Goerner M., Rowlings P.A., Tiberghien P., Elfenbein G.J. i wsp. ABO blood group barrier in allogeneic bone marrow transplantation revisited *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11(12):1006-1013
102. Kollman C., Howe C.W., Anasetti C., Antin J.H., Davies S.M., Filipovich A.H., Hegland J., Kamani N., Kernan N.A., King R. i wsp. Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age *Blood* 2001;98(7):2043-2051
103. Kimura F., Sato K., Kobayashi S., Ikeda T., Sao H., Okamoto S., Miyamura K., Mori S., Akiyama H., Hirokawa M. i wsp. Impact of ABO-blood group incompatibility on the outcome of recipients of bone marrow transplants from unrelated donors in the Japan Marrow Donor Program *Haematologica* 2008;93(11):1686-1693
104. Michallet M., Le Q.H., Mohty M., Prebet T., Nicolini F., Boiron J.M., Esperou H., Attal M., Milpied N., Lioure B. i wsp. Predictive factors for outcomes after reduced intensity conditioning hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies: a 10-year retrospective analysis from the Societe Francaise de Greffe de Moelle et de Therapie Cellulaire *Exp Hematol* 2008;36(5):535-544
105. Mielcarek M., Torok-Storb B., Storb R. ABO incompatibility and relapse risk in patients undergoing allogeneic marrow transplantation for acute myeloid leukemia *Bone Marrow Transplant* 2002;30(8):547-548

106. Mehta J., Powles R., Sirohi B., Treleaven J., Kulkarni S., Saso R., Tait D., Singhal S. Does donor-recipient ABO incompatibility protect against relapse after allogeneic bone marrow transplantation in first remission acute myeloid leukemia? *Bone Marrow Transplant* 2002;29(10):853-859
107. Erker C.G., Steins M.B., Fischer R.J., Kienast J., Berdel W.E., Sibrowski W., Cassens U. The influence of blood group differences in allogeneic hematopoietic peripheral blood progenitor cell transplantation *Transfusion* 2005;45(8):1382-1390
108. Bieniaszewska M., Balon J., Halaburda K., Reichert M., Piekarska A., Pawlowski R., Hellmann A. Kliniczne znaczenie wczesnego, całkowitego chimeryzmu po allogenicznej transplantacji komórek progenitorowych hematopoezy *Acta Haematol Pol* 2004;35(2):217-225
109. Schaap N., Schattenberg A., Mensink E., Preijers F., Hillegers M., Knops R., Pennings A., Boezeman J., Geurts v.K., de Pauw B. i wsp. Long-term follow-up of persisting mixed chimerism after partially T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation *Leukemia* 2002;16(1):13-21
110. Mossallam G.I., Kamel A.M., Storer B., Martin P.J. Prognostic utility of routine chimerism testing at 2 to 6 months after allogeneic hematopoietic cell transplantation *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15(3):352-359
111. Huisman C., de Weger R.A., de Vries L., Tilanus M.G., Verdonck L.F. Chimerism analysis within 6 months of allogeneic stem cell transplantation predicts relapse in acute myeloid leukemia *Bone Marrow Transplant* 2007;39(5):285-291
112. Lawler M., McCann S.R., Marsh J.C., Ljungman P., Hovs J., Vandenberghe E., O'Riordan J., Locasciulli A., Socie G., Kelly A. i wsp. Serial chimerism analyses indicate that mixed haemopoietic chimerism influences the probability of graft rejection and disease recurrence following allogeneic stem cell transplantation (SCT) for severe aplastic anaemia (SAA): indication for routine assessment of chimerism post SCT for SAA *Br J Haematol* 2009;144(6):933-945
113. Wang Y., Liu D.H., Liu K.Y., Xu L.P., Zhang X.H., Han W., Chen H., Chen Y.H., Wang F.R., Wang J.Z. i wsp. Long-term follow-up of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation without in vitro T cell depletion for the treatment of leukemia: nine years of experience at a single center *Cancer* 2013;119(5):978-985
114. Choi S.J., Lee K.H., Lee J.H., Kim S., Chung H.J., Lee J.S., Kim S.H., Park C.J., Chi H.S., Kim W.K. Prognostic value of hematopoietic chimerism in patients with acute leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: a prospective study *Bone Marrow Transplant* 2000;26(3):327-332
115. Hałaburda K., Zaucha J.M., Bieniaszewska M., Knopińska-Posłuszny W., Hellmann A. Pierwsza allogeniczna transplantacja szpiku od dawcy niespokrewnionego w Akademii Medycznej w Gdańsku *Ann Acad Med Gedan* 2001;32:13-19
116. Tamura S., Saheki K., Takatsuka H., Wada H., Fujimori Y., Okamoto T., Takemoto Y., Hashimoto-Tamaoki T., Furuyama J., Kakishita E. Early detection of relapse and evaluation of treatment for mixed chimerism using fluorescence in situ hybridization following allogeneic hematopoietic cell transplant for hematological malignancies *Ann Hematol* 2000;79(11):622-626
117. Thiede C., Bornhauser M., Ehninger G. Strategies and clinical implications of chimerism diagnostics after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation *Acta Haematol* 2004;112(1-2):16-23
118. Antin J.H., Childs R., Filipovich A.H., Giralt S., Mackinnon S., Spitzer T., Weisdorf D. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem Meetings of the

- International Bone Marrow Transplant Registry and the American Society of Blood and Marrow Transplantation *Biol Blood Marrow Transplant* 2001;7(9):473-485
119. Khan F., Agarwal A., Agrawal S. Significance of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation: new variations on an old theme *Bone Marrow Transplant* 2004;34(1):1-12
120. Mossallam G.I., Smith A.G., McFarland C. Comparison of variable number tandem repeat and short tandem repeat genetic markers for qualitative and quantitative chimerism analysis post allogeneic stem cell transplantation *J Egypt Natl Canc Inst* 2005;17(2):103-113
121. Doney K., Loken M., Bryant E., Smith A., Appelbaum F. Lack of utility of chimerism studies obtained 2-3 months after myeloablative hematopoietic cell transplantation for ALL *Bone Marrow Transplant* 2008;42(4):271-274
122. Bader P., Kreyenberg H., Hoelle W., Dueckers G., Handgretinger R., Lang P., Kremens B., Dilloo D., Sykora K.W., Schrappe M. i wsp. Increasing mixed chimerism is an important prognostic factor for unfavorable outcome in children with acute lymphoblastic leukemia after allogeneic stem-cell transplantation: possible role for pre-emptive immunotherapy? *J Clin Oncol* 2004;22(9):1696-1705
123. Bader P., Holle W., Klingebiel T., Handgretinger R., Benda N., Schlegel P.G., Niethammer D., Beck J. Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation: the impact of quantitative PCR analysis for prediction of relapse and graft rejection in children *Bone Marrow Transplant* 1997;19(7):697-702
124. Gorczyńska E., Turkiewicz D., Toporski J., Kalwak K., Rybka B., Ryczan R., Sajewicz L., Chybicka A. Prompt initiation of immunotherapy in children with an increasing number of autologous cells after allogeneic HCT can induce complete donor-type chimerism: a report of 14 children *Bone Marrow Transplant* 2004;33(2):211-217
125. Formankova R., Honzatkova L., Moravcova J., Sieglova Z., Dvorakova R., Nadvornikova S., Vitek A., Lukasova M., Stary J., Brdicka R. Prediction and reversion of post-transplant relapse in patients with chronic myeloid leukemia using mixed chimerism and residual disease detection and adoptive immunotherapy *Leuk Res* 2000;24(4):339-347
126. Bautista F., Moreno L., Fernandez-Navarro J.M., Senent L., Andres M.M., Castel V., Verdeguer A. Evaluation of chimerism by quantitative PCR analysis of DNA polymorphism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in a pediatric population with malignancies *Pediatr Transplant* 2011;15(1):81-87
127. Guimond M., Busque L., Baron C., Bonny Y., Belanger R., Mattioli J., Perreault C., Roy D.C. Relapse after bone marrow transplantation: evidence for distinct immunological mechanisms between adult and paediatric populations *Br J Haematol* 2000;109(1):130-137
128. Kolb H.J. Donor leukocyte transfusions for treatment of leukemic relapse after bone marrow transplantation. EBMT Immunology and Chronic Leukemia Working Parties *Vox Sang* 1998;74 Suppl 2:321-329
129. Kolb H.J., Holler E. Adoptive immunotherapy with donor lymphocyte transfusions *Curr Opin Oncol* 1997;9(2):139-145
130. Roux E., Helg C., Chapius B., Jeannet M., Roosnek E. Mixed chimerism after bone marrow transplantation and the risk of relapse *Blood* 1994;84(12):4385-4386
131. Bader P., Stoll K., Huber S., Geiselhart A., Handgretinger R., Niemeyer C., Einsele H., Schlegel P.G., Niethammer D., Beck J. i wsp. Characterization of lineage-specific chimerism in patients with acute leukaemia and myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation before and after relapse *Br J Haematol* 2000;108(4):761-768
132. Miura Y., Tanaka J., Toubai T., Tsutsumi Y., Kato N., Hirate D., Kaji M., Sugita J., Shigematsu A., Iwao N. i wsp. Analysis of donor-type chimerism in lineage-specific cell populations after allogeneic myeloablative and non-myeloablative stem cell transplantation *Bone Marrow Transplant* 2006;37(9):837-843

133. Nikolousis E., Robinson S., Nagra S., Brookes C., Kinsella F., Tauro S., Jeffries S., Griffiths M., Mahendra P., Cook M. i wsp. Post-transplant T cell chimerism predicts graft versus host disease but not disease relapse in patients undergoing an alemtuzumab based reduced intensity conditioned allogeneic transplant *Leuk Res* 2013;37(5):561-565
134. El Cheikh J., Vazquez A., Crocchiolo R., Furst S., Calmels B., Castagna L., Lemarie C., Granata A., Ladaique P., Oudin C. i wsp. Acute GVHD is a strong predictor of full donor CD3+ T cell chimerism after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation *Am J Hematol* 2012;87(12):1074-1078
135. El Cheikh J., Crocchiolo R., Furst S., Ladaique P., Castagna L., Faucher C., Calmels B., Oudin C., Lemarie C., Granata A. i wsp. Donor CD3(+) lymphocyte infusion after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation: single-center experience *Exp Hematol* 2013;41(1):17-27
136. Baron F., Sandmaier B.M. Chimerism and outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning *Leukemia* 2006;20(10):1690-1700
137. Rupa-Matysek J., Lewandowski K., Nowak W., Sawinski K., Gil L., Komarnicki M. Correlation between the kinetics of CD3+ chimerism and the incidence of graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation *Transplant Proc* 2011;43(5):1915-1923
138. Jaksch M., Uzunel M., Remberger M., Sundberg B., Mattsson J. Molecular monitoring of T-cell chimerism early after allogeneic stem cell transplantation may predict the occurrence of acute GVHD grades II-IV *Clin Transplant* 2005;19(3):346-349
139. van Besien K., Dew A., Lin S., Joseph L., Godley L.A., Larson R.A., Odenike T., Rich E., Stock W., Wickrema A. i wsp. Patterns and kinetics of T-cell chimerism after allo transplant with alemtuzumab-based conditioning: mixed chimerism protects from GVHD, but does not portend disease recurrence *Leuk Lymphoma* 2009;50(11):1809-1817
140. Petersen S.L., Madsen H.O., Ryder L.P., Svejgaard A., Masmus T.N., Dickmeiss E., Heilmann C., Vindelov L.L. Chimerism studies in HLA-identical nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation point to the donor CD8(+) T-cell count on day + 14 as a predictor of acute graft-versus-host disease *Biol Blood Marrow Transplant* 2004;10(5):337-346
141. Svenberg P., Mattsson J., Ringden O., Uzunel M. Allogeneic hematopoietic SCT in patients with non-malignant diseases, and importance of chimerism *Bone Marrow Transplant* 2009;44(11):757-763
142. Lee S.J., Vogelsang G., Gilman A., Weisdorf D.J., Pavletic S., Antin J.H., Horowitz M.M., Akpek G., Flowers M.E., Couriel D. i wsp. A survey of diagnosis, management, and grading of chronic GVHD *Biol Blood Marrow Transplant* 2002;8(1):32-39
143. Mengarelli A., Iori A.P., Romano A., Cerretti R., Cerilli L., De Propris M.S., Fenu S., Moleti M.L., De Felice L., Girelli G. i wsp. One-year cyclosporine prophylaxis reduces the risk of developing extensive chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation *Haematologica* 2003;88(3):315-323
144. Burroughs L.M., Storb R., Leisenring W.M., Pulsipher M.A., Loken M.R., Torgerson T.R., Ochs H.D., Woolfrey A.E. Intensive postgrafting immune suppression combined with nonmyeloablative conditioning for transplantation of HLA-identical hematopoietic cell grafts: results of a pilot study for treatment of primary immunodeficiency disorders *Bone Marrow Transplant* 2007;40(7):633-642
145. Burroughs L., Woolfrey A. Hematopoietic cell transplantation for treatment of primary immune deficiencies *Cell Ther Transplant* 2010;2(8)
146. Bader P., Klingebiel T., Schaudt A., Theurer-Mainka U., Handgretinger R., Lang P., Niethammer D., Beck J.F. Prevention of relapse in pediatric patients with acute leukemias

- and MDS after allogeneic SCT by early immunotherapy initiated on the basis of increasing mixed chimerism: a single center experience of 12 children *Leukemia* 1999;13(12):2079-2086
147. Balon J., Halaburda K., Bieniaszewska M., Reichert M., Bieniaszewski L., Piekarska A., Pawlowski R., Hellmann A. Early complete donor hematopoietic chimerism in peripheral blood indicates the risk of extensive graft-versus-host disease *Bone Marrow Transplant* 2005;35(11):1083-1088
148. Bader P., Beck J., Frey A., Schlegel P.G., Hebarth H., Handgretinger R., Einsele H., Niemeyer C., Benda N., Faul C. i wsp. Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT *Bone Marrow Transplant* 1998;21(5):487-495
149. Elmaagacli A.H., Beelen D.W., Becks H.W., Mobascher A., Stockova J., Trzensky S., Opalka B., Schaefer U.W. Molecular studies of chimerism and minimal residual disease after allogeneic peripheral blood progenitor cell or bone marrow transplantation *Bone Marrow Transplant* 1996;18(2):397-403
150. Elmaagacli A.H., Runkel K., Steckel N., Opalka B., Trenschele R., Seeber S., Schaefer U.W., Beelen D.W. A comparison of chimerism and minimal residual disease between four different allogeneic transplantation methods in patients with chronic myelogenous leukemia in first chronic phase *Bone Marrow Transplant* 2001;27(8):809-815
151. Rettinger E., Willasch A.M., Kreyenberg H., Borkhardt A., Holter W., Kremens B., Strahm B., Woessmann W., Mauz-Koerholz C., Gruhn B. i wsp. Preemptive immunotherapy in childhood acute myeloid leukemia for patients showing evidence of mixed chimerism after allogeneic stem cell transplantation *Blood* 2011;118(20):5681-5688
152. Horn B., Soni S., Khan S., Petrovic A., Breslin N., Cowan M., Pelle-Day G., Cooperstein E., Baxter-Lowe L.A. Feasibility study of preemptive withdrawal of immunosuppression based on chimerism testing in children undergoing myeloablative allogeneic transplantation for hematologic malignancies *Bone Marrow Transplant* 2009;43(6):469-476
153. Inagaki J., Fukano R., Nishikawa T., Nakashima K., Sawa D., Ito N., Okamura J. Outcomes of immunological interventions for mixed chimerism following allogeneic stem cell transplantation in children with juvenile myelomonocytic leukemia *Pediatr Blood Cancer* 2013;60(1):116-120
154. Lutz C., Massenkeil G., Nagy M., Neuburger S., Tamm I., Rosen O., Dorken B., Arnold R. A pilot study of prophylactic donor lymphocyte infusions to prevent relapse in adult acute lymphoblastic leukemias after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation *Bone Marrow Transplant* 2008;41(9):805-812
155. Schaap N., Schattenberg A., Bar B., Preijers F., van de Wiel van Kemenade, de Witte T. Induction of graft-versus-leukemia to prevent relapse after partially lymphocyte-depleted allogeneic bone marrow transplantation by pre-emptive donor leukocyte infusions *Leukemia* 2001;15(9):1339-1346
156. Rossi G., Carella A.M., Minervini M.M., Savino L., Fontana A., Pellegrini F., Greco M.M., Merla E., Quarta G., Loseto G. i wsp. Minimal residual disease after allogeneic stem cell transplant: a comparison among multiparametric flow cytometry, Wilms tumor 1 expression and chimerism status (Complete chimerism versus Low Level Mixed Chimerism) in acute leukemia *Leuk Lymphoma* 2013;
157. Stikvoort A., Gertow J., Sundin M., Remberger M., Mattsson J., Uhlin M. Chimerism patterns of long-term stable mixed chimeras posthematopoietic stem cell transplantation in patients with nonmalignant diseases: follow-up of long-term stable mixed chimerism patients *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19(5):838-844

158. Lion T., Watzinger F., Preuner S., Kreyenberg H., Tilanus M., de Weger R., van Loon J., de Vries L., Cave H., Acquaviva C. i wsp. The EuroChimerism concept for a standardized approach to chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation *Leukemia* 2012;26(8):1821-1828
159. Raimondi R., Soli M., Lamparelli T., Bacigalupo A., Arcese W., Belloni M., Rodeghiero F. ABO-incompatible bone marrow transplantation: a GITMO survey of current practice in Italy and comparison with the literature *Bone Marrow Transplant* 2004;34(4):321-329
160. Goldman J., Liesveld J., Nichols D., Heal J., Blumberg N. ABO incompatibility between donor and recipient and clinical outcomes in allogeneic stem cell transplantation *Leuk Res* 2003;27(6):489-491
161. Ozkurt Z.N., Yegin Z.A., Yenicesu I., Aki S.Z., Yagci M., Sucak G.T. Impact of ABO-incompatible donor on early and late outcome of hematopoietic stem cell transplantation *Transplant Proc* 2009;41(9):3851-3858
162. Resnick I.B., Tsirigotis P.D., Shapira M.Y., Aker M., Bitan M., Samuel S., Abdul-Hai A., Ackerstein A., Or R., Slavin S. ABO incompatibility is associated with increased non-relapse and GVHD related mortality in patients with malignancies treated with a reduced intensity regimen: a single center experience of 221 patients *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14(4):409-417
163. Yildirim I., Ozer Y., Yuksel M.K., Arat M., Arslan O. Erythrocyte antigen and reticulocyte engraftment after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation *Bone Marrow Transplant* 2004;34(4):351-355
164. Rowley S.D., Liang P.S., Ulz L. Transplantation of ABO-incompatible bone marrow and peripheral blood stem cell components *Bone Marrow Transplant* 2000;26(7):749-757
165. Robin M., Guardiola P., Dombret H., Baruchel A., Esperou H., Ribaud P., Devergie A., Gluckman E., Socie G. Allogeneic bone marrow transplantation for acute myeloblastic leukaemia in remission: risk factors for long-term morbidity and mortality *Bone Marrow Transplant* 2003;31(10):877-887
166. Stussi G., Seebach L., Muntwyler J., Schanz U., Gmur J., Seebach J.D. Graft-versus-host disease and survival after ABO-incompatible allogeneic bone marrow transplantation: a single-centre experience *Br J Haematol* 2001;113(1):251-253
167. Bacigalupo A., Van Lint M.T., Occhini D., Margiocco M., Ferrari G., Pittaluga P.A., Frasconi F., Peralvo J., Lercari G., Carubia F. i wsp. ABO compatibility and acute graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation *Transplantation* 1988;45(6):1091-1094
168. Helming A.M., Brand A., Wolterbeek R., Van Tol M.J., Egeler R.M., Ball L.M. ABO incompatible stem cell transplantation in children does not influence outcome *Pediatr Blood Cancer* 2007;49(3):313-317
169. Lee J.H., Lee J.H., Choi S.J., Kim S., Seol M., Kwon S.W., Park C.J., Chi H.S., Lee J.S., Kim W.K. i wsp. Changes of isoagglutinin titres after ABO-incompatible allogeneic stem cell transplantation *Br J Haematol* 2003;120(4):702-710
170. Laurecet F.M., Samii K., Bressoud A., Tajeddin M., Easton J., Stelling M.J., Chapuis B. Massive delayed hemolysis following peripheral blood stem cell transplantation with minor ABO incompatibility *Hematol Cell Ther* 1997;39(3):159-162

8. STRESZCZENIE

Mieszany chimeryzm (MC), czyli długotrwałe współwystępowanie hematopoezy biorcy i dawcy po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych jest mimo wielu lat badań przedmiotem żywego zainteresowania. Znaczenie kliniczne tego zjawiska wzbudza kontrowersje. Wprowadzenie nowych metod oceny chimeryzmu hematopoetycznego, opartych o techniki molekularne pozwoliło na stwierdzenie, że MC jest zjawiskiem częstszym, niż opisywały to wcześniej stosowane metody badania. Techniki z zastosowaniem hiperzmiennych sekwencji DNA zburzyły również pogląd, że przeszczepienie po kondycjonowaniu mieloablacyjnym prowadzi do wczesnego, całkowitego zastąpienia hematopoezy biorcy układem krwiotwórczym dawcy (całkowitego chimeryzmu – CC). Efektem fenomenu MC może być rozwój mechanizmów tolerancji immunologicznej prowadzący do osłabienia kluczowego w transplantacji efektu przeszczep przeciwko białaczce, a tym samym do wzrostu ryzyka niepowodzenia terapii, czyli wznowy choroby. Drugim elementem mogącym wpływać na pożądany efekt immunologiczny przeszczepienia jest profilaktyka immunosupresyjna stosowana w celu zapobiegania chorobie przeszczep przeciwko gospodarzowi. Jak wykazano w badaniach ankietowych intensywność i czasokres stosowania cyklosporyny są najczęściej zależne od arbitralnych decyzji transplantologa. Założenia schematu profilaktyki opierają się na historycznych podstawach uznających okres pierwszych stu dni po transplantacji za czas największego zagrożenia powikłaniami zależnymi od aktywacji układu immunologicznego. Brak jest obiektywnych przesłanek pozwalających na podjęcie decyzji o skróceniu, wydłużeniu lub odstawieniu profilaktyki immunosupresyjnej u pacjentów wolnych od objawów klinicznych GvHD. Właściwą ocenę wpływu czasu immunosupresji i statusu chimeryzmu utrudnia konieczność długotrwałego monitorowania pacjentów celem oceny skutków odległych, jakim może być wznowa. Wymaga to zapewnienia wieloletniej, stałej opieki potransplantacyjnej badanym pacjentom.

Uwzględniając powyższe przesłanki za cele pracy badawczej postawiono ocenę znaczenia chimeryzmu hematopoetycznego, jako czynnika prognostycznego w zakresie głównych powikłań stanowiących o niepowodzeniu transplantacji: umiarkowanej i ciężkiej postaci przewlekłej GvHD oraz wznowy choroby, a także ocenę użyteczności oceny chimeryzmu, jako obiektywnego wyznacznika czasu utrzymywania profilaktyki immunosupresyjnej. Podjęto badania mające na celu ocenę dwóch stosowanych standardów profilaktyki: wczesnego, rozpoczętego w trzecim miesiącu po transplantacji odstawiania cyklosporyny i późnego – rozpoczynanego po dobie setnej. Decyzję o czasie trwania terapii podejmowano na podstawie wyniku badania chimeryzmu w dobie sześćdziesiątej. U pacjentów z MC profilaktykę skracano, u tych z CC utrzymywano do doby setnej. Podstawą decyzji był status chimeryzmu oznaczany metodą oceny krótkich tandemowych powtórzeń DNA (STR). Metoda ta uważana obecnie za tzw. złoty standard oceny chimeryzmu była stosowana niezmiennie od 1998 roku. Celem pełnej oceny chimeryzmu podjęto także badania nad chimeryzmem erytropoetycznym wynikającym z niezgodności w zakresie grup krwi między dawcą a biorcą. Ostatecznym celem badawczym było stworzenie podstaw do konstrukcji protokołu opieki potransplantacyjnej zapewniającego minimalizację ryzyka potransplantacyjnej wznowy choroby oraz występowania przewlekłej GvHD.

Protokół badania był jednocześnie wersją roboczą protokołu opieki potransplantacyjnej. Zgodnie z protokołem oznaczenia chimeryzmu wykonywano do doby setnej co

miesiąc, do 2 roku po przeszczepieniu co 3 miesiące, a następnie co pół roku. W pierwszych dwóch latach badano szpik i krew obwodową, następnie jedynie krew.

Chimeryzm oznaczano badając amplifikowane DNA biorcy. Produkty amplifikacji, znakowane fluorescencyjnie analizowano metodą elektroforezy kapilarnej przy użyciu automatycznego sekwenatora DNA ABI PRISM 310 (Perkin-Elmer). Celem oceny półilościowej określano pole pod krzywą wybranych różnicujących pików w co najmniej 1 loci. Materiał od dawcy i biorcy pobierano do oznaczeń w okresie przedprzeszczepowym we wstępnej analizie wskazując różnicujące loci. Badania chimeryzmu erytropoetycznego prowadzono dokonując analiz grup AB0, antygenów układu Rh oraz 6 tzw. mniejszych antygenów grupowych. Oznaczano również miano izoaglutynin.

Grupę poddaną wstępnej analizie stanowili wszyscy chorzy (320), u których dokonano przeszczepienia komórek krwiotwórczych w ośrodku transplantacyjnym w latach 1994-2011. Ze względu na duże zróżnicowanie grupy do dalszych analiz przyjęto 240 pacjentów poddanych przeszczepieniu po kondycjonowaniu mieloablacyjnym z powodu rutynowych wskazań. Przyczynami wykluczenia było: kondycjonowanie niemieloablacyjne lub o zredukowanej toksyczności, przeszczepienie w trybie ratunkowym, syngeniczne lub wykonane w pierwszych trzech latach działalności ośrodka. Porównanie całej populacji poddanych transplantacji i grupy pacjentów przyjętych do analiz nie wykazało istotnych różnic. Celem analiz porównawczych w zakresie profilaktyki immunosupresyjnej do badanej grupy włączono zarówno pacjentów z wykonanymi, systematycznymi oznaczeniami chimeryzmu, jak i chorych bez oznaczeń. Porównanie obu podgrup nie wykazało różnic poza długością czasu obserwacji i częstością zgonów wczesnych.

Ze względu na rodzaj profilaktyki immunosupresyjnej zależny od statusu chimeryzmu w dobie sześćdziesiątej wyodrębniono 2 podgrupy badawcze: z MC i wczesną redukcją immunosupresji (29 pacjentów) i z CC i opóźnioną redukcją immunosupresji. Grupy porównano z podgrupą chorych, u których profilaktyka była prowadzona niezależnie od oznaczeń chimeryzmu oraz z grupą leczonych w dobie 60-tej z powodu ostrej GvHD.

Przeanalizowano wyniki oznaczeń chimeryzmu we krwi obwodowej i szpiku stwierdzając istotną statystycznie korelację wykonanych badań. W dalszych porównaniach ograniczono się do wyników badań krwi obwodowej.

Analiza wyników oznaczeń chimeryzmu wykazała istotną korelację między mieszanym chimeryzmem stwierdzanym w kolejnych dobach oznaczeń, a częstością wznów choroby w badanej grupie. Nie stwierdzono wpływu postaci uzyskiwanego chimeryzmu w żadnym z punktów czasowych na częstość występowania ostrej i przewlekłej GvHD oraz ogólne przeżycie pacjentów. Porównanie podgrup badawczych wyłonionych na podstawie oznaczeń chimeryzmu i podgrup kontrolnych nie wykazało różnic między grupami w zakresie częstości wznów. Nie odnotowano również istotnego wzrostu częstości ostrej GvHD w żadnej z podgrup. Istotnie wyższy odsetek przewlekłej GvHD stwierdzono jedynie w podgrupie, która w dobie sześćdziesiątej była leczona z powodu ostrej GvHD. Prześledzenie szlaków zmian chimeryzmu i jego dynamiki potwierdziło, że jedynie stabilny CC koreluje z niskim ryzykiem wznowy. W podgrupie pacjentów z MC w dobie 60 stwierdzono istotny statystycznie różnicę w zmianie postaci chimeryzmu w porównaniu z grupy z CC.

Analiza danych dotyczących niezgodności w zakresie grup krwi nie wykazała wpływu niezgodności i jej rodzaju na dalszy przebieg potransplantacyjny. Żadna ze

stwierdzonych niezgodności nie korelowała z częstością wznów, występowania ostrej i przewlekłej GvHD i ogólnym przeżyciem potransplantacyjnym. Badanie chimeryzmu erytropoetycznego możliwe było u 85% pacjentów, po oznaczeniu tzw. mniejszych antygenów grupowych. Status chimeryzmu w żadnym z punktów czasowych badania nie korelował istotnie z opisanymi wyżej powikłaniami. Również długotrwała odnowa autologiczna erytropoezy nie oznaczała większego ryzyka wznowy. Status chimeryzmu osiągniętego w pół roku po transplantacji (w czasie zbliżonym do fizjologicznego przeżycia erytrocytów) nie korelował z uzyskiwaniem niezależności od przetoczeń. Zbadano także dynamikę zmian chimeryzmu erytropoetycznego oraz miana izoaglutynin, ponownie nie stwierdzając wpływu tych zjawisk na częstość wznów choroby. Rodzaj niezgodności nie wpływał istotnie na eliminację własnej erytropoezy.

Nie stwierdzono również istotnej zależności między wynikami oznaczeń chimeryzmu metodą oceny STR i analizy niezgodności grup krwi. Szlaki eliminacji własnych erytrocytów przebiegał niezależnie od eliminacji krwinek jądrzastych.

Wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają istotne klinicznie znaczenie monitorowania chimeryzmu przeszczepowego metodami molekularnymi. Status chimeryzmu osiąganego w dobie sześćdziesiątej i późniejszych jest niezależnym czynnikiem prognostycznym w przewidywaniu wznowy. Szczególne znaczenie ma monitorowanie dynamiki chimeryzmu. Pozwala na wyłonienie grupy pacjentów szczególnie zagrożonych wznową. Skrócenie okresu profilaktyki immunosupresyjnej u pacjentów wolnych od GvHD jest bezpieczne, gdyż nie wpływa na większą częstość jego występowania po redukcji immunosupresji. Stopień redukcji i tempo odstawiania terapii mogą mieć wpływ na ograniczenie odsetka wznów. Określenie optymalnego schematu profilaktyki immunosupresyjnej wymaga jednak dalszych badań.

Oznaczenia chimeryzmu erytropoetycznego nie wykazują wartości prognostycznej w zakresie badanych powikłań potransplantacyjnych. Nie stwierdzono również korelacji między rodzajem niezgodności a występowaniem niepowodzeń transplantacji. Uzyskane wyniki wskazują jednak, że monitorowanie miana przeciwciał może mieć znaczenie u pacjentów z niezgodnością dużą.

Wyniki przeprowadzonych badań upoważniają do sformułowania wniosków dotyczących modyfikacji protokołu opieki potransplantacyjnej u pacjentów z ostrymi białaczkami i wzrostową dynamiką chimeryzmu w dobie 30, 60 i 100. Pacjenci z tej grupy wymagają zwiększenia częstotliwości kontroli po dobie 100 oraz ścisłego monitorowania choroby resztkowej.

9. SUMMARY

Long-term coexistence of donor's and recipient's hematopoiesis after transplantation of blood-producing cells (mixed chimerism – MC), despite continuous research, is still a subject of great concern. Clinical meaning of such phenomenon is controversial. Introducing new methods of evaluating hematopoietic chimerism, based on molecular techniques of much greater sensitivity, allowed to create a hypothesis, that MC is more frequent, than the previously used methods reported. What is more, using hypervariable sequences of DNA overthrew the view, that transplantation after myeloablative conditioning leads to early, complete replacement of recipient's hematopoiesis by donor's one (complete chimerism – CC). The first effect of MC phenomenon may be a development of immunological tolerance mechanisms, leading to weakening of key effect graft versus leukemia, and thereby increasing the risk of treatment failure, disease's relapse. The second element that can contribute to achieve the desired immunological effect of transplantation is immunosuppressive prophylaxis, used to prevent the graft versus host disease (GvHD). As surveys showed, intensity and duration of cyclosporine usage most frequently depend on arbitral decision of transplantologist. Assumptions of prophylaxis scheme are based on historical knowledge, that first 100 days after transplantation, is the time of greatest danger of complications occurrence, depending on activation of immunological system. There is a lack of evidences, that allow to make a decision of shortening, prolonging, or canceling immunosuppressing prophylaxis in treatment of patients free of clinical symptoms of GvHD. The proper assessment of impact created by time of immunosuppressing, and chimerism status is hindered by necessity of patient's long-term monitoring until distant effects. Therefore it requires long-term, constant post-transplantation care of examined patients.

Considering previously mentioned premises, the aim of this research is to assess the meaning of hematopoietic chimerism as a prognostic factor in the area of main complications, leading to transplant failure: mild and severe kind of chronic GvHD and disease's relapse, and to evaluate the utility of chimerism's assessment as an objective determinant of immunosuppressing prophylaxis' maintaining. Researches have been carried out to assess two mainly used prophylaxis standards: early - initiated during third month after transplantation, which is cyclosporine withdrawal, and late – initiated after day +100. Decision concerning the length of therapy, was made based on the outcome of chimerism test carried out in day +60. Prophylaxis was shortened for patients with MC, while remained the same for CC patients until day +100. The decision has been taken on basis of chimerism status, marked by method of assessing short, tandem repeat of DNA (STR). Described method was used in present form since 1998 and nowadays is considered a “gold standard” in assessment of chimerism.

In order to fully assess chimerism, researches have been carried out on erythropoietic chimerism, which is a result of ABO incompatibility between the donor and recipient. The ultimate aim was to create from the ground up a protocol of post-transplant care, ensuring minimal post-transplant risk of disease's relapse and occurrence of chronic GvHD.

The research protocol was simultaneously a draft of post-transplant care protocol. According to this protocol, chimerism marking was carried out monthly until day +100, once every 3 months until second year after transplant, after that once every 6 months.

Chimerism has been marked by studying amplified recipient's DNA. Amplification products, marked with fluorescent agents, have been analyzed with capillary electrophoresis method using automatic sequencer DNA ABI PRISM 310 (Perkin-Elmer). In order to create the semi-quantitative assessment, an area has been defined under the curve of chosen, differentiating files, in at least 1 loci. Donor's and recipient's material has been collected for marking, in pre-transplant period, in early analysis, pointing out the differentiating loci. The chimerism research has been carried out on ABO blood group, Rh antigens, and 6 "smaller" group antigens.

The initially analysed group consisted of 320 patients with transplanted hematopoietic cells in the facility throughout 1994-2011. Because of great diversity of the group, for farther analysis 240 patients were taken. The main reasons for rejection were: non-myeloablative conditioning or with reduced toxicity, emergency transplant, syngenic or performed in first 3 years of the center's activity. Comparison of the selected group with whole population didn't show any key differences. In order to carry out a comparative analysis in the area of immunosuppressing prophylaxis, the group consisted of patients with performed, systematic marking of chimerism, as well as those without them. Comparison of those 2 groups didn't show any significant differences, except length of observation, and the number of early deaths.

On "60" day, 2 subgroups has been created on basis of the immunosuppressing prophylaxis type: first – patients with MC and early reduction of immunosuppression (29 patients), and the second – patients with CC and delayed reduction of immunosuppression. Subgroups have been compared with the group of patients whose prophylaxis was conducted regardless to chimerism status, and with the group of patients treated for severe GvHD on day "60".

The chimerism marking results from marrow and peripheral blood has been analysed, allowing to state a strong correlation not depending on the day of peripheral blood analysis.

The chimerism assessment analysis pointed a strong correlation between MC stated throughout following days of marking, and group's frequency of disease's relapse. The influence of the stated chimerism type on frequency of severe, chronic GvHD occurrence and overall patients' survival has not been stated. Comparison of the research subgroups created on basis of chimerism marking, and control subgroups did not state any differences regarding frequency of disease's relapse. Any substantial increase in frequency of acute GvHD has not been noted. A relevant percent of chronic GvHD has been stated only in a subgroup, which in day "60" was treated because of severe GvHD. Investigating routes of chimerism changes and its dynamics confirmed, that only a stable CC is correlating with a low possibility of a relapse. In a subgroup of patients with MC in day "60" a relevant statistical difference in chimerism type change has been stated, in comparison to a group with CC.

Analysis of data concerning incompatibility in the area of blood groups did not state any influence of such incompatibility and its type on later post-transplant procedure. Any of the stated incompatibility did not correlate with the frequency of disease's relapse, occurrence of chronic and severe GvHD and overall post-transplant survival. Erythropoietic chimerism research was possible to be carried out in 85% of patients, after marking "smaller group antigen". Chimerism status in none of the time points did not correlate significantly with previously described complications. Long-term autolo-

gous regeneration did not result in greater risk of relapse as well. The status has been reached in 6 months after transplant (in a time of potential, physiological-related time of erythrocytes survival time of their complete elimination) did not correlate with achieving independency from transfusions. The dynamics of changes in erythropoietic chimerism has also been researched, as well as value of isoagglutinin, again, with no stated influence of such phenomenon on frequency of disease's relapse. The type of inconsistency did not have any relevant influence on elimination of own erythropoiesis.

A relevant correlation between chimerism marking results using STR assessment method, and blood group inconsistency analysis has not been stated as well. Routes of elimination own erythrocytes proceeded irrespectively to elimination of the nucleated cells.

Results of the carried out researches confirm clinically significant meaning of monitoring post-transplant chimerism with molecular methods. Reaching chimerism status in day "60" and next, is an independent prognostic factor in predicting a relapse. Monitoring chimerism dynamics has a crucial meaning, as it allows selecting patients endangered by a substantial chance of relapse. Shortening of immunosuppressing prophylaxis for patients free of GvHD is safe, and has no influence on increasing frequency of its occurrence after reduction of immunosuppression. The extent of reduction and therapy discontinuing rate may have a potential impact on limiting percent of relapses, however it requires further research.

Erythropoietic chimerism marking do not demonstrate a prognostic value in the area of researched post-transplant complications. What is more, a correlation between inconsistency type and occurrence of researched complications has not been stated. Monitoring changes of antybodies may have a crucial meaning for patients with massive inconsistency.

Presented results empower continuous modification of post-transplant care protocol with modification of immunosuppressive prophylaxis.