

Dr Jacek Toporski, MD, PhD

Streszczenie wykładu:

PRZESZCZEPIANIE HAPLOIDENTYCZNYCH KOMÓREK KRWIOTWÓRCZYCH U DZIECI, CZYLI KAŻDY PACJENT MA DAWCĘ

Rok 1938, Lwów, Uniwersytet im. Jana Kazimierza. Profesor Jan Raszek-Rosenbusch i dr. Franciszek Groer przeprowadzili pierwszą w Polsce, a prawdopodobnie również pierwszą na świecie transplantację szpiku. Kilka mililitrów szpiku pobranego od zdrowego dawcy (rodzeństwa lub jednego z rodziców) podano doszpikowo (domostkowo). Zabieg ten powtarzano kilkakrotnie u tego samego pacjenta, a transplantacji poddano kilku pacjentów. Oczywiście, z braku wiedzy o antygenach zgodności tkankowej i ich znaczeniu w transplantologii zabiegi te skazane były na niepowodzenie. Wojna przerwała pracę lekarzy ze Lwowa, a wyniki przedwojennych eksperymentów opublikowali oni dopiero w 1949 roku w *Annals of Paediatrics* („Technique and indications of the therapeutic intramedullar transfusion of the bone marrow in children”).

Użycie bomby atomowej pod koniec II Wojny Światowej, a później wypadki w amerykańskich elektrowniach atomowych skłoniły do podjęcia na nowo koncepcji zastąpienia uszkodzonego szpiku kostnego przez zdrowy szpik od dawcy. Próby podejmowane w latach 50-tych dwudziestego wieku były jednak nieudane. Tym niemniej już wtedy sformułowano hipotezę, że przeszczepienie szpiku kostnego może być także skuteczną metodą leczenia białaczki, a hipotezę tę potwierdzono na modelach zwierzęcych. Dynamiczny rozwój transplantacji szpiku kostnego w dzisiejszym rozumieniu zapoczątkowało odkrycie i poznanie znaczenia antygenów zgodności tkankowej zwanych antygenami transplantacyjnymi. Pozwoliło to na dobór zgodnych dawców oraz zmniejszenie zarówno ryzyka odrzucenia przeszczepu jak i ryzyka wystąpienia choroby „przeszczep przeciwko gospodarzowi” (*graft versus host disease* – GvHD).

Jednak o powodzeniu transplantacji szpiku, który to zabieg z formalnego punktu widzenia powinien się nazywać transplantacją komórek krwiotwórczych, decyduje szereg innych czynników. Niezwykle istotnie jest leczenie cytostatykami przed transplantacją. Ta chemioterapia lub czasami chemioradioterapia niszczy układ odpornościowy biorcy oraz przygotowuje miejsce dla przeszczepianych komórek krwiotwórczych. U pacjentów z chorobą nowotworową (na przykład białaczką) to tak zwane cytostatyczne uwarunkowanie przeszczepu (*conditioning* - kondycjonowanie) ma również działanie przeciwbiałaczkowe – eliminuje resztkowe, często oporne na inne leczenie, komórki białaczkowe.

Oczywiście transplantacja komórek krwiotwórczych, tak jak transplantacja każdego innego narządu prowadzi do interakcji komórek biorcy z komórkami dawcy w mechanizmie odrzucenia przeszczepu. Natomiast, jeżeli przeszczepione komórki rozpoznają komórki biorcy jako obce = non-self, to taka interakcja może prowadzić do sytuacji odwrotnej, czyli do odrzucenia przeszczepu, sytuacji, która nosi nazwę GvHD. Ryzyko tych powikłań jest tym mniejsze, im większa jest zgodność tkankowa między dawcą i biorcą. Niestety nawet 100% zgodność nie daje 100 % gwarancji, że wymienione wyżej powikłania nie wystąpią. Dlatego niezbędna jest przedprzeszczepowa chemio- lub chemioradioterapia, czasem z użyciem swoistych przeciwciał antylimfocytarnych, w celu eliminacji limfocytów pacjenta zdolnych do odrzucenia. Ta tak zwana immunoablacja stosowana jest często jako dodatek do chemioradioterapii w przypadku: transplantacji komórek krwiotwórczych od dawcy niespokrewnionego, krwi pępowinowej lub transplantacji od dawców częściowo zgodnych w układzie zgodności tkankowej. Ryzyko wystąpienia GvHD można zmniejszyć przez

stosowanie profilaktyki tego powikłania. Złoty standard stanowi nadal, po ponad 40 latach stosowania, profilaktyka farmakologiczna przy użyciu Cyklosporyny A (od dnia poprzedzającego transplantację) i małych dawek Metotreksatu (zwykle w dniu +1, +3, +6, +11) po przeszczepieniu. Czasami stosuje się niewielkie dawki hormonów nadnerczy lub „mechanicznie” usuwa się z przeszczepu komórki, które mogą rozpoznać tkanki gospodarza jako obce (non-self) i spowodować ich uszkodzenie w procesie GvHD.

W dalszych rozważaniach pominiemy transplantacje autologicznych (własnych) komórek krwiotwórczych, który to zabieg pozwala jedynie na przeprowadzenie wysokodawkowej, niszczącej szpik kostny chemioterapii poprzez odtworzenie funkcji krwiotwórczej. Czasem ten zabieg wykonywany jest w celu wykonania „resetu” układu immunologicznego w leczeniu chorób z autoagresji (np. w stwardnieniu rozsianym).

Przeszczepienie obcych - allogenicznych komórek krwiotwórczych oznacza przeszczepienie komórek pobranych od dawcy. Początkowo przeszczepiano szpik kostny i stąd w potocznym obiegu funkcjonuje zwyczajowa nazwa „przeszczepienie szpiku”. Jednak z czasem stwierdzono, że komórki krwiotwórcze zdolne do rekonstrukcji krwiotworzenia znajdują się również we krwi obwodowej, krwi pępowinowej a także w śledzionie. Obecnie w zależności od wskazań, wieku dawcy, a także czasem od preferencji ośrodka przeszczepiającego wykonywane są transplantacje komórek pobranych ze szpiku, krwi obwodowej, lub krwi pępowinowej - dlatego nazwa przeszczepianie szpiku została zastąpiona przez określenie **transplantacja komórek krwiotwórczych**. Ciągłe obowiązuje zasada, że dawca komórek krwiotwórczych powinien być jak najbardziej zgodny z pacjentem. Najlepszym dawcą, przynajmniej w klasycznych wskazaniach do transplantacji, jest zgodny dawca rodzinny (brat lub siostra). Liczba pacjentów, którzy mają zgodnego dawcę rodzinnego jest ograniczona i waha się w granicach 20 - 25 % a obecny model rodziny posiadającej 1 lub 2 dzieci powoduje zmniejszenie liczby zabiegów przeszczepienia od zgodnego dawcy rodzinnego. W przypadku braku zgodnego dawcy rodzinnego transplantacja jest w dalszym ciągu możliwa, ale w takiej sytuacji trzeba rozpocząć poszukiwanie dawcy alternatywnego. Takim dawcą alternatywnym może być zgodny dawca niespokrewniony (MUD) lub częściowo zgodny dawca rodzinny (dawca haploidentyczny). Przeszczepienie krwi pępowinowej to w praktyce przeszczepienie komórek od dawcy niespokrewnionego zwykle częściowo zgodnego z pacjentem, przy czym kryterium zgodności jest mniej restrykcyjne niż w przypadku od dorosłego dawcy niespokrewnionego, kiedy w zasadzie bez problemów akceptuje się zgodność 9/10 (zgodność antygenowa lub alleliczna). Zgodność między dawcą i biorcą w 8 na 10 antygenów lub alleli budzi już większe kontrowersje i często nie akceptuje się takiego dawcy (z wyłączeniem niezgodności przy przeszczepianiu krwi pępowinowej).

Szczególnym rodzajem transplantacji jest przeszczepianie komórek krwiotwórczych od dawcy rodzinnego częściowo zgodnego w układzie HLA. Ten rodzaj transplantacji wymaga specjalnego przygotowania pacjenta w celu zminimalizowania ryzyka odrzucenia przeszczepu oraz specjalnej obróbki przeszczepianych komórek w celu zminimalizowania ryzyka wystąpienia choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi. Transplantacja od dawcy rodzinnego częściowo zgodnego nazywana jest **transplantacją haploidentyczną**.

Haplo jest tak zwanym tematem słowotwórczym wywodzącym się ze starogreckiego ἀπλοῦς. Jest to pierwszy człon wyrazów złożonych i oznacza pojedynczy, prosty. Genotyp człowieka składa się z dwóch haplotypów odziedziczonych od rodziców - określenie haploidentyczny oznacza zgodność w jednym haplocie = zgodność w połowie antygenów transplantacyjnych. W praktyce rodzice są:

- w połowie zgodni = haploidentyczni ze swoimi dziećmi,
- dzieci są w połowie zgodni z rodzicami,
- rodzeństwo między sobą może być całkowicie zgodne, haploidentyczne lub całkowicie niezgodne.

Wynika z tego, że w praktyce każde dziecko, a właściwie każdy pacjent ma dawcę haploidentycznego, oczywiście poza wyjątkowymi przypadkami, na przykład dzieci adoptowanych bez możliwości dotarcia do biologicznych członków rodziny.

W 1996 roku, na kursie Bone Marrow Transplantation in Children w Erice na Sycylii, Franco Aversa z Uniwersytetu w Peruggi zaprezentował wyniki przeszczepiania komórek krwiotwórczych od dawców haploidentycznych (haploSCT). Prezentacja ta była inspiracją dla programu transplantacji haploidentycznych w Klinice Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej we Wrocławiu. Fundacja „Na Ratunek Dzieciom z Chorobą Nowotworową” zakupiła urządzenie do immunomagnetycznej selekcji komórek krwiotwórczych, a odczynniki sfinansowano z grantu KBN. Pierwszą haplo SCT wykonano jesienią 1998 u niemowlęcia z ciężkim wrodzonym niedoborem odporności (SCID).

Początkowo przeszczepiano wyselekcjonowane komórki krwiotwórcze (pozytywna selekcja tak zwanych komórek CD34+). Z czasem udoskonalono metodę usuwania limfocytów T (CD3+) którą ostatnio zastąpiono jeszcze bardziej precyzyjną deplecją subpopulacji limfocytów T wykazujących obecność TCR (T Cell Receptor), w skład którego wchodzi łańcuchy α oraz β . Te właśnie komórki są w pierwszej kolejności odpowiedzialne za reakcję przeszczep przeciwko gospodarzowi i ich selektywne usunięcie zmniejsza ryzyko wystąpienia tego powikłania. Generowanie limfocytów mogących rozpoznać i reagować na różne patogeny - wirusy, bakterie lub grzyby stwarza możliwości zmniejszenia ryzyka po przeszczepowych powikłań infekcyjnych, które to powikłania są poza wznową choroby podstawowej najczęstszą przyczyną niepowodzenia w transplantacjach haploidentycznych.

To deplete or not to deplete that is the question. Przez lata głównym sposobem na pokonanie biologicznej bariery, pokonanie niezgodności między pacjentem i dawcą było mechaniczne (immunomagnetyczne) usuwanie z przeszczepu komórek zdolnych odpowiedzieć na stymulację antygenami dawcy. Ta metoda jest niezwykle skuteczna ale jej wadą jest konieczność przygotowania komórek ex vivo, wymaga specjalistycznego sprzętu, jest w końcu droga i wyjątkowo czasochłonna. Alternatywą haploidentycznych transplantacji z deplecją limfocytów jest przeszczepienie nieprzetworzonych komórek i podanie po transplantacji cyklofosfamidu, cytostatyku który skutecznie niszczy komórki dawcy, które stały się aktywne w odpowiedzi na stymulację antygenami biorcy - tak zwane **komórki alloreaktywne** – i w ten sposób przełamanie biologicznej bariery niezgodności. Wadą tej metody jest konieczność długotrwałej i wielolekowej immunosupresji, która w ogóle nie jest wymagana w transplantacji z wyłączeniem - T-deplecją.

Na Oddziale Onkologii, Hematologii, Immunologii Dziecięcej Szpitala Uniwersyteckiego w Lund (Skåne University Hospital) transplantacje haploidentyczne wykonywane są od roku 2005. W tym czasie wykonano 59 zabiegów u 51 dzieci. Charakterystyka pacjentów znajduje się w tabeli poniżej. Należy przy tym podkreślić, że wszyscy pacjenci ze wskazaniami nowotworowymi mieli chorobę wysokiego ryzyka, zwykle oporną na konwencjonalne leczenie.

We wszystkich przypadkach dawcą było jedno z rodziców. Komórki krwiotwórcze pobierano w procesie aferezy z krwi obwodowej po 3-5 dniowej mobilizacji przy pomocy czynnika wzrostowego (GCSF). Do roku 2011 połowa aferezatu podlegała immunomagnetycznej deplecji CD3 dodatnich limfocytów, a z drugiej połowy selekcjonowano komórki CD34 pozytywne. Od roku 2012 jedyną metodą opracowania komórek do transplantacji jest immunomagnetyczne usuwanie limfocytów TCR $\alpha\beta$ pozytywnych. Ponieważ takie przetwarzanie ex vivo komórek przed transplantacją nie zmienia liczby limfocytów B, zastosowano deplecję limfocytów B in vivo przy pomocy przeciwciał monoklonalnych (preparat zwany rituximab) podawanych dzień po transplantacji. W przeciwnym razie przeszczepienie dużej liczby limfocytów B jest znanym czynnikiem ryzyka rozwoju chłoniaka stymulowanego proliferacją wirusa Epstein-Barr. Do roku 2013

były dostępne przeciwciała monoklonalne anti-CD3 (OKT3) i tych przeciwciał używano w okresie około przeszczepowym (od dnia -8 do dnia +21) w celu dodatkowej immunosupresji mającej głównie na celu zmniejszenie ryzyka odrzucenia przeszczepu. Po roku 2013 zastąpiono OKT3 surowicą antylimfocytarną (ATG) podawaną od -11 do -8 dnia przed przeszczepem.

Tab. 1. Charakterystyka pacjentów

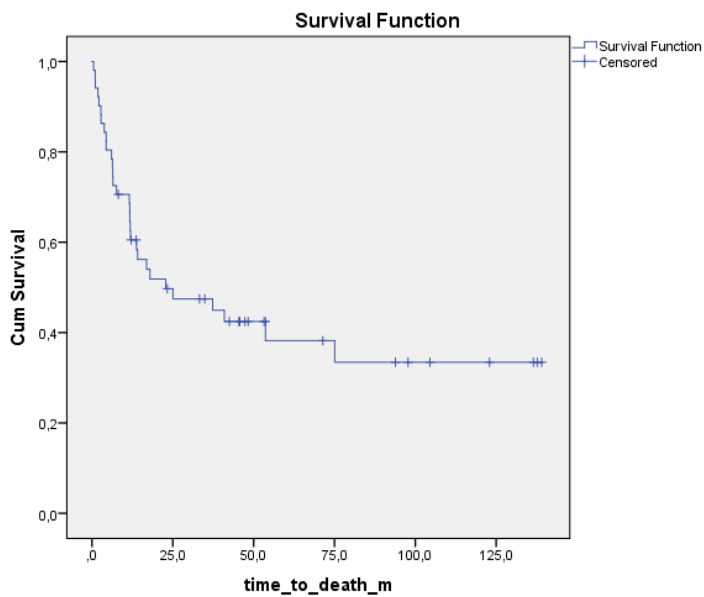
| | N | Płeć (M/K) | Wiek (lata, mediana, zakres) |
|---------------------------------|-----|---------------|---------------------------------|
| Cała grupa | 51 | 32/19 | 5,5 (0,1 – 17,8) |
| Białaczka | 21 | 12/9 | 8,2 (0,7 – 17,4) |
| <i>ALL</i> | 13 | | |
| <i>AML</i> | 5 | | |
| <i>MDS/JMML</i> | 2/1 | | |
| Guz lity | 18 | 12/6 | 6,5 (3,0 – 17,8) |
| <i>Neuroblastoma</i> | 15 | 10/5 | |
| <i>RMS</i> | 1 | | |
| <i>Guz Wilmsa</i> | 1 | | |
| <i>Mięsak Ewinga</i> | 1 | | |
| Ch. nienowotworowa | 12 | 8/4 | 1,2 (0,1 – 8,1) |
| <i>SCID</i> | 6 | 4/2 | |
| <i>Osteopetroza</i> | 2 | | |
| <i>Mukopolisacharydoza VI</i> | 2 | | |
| <i>Anemia Fanconiego</i> | 1 | | |
| <i>SAA (anemia aplastyczna)</i> | 1 | | |

Prawie wszyscy pacjenci otrzymali chemioterapię przedprzeszczepową złożoną z Fludarabiny, Tiotepy i Melfalanu. Pacjenci ze wskazaniami nienowotworowymi otrzymali chemioterapię mieloablacyjną z Busulfanem dożylnie (dawkowanie indywidualne w zależności od wyniku badań farmakodynamicznych). Pacjenci z klasycznym złożonym niedoborem odporności (SCID) nie otrzymali żadnej chemioterapii. Wszyscy pacjenci z NBL otrzymali wysoką dawkę MIGB (terapeutyczny izotop jodu I¹³¹) około 3 tygodnie przed rozpoczęciem kondycjonowania. W przypadku gdy liczba resztkowych, kontaminujących przeszczep limfocytów T przekraczała 25x10³/kg biorcy dodatkowo stosowano 4 tygodniową profilaktykę GvHD podając mykofenolat mofetilu.

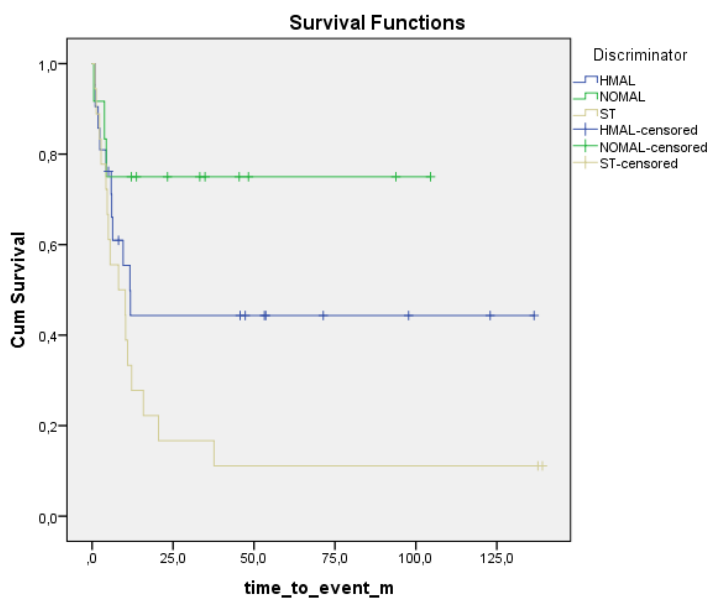
Trwałą allogeniczną odnowę hematologiczną obserwowano u 49 z 51 pacjentów (jeden pacjent zmarł w dniu +16, przed odnową). Jeden pacjent odnowił się autologicznie. U pięciu pacjentów stwierdzono odrzucenie przeszczepu, wykonano retransplantację, po której uzyskano trwałą hematopoezę. Czterech innych pacjentów przeszczepiono po raz drugi, ale w tym wypadku wskazaniem do powtórzenia zabiegu była wznowa choroby podstawowej. Na dzień 7 marca 2017 roku żyje 21/51 pacjentów (mediana 4 lata, 0,7 – 11,5). Biorąc pod uwagę, że większość dzieci należała do grupy wysokiego ryzyka (transplantacja po wznowie lub w przypadku choroby odpornej na konwencjonalne leczenie) przeżycie 10/21 pacjentów z białaczką może być całkiem satysfakcjonujące. 30 pacjentów zmarło (mediana 9,6 miesięcy, 0,5-75). W przypadku transplantacji w grupie pacjentów ze wskazaniami onkologicznymi główną przyczyną zgonu była wznowa choroby (23/27). Cztero dzieci (4/27) z tej grupy zmarło w remisji choroby - dwóch pacjentów z ALL w przebiegu ostrego zapalenia wątroby wywołanego przez adenowirusa i dwóch z przebiegu powikłań ostrej sterydoopornej choroby GvHD, w obu przypadkach po profilaktycznym podaniu limfocytów

dawcy (DLI). Warto podkreślić, że poza tymi dwoma pacjentami ostra choroba GvHD nie stanowiła istotnego problemu klinicznego. Żaden z pacjentów nie rozwinął przewlekłej formy choroby GvHD. Łącznie 7/51 pacjentów zmarło w powodu komplikacji związanych z transplantacją.

W grupie przeszczepianych ze wskazań nie onkologicznych żyje 9/12 pacjentów - mediana 35 miesięcy, (12 – 105). Troje dzieci zmarło 16, 114 i 132 dni po transplantacji: jedno w przebiegu posocznicy wywołanej *Klebsiella pneumoniae*, a dwoje z powodu nieokreślonej, prawdopodobnie wirusowej infekcji układu oddechowego i gwałtownie postępującej niewydolności oddechowej. Poniższe diagramy przedstawiają prawdopodobieństwo przeżycia po przeszczepieniu szpiku, łącznie dla całej grupy pacjentów (Rys. 1) i z podziałem na 3 kategorie (Rys. 2).



Rys.1.
Prawdopodobieństwo przeżycia dla całej grupy pacjentów poddanych haploidentycznej transplantacji szpiku (41,2%).



Rys. 2.
Prawdopodobieństwo przeżycia po haploidentycznej transplantacji szpiku w zależności od rodzaju rozpoznania (białaczki – 47,6%, guzy lite – 11,1%, choroby nienowotworowe – 75%).

Obecnie nie podważa się znaczenia transplantacji haploidentycznych komórek krwiotwórczych. Co więcej wydaje się, że w niedługim czasie ten rodzaj transplantacji stanie się istotną platformą terapii komórkowej i pozwoli na zrozumienie i wykorzystanie mechanizmów odpowiedzi immunologicznej w kontroli procesu nowotworzenia. Jak na razie potencjalne korzyści są w części niwelowane przez długotrwałe upośledzenie układu odpornościowego. Śmiertelność przeszczepowa jest w dalszym ciągu wysoka i konieczne jest opracowanie metod pozwalających na szybsze odzyskanie sprawności immunologicznej przez przeszczepione komórki immunokompetentne. Jednakże samo tylko ograniczenie śmiertelności spowodowanej przez infekcje, zwłaszcza wirusowe, będzie dużym krokiem naprzód.

Generacja komórek antygenowo-specyficznych to następne wyzwanie. Próby wykorzystywania niemodyfikowanych limfocytów dawcy (*donor lymphocyte infusion*) mają co prawda swoje przesłanki teoretyczne, ale z drugiej strony wiadomo, że ryzyko trudnej do kontroli/leczenia GvHD jest wysokie, widać to także w naszej grupie pacjentów. Z tego punktu widzenia atrakcyjna wydaje się być hipoteza, że alloreaktywne (mogące zainicjować GvHD) limfocyty znajdują się we frakcji tak zwanych naiwnych, CD45RA dodatnich limfocytów. Obecna technologia pozwala na wykrycie i skuteczne usunięcie tych limfocytów z próbki krwi pobranej od dawcy i z pozostawieniem limfocytów pamięci, które odpowiedzialne są za szybką odpowiedź i skuteczną obronę przed patogenami (wirusy, bakterie). W ten sposób można korygować upośledzoną przez przeszczepieniem odporność poprawiając funkcje obronne bez zwiększonego ryzyka GvHD. Pamiętając dwóch pacjentów z ALL, którzy zmarli w remisji białaczki z powodu gwałtownej niewydolności wątroby w przebiegu zakażenia adenowirusem zaplanowano wstępne badanie kliniczne. Celem było sprawdzenie bezpieczeństwa podawania limfocytów T po deplecji komórek CD45RA pozytywnych u pacjentów z reaktywacją infekcji wirusowej. Próbę tą wykonano u 6 pacjentów. Podano od 25000 lub 50000 komórek/kg cc bez żadnych objawów GvHD. Uzyskano skuteczną redukcję liczby kopii wirusów lub całkowitą eliminację wirusa bez zaostrzenia objawów klinicznych infekcji.

Początkowo haploprzeszczep był alternatywą w przypadku braku zgodnego dawcy lub braku czasu na poszukiwanie optymalnego dawcy. Obecnie wskazania do haploSCT wykraczają poza wskazania związane z wymianą chorej hematopoezy. To wskazanie pozostaje oczywiście aktualne w chorobach nienowotworowych. HaploSCT oraz przeszczepowa infuzja limfocytów (DLI), generowanie cytotoksycznych limfocytów rozpoznających antygeny nowotworowe, jest atrakcyjną i dynamicznie eksplorowaną koncepcją leczenia chorób nowotworowych układu krwiotwórczego, jak i również niektórych nowotworów narządowych. Postuluje się możliwość indukcji efektu przeszczep przeciwko nowotworowi (*graft versus neoplasia/tumor/leukemia*). Efekt ten jest mediowany przez immunokompetentne komórki dawcy (limfocyty T, komórki NK) i daje szansę skutecznego leczenia nawet w przypadkach oporności na leczenie cytostatyczne.