

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Jelena Rascon

**CHIMERIZMO ANALIZĖ ATSKIROSE LĄSTELIŲ  
POPULIACIJOSE PO ALOGENINĖS KRAUJODAROS  
KAMIENINIŲ LĄSTELIŲ TRANSPLANTACIJOS  
VAIKAMS**

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, medicina (07 B)

Vilnius, 2009

Disertacija rengta:

2002 – 2006 metais Humboldto universitete (Berlynas)

Mokslinis vadovas:

prof. habil. dr. Gerhard Gaedicke (Humboldto universitetas, Berlynas, biomedicinos mokslai, medicina – 07 B)

2007 – 2009 metais Vilniaus universitete

Mokslinis konsultantas:

prof. habil. dr. Vytautas Usonis (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 07 B)

Disertacija ginama eksternu

## SANTRUMPOS

ALD	adrenoleukodistrofija
ALP	atskiros ląstelių populiacijos
CD3	T limfocitai
CD19	B limfocitai
CD34	kraujodaros kamieninės ląstelės
CNS	centrinė nervų sistema
DC	donoro chimerizmas
DNR	dezoksiribonukleino rūgštis
FA	Fanconi anemija
KKL	kraujodaros kamieninės ląstelės
KKLT	kraujodaros kamieninių ląstelių transplantacija
LIN	ligonio identifikacijos numeris
MC	mišrus chimerizmas
PGR	polimerazės grandininė reakcija
PI	pasikliautinasis intervalas
PKL	periferinio kraujo leukocitai
SP	standartinė paklaida
TPŠL	transplantato prieš šeimininką liga
ŪLL	ūmi limfoblastinė leukemija

## TURINYS

<b>1. ĮVADAS .....</b>	<b>7</b>
1.1. Darbo aktualumas .....	7
1.2. Darbo tikslas .....	9
1.3. Darbo uždaviniai .....	9
1.4. Darbo naujumas .....	10
1.5. Darbo praktinė reikšmė .....	10
1.6. Ginamieji disertacijos teiginiai .....	11
<b>2. LITERATŪROS APŽVALGA .....</b>	<b>12</b>
2.1. Chimerizmo reikšmė ir tyrimo metodai .....	12
2.1.1. Chimerizmo reikšmė po alogeninės KKLТ .....	12
2.1.2. Chimerizmo tyrimo metodai .....	13
2.1.3. Chimerizmo tyrimo jautrumo padidinimo būdai .....	15
2.2. Chimerizmo reikšmė sergant ŪLL.....	17
2.2.1. Alogeninė KKLТ gydant vaikų ŪLL .....	17
2.2.2. Chimerizmo ryšys su leukemijos recidyvu.....	19
2.2.3. Chimerizmo tyrinėjimai atskirose ląstelių populiacijose .....	20
2.2.4. Chimerizmo reikšmė imunoterapijai .....	23
2.3. Chimerizmo reikšmė sergant FA .....	25
2.3.1. Alogeninė KKLТ gydant FA .....	25
2.3.2. Chimerizmo tyrinėjimai sergant FA.....	27
2.3.3. Chimerizmas ir transplantato atmetimas .....	28
2.4. Chimerizmo reikšmė sergant ALD .....	30
2.4.1. Alogeninė KKLТ gydant ALD .....	30
2.4.2. Chimerizmo tyrinėjimai sergant ALD.....	33
2.5. Alogeninės KKLТ Lietuvoje .....	35
2.5.1. KKL transplantacijų tarnyba Lietuvoje .....	35
2.5.2. Chimerizmo tyrimų raida Lietuvoje.....	36
<b>3. TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI.....</b>	<b>38</b>
3.1. Tyrimo metodologija.....	38
3.2. Tiriamieji ligoniai .....	39

3.2.1. Chimerizmo analizė atskirose ląstelių populiacijose .....	39
3.2.2. Lietuvoje transplantuotų vaikų chimerizmo analizė .....	40
3.3. Chimerizmo tyrimo metodika.....	40
3.3.1. Tiriamoji medžiaga.....	40
3.3.2. Atskirų ląstelių populiacijų išskyrimas .....	41
3.3.3. DNR išskyrimas .....	42
3.3.4. DNR kiekio matavimas.....	43
3.3.5. DNR žymenų gausinimas PGR metodu .....	43
3.3.6. Kapiliarinė elektroforezė .....	44
3.3.7. Elektroferogramos vertinimas.....	45
3.4. Chimerizmo apibrėžimas ir vertinimas .....	47
3.5. Statistinė duomenų analizė .....	48
<b>4. REZULTATAI.....</b>	<b>49</b>
4.1. Ūmi limfoblastinė leukemija .....	49
4.1.1. Ligonių klinikiniai rodikliai.....	49
4.1.2. ALP analizė esant visiškam donoro chimerizmui PKL .....	49
4.1.3. Mišrus chimerizmas PKL ir ALP.....	53
4.1.4. Klinikinių rodiklių ir chimerizmo PKL lyginamoji analizė .....	55
4.1.5. Chimerizmo PKL ir ALP įtaka išgyvenamumui po transplantacijos.....	57
4.2. Fanconi anemija .....	59
4.2.1. Ligonių klinikiniai rodikliai.....	59
4.2.2. ALP analizė esant visiškam donoro chimerizmui PKL .....	61
4.2.3. ALP analizė esant mišriam chimerizmui PKL .....	61
4.2.4. Klinikinių rodiklių ir chimerizmo lyginamoji analizė.....	65
4.2.5. Chimerizmo PKL ir ALP įtaka išgyvenamumui po transplantacijos.....	67
4.3. Adrenoleukodistrofija.....	69
4.3.1. Ligonių klinikiniai rodikliai.....	69
4.3.2. ALP analizė esant visiškam donoro chimerizmui PKL .....	69
4.3.3. ALP analizė esant mišriam chimerizmui PKL .....	72

4.3.4. Klinikinių rodiklių ir chimerizmo lyginamoji analizė.....	74
4.3.5. Chimerizmo PKL ir ALP įtaka išgyvenamumui po transplantacijos.....	74
4.4. Lietuvoje transplantuotų vaikų chimerizmo analizė.....	77
4.4.1. Ligonių klinikiniai rodikliai.....	77
4.4.2. Chimerizmo kinetikos analizė.....	79
4.4.3. Klinikinių rodiklių ir chimerizmo lyginamoji analizė.....	81
4.4.4. Chimerizmo įtaka išgyvenamumui po transplantacijos .....	83
<b>5. REZULTATŲ APTARIMAS.....</b>	<b>86</b>
5.1. Ūmi limfoblastinė leukemija .....	86
5.2. Fanconi anemija .....	98
5.3. Adrenoleukodistrofija.....	110
5.4. Lietuvoje transplantuotų vaikų chimerizmo analizė.....	116
<b>6. IŠVADOS.....</b>	<b>124</b>
<b>7. PRAKTINĖ TYRIMO REIKŠMĖ .....</b>	<b>125</b>
7.1. Darbo rezultatų praktinė reikšmė.....	125
7.2. Chimerizmo tyrimo rekomendacijos po alogeninės KKLTV vaikams .....	126
<b>8. LITERATŪROS SĄRAŠAS .....</b>	<b>127</b>
<b>9. SPAUSDINTI DARBAI DISERTACIJOS TEMA .....</b>	<b>165</b>
9.1. Straipsniai leidiniuose, įrašytuose į Mokslinės informacijos instituto (ISI) sąrašą.....	165
9.2. Straipsniai Lietuvos recenzuojamuose periodiniuose leidiniuose.....	165
<b>10. PRIEDAI.....</b>	<b>166</b>
10.1. Ligonio tyrimo anketa (1 priedas).....	166
10.2. Asmens informavimo ir informuoto asmens sutikimo forma (2 priedas).....	167
<b>11. PADĖKA.....</b>	<b>168</b>

# 1. ĮVADAS

## 1.1. DARBO AKTUALUMAS

Alogeninė kraujodaros kamieninių ląstelių transplantacija (KKLT) – tai sudėtingas gydymo metodas, kuris suteikia galimybę pasveikti ligoniams, sergantiems nepagydomomis ligomis. Pirmoji alogeninė KKLT atlikta 1968 metais ligoniui, sirgusiam sunkiu imunodeficitu (Good R.A. ir kt., 1969). Nuo to laiko transplantacijų skaičius nuolat auga visame pasaulyje ir šiuo metu Europoje siekia 9000 KKLT per metus (Gratwohl A. ir kt., 2007). Transplantacijos rezultatai priklauso nuo daugelio veiksnių: transplantato prieš šeimininką ligos (TPŠL) (Socié G. ir kt., 1999; Zecca M. ir kt., 2002; Guardiola P. ir kt., 2004), toksinių-infekcinių komplikacijų (Gratwohl A. ir kt., 2005; Robin M. ir kt., 2007), leukemijos recidyvo (Eapen M. ir kt., 2004). Šių veiksnių tarpusavio sąveika lemia sėkmingą arba lemtingą transplantacijos baigtį, todėl ankstyva šių komplikacijų diagnostika yra labai svarbi ligonių pasveikimui.

Vienas pagrindinių alogeninės transplantacijos vertinimo būdų yra chimerizmo tyrimas. Tiriama chimerizmą, nustatoma kokios kilmės – iš donoro ar recipiento kraujodaros kamieninių ląstelių (KKL) – yra recipiento kraujo ląstelės. Chimerizmo tyrimas leidžia įvertinti persodintų KKL prigijimą, transplantato prieš šeimininką ir transplantato prieš leukemiją reakcijas, leukemijos recidyvo ir transplantato atmetimo riziką (Petz L.D., 1994). Skiriamas visiškas donoro chimerizmas (DC), kuomet visos tiriamos ląstelės yra donoro kilmės ir mišrus chimerizmas (MC), kai tuo pačiu metu aptinkamos donoro ir recipiento ląstelės. Potransplantacinių komplikacijų savalaikią diagnostiką labai svarbu naudoti kuo jautresnę chimerizmo tyrimo metodiką. Šiuo metu chimerizmui tirti plačiai naudojami polimorfiniai dezoksiribonukleino rūgšties (DNR) žymenys (Antin J.H. ir kt., 2001; Bader P. ir kt., 2005a). Šių žymenų analizė periferinio kraujo leukocituose (PKL) užtikrina tyrimo jautrumą iki  $1-5 \times 10^{-2}$  (Lion T., 2003; Schraml E. ir kt., 2003,

McCann S.R. ir Lawler M., 2004). PKL suskaidymas į atskiras ląstelių populiacijas (ALP) padidina tyrimo jautrumą iki  $10^{-3}$ – $10^{-4}$  (Lion T., 2001).

Mokslinėje literatūroje gana gausu publikacijų, nagrinėjančių chimerizmą leukemija sergantiems ligoniams. Klinikiniai tyrimai rodo, kad chimerizmo analizė ALP gali būti naudinga ankstyvai leukemijos recidyvo diagnostikai (Zetterquist H. ir kt., 2000; Mattsson J. ir kt., 2001a; Thiede C. ir kt., 2002) ir TPŠL rizikos įvertinimui (Mattsson J. ir kt., 2001b). Šių studijų trūkumas yra tame, kad buvo vertinami pacientai, sergantys įvairiomis leukemijos formomis, kuriems skirta skirtinga parengiamoji chemoterapija (kondicionavimas). Be to, dažniausiai buvo analizuota tik viena ląstelių populiacija. Nuoseklus chimerizmo stebėjimas įvairiose ALP po alogeninės transplantacijos vaikams iki šiol yra nėra atliktas.

Vienas vaikų alogeninės KKLТ ypatumų – gana didelė dalis ligonių, transplantuojamų dėl nepiktybinių kraujo ligų. Šios ligos dažniausia pasireiškia ankstyvoje vaikystėje ir pasižymi laipsnišku progresavimu. Dėl šių susirgimų patogenezės ypatumų sėkmingi transplantacijos rezultatai pasiekti palyginus neseniai (Baumann M. ir kt., 2003; Gluckman E. ir Wagner J.E., 2008). Įvairiose mokslinėse publikacijose didžiausias dėmesys skiriamas kondicionavimo optimizavimui (Wagner J.E. ir kt., 2007) ir donoro parinkimui (Guardiola P. ir kt., 2000; Resnick I.B. ir kt., 2005; Gluckman E. ir kt., 2007), tačiau iki šiol neradome studijų, tyrinėjančių chimerizmą. ALP izoliacijos reikšmė chimerizmo analizei sergant šiomis ligomis taip pat nėra aprašyta.

Šis mokslinis darbas pradėtas Humboldto universiteto Charité klinikų Vaikų kaulų čiulpų transplantacijos skyriuje, vykdant doktorantūros studijas Humboldto universitete (Berlynas, Vokietija). Tai vienas didžiausių vaikų KKLТ centrų Europoje ([www.ebmt.org](http://www.ebmt.org)), kuriame pagrindinę transplantuojamų ligonių dalį sudaro vaikai, sergantys ūmia limfoblastine leukemija (ŪLL), Fanconi anemija (FA) ir adrenoleukodistrofija (ALD). Būtent šios ligonių grupės buvo pasirinktos chimerizmo tyrinėjimams – tai skirtingos patologijos, kurioms taikoma skirtinga transplantacijos taktika. Dėl to galima būtų tikėtis skirtingos chimerizmo kinetikos.



Tęsiant darbą Vilniaus universitete, siekta įvertinti nuosavą patyrimą vaikų hematologinės transplantacijos srityje. Lietuvoje pirmoji KKLТ vaikams atlikta 2002 m. vasario mėnesį, transplantacijų rezultatai atitinka pasaulinę praktiką. Tačiau Lietuvos vaikams chimerizmo tyrinėjimai iki šiol nebuvo atlikti. ALP išskyrimas mūsų šalyje kol kas neatliekamas. Manome, kad chimerizmo analizė ALP remiantis kitos klinikos patirtimi gali būti naudinga, siekiant išsiaiškinti šio metodo svarbą vaikų alogeninei KKLТ ir įvertinti jo įdiegimo Lietuvoje būtinumą.

## **1.2. DARBO TIKSLAS**

Pagerinti vaikų ištyrimą po alogeninės KKLТ, įvertinus chimerizmo pokyčių ALP reikšmę ankstyvai gyvybei pavojingų komplikacijų diagnostikai.

## **1.3. DARBO UŽDAVINIAI**

1. Nustatyti DC ir MC dažnį PKL ir ALP atskirose ligų grupėse po specifinio kondicionavimo.
2. Palyginti chimerizmo kinetiką PKL ir ALP.
3. Nustatyti chimerizmo PKL ir ALP ryšį su ligos recidyvu ir transplantato atmetimu.
4. Išanalizuoti prieštransplantacinių veiksnių įtaką chimerizmui.
5. Įvertinti chimerizmo PKL ir ALP įtaką išgyvenamumui po transplantacijos.
6. Išnagrinėti chimerizmą vaikams, kuriems alogeninė KKLТ atlikta Lietuvoje.

#### **1.4. DARBO NAUJUMAS**

- Disertacijoje pateiktas nuoseklus ir ilgalaikis chimerizmo stebėjimas PKL ir trijose ALP. Skirtingai nuo jau skelbtų darbų, chimerizmas sektas labai homogeninėje ligonių grupėje – ŪLL sergantiems vaikams po mieloabliacinio kondicionavimo. Pirmą kartą ištirta chimerizmo kinetika KKL frakcijoje.
- Pirmą kartą atlikta chimerizmo analizė ligoniams sergantiems FA. Iki šiol duomenys apie chimerizmą šioje ligonių grupėje minimi tik bendrame transplantacijos kontekste, daugiausia aprašant pavienius klinikinius atvejus. Neradome didesnių studijų, tyrinėjančių chimerizmo kinetiką ALP sergant FA.
- Chimerizmo stebėjimas ligoniams sergantiems ALD kol kas nėra aprašytas. Disertacijoje pateikta analizė papildo mokslo žinias ne tik apie chimerizmo kinetiką, bet ir apie transplantaciją sergant ALD apskritai, kadangi mokslinių duomenų apie šią labai retą ligą itin mažai.
- Pirmą kartą atlikti Lietuvoje transplantuotų vaikų chimerizmo tyrinėjimai. Ši analizė atspindi mūsų šalies hematologinės transplantologijos rezultatus ir jų vietą šiuolaikinių mokslo pasiekimų kontekste.

#### **1.5. DARBO PRAKTINĖ REIKŠMĖ**

Chimerizmo tyrimas ALP suteikia naujos informacijos apie šio metodo informatyvumą kiekvienoje ligos grupėje ir jo kasdienio pritaikymo klinikinėje praktikoje tikslumą. Remiantis disertacijoje pateiktais duomenimis, pateikiamos ligonių ištyrimo po KKL rekomendacijos. Planuojama šias rekomendacijas įdiegti praktiniame darbe, tiriant chimerizmą Lietuvos vaikams. Mūsų darbe aprašyti rezultatai suteikia pagrindą tolimesniems moksliniams tyrinėjimams, siekiant išsiaiškinti po transplantacijos išliekančios recipiento kraujodaros, aptinkamos ALP, reikšmę.

## 1.6. GINAMIEJI DISERTACIJOS TEIGINIAI

1. Sergantiems ŪLL ir ALD po mieloabliacinio kondicionavimo, esant visiškam DC leukocitų frakcijoje ALP aptinkama autologinė kraujodara, išliekanti kelerius metus po transplantacijos, bet neturinti įtakos jos rezultatams.
2. Sergant FA ir ALD vystosi ilgalaikis stabilus MC, matomas PKL ir ALP. FA recipientai, kuriems randamas šis MC tipas, linkę gyventi ilgiau.
3. FA grupėje chimerizmas priklauso nuo KKL šaltinio – galimybė išsivystyti MC yra didesnė persodinus kaulų čiulpus, nei periferinio kraujo KKL.
4. Chimerizmas ALP neturi įtakos transplantacijos rezultatams.
5. Išanalizavus PKL Lietuvoje transplantuotiems vaikams nustatyta, kad mūsų šalyje atliktų chimerizmo tyrimų rezultatai atitiko šiuolaikinius mokslo pasiekimus šioje srityje.

## 2. LITERATŪROS APŽVALGA

### 2.1. CHIMERIZMO REIKŠMĖ IR TYRIMO METODAI

#### 2.1.1. Chimerizmo reikšmė po alogeninės KKL

Žodis chimerizmas kilęs iš graikų mitologijos (2.1 pav.). Antikoje “chimaera” (graikiškai “ožka”) vadintas mistinis gyvūnas, turintis liūto galvą, ožkos kūną ir gyvatės uodegą. Medicinoje chimerizmo sąvoka apibūdina būklę, kuomet viename organizme aptinkamos dviejų genetiškai skirtingų



**2.1 pav.** Chimera graikų mitologijoje

vaisiaus ląstelių kiekis (mikrochimerizmas), patenkantis į moters organizmą nėštumo metu, vėliau gali sąlygoti autoimuninės ligos išsivystymą (Adams K.M. ir Nelson J.L., 2004).

Kaulų čiulpų transplantacijoje chimerizmo terminą pirmas panaudojo Fordas 1956 metais – mirtinai apšvitintą gyvūną, kurio kraujodara atsistatė perpylus kito gyvūno kaulų čiulpus, jis pavadino “apšvitos chimera” (*angl. radiation chimaera*) (Ford C.E. ir kt., 1956). Hematologijoje nagrinėjamas hemopoetinis, t.y. kraujo ląstelių chimerizmas. Tiriant chimerizmą, nustatoma kokios kilmės (iš donoro ar recipiento KKL) yra kraujo ląstelės. Jei visos tiriamos ląstelės yra donoro kilmės, kalbama apie visišką donoro chimerizmą. Jei randamos abiejų individų ląstelės, tokia būklė vadinama mišriu

individų ląstelės. Dažniausiai taip atsitinka terapinių intervencijų pasekoje: po organų arba kaulų čiulpų transplantacijos, po kraujo komponentų perpylimo. Natūraliai chimerizmas kartais aptinkamas heterozigotinių dvynių kraujo ląstelėse, kai dėl fetalinių kraujagyslių anastomozijų vyksta KKL migracija tarp abiejų dvynių. Manoma, kad labai nedidelis

chimerizmu. Jei randamos tik recipiento ląstelės – kalbama apie visišką recipiento chimerizmą.

Chimerizmo tyrimas po transplantacijos turi didžiulę reikšmę: jis leidžia įvertinti persodintų KKL prigijimą, transplantato atmetimo riziką, transplantato prieš šeimininką ir transplantato prieš leukemiją reakcijas, transplantato funkciją, t.y. hematologinį bei imuninį atsistatymą, metabolinę substituciją (Petz L.D., 1994). Sergant leukemija, didėjantis MC gali pranašauti artėjantį recidyvą (Ramirez M. ir kt., 1996). Išvardintos būklės lemia transplantacijos rezultatus, todėl chimerizmo tyrimas yra vienas svarbiausių potransplantaciniame periode.

### **2.1.2. Chimerizmo tyrimo metodai**

Chimerizmą galima tirti įvairiais metodais. Visi metodai grindžiami tam tikro žymens nustatymu, pagal kurį galima nedvejojant atskirti donoro ląsteles nuo recipiento. Istoriskai chimerizmui tirti buvo naudojami kraujo grupių antigenai, lyties chromosomos, autosomų aberacijos, žmogaus leukocitų antigenai, imunoglobulinų poklasės. Šių metodų esminis trūkumas – ribotas žymenų polimorfiškumas (ypač jei recipientas ir donoras giminingi) ir nedidelis jautrumas, neviršijantis  $10^1$ – $10^{-1}$  (Barta A. ir kt., 2000).

Praėjusio šimtmečio 80-aisiais metais chimerizmui tirti pradėti naudoti DNR struktūros skirtumai (Knowlton R.G. ir kt., 1986). Šis metodas remiasi trumpų DNR fragmentų, taip vadinamų polimorfinių DNR žymenų (VNTR, variabilios tandemiškai pasikartojančios sekos, *angl. variable number tandem repeats* ir STR, trumpos pasikartojančios sekos, *angl. short tandem repeats*) analize. Jų struktūros pagrindą sudaro tandemiškai pasikartojantis bazių porų (bp) motyvas (VNTR motyvą sudaro 10-60 bp, STR – 4-10 bp), kuris suformuoja nuo 100 iki 340 bp ilgio DNR fragmentą. VNTR ir STR žymenų esama visose chromosomose, jie nekoduoja genetinės informacijos ir pasižymi didele įvairove (polimorfiškumu) tarp atskirų individų. Būtent ši fragmentų

ilgio įvairovė naudojama gretinant donoro ir recipiento DNR, tuo būdu nustatant kraujo ląstelių kilmę. Chimerizmo tyrimas DNR lygmenyje yra žymiai jautresnis ir specifiškesnis, nei taikant kitus metodus – ląstelių kilmei nustatyti pakanka  $\geq 3$  ląstelių tiriamojoje medžiagoje (Nagy M. ir kt., 2005).

Dauguma laboratorijų chimerizmui tirti naudoja STR fragmentus. Kartais kai kurių STR žymenų donoro ir recipiento aleliai gali būti vienodi, ypač jei donoras ir recipientas giminingi. Tokie aleliai chimerizmo analizei yra neinformatyvūs. Todėl, siekiant kuo tiksliau įvertinti recipiento chimerizmą po transplantacijos, analizuojamos keletas ar net keliolika DNR sričių ir nustatomi visi informatyvūs aleliai. Analizuojamų STR žymenų skaičius priklauso nuo kiekvienos laboratorijos darbo specifikos ir paprastai svyruoja nuo 5 (Schraml E. ir kt., 2003) iki 15 (Hancock J.P. ir kt., 2003). STR žymenų spektras parenkamas vadovaujantis kiekvienos institucijos patirtimi ir nuostatomis arba naudojami komerciniai rinkiniai, tačiau šis pasirinkimas neturi įtakos rezultatų tikslumui (Beck O. ir kt., 2006). Chimerizmo tyrimo jautrumas remiantis DNR žymenų analize siekia  $1-5 \times 10^{-2}$  (Lion T., 2003; Schraml E. ir kt., 2003; McCann S.R. ir Lawler M., 2004).

Po transplantacijos chimerizmas tiriamas periferiniame kraujyje ir/ar kaulų čiulpuose. Paprastai dauguma klinikų tiria chimerizmą periferiniame kraujyje, kadangi ši tiriamoji medžiaga yra lengvai prieinama ir nereikalauja vietinės ar bendros nejaunos bandiniui paimti. Rezultatai yra pakankamai informatyvūs, tiriant abi terpes, nors kai kurios studijos rodo, kad kaulų čiulpuose MC aptinkamas dažniau, nei periferiniame kraujyje, o tai gali būti svarbu ankstyvai leukemijos recidyvo diagnostikai (Wang L.J. ir kt., 2002; Stumph J. ir kt., 2008).

Pirmiausia iš tiriamosios medžiagos išgryninama DNR. Po to ji gausinama dauginės polimerazės grandininės reakcijos (PGR) būdu, naudojant specifinius STR pradmenis. PGR reakcija suteikia galimybę tiriama DNR sekos fragmentą pagausinti šimtus tūkstančių kartų. Amplifikuotų fragmentų ilgis priklauso nuo pasikartojančių nukleotidų motyvų skaičiaus. PGR fragmentų vaizdinei analizei naudojama vertikali elektroforezė poliakrilamido

gelyje arba kapiliarinė elektroforezė. Pastaroji yra jautresnė ir patogesnė kiekybiniam vertinimui (Lion T., 2003). Kiekybinis donoro ir recipiento alelių santykis apskaičiuojamas remiantis informatyvių alelių pikų plotu pagal specialias formules (Thiede C. ir kt., 1999) arba pasitelkiant kompiuterines programas.

Šiuo metu įvairiuose Europos centruose chimerizmui tirti naudojamos metodikos yra ganėtinai skirtingos. Tai apsunkina klinikinių studijų rezultatų palyginimą ir apibendrinimą. Todėl 2002 metais pradėtas bendras EUROCHIMERISM projektas ([www.eurochimerism.org](http://www.eurochimerism.org)), kuriame dalyvauja dvylika pagrindinių Europos laboratorijų. Projekto tikslas – standartizuoti chimerizmo tyrimo metodiką, paruošti vieningą STR fragmentų nomenklatūrą (Watzinger F. ir kt., 2006), sukurti vienodus diagnostikos ir chimerizmo stebėjimo po transplantacijos kriterijus. Tokiu būdu siekiama pagerinti klinikinių intervencijų, besiremiančių chimerizmo tyrimais, efektyvumą.

### **2.1.3. Chimerizmo tyrimo jautrumo padidinimo būdai**

Paprastai chimerizmui tirti naudojami nefrakcionuoti periferinio kraujo leukocitai arba kaulų čiulpų mielokariocitai. Ši tiriamoji medžiaga yra lengviausiai prieinama ir nereikalauja papildomo apdorojimo prieš DNR žymenų gausinimą PGR. Tokioje terpėje metodo jautrumas leidžia identifikuoti  $10^{-1}$ – $10^{-2}$  recipiento ląstelių (Thiede C. ir Lion T., 2001). Norint kuo anksčiau diagnozuoti leukemijos recidyvą ar transplantato atmetimą, mėginama įvairiais būdais padidinti tyrimo jautrumą. Vienas galimų kelių šiai problemai spręsti – tirti chimerizmą atskirose leukocitų frakcijose (T limfocituose, B limfocituose ir kt.). Atskirų ląstelių populiacijų išskyrimas padidina tyrimo jautrumą iki  $10^{-3}$ – $10^{-4}$  (Lion T. ir kt., 2001). Ląstelių izoliacija gali būti atlikta tėkmės citometrijos (Wan L.P. ir kt., 2006) arba imunomagnetinės izoliacijos būdu (Bader P. ir kt., 2000, Massenkeil G. ir kt., 2003). Klinikinėje praktikoje paprastai išskiriami T ir B limfocitai, monocitai,

granulocitai. Moksliniais tikslais chimerizmas tiriamas NK ląstelėse (Koenecke C. ir kt., 2003), eritrocituose (Spangrude G.J. ir kt., 2006), trombocituose (Eklund O. ir kt., 2003; Thiele J. ir kt., 2003), dendritinėse ląstelėse (Nachbaur D. ir kt., 2003; Auffermann-Gretzinger D. ir kt., 2006) ir kitose ląstelėse. Donoro ir recipiento įvairių ląstelių santykio pokyčių stebėjimai leidžia tiksliau įvertinti transplantato prigijimą (Baron F. ir kt., 2005a; Wan L.P. ir kt., 2006), anksčiau diagnozuoti leukemijos recidyvą (Massenkeil G. ir kt., 2003) ar transplantato atmetimą (Matthes-Martin S. ir kt., 2003). Tai ypatingai svarbu tais atvejais, kai KKL persodinamos po sumažinto intensyvumo kondicionavimo (Lion T., 2007). Ląstelių populiacijų išskyrimas yra paprastas ir greitas būdas padidinti chimerizmo tyrimo jautrumą, todėl lengvai įdiegiamas klinikinėje praktikoje. Vienintelis jo trūkumas – didesni tyrimo kaštai.

Chimerizmo tyrimo informatyvumui pagerinti DNR žymenis galima gausinti kiekybinės PGR, taip vadinamos tikro laiko PGR, būdu. Šios reakcijos privalumas – tikslus ir automatizuotas donoro ir recipiento DNR santykio kiekybinis įvertinimas bei didesnis reakcijos jautrumas, siekiantis  $10^{-3}$  –  $10^{-5}$  (Alizadeh M. ir kt., 2002). Tuo pačiu metu chimerizmui tirti bandomi alternatyvūs polimorfizmo žymenis. Vieni labiausiai paplitusių yra genomo pavienių nukleotidų skirtumai (Maas F. ir kt., 2003; Hochberg E.P. ir kt. 2003; Gineikienė E. ir kt., 2009). Šių žymenų analizė padidina tikimybę rasti informatyvius genetinius skirtumus tarp giminingų individų, tačiau šis metodas yra techniškai sudėtingas, todėl kol kas naudojamas daugiausiai moksliniams tikslams (Baron F. ir kt., 2005a; Koldehoff M. ir kt., 2006). Pastaruoju metu moksliniuose tyrimuose naudojami ir kiti polimorfizmo žymenis, pvz. Y chromosomos specifinės sekos (Fehse B. ir kt., 2001; Thiede C. ir kt., 2003), genomo sekų polimorfizmas (Willasch A. ir kt., 2007), kurie gausinami ir vertinami tikro laiko PGR būdu. Šios metodikos jautrumas taip pat siekia  $10^{-3}$  –  $10^{-5}$ . Naudojant standartinius DNR žymenų rinkinius, mėginama tobulinti vaizdinę amplifikatų analizę kapiliarinės elektroforezės metodu – prailginus



fluorescuojančių žymenų įpurškimo laiką, galima padidinti tyrimo jautrumą iki  $10^{-3}$  (Buño I. ir kt., 2005).

## **2.2. CHIMERIZMO REIKŠMĖ SERGANT ŪLL**

### **2.2.1. Alogeninė KKLТ gydant vaikų ŪLL**

ŪLL yra viena dažniausiai diagnozuojamų piktybinių ligų vaikų amžiuje. Ji sudaro iki 30 proc. visų pediatriinių navikų (Gustaffson G. ir Lie S.O., 1999). Chemoterapijos tobulėjimo dėka per paskutinius trisdešimt metų vaikų ŪLL gydymo rezultatai labai pagerėjo – šiuo metu ilgalaikis bendras išgyvenamumas siekia 85 proc. (Gatta G. ir kt., 2005). Tačiau gydymas citostatikais nevisada veiksmingas. Daugiausiai gydymo rezultatai priklauso nuo ligos rizikos grupės: standartinės rizikos ligoniai pasveiksta gydant vien chemoterapija – jų išgyvenamumas be neigiamo įvykio siekia 90 proc., tuo metu didelės rizikos ligonių išgyvenamumas be neigiamo įvykio neviršija 50 proc. (Möricke A. ir kt., 2008; Pui C.H. ir kt., 2008). Likusiai pusei ligonių, kuriems chemoterapija yra neveiksminga, alogeninė KKLТ gali užtikrinti pasveikimą 67 proc. atvejų (Schrauder A. ir kt., 2006). Pastaraisiais metais vaikų alogeninės transplantacijos rezultatai gydant vaikų ŪLL labai pagerėjo: atliekant genetinį žmogaus leukocitų antigenų tipavimą, tapataus giminingo ar negiminingo donoro pasirinkimas nebeturi įtakos transplantacijos rezultatams (Al-Kasim F.A. ir kt., 2002; Gassas A. ir kt., 2007; Remberger M. ir kt., 2008), o mirtingumas dėl infekcinių-toksinių komplikacijų sumažėjo iki 13-16 proc. (Meisel R. ir kt., 2005). Leukemijos recidyvas po transplantacijos išlieka pagrindinė problema – vaikams sergantiems ŪLL tikimybė išgyventi tris metus po KKLТ be recidyvo įvairių autorių duomenimis svyruoja nuo 30 iki 54 proc. (Bader P. ir kt., 2004; Gaynon P.S., 2005).

Moksliniai tyrimai rodo, kad anksti diagnozavus recidyvą po transplantacijos, daliai ligonių galima pasiekti pakartotinę remisiją, paskyrus imunoterapiją. Kuo anksčiau aptiktas recidyvas, t.y. kuo mažiau organizme

navikinių ląstelių, tuo didesnė tikimybė, kad imunoterapija bus efektyvi, nesukeldama nepageidaujamų reakcijų (Slavin S. ir kt., 1995; Or R. ir kt., 1998). Todėl jautrių metodikų, kurios įgalina aptikti minimalius piktybinio proceso požymius, taikymas yra ypatingai svarbus klinikinėje praktikoje. Po transplantacijos remisijos kokybei sekti gana plačiai naudojami jautrūs molekuliniai minimalios liktinės ligos žymenys, kurie gausinami tikro laiko PGR būdu. Metodikos jautrumas leidžia aptikti tiriamojoje medžiagoje vieną blastą tarp  $10^4$  –  $10^6$  sveikų ląstelių (Spinelli O. ir kt., 2007; Jólkowska J. ir kt., 2007). Šio metodo trūkumas – ne visiems ligoniams identifikuojamas molekulinis žymuo: greitai ir lengvai aptinkami genų susiliejimo transkriptai randami apie 40-50 proc. ligonių sergančių B pirmtakų ŪLL ir tik 10-20 proc. sergančių T pirmtakų ŪLL (Cazzaniga G. ir Biondi A., 2005). Kloniškumo tyrimas, remiantis imunoglobulinų ir T limfocitų receptorių genų persitvarkymų analize, leidžia aptikti specifinį molekulinį žymenį beveik 95 proc. ligonių, tačiau ši metodika reikalauja didelių techninių ir laiko sąnaudų (Li A. ir kt., 2003; Cazzaniga G. ir Biondi A., 2005). Remisijos kokybę taip pat galima įvertinti tėkmės citometrijos metodu pagal pirminių blastų fenotipą, tačiau metodikos jautrumas neviršija  $10^{-4}$  (van der Velden V.H. ir kt., 2004; Janeliūnienė M. ir kt., 2007). Norint tiksliai apskaičiuoti minimalų piktybinių ląstelių kiekį, būtina tirti kaulų čiulpus, kadangi kai kurių tyrimų duomenimis minimalios liktinės ligos kiekybinė išraiška kaulų čiulpuose ir periferiniame kraujyje tarpusavyje nekoreliuoja (Stock W. ir kt., 2007). Tuo tarpu po transplantacijos ligoniai ilgą laiką sekami ambulatoriškai, kuomet kaulų čiulpai tiriami kur kas rečiau, nei periferinis kraujas, kuris imamas įvairiems kitiems tyrimams. Be to, vaikams kaulų čiulpų aspiracinė biopsija atliekama su bendra nejautra. Visa tai riboja molekulinį žymenų tyrimus po transplantacijos. Chimerizmo tyrimas gali būti gera alternatyva remisijos kokybės vertinimui po transplantacijos – polimorfiniai DNR žymenys randami visiems recipientams, metodikos jautrumas analizuojant ALP arba taikant tikro laiko PGR siekia  $10^{-4}$  –  $10^{-5}$ , klinikiniais tyrimais įrodytas ryšys tarp didėjančio

MC ir leukemijos recidyvo (žr. žemiau), o tiksliam recipientų ir donoro ląstelių kiekybiniam įvertinimui pakanka periferinio kraujo.

### **2.2.2. Chimerizmo ryšys su leukemijos recidyvu**

Mokslinėje literatūroje yra daug publikacijų nagrinėjančių chimerizmą sergant leukemija. Tyrinėjimų pradžioje daugelis mokslinių grupių nagrinėjo chimerizmo reikšmę leukemijos recidyvo diagnostikai, tačiau jų sąsają pavyko nustatyti ne iš karto (Yam P.I. ir kt., 1987; Offit K. ir kt., 1990; Bertheas M.F. ir kt., 1991). Kol chimerizmui tirti buvo naudojami mažai jautrūs žymenys, po mieloabliacinio kondicionavimo stebėtas tiek visiškai DC, tiek MC, kuris daugiausia buvo apibūdinamas kaip laikinas.

Suttorp pirmą kartą aprašė leukemija sergantiems recipientų chimerizmo tyrimus remiantis DNR žymenų skirtumais (Suttorp M. ir kt., 1993). Informatyvūs DNR aleliai buvo rasti visiems tirtiems ligoniams (n = 61). Ši metodika leido pakankamai tiksliai įvertinti transplantato prigijimą po mieloabliacinio kondicionavimo, kai ląstelių kiekis periferiniame kraujyje yra labai mažas. Ji taip pat pasirodė esanti pakankamai jautri MC aptikti, tačiau MC reikšmė recidyvo diagnostikai šiame tyrime išliko neaiški.

DNR žymenų tyrimas gana greitai tapo visuotinai priimtu metodu chimerizmui tirti. Nepaisant jautrios metodikos, van Leeuwen ir jo grupė nesugebėjo įrodyti MC sąsajos su leukemijos recidyvu (van Leeuwen J.E. ir kt., 1993). Ištyrusi 53 ligonius, sergančius ūmia limfoblastine ir mieloblastine leukemijomis, mielodisplaziniu sindromu bei juveniline mielomonocitine leukemija, olandų mokslinė grupė rado stabilų ir praeinantį MC, kuris pirmą kartą buvo tirtas ne tik periferinio kraujo leukocituose, bet ir T limfocituose. Studijos rezultatai gali būti paaiškinami ganėtinai ilgais laiko tarpais tarp chimerizmo tyrimų – kraujo mėginiai buvo imami, praėjus 2, 6 ir 12 mėnesiams po KKLТ.

Pradėjus tirti chimerizmą kartą per mėnesį, buvo rasta koreliacija tarp MC ir leukemijos recidyvo – Ramirez ir bendraautoriai paskelbė klinikinės studijos, kurioje tyrinėjo chimerizmą 12 vaikų sergančių ŪLL, rezultatus (Ramirez M. ir kt., 1996). Šiame tyrime pirmą kartą pabrėžiama chimerizmo kinetikos svarba – didėjantis MC buvo susijęs su leukemijos recidyvu, o esant mažėjančiam MC arba tranzitoriniam chimerizmui T limfocituose ligoniams tęsėsi remisija.

Tyrimo dažnumo svarba buvo patvirtinta vokiečių studijoje, kurioje chimerizmas tirtas 55 vaikams sergantiems ūmia limfoblastine ir mieloblastine leukemija ir mielodisplaziniu sindromu (Bader P. ir kt., 1998). Ankstyvame potransplantaciniame periode kraujo mėginiai imti kartą per savaitę iki 200-osios dienos po KKLТ, o vėliau ambulatoriškai – kartą per mėnesį. Intensyvi chimerizmo kontrolė patvirtino MC koreliaciją su leukemijos recidyvu ir atskleidė kelis chimerizmo kinetikos tipus, kurių prognozė pasirodė esanti skirtinga: 9 iš 10 ligonių, kuriems rastas didėjantis MC, išsivystė leukemijos recidyvas, o vaikams, kuriems recipiento frakcija palaipsniui mažėjo, tęsėsi ilgalaikė remisija.

### **2.2.3. Chimerizmo tyrinėjimai atskirose ląstelių populiacijose**

Pirmieji mėginimai tirti chimerizmą atskirose ląstelių populiacijose paskelbti 1993 metais – van Leeuwen tyrė chimerizmą periferinio kraujo T limfocituose (van Leeuwen J.E. ir kt., 1993), o vėliau ir leukemijos fenotipui specifinėse ląstelėse, išskirtose iš kaulų čiulpų (van Leeuwen J.E. ir kt., 1994). Šiuose darbuose nepavyko nustatyti ALP išskyrimo pranašumo, lyginant su bendra periferinio kraujo leukocitų populiacija.

Bader paskelbė klinikinio tyrimo rezultatus, kuriame nagrinėta ALP reikšmė leukemijos recidyvo diagnostikai (Bader P. ir kt., 2000). Studijoje dalyvavo 22 vaikai, sergantys ūmia limfoblastine ir mieloblastine leukemijomis ir mielodisplaziniu sindromu, kuriems skirtas mieloabliacinis kondicionavimas. Chimerizmas tirtas granulocituose, CD3, CD14, CD19 ir

CD56 ląstelių populiacijose. ALP izoliacija buvo atliekama tik tuo atveju, kai MC buvo aptinkamas PKL. MC buvo rastas visose tirtose ląstelėse tuomet, kai leukemijos recidyvas diagnozuotas nepraėjus 300 dienų po transplantacijos (3 iš 6 recidyvavusių ligonių). Esant vėlyvam leukemijos recidyvui (likę 3 ligoniai), MC buvo aptiktas tik blastų populiacijoje, tuo metu visos kitos tirtos ląstelės liko donoro kilmės. Šioje publikacijoje ALP tyrimo būtinumas išliko neaiškus.

Zetterquist ištyrė chimerizmą B limfocituose 12 ligonių sergančių B pirmtakų ŪLL (Zetterquist H. ir kt., 2000). Šioje studijoje jis aptiko MC B limfocituose 5 iš 12 tirtų pacientų. Keturiems iš penkių vėliau išsivystė leukemijos recidyvas. Šiame tyrime lygiagrečiai buvo tirti ir minimalios liktinės ligos žymenys, kurie taip pat koreliavo su leukemijos recidyvu. Buvo padaryta išvada apie chimerizmo tyrimo B limfocituose informatyvumą ankstyvai leukemijos recidyvo diagnostikai.

Mattsson paskelbė chimerizmo tyrinėjimų leukemijos fenotipui specifinėse ląstelėse rezultatus (Mattsson J. ir kt., 2001a). Šioje studijoje tirti 30 ligonių, kurie sirgo mieloidinės eilės hemoblastozėmis (ūmia mieloblastine ir bifenotipine leukemijomis, mielodisplaziniu sindromu ir juveniline mielomonocitine leukemija). Visiems ligoniams skirtas mieloabliacinis kondicionavimas. Chimerizmui tirti ląstelių populiacija buvo išskiriama atsižvelgiant į leukemijos blastų fenotipą diagnozės metu (CD13, CD33, CD7 koekspresija). Šiame tyrime leukemijos recidyvas diagnozuotas 10 iš 30 ligonių. Visais atvejais recidyvo metu MC buvo randamas leukemijos fenotipui specifinėse ląstelėse.

Thiede teigė, kad chimerizmo tyrimas CD34 ląstelėse yra pakankamai patikimas ankstyvai leukemijos recidyvo diagnostikai (Thiede C. et al., 2002). Ištyrus 87 ligonius sergančius daugiausia mieloidinės eilės leukemijomis po mieloabliacinio kondicionavimo, MC CD34 populiacijoje buvo rastas 22 ligoniams, iš kurių 20 diagnozuotas recidyvas.

Chimerimo kinetika ALP tirta taip pat ligoniams, kuriems skirtas sumažinto intensyvumo kondicionavimas. Nemieloabliacinių citostatikų dozių

skyrimas galutinai nesunaikina recipiento kraujodaros, todėl MC po transplantacijos aptinkamas žymiai dažniau (Baron F. ir kt., 2005a). Autologinės kraujodaros išlikimas ankstyvame potransplantaciniame periode, kai ląstelių kiekis periferiniame kraujyje yra ganėtinai mažas, sudaro geras prielaidas atskirų ląstelių frakcijų išskyrimui ir tyrinėjimams. Iš kitos pusės, išliekant recipiento kraujodarai, recidyvo rizika yra kur kas didesnė – sergant ūmia limfoblastine ar mieloidine leukemija ji siekia 44-52 proc. (Baron F. ir kt., 2006; Kahl C. ir kt., 2007). Todėl MC kinetikos stebėjimas po nemieloabliacinės transplantacijos yra ypač aktualus ankstyvai recidyvo diagnostikai.

Massenkeil tyrinėjo profilaktinės imunoterapijos veiksmingumą 23 ligoniams sergantiems ūmia limfoblastine ir mieloblastine leukemijomis. Donoro limfocitų infuzija buvo skirta profilaktiškai remiantis MC periferiniame kraujyje. Recipiento kraujodara aptikta visiems ligoniams (n = 13), kuriems išsivystė leukemijos recidyvas (vidutiniškai 8 savaites prieš recidyvą). Autologinė frakcija anksčiausiai pasirodė CD4, CD8 populiacijose, o vėliau granulocituose (CD14/15). Tokie chimerizmo pokyčiai aprašyti ir kitų autorių (Wan L.P. ir kt., 2006). Išnagrinėjęs chimerizmo kinetiką, Massenkeil stebėjo didėjančią arba mažėjančią, bet ne stabilų MC (Massenkeil G. ir kt., 2003). Stabilaus MC nebuvimas po sumažinto intensyvumo kondicionavimo sergant leukemija taip pat patvirtintas kituose darbuose (McSweeney P.A. ir kt., 2001; Niederwieser D. ir kt., 2003).

Apibendrinant skelbtų tyrimų rezultatus, reikia pažymėti, kad didžiajai vaikų leukemijų daliai, t.y. ligoniams sergantiems ŪLL, kuriems skiriamas mieloabliacinis kondicionavimas, ALP izoliacijos reikšmė chimerizmo diagnostikai išliko neaiški. Publikuotos studijos tyrinėja palyginus nedidelį ligonių skaičių, sergančių įvairiomis piktybinėmis kraujo ligomis (daugiausia mieloidinės eilės neoplazijomis). Negausūs tyrimai, įrodę ALP izoliacijos pranašumą, atlikti tyrinėjant daugiausia suaugusius pacientus po sumažinto intensyvumo kondicionavimo. Vaikams sumažinto intensyvumo kondicionavimas yra pakankamai plačiai taikomas gydant nepiktybines kraujo

ligas, tačiau jo efektyvumas sergant leukemija išlieka abejotinas (Meissner B. ir kt., 2007). Šiuo metu bandoma tiksliau apibrėžti sumažinto intensyvumo kondicionavimo taikymą pediatriinėje praktikoje (Klingebiel T. ir kt., 2006; Satwani P. ir kt., 2008). Bendrai chimerizmo tyrinėjimų tendencijai būdingas laipsniškas perėjimas prie jautresnių metodikų, siekiant kuo anksčiau diagnozuoti leukemijos recidyvą. ALP išskyrimas yra viena iš galimybių metodikos jautrumui pagerinti, tačiau jos informatyvumas nėra pakankamai ištirtas.

#### **2.2.4. Chimerizmo reikšmė imunoterapijai**

Po transplantacijos TPŠL profilaktikai skiriamo imunosusupresinio gydymo intensyvumas yra tiesiogiai susijęs su transplantato prieš leukemiją efektu. Kuo didesnė ciklosporino dozė, tuo mažesnė TPŠL išraiška, bet didesnė recidyvo rizika. Šis ryšys yra gana gerai ištirtas suaugusiems pacientams sergantiems lėtine mieloidine leukemija (Kolb H.J. ir kt., 1995), tačiau jis taip pat patvirtintas ir vaikų transplantacijoje, kur dauguma ligonių transplantuojami dėl ūmių sparčiai progresuojančių leukemijų (Teuffel O. ir kt., 2005; Gassas A. ir kt., 2007). Leukemijos recidyvas po transplantacijos išlieka pagrindine problema, kuri nulemia ligonių mirtingumą (Socie G. ir kt., 1999; Eapen M. ir kt., 2004). Keletas studijų pademonstravo imunoterapijos korekcijos efektyvumą, mėginant išgelbėti recidyvo ištiktus ligonius. Staigus ir ankstyvas ciklosporino nutraukimas arba donoro limfocitų infuzija pasirodė esantys veiksmingi, mėginant nugalėti piktybinį kloną (Abraham R. ir kt., 1997; Porter D.L. ir kt., 2000). Tačiau sergant greitai progresuojančiais navikais, imunonokorekcija esant morfologiniams ir klinikiniais recidyvo požymiams dažnai būna pavėluota, nes navikinių ląstelių daugėja kur kas greičiau, nei spėja išsivystyti imunologinis atsakas (Collins J.R.H. ir kt., 2000; Bader P. ir kt., 2004). Todėl imuninės reakcijos sukėlimas pradinėje recidyvo stadijoje yra labai svarbus, mėginant užkirsti kelią leukemijos atsinaujinimui.

Tačiau šiai intervencijai trūko objektyvaus kriterijaus, kuris nusakytų jos optimalų momentą.

Įrodžius didėjančio MC ir leukemijos recidyvo sąsają, recipientų ląstelių daugėjimas periferiniame kraujyje tapo pagrindu prevencinės imunoterapijos skyrimui nelaukiant morfologinio recidyvo diagnozės. Imunoterapija koreguojama – nutraukiama imunoprofilaktika ciklosporinu arba skiriama donoro limfocitų infuzija – kai autologinių ląstelių dalis PKL didėja daugiau nei 5 proc. Atsakas į gydymą vertinamas pagal chimerizmo konversiją iš MC į visišką DC ir pagal ligonių, kuriems tęsėsi remisija, skaičių. Profilaktinės imunoterapijos efektyvumas pradžioje buvo įrodytas nedidelėje studijoje, tyrusioje 12 vaikų, sergančių ūmia limfoblastine ir mieloblastine leukemijomis bei mielodisplaziniu sindromu (Bader P. ir kt., 1999). Vėliau šie rezultatai pakartoti dideliame tyrime, kuriame dalyvavo 173 vaikai, sergantys ŪLL (Bader P. ir kt., 2002). Paskyrus profilaktinę imunoterapiją ligoniams su didėjančiu MC, jų išgyvenamumas be neigiamo įvykio statistiškai reikšmingai pagerėjo nuo 0 iki 38 proc., lyginant su tais, kuriems šis gydymas nebuvo skirtas ( $p = 0,0024$ ). Prospektyvinis daugiacentrinis tyrimas, kuriame tirti 163 vaikai sergantys ŪLL dar kartą patvirtino intensyvaus chimerizmo tyrimų atlikimo svarbą, norint laiku aptikti MC ir užtikrinti profilaktinės imunoterapijos maksimalų efektą (Bader P. ir kt., 2004).

Panašūs rezultatai gauti tiriant suaugusius ligonius. Daugumai jų dėl įvairių priežasčių skirtas sumažinto intensyvumo kondicionavimas, po kurio MC dažnis PKL siekė 64 proc. (Massenkeil G. ir kt., 2003). Iš 23 studijoje aprašytų ligonių 14 buvo transplantuoti nesant remisijai iki KKL. Paskyrus profilaktinę donoro limfocitų infuziją remiantis vien MC periferiniame kraujyje ( $n = 11$ ), 6 iš 11 tiriamųjų pasiekta chimerizmo konversija iš MC į DC. Trims pacientams, kuriems leukemija iki KKL progresavo, pavyko pasiekti remisiją, perpylus donoro limfocitus. Skiriant profilaktinę imunoterapiją, chimerizmo konversiją pavyksta pasiekti 92 proc. ligonių, tuo pačiu užtikrinti remisiją 83 proc. pacientų (Lutz C. ir kt., 2008). Stabiliai remisijai išlaikyti ir maksimaliam transplantato prieš leukemiją efektui pasiekti



ypač svarbi chimerizmo konversija T limfocituose (Dey B.R. ir kt., 2003; Mohty M. ir kt., 2007).

Apibendrinant apžvelgtus mokslinius tyrimus matome, kad sergant leukemija chimerizmo tyrimas yra vienas svarbiausių būdų ankstyvai recidyvo po transplantacijos diagnostikai. Tačiau chimerizmo tyrimo ALP rezultatai prieštaringi. ALP išskyrimo reikšmė ankstyvai recidyvo diagnostikai ir imunoterapijai pediatriiniams ligoniams po mieloabliacinio kondicionavimo nėra ištirta. Todėl disertacijoje pateikiami vaikų sergančių ŪLL chimerizmo tyrimo ALP rezultatai gali suteikti naujų duomenų šioje srityje.

## **2.3. CHIMERIZMO REIKŠMĖ SERGANT FA**

### **2.3.1. Alogeninė KKLТ gydant FA**

Fanconi anemija (FA) – tai reta įgimta liga, paveldima autosominiu recesyviniu būdu. FA būdingos daugybinės įgimtos įvairių organų anomalijos ir progresuojanti kaulų čiulpų aplazija (Young N.S. ir Alter B.P., 1994). Pakitimai kaulų čiulpuose pradžioje primena aplazinę anemiją. Palaipsniui kraujodaros ląstelėse atsiranda chromosomų pakitimai būdingi mielodisplaziniam sindromui, kurie galiausiai sąlygoja ūmios mieloblastinės leukemijos išsivystymą. Kaulų čiulpų aplazija (anemija, trombocitopenija, leukopenija) paprastai randama pirmaisiais gyvenimo metais, tačiau jei dėl ląstelių mozaicizmo, pasitaikančio iki 30 proc. ligonių (Soulier J. ir kt., 2005), somatinės anomalijos nėra ryškios, liga gali būti diagnozuota žymiai vėliau (Ragelienė L., 2003; Gluckman E. ir Wagner J.E., 2008). Negydant 81 proc. ligonių miršta nesulaukę 40 metų nuo sunkių infekcijų arba kraujavimo (Butturini A. ir kt., 1994).

FA sergančiųjų ląstelėms būdingas chromosomų nestabilumas ir padidėjęs jautrumas DNR surišančioms medžiagoms bei jonizuojančiam spinduliavimui (Auerbach A.D. ir Wolman S.R., 1976; Gluckman E. ir kt., 1983). Genomo nestabilumas palengvina ląstelės transformaciją ir piktybinio

klono atsiradimą. Sergant FA, ypač dažnai diagnozuojama ūmi mieloblastinė leukemija ir stemplės, galvos, kaklo bei šlapimo takų plokščialąstelinė karcinoma (Faivre L. ir kt., 2000; Rosenberg P.S. ir kt., 2003; Kutler D.I. ir kt., 2003). Įgimtas polinkis malignizacijai lemia 76 proc. kumuliacinę vėžio išsivystymo riziką iki 45 metų amžiaus (Alter B.P., 2003). Taigi, progresuojanti kaulų čiulpų aplazija ir vėžys yra pagrindinės FA sergančiųjų mirties priežastys.

Persodinus donoro kaulų čiulpus, galima pakeisti pažeistą kraujodarą ir taip išvengti ligonio mirties dėl hematologinių komplikacijų. Tačiau alogeninė KKLТ FA sergantiesiems turi kai kurių ypatumų: dėl chromosomų nestabilumo įprastinis mieloabliacinis kondicionavimas sukelia žymiai daugiau toksinių komplikacijų ir sunkesnę TPŠL, nei transplantuojant kitomis ligomis sergančius vaikus. Dėl šių priežasčių alogeninė KKLТ ilgą laiką buvo neefektyvi. Pirmieji sėkmingi transplantacijos rezultatai buvo paskelbti prancūzų mokslininkų 1983 metais, panaudojus sumažinto intensyvumo kondicionavimą torakoabdominaline apšvita ir ciklofosfamidų (Gluckman E. ir kt., 1983). Pradžioje transplantacija taikyta tik tiems vaikams, kurie turėjo identišką giminingą donorą. Minėto režimo skyrimas didesnei ligonių grupei (n = 151) lėmė 70 proc. bendrą dvejų metų išgyvenamumą, persodinus giminingų donorų KKLТ (Gluckman E. ir kt., 1995). Vėliau vis plačiau pradėtos naudoti tapačių negiminingų donorų KKL, kurioms prigijus pasiektas 30 proc. bendras trejų metų išgyvenamumas (Guardiola P. ir kt., 2000a).

Tačiau tiek kūno apšvita, tiek ciklofosfamidai patys gali skatinti nestabiliaus FA ląstelių genomo piktybinę transformaciją ir vėžio atsiradimą. Tikimybė, kad praėjus 2 metams po transplantacijos ligoniui išsivystys vėžys sudaro 14 proc. (Deeg H.J. ir kt., 1996). Todėl mėginant sumažinti vėžio atsiradimo riziką, daugelis centrų ieško alternatyvių kondicionavimo būdų. Labiausiai paplitęs sumažinto intensyvumo kondicionavimas fludarabinu, kuris derinamas su torakoabdominaline apšvita (Kurre P. ir kt., 2003), busulfanu (Maschan A.A. ir kt., 2004) arba ciklofosfamidų (Tan P.L. ir kt., 2006;

Locatelli F. ir kt., 2007). TPŠL pasireiškimui sušvelninti T limfocitų kiekis mažinamas, šalinant juos iš transplantato arba skiriant antitimocitinį globuliną.

Sumažinto intensyvumo kondicionavimas ženkliai pagerino transplantacijos rezultatus ir sudarė sąlygas persodinti giminingų ir negiminingų donorų KKL. Šiuo metu persodinus giminingo donoro KKL, bendras 5 metų išgyvenamumas siekia 85 proc., o persodinant negiminingo donoro KKL, bendras 3 metų išgyvenamumas padidėjo iki 52 proc. (Gluckman E. ir Wagner J.E., 2008). Kelių studijų patirtis rodo, kad būtent fludarabino naudojimas sumažino mirtingumą dėl toksinių komplikacijų iki 24 proc. ir pagerino išgyvenamumo rodiklius (Locatelli F. ir kt., 2007; Wagner J.E. ir kt., 2007). Ar sumažėjo antrinių navikų išsivystymo rizika po šio režimo kol kas išlieka neaišku, nes didžiausia solidinių navikų atsiradimo tikimybė yra praėjus 8–9 metams po KKL (Deeg H.J. ir kt., 1996).

### **2.3.2. Chimerizmo tyrinėjimai sergant FA**

Šiai dienai yra palyginus nedaug skelbtų mokslinių darbų, nagrinėjančių chimerizmą FA recipientams. Viena pirmųjų ir išsamiausių studijų apima 19 ligonių, kuriems tirtas chimerizmas po sumažinto intensyvumo kondicionavimo torakoabdominaline kūno apšvita ir ciklofosfamidų (Socié G. ir kt., 1993). Daugumai pacientų (17/19) persodintos identiškų giminingų donorų KKL. Chimerizmas tirtas periferinio kraujo mononukleuose ir bendroje limfocitų populiacijoje nesilaikant kokios nors schemos. Donoro ir recipientų ląstelėms atskirti naudoti polimorfiniai DNR žymenys. Kraujo mėginiai tyrimams imti 2 metus po transplantacijos. Esant tokiai tyrimo metodikai, 13 iš 19 tirtų vaikų rastas visiškas DC, o 6 iš 19 aptiktas tranzitorinis MC, po kurio 5 iš 6 išsivystė visiškas DC.

Mital aprašė chimerizmo kinetiką FA sergančiam ligoniui po identiško kondicionavimo torakoabdominaline apšvita ir ciklofosfamidų, kuriam buvo persodintos tapataus giminingo donoro KKL (Mital M.K. ir kt., 1999).

Chimerizmui tirti lygiagrečiai naudoti citogenetiniai markeriai ir polimorfiniai DNR žymenys. Analizuota bendra leukocitų populiacija ir ALP: granulocitai, CD3 ir CD19 limfocitai. Tiriant minėtas ląsteles kartą per mėnesį, T limfocituose rastas MC, išlikęs iki 2 metų po transplantacijos. Tuo pačiu metu ligoniui stebėtas užsitęsęs kraujodaros atsistatymas, kuris buvo susietas su MC CD3 populiacijoje. Motwani aprašė 7 ligonius, kuriems KKL atlikta skiriant kondicionavimą fludarabinu ir ciklofosfamidą (Motwani J. ir kt., 2005). Šiame straipsnyje palyginus išsamiai aprašyti dviejų ligonių, kuriems išsivystė transplantato atmetimas, chimerizmo tyrimai. Abiem ligoniams buvo atlikta T limfocitų deplecija, todėl po transplantacijos leukocitų frakcijoje stebėtas donoro DNR mažėjimas.

Didžioji dalis kitų skelbtų darbų aprašo pavienius klinikinius atvejus, kuriuose chimerizmas minimas tik bendrame transplantacijos kontekste kaip persodintų ląstelių prigijimo rodiklis po tam tikros sumažinto intensyvumo kondicionavimo modifikacijos, pvz., skiriant fludarabiną su ciklofosfamidą (Boulad F. ir kt., 2000; Rossi G. ir kt., 2003; George B. ir kt., 2005), fludarabiną su busulfanu (Maschan A.A. ir kt., 2004), vien ciklofosfamidą be apšvitos (Ayas M. ir kt., 2005) arba naudojant alternatyvius KKL šaltinius, pvz., identišką negimingą (Zwaan C.M. ir kt., 1998; MacMillan M.L. ir kt., 2001) arba haploidentinį donorą (Elhasid R. ir kt., 2000), identiško negiminingo donoro virkštelės kraują (Aker M. ir kt., 1999; Yoshimasu T. ir kt., 2001). Minėtuose darbuose chimerizmui tirti naudoti polimorfiniai DNR žymenys, kurių pagalba randamas visiškas DC arba MC. Tačiau nė viena šių publikacijų nenagrinėja chimerizmo kinetikos *per se* ir jos vaidmens sergant FA.

### **2.3.3. Chimerizmas ir transplantato atmetimas**

Transplantato atmetimas – viena galimų komplikacijų, kurios gali lemti nesėkmingą transplantacijos išeitį (Dufour C. ir kt., 2001). Įvairių autorių

duomenimis sergant FA transplantato atmetimo dažnis svyruoja nuo 6 iki 22 proc. (Motwani J. ir kt., 2005; Locatelli F. ir kt., 2007). Vienintelis transplantato gydymo būdas – pakartotinė KKLТ. Tačiau transplantato prigijimas po antro persodinimo įvairių autorių duomenimis tesiekia 57-75 proc. (Davies S.M. ir kt., 1994; Remberger M. ir kt., 1998). Be to, ji susijusi su didesne TPŠL ir infekcinių-toksinių komplikacijų rizika (Lang P. ir kt., 2008). Todėl ankstyva savalaikė gresiančio atmetimo diagnostika yra labai svarbi. Chimerizmo sekimas gali būti naudojamas gresiančio transplantato atmetimo diagnostikai. Kaip minėta aukščiau, kol kas nepavyko rasti išsamių studijų, nagrinėjančių chimerizmo kinetiką FA sergantiems ligoniams. Chimerizmo svarba transplantato atmetimui daugiausia ištirta ligoniams, sergantiems kitomis nepiktybinėmis kraujo ligomis.

MC ryšys su transplantato atmetimu nustatytas dar devintame dešimtmetyje – Hill paskelbė klinikinės studijos rezultatus, kurioje ištyrė 96 ligonius sergančius aplazine anemija (Hill R.S. ir kt., 1986). Transplantato atmetimas buvo reikšmingai dažniau diagnozuojamas ligoniams turintiems MC, nei turintiems visišką DC. Panašios išvados buvo padarytos kai kuriuose vėlesniuose tyrimuose, tačiau šiuose darbuose buvo atkreiptas dėmesys taip pat ir į chimerizmo kinetiką – esant nedideliam stabiliam recipiento DNR kiekiui kraujo ląstelėse, transplantato atmetimas nesivystė ir ligoniams tęsėsi ilgalaikė remisija (Lawler M. ir kt., 1995; Bader P. ir kt., 1997; Hassan R. ir kt., 2004). Chimerizmo kinetikos svarba ankstyvai transplantato atmetimo diagnostikai išsamiai išnagrinėta Hoelle paskelbtame tyrime, kuriame tirti 32 aplazine anemija sergantys vaikai (Hoelle W. ir kt., 2004). Dviems iš keturių pacientų, kuriems nustatytas didėjantis MC, diagnozuotas transplantato atmetimas. Kitus du ligonius pavyko išgelbėti nuo gresiančio transplantato atmetimo, paskyrus profilaktinę imunoterapiją. Po jos abiem pacientams ivyko chimerizmo konversija iš MC į DC. Tuo tarpu kitiems 6 ligoniams, kuriems aptiktas stabilus arba mažėjantis MC, tęsėsi ilgalaikė remisija be jokių transplantato atmetimo požymių. Didėjančio MC sąsaja su transplantato atmetimu taip pat

aprašyta sergant lėtine mieloidine leukemija, metabolinėmis kaupimo ligomis, mielodisplaziniu sindromu (Woodard P. ir kt., 2003).

Chimerizmo tyrinėjimai ALP rodo, kad didėjantis MC chimerizmas T limfocituose yra svarbus transplantato atmetimui. Horan apašė chimerizmo kinetiką 4 ligoniams sergantiems talasemija ir pjautuvo pavidalo ląstelių anemija (Horan J.T. ir kt., 2005). Po sumažinto intensyvumo kondicionavimo fludarabinu ir torakoabdominaline apšvita 3 iš 4 ligonių išsivystė transplantato atmetimas. Ištyrus chimerizmą CD3 ir CD33 populiacijose pastebėta, kad autologinė frakcija visais atvejais buvo didesnė T limfocituose, nei granulocituose. Kitoje studijoje, tyrusioje 124 ligonius sergančius piktybinėmis ir nepiktybinėmis kraujo ligomis, įvertinta transplantato atmetimo tikimybė po analogiško nemieloabliacinio kondicionavimo fludarabinu ir torakoabdominaline apšvita. Šioje studijoje patvirtinta donoro DNR kiekio svarba CD3 frakcijoje – transplantato atmetimo rizika buvo reikšmingai didesnė, jei 14 dieną po KKLТ donoro chimerizmas T limfocituose buvo mažas (Masmas T.N. ir kt., 2008).

Apžvelgti literatūros duomenys rodo, kad sergant FA išsamūs chimerizmo tyrinėjimai ligoniams gydytiems fludarabinu kol kas nebuvo atlikti. Stokojama ir duomenų apie ALP išskyrimo ir tyrimo tikslingumą sergant šia liga. Tikimasi, kad žemiau aprašyti 22 FA sergančių vaikų chimerizmo tyrimo ALP rezultatai papildys mokslo žinias šiuo klausimu ir bus svarbūs priimant sprendimus klinikinėje praktikoje.

## **2.4. CHIMERIZMO REIKŠMĖ SERGANT ALD**

### **2.4.1. Alogeninė KKLТ gydant ALD**

Su X chromosoma susijusi ALD yra retas neurometabolinis sutrikimas. Ligos dažnis bendroje populiacijoje sudaro 1:42 000 gyventojų (Bezman L. ir kt., 2001). Šia liga serga berniukai ir vyrai, o moterys paprastai yra besimptomės nešiotojos, nors dėl papildomų spontaninių mutacijų gali susirgti

ir mergaitės (Hershkovitz E. ir kt., 2002). Pagrindinis ALD patogenezės veiksnys – sutrikusi labai ilgų grandžių riebalų rūgščių  $\beta$ -oksidacija ir skilimas peroksisomose (Moser H.W., 1995). Padidėjęs minėtų rūgščių kiekis kraujyje sąlygoja mielino nestabilumą. Pakitęs mielinas aktyvuoja smegenų glijos ląsteles ir sukelia uždegiminę-imuninę CNS demielinizaciją ir/arba antinksčių nepakankamumą (Ito M. ir kt., 2001; Hudspeth M.P. ir Raymond G.V., 2007). Klinikinių simptomų išraiška svyruoja nuo greitai progresuojančios cerebrinės vaikų formos, dėl kurios berniukai paprastai miršta nesulaukę 15 metų, iki adrenomieloneuropatijos, pasireiškiančios periferinėmis paraparezėmis, kurios labiau būdingos suaugusiems (Reingardienė D., 2002; Moser H.W. ir kt., 2005). Iki 10 proc. atvejų liga gali pasireikšti tik Adisono sindromu (Kemp S. ir Moser H.W., [www.x-ald.nl](http://www.x-ald.nl)). Vaikų cerebrinė su X chromosoma susijusi ALD forma pirmą kartą aprašyta 1923 metais (Siemerling E. ir Creutzfeldt H.G., 1923). Liga pasireiškia greitai progresuojančia smegenų baltosios medžiagos demielinizacija. Vidutinis klinikinių simptomų atsiradimo amžius yra 7 metai. Psichoneurologiniai simptomai per 1–3 metus progresuoja iki vegetacinės būklės ir galiausiai ligonio mirties. Vienintelis radikalus gydymo metodas, kuris gali sustabdyti ligos progresavimą, yra alogeninė KKLТ.

ALD yra neurometabolinio sutrikimo pavyzdys, kai liga pakankamai gerai gydoma KKLТ. ADL sergančiųjų lyginamoji studija, kurioje analizuotas bendras išgyvenamumas tarp identiškų CNS pažeidimus turinčių ligonių, parodė reikšmingai geresnį recipientų bendrą išgyvenamumą po KKLТ, lyginant su kitais būdais gydytais vaikais (54 proc., lyginant su 95 proc.,  $p = 0,006$ ) (Mahmood A. ir kt., 2007). Alogeninė transplantacija ALD sergančiam vaikui pirmą kartą aprašyta 1984 metais (Moser H.W. ir kt., 1984). Nuo tada šis gydymo būdas taikomas įvairiose pasaulio klinikose. Transplantacijos efektas grindžiamas imuninės sistemos pakeitimu – aktyvuotos recipiento glijos ląstelės (priklausančios monocitų-makrofagų sistemai) pakeičiamos sveikomis donoro ląstelėmis (Krivit W. ir kt., 1999; Hudspeth M.P. ir Raymond G.V., 2007). Shapiro paskelbė tyrimo, kuriame apie 10 metų stebėta 12 berniukų po alogeninės KKLТ, rezultatus. Nustatyta, kad

transplantacijos efektyvumas stabdant neurologinės simptomatikos progresavimą priklauso nuo psichoneurologinio pažeidimo laipsnio prieš transplantaciją (Shapiro E. ir kt., 2000).

Didžiausia šiuo metu publikuota studija, tyrusi transplantacijos rezultatus ALD sergantiems ligoniams, išspausdinta 2004 metais (Peters C. ir kt., 2004). Joje išnagrinėta 94 ligonių būklė po transplantacijos. Straipsnyje apibendrinta 43 vaikų transplantacijos centrų patirtis nuo 1982 iki 1999 metų. Visiems ligoniams skirtas mieloabliacinis kondicionavimas, tačiau jis buvo nevienodas (citostatikai su apšvita, vien citostatikai, skirtingi chemopreparatai), kadangi tiriamieji surinkti iš daugelio Europos ir JAV klinikų. Donorai ir KKL šaltiniai taip pat yra nevienodi – persodintos negiminingų, giminingų, identiškų ir netapačių donorų ląstelės, kurios imtos iš kaulų čiulpų, periferinio ir virkštelės kraujo. Bendras 5-ių metų išgyvenamumas, persodinus tapataus giminingo donoro KKL, siekė 64 proc., o persodinus negiminingo donoro ląsteles – 53 proc. Dar kartą patvirtinta, kad transplantacijos rezultatams didžiausios įtakos turi psichoneurologinė ligonio būklė iki KKL. Nustatyta, kad intelekto koeficientas prieš transplantaciją yra patikimas prognostinis rodiklis, kuris nusako tiek bendrą išgyvenamumą, tiek neurologinės simptomatikos galimą progresavimą po KKL.

Transplantacijos rezultatams pagerinti, ieškomi alternatyvūs kondicionavimo būdai ar KKL šaltiniai. Tyrimų duomenimis mirtingumas dėl toksinių komplikacijų svyruoja nuo 14 iki 18 proc., o TPŠL išsivysto 12 proc. ligonių (Peters C. ir kt., 2004). Todėl kai kuriose klinikose mėginama skirti sumažinto intensyvumo kondicionavimą. Resnick aprašė 3 ligonius, kuriems skirtas sumažinto intensyvumo kondicionavimas fludarabinu, busulfanu ir antitimocitiniu imunoglobulinu (Resnick I.B. ir kt., 2005). Visiems persodinti tapačių giminingų donorų kaulų čiulpai. Nei vienas šių ligonių nemirė dėl infekcinių-toksinių komplikacijų, tik vienam jų išsivystė I<sup>o</sup> ūmi TPŠL. Visi trys aprašyti pacientai išgyveno po transplantacijos, išliekant stabiliai ar kiek pagerėjusiai neurologinei būklei.



#### **2.4.2. Chimerizmo tyrinėjimai sergant ALD**

Šiai dienai literatūroje esamų duomenų apie chimerizmo kinetiką sergant ALD yra itin mažai. Praėjusio dešimtmečio pabaigoje Bader paskelbė studijos rezultatus, kurioje nustatė MC ryšį su transplantato atmetimu ir leukemijos recidyvu (Bader P. ir kt., 1997). Tiriamųjų grupę sudarė 52 vaikai sergantys piktybinėmis ir nepiktybinėmis kraujo ligomis, iš jų paminėti 2 ALD sirgę ligoniai. Paskyrus mieloabliacinį kondicionavimą busulfanu ir ciklofosfamidą, abiem išsivystė visiškai DC, aptiktas PKL. Abu berniukai mirė dėl pagrindinės ligos progresavimo. Šeši pacientai paminėti kitoje vokiečių autorių studijoje, kurioje tirtas chimerizmas ir profilaktinė imunoterapija 53 nepiktybinėmis kraujo ligomis sergantiems vaikams (Willasch A. ir kt., 2006b). Trims iš šešių recipientų po mieloabliacinio kondicionavimo ir T limfocitų deplecijos išsivystė MC. Vienas jų mirė dėl ligos progresavimo.

Koc tyrinėjo chimerizmą stromos ląstelėse po alogeninės KKLTL, kuri buvo atlikta ligoniams turintiems lizosominį ar peroksisominį medžiagų apykaitos defektą (Koc O.N. ir kt., 1999). Tarp 13 tiriamųjų buvo ir du ALD sergantys ligoniai. Tirtoje ląstelių populiacijoje rastas MC, esant visiškai DC kraujo ląstelėse. Tačiau hemopoezinis chimerizmas šiame darbe plačiau nenagrinėtas.

Krivot analizavo neurologinę simptomatiką po transplantacijos 21 ALD sergančiam ligoniui (Krivot W. ir kt., 1995). Psichoneurologinės būklės pagerėjimas buvo tiesiogiai siejamas su stabilium transplantato prigijimu. Tačiau prigijimo stabilumas nebuvo patvirtintas chimerizmo tyrimais. Klinikinis ir vizualiai matomas (magentinio branduolinio rezonanso tyrimo metu) transplantato gydomasis poveikis buvo taip pat konstatuotas ir kituose tyrimuose (Loes D.J. ir kt., 1994; Moser H.W. ir kt., 1995). Akivaizdus pagerėjimas paprastai buvo matomas praėjus 5-12 metų po transplantacijos (Shapiro E. ir kt., 2000). Visose publikacijose būtina pagrindinės ligos regreso sąlyga laikomas stabilus transplantato prigijimas, tačiau šis teiginys nėra paremtas chimerizmo tyrimais.

Baumann aprašė transplantacijos poveikį 12 berniukų (Baumann M. ir kt., 2003). Šiame tyrime pagrindinis dėmesys skirtas neurologinės būklės vertinimui prieš ir po transplantacijos ir jos įtakai transplantacijos baigčiai. Taip pat paminėtas ir prigijimas po KKL: po mieloabliacinio kondicionavimo busulfanu ir ciklofosfamidų – daugumai ligonių (11/12) išsivystė visiškai DC. Vienam pacientui stebėtas dinamiškoje didėjantis MC, po 4 metų autologinė frakcija siekė 60-80 proc. Plačiau chimerizmo kinetika šiems ligoniams nenagrinėta.

Aukščiau minėtoje Peters studijoje, kurioje tirti 96 ligoniai, minimas ir transplantato prigijimas (Peters C. ir kt., 2004). Vertinant prigijimą, jis buvo apibrėžtas kaip 10-89 proc. donoro ląstelių, esant  $0,5 \times 10^9/L$  neutrofilų periferiniame kraujyje. Chimerizmui tirti naudoti polimorfiniai DNR žymenys arba lyties chromosomos. Taikant tokius kriterijus ir tyrimo metodus, prigijimas konstatuotas 86 proc. ligonių. Turint omenyje ganėtinai heterogeninį ligonių kondicionavimą, skirtingus donorus ir naudotus KKL šaltinius, nevienodą chimerizmo tyrimo metodiką, negalima daryti vienareikšmiškų išvadų apie mišraus ar visiškai DC dažnumą.

Resnick publikuotoje studijoje po sumažinto intensyvumo kondicionavimo fludarabinu, busulfanu ir antitimocitiniu globulinu visiems trims tiriamiesiems išsivystė visiškai DC (Resnick I.B. ir kt., 2005). Chimerizmas tirtas vieną kartą per savaitę periferiniame kraujyje, naudojant polimorfinius DNR žymenis. Vienam ligoniui stebėtas tranzitorinis MC, kuris buvo aptinkamas tik pirmą mėnesį po transplantacijos. Šios studijos trūkumas – mažas ligonių skaičius, todėl chimerizmo kinetika po sumažinto intensyvumo kondicionavimo turėtų būti ištirta didesniai pacientų kolektyvai.

Apibendrinant literatūroje paskelbtus duomenis, galima teigti, kad moksliniai darbai, kurie tyrinėtų chimerizmą ADL sergantiems vaikams kol kas nėra atlikti. Taip pat nėra tyrimų, nagrinėjančių chimerizmo kinetiką ALP, sergant šia reta liga. Todėl disertacijoje pateikiami duomenys teikia naujų žinių apie chimerizmo kinetiką ALD sergantiems vaikams.

## 2.5. ALOGENINĖ KKL LTUVOJE

### 2.5.1. KKL transplantacijų tarnyba Lietuvoje

Pirmoji KKL Lietuvoje atlikta 1999 metų spalio mėnesį Vilniaus universiteto Santariškių klinikose suaugusiam ligoniui, sergančiam ūmia limfoblastine leukemija. Jam persodinti brolio dvynio kaulų čiulpai. Nuo to laiko transplantacijų skaičius Lietuvoje nuolat augo (Slobinas A. ir kt., 2004). Pradžioje KKL buvo persodinamos tik suaugusiems recipientams. Daugiausia buvo atliekamos autologinės ir alogeninės KKL iš tapataus giminingo donoro. Nuo 2005 metų, įsteigus negiminingų donorų paieškos tarnybą ir Lietuvos negiminingų kaulų čiulpų donorų registrą, tapo įmanoma persodinti negiminingo donoro ląsteles.

2002 metų vasario mėnesį Vilniaus universiteto vaikų ligoninėje įkurtas kaulų čiulpų transplantacijos poskyris, kuriame atliekamos KKL transplantacijos vaikams. Pirmą kartą KKL vaikui buvo persodintos 2002 metų vasario 12 dieną – 14-os metų mergaitei, sirgusiai recidyvuojančia Hodžkino limfoma atlikta autologinė transplantacija. Tais pačiais metais balandžio 2 dieną 12-os metų mergaitei dėl įgytos kaulų čiulpų aplazijos persodinti identiškos sesers kaulų čiulpai. Šuo metu Lietuvoje vaikams atliekamos tiek autologinės, tiek alogeninės transplantacijos (Rascon J. ir kt., 2004; Pasaulienė R. ir kt., 2006). Nuo 2005 metų vaikams taip pat pradėtos atlikti negiminingo donoro transplantacijos, kurių skaičius kiekvienais metais didėja (Ragelienė L. ir kt., 2006). Pirmą kartą negiminingo donoro kaulų čiulpai Lietuvoje vaikui buvo persodinti 2005 metų spalio 12 dieną. Pirmąją negiminingų KKL recipientę tapo 7-ių metų mergaitė serganti Fanconi anemija.

Šiuo metu Lietuvoje vaikams ir suaugusiems vidutiniškai atliekama apie 70-80 transplantacijų per metus (Gratwohl A. ir kt., 2007). Apytiksliai pusę jų sudaro alogeninės KKL, kurių didžiąją dalį sudaro transplantacijos iš negiminingo donoro. Lyginant su kitomis Baltijos šalių valstybėmis, Lietuvos KKL transplantacijų tarnyba užima pirmąją vietą – nors Estijoje transplantacijos pradėtos atlikti 1993 metais (Everaus H. ir kt., 2002), didžiąją

jų dalį ilgą laiką sudarė autologinės transplantacijos, atliekamos suaugusiems pacientams (Kaare A. ir Everaus H., 2004). Vaikams daugiausia taip pat persodintos savos KKL, tačiau pastaruoju metu vis daugiau atliekama alogeninių transplantacijų, tame tarpe iš negiminingų donorų (Mikkel S. ir kt., 2008). Latvijoje pirmosios autologinės transplantacijos atliktos 2001 metais, alogeninės – 2006 metais (Puga I. ir kt., 2008). Persodinti KKL vaikams Latvijoje kol kas nėra galimybių.

### **2.5.2. Chimerizmo tyrimų raida Lietuvoje**

Įdiegus alogenines transplantacijas Lietuvoje, atsirado būtinybė tirti chimerizmą (chimerizmo tyrimo reikšmė po alogeninės KKLT aprašyta aukščiau, žr. 12 p.). Pirmieji tyrimai buvo atlikti Lietuvos teismo medicinos institute DNR ekspertizių laboratorijoje. Donoro ir recipiento ląstelėms atskirti naudoti polimorfiniai DNR žymenys, tačiau tyrimai buvo atliekami nereguliariai, dideliais intervalais tarp tiriamosios medžiagos paėmimo. Be to, elektroferogramos buvo vertinamos tik kokybiškai, nepateikiant tikslaus donoro ir recipiento DNR procentinio santykio, o tyrimų atlikimas ir vertinimas užtrukdavo nuo kelių savaitių iki kelių mėnesių. Visa tai neatitiko klinikinių poreikių.

2005 metai Vilniaus Biomedicinos tyrimų centre atsirado galimybė rutiniškai tirti chimerizmą kiekvienam transplantuojamam ligoniui (Ambrasienė D. ir kt., 2006). Donoro ir recipiento ląstelėms atskirti naudoti polimorfiniai DNR žymenys – komercinis 16-os autosominių genetinių sričių ir amelogenino geno rinkinys (AmpFISTR Identifier PCR Kit, Applied Biosystems, JAV). DNR žymenys gausinti dauginės PGR būdu, amplifikatų vaizdiniam įvertinimui naudota kapiliarinė elektroforezė. Metodikos jautrumas siekė  $1-5 \times 10^{-2}$ , rezultatai buvo pateikiami automatizuotai apskaičiavus donoro ir recipiento DNR procentinį santykį. Ši tyrimo metodika atitiko chimerizmo

tyrimams keliamus reikalavimus (Antin J.H. ir kt., 2001; Bader P. ir kt., 2005a), išskyrus tai, kad tyrimų atlikimas užtrukdavo iki kelių savaičių.

Nuo 2007 metų Vilniaus universiteto Santariškių klinikų Hematologijos, onkologijos ir transfuziologijos centre įsteigus biomolekulinių tyrimų laboratoriją, chimerizmui tirti naudojami paskutiniai moksliniai pasiekimai – šalia polimorfinių DNR žymenų tiriami pavienių nukleotidų skirtumai (Gineikienė E. ir kt., 2009). Analizuojami žymenys gausinami tikro laiko PGR, kurios metu atliekamas greitas ir tikslus donoro ir recipiento DNR kiekio įvertinimas. Visa tai padidina metodikos jautrumą iki  $1-5 \times 10^{-2}$ , o tyrimų rezultatai yra prieinami per vieną-dvi dienas, kas labai svarbu klinikinėje praktikoje.

Kol kas Lietuvoje chimerizmas tiriamas tik periferinio kraujo bendroje leukocitų populiacijoje ir kaulų čiulpų mielokariocituose. Atskirų ląstelių populiacijų išskyrimas mūsų šalyje kol kas neatliekamas, nors techninės galimybės tam yra. Vienkartinei chimerizmas tirtas CD4 ir CD8 frakcijose dviem vaikams po alogeninės transplantacijos iš negiminingo donoro (Norkūnas M. ir Ragelienė L., 2008). Abiem ligoniams skirtas sumažinto intensyvumo kondicionavimas, po kurio PKL aptikta recipiento DNR. Ląstelių populiacijų išskyrimas, kuris buvo atliktas tėkmės citometrijos metodu (Matuzevičienė R. ir Kučinskienė Z., 2002), suteikė papildomos klinikinio požiūriu labai vertingos informacijos apie autologinės kraujodaros persistavimą.

Šiuo metu Vilniaus universiteto Santariškių klinikose yra techninės galimybės išskirti ALP tėkmės citometrijos ir imunomagnetinės izoliacijos metodu, naudojant imunomagnetinę kolonėlę. Vilniaus universiteto vaikų ligoninėje planuojama įdiegti imunomagnetinį ląstelių išskyrimą, naudojant imunomagnetines daleles. Tačiau kol kas nėra aišku, ar visiems vaikams po alogeninės KKLTT tikslinga tirti chimerizmą ALP. Turint omenyje didelius alogeninės transplantacijos kaštus, šis klausimas yra ganėtinai aktualus. Šioje disertacijoje pateikiami klinikinio tyrimo duomenys turėtų padėti rasti atsakymą į šį klausimą.

### 3. TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI

#### 3.1. TYRIMO METODOLOGIJA

Tyrimo objektą sudaro chimerizmo ALP tyrinėjimai vaikams, kuriems KKL persodintos Humboldto universiteto Charité klinikų Bendrosios pediatrijos klinikos Vaikų kaulų čiulpų transplantacijos skyriuje (Berlynas, Vokietija) ir Vilniaus universiteto vaikų ligoninės Onkohematologijos centre. Tiriant chimerizmą vokiečių pacientams, ALP izoliacija atlikta prospektyviai pagal žemiau aprašytą protokolą (žr. 3.3.2 skyrių, 41 p.), retrospektyviai buvo peržiūrėta ir išanalizuota pacientų medicininė dokumentacija. Lietuvos vaikų chimerizmas tyrinėtas retrospektyviai, nagrinėjant medicininę dokumentaciją.

Visiems ligoniams chimerizmas tirtas pagal tą pačią schemą:

- 1) išnagrinėti ligonių klinikiniai rodikliai prieš ir po transplantacijos;
- 2) peržiūrėti ir apibendrinti kiekvieno ligonio chimerizmo tyrimai PKL ir ALP; apskaičiuotas DC ir MC dažnis kiekvienoje analizuotoje ląstelių frakcijoje; esant MC, chimerizmo kinetika pavaizduota grafiškai;
- 3) priklausomai nuo chimerizmo kinetikos PKL, ligoniai priskirti DC ar MC grupei (žr. 3.3 skyrių, 40 p.); abiejose grupėse klinikinė eiga palyginta su chimerizmo kinetika;
- 4) įvertinta klinikinių rodiklių iki KKL įtaka chimerizmui DC ir MC grupėse;
- 5) įvertinta chimerizmo PKL ir ALP įtaka transplantacijos rezultatams.

Klinikiniai duomenys surinkti iš ligos istorijų ir ambulatorinių kortelių. Chimerizmas išnagrinėtas, peržiūrėjus ligonių chimerizmo tyrimų originalus DNR laboratorijoje. Kiekvieno ligonio klinikiniai rodikliai ir chimerizmo duomenys apibendrinti ligonio tyrimo anketoje (1 priedas).

Vokiečių pacientams chimerizmo tyrimai atlikti Humboldto universiteto Charité klinikų Teismo medicinos instituto DNR laboratorijoje. Lietuvos vaikams chimerizmo tyrimus atliko Biomedicininis tyrimų centras (Vilnius).

## 3.2. TIRIAMIEJI LIGONIAI

### 3.2.1. Chimerizmo analizė atskirose ląstelių populiacijose

Tiriamąjį kontingentą sudarė vaikai iki 18 metų, kuriems alogeninė KKLТ atlikta Humboldto universiteto Charité klinikų Bendrosios pediatrijos klinikos Vaikų kaulų čiulpų transplantacijos skyriuje (Berlynas, Vokietija). Ligoniams persodintos tapataus giminingo ar negiminingo donoro KKL. Transplantacijos atliktos nuo 1999 metų balandžio iki 2006 sausio mėnesio.

Chimerizmo kinetikos tyrinėjimams pasirinktos trys ligų grupės: ŪLL, FA ir ALD (3.2-1 lentelė). Prieš transplantaciją skirtas ligai specifinis kondicionavimas. Tyrimo tikslas buvo įvertinti chimerizmo kinetiką PKL ir ALP, esant standartinėms transplantacijos sąlygoms, todėl ligoniai, kuriems naudotas ypatingas kondicionavimas, donoras ar transplantato paruošimas (žr. neįtraukimo kriterijus) buvo pašalinti iš analizės.

Neįtraukimo kriterijai:

- sumažinto intensyvumo kondicionavimas ligoniams sergantiems ŪLL
- haploidentinis donoras
- T limfocitų pašalinimas iš transplantato
- ankstyvas mirtingumas iki 14 dienos po KKLТ
- nepakankamas chimerizmo tyrimų skaičius

Duomenų vertinimas baigtas 2006 metų gegužės 1 dieną.

3.2-1 lentelė. Tiriamieji ligoniai.

	Ligonų skaičius	Amžius metais (vidurkis ± SN)	Lytis		
			Beraiukai	Mergaitės	Lyčių santykis
ŪLL	43	11,2 ± 4,9	24	19	1,3:1
FA	22	9,9 ± 4,9	15	7	2,1:1
ALD	21	15,3 ± 8,3	21	0	21:0
Lietuvos pacientai	19	9,8 ± 5,4	8	11	1:1,4
Viso	105	10,1 ± 4,7	71	34	2,1:1

Santrumpos: SN – standartinis nuokrypis

### **3.2.2. Lietuvoje transplantuotų vaikų chimerizmo analizė**

Tiriamąją grupę sudarė vaikai iki 18 metų, kuriems alogeninė KKL atlikta Vilniaus universiteto vaikų ligoninės Onkohematologijos centre nuo 2002 metų vasario iki 2007 metų gegužės mėnesio. Ligoniams persodintos tapataus giminingo ar negiminingo donoro KKL. Tyrimo metu siekta išanalizuoti chimerizmo kinetiką vaikams, kuriems chimerizmas tirtas pagal tokią pačią metodiką kaip ir vokiečių pacientams (žr. žemiau). Kadangi Lietuvoje ALP izoliacija kol kas neatliekama, chimerizmas tirtas tik PKL.

Lietuvos pacientams taikyti tokie patys 3.2.1 skyriuje aprašyti neįtraukimo kriterijai.

Surinktų duomenų vertinimas baigtas 2007 metų gegužės 1 dieną.

Lietuvos vaikų chimerizmo tyrinėjimams buvo gautas Lietuvos bioetikos komiteto leidimas (2007-04-23 Nr.: 12). Iš ligonių ir jų tėvų/globėjų buvo paimtas informuotas sutikimas dalyvauti tyrime (2 priedas).

## **3.3. CHIMERIZMO TYRIMO METODIKA**

Donoro ir recipiento ląstelėms atskirti naudoti polimorfiniai DNR žymenys, taip vadinamos trumpos pasikartojančios sekos (*angl. STR, short tandem repeats*). Jas sudaro nuo 4 iki 10 tandemiškai pasikartojančių nukleotidų porų, formuojančių 100-400 bazių porų ilgio DNR atkarpą. DNR žymenys gausinti dauginės PGR metu. Pagausinti DNR fragmentai analizuoti kapiliarinės elektroforezės metodu.

### **3.3.1. Tiriamoji medžiaga**

Prieš transplantaciją imti donoro ir recipiento periferinio kraujo mėginiai abiejų individų DNR žymenims nustatyti. Analizuotos devynios autosominės



DNR specifinės sritys (lokusai) ir amelogenino genas. Kiekvienai donoro ir recipiento porai identifikuotas mažiausiai vienas informatyvus DNR žymuo.

Po transplantacijos chimerizmui tirti imta apytiksliai 2,7-8 ml periferinio kraujo į mėgintuvėlį su etilendiamintetraacetilo rūgštimi. Periferinio kraujo mėginiai imti kartą per savaitę iki 50 dienos. Vėliau chimerizmas tirtas kartą per dvi savaites iki 100 dienos, po to – kartą per mėnesį per pirmuosius metus po transplantacijos. Vėliau – vieną-du kartus per metus.

### **3.3.2. Atskirų ląstelių populiacijų išskyrimas**

Chimerizmas tirtas PKL ir ALP. Ląstelių frakcijų išskyrimui naudota teigiama selekcija imunomagnetinėmis dalelėmis (Dynabeads<sup>®</sup> M-450, Deutsche Dynal GmbH, Hamburgas, Vokietija).

Imunomagnetinę dalelę sudaro latekso rutuliukas su geležies branduoliu, sujungtu su monokloniniu antikūnu prieš ląstelės paviršiuje esantį antigeną (pvz. anti-CD3 antikūnas prieš T limfocitų CD3 antigeną). Apvalus 4,5 μm skersmens geležies branduolys ( $\delta\text{Fe}_2\text{O}_3$  ir  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) pasižymi magnetinėmis savybėmis, t.y. juda magnetiniame lauke. Įvykus imuninei reakcijai tarp antigeno ir antikūno-geležies branduolio komplekso, surištos ląstelės pašalinamos magneto pagalba ir tokiu būdu atskiriamos nuo kitų.

Ląstelių populiacijos išskyrimas atliktas tokia tvarka:

- PKL (bendra branduolį turinčių ląstelių populiacija periferiniame kraujyje)
- CD3 populiacija (T limfocitai) – CD3-Dynabeads
- CD19 populiacija (B limfocitai) – CD19-Dynabeads
- CD34 populiacija (KKL) – CD34-Dynabeads

Pirmiausia, 150 μl periferinio kraujo atskirta į atskirą mėgintuvėlį PKL tirti. Iš šio mėginio kiekio buvo išskiriama DNR be jokio papildomo tiriamosios medžiagos paruošimo. Į likusį kraujo kiekį įdėta 150μl vienos rūšies imunomagnetinių dalelių ( $4 \times 10^5$  Dynabeads dalelių/μl, Dynal<sup>®</sup> Biotech,

Hamburgas, Vokietija), laikantis viršuje aprašytos išskyrimo tvarkos. Mėginys su Dynabeads dalelėmis inkubuotas švelniai maišant 20-30 min. +6°C temperatūroje. Po inkubacijos mėgintuvėliai 3 minutėms patalpinti į magneto stovą (Dynal Magnetic Particle Concentrator, Dynal<sup>®</sup> MPC). Magnetiniame lauke ląstelių frakcija, surišta specifinių Dynabeads dalelių, atsiskyrė nuo likusios kraujo dalies, kuri buvo surinkta sekančiai inkubacijai. Atskirta ląstelių populiacija tris kartus plauta buferiniame tirpale. Iš 150 µl paruoštos ląstelių suspensijos buvo išskiriama DNR. Po ląstelių frakcijos atskyrimo likusi tiriamoji medžiaga inkubuota su kitos rūšies imunomagnetinėmis dalelėmis, laikantis aukščiau aprašytos išskyrimo tvarkos.

Išskirtos populiacijos grynumas patikrintas tėkmės citometru, pašalinus imunomagnetines daleles specifiniais reagentais (Becton Dickinson, Heidelbergas, Vokietija). Įvairiose išskyrimo etapuose populiacijos grynumas siekė 93 proc.

### **3.3.3. DNR išskyrimas**

Visi DNR išskyrimo etapai atlikti automatizuotai DNR išskyrimo aparatu GenoM<sup>™</sup>-48 Robotic Workstation (GenoVision, Viena, Austrija). Pirmiausia, chaotropiniais reagentais (guanidino tiocianatu) lizuota 150 µl paruoštos ląstelių suspensijos. Iš ląstelių homogenato DNR išgryninta stiklo suspensija, sujungta su magnetinėmis dalelėmis (Qiamp Blood Kit, Qiagen, Hildenas, Vokietija). Nereikalingi ląstelių komponentai atplauti chaotropiniame tirpale, kuris pašalintas etanoliu. Etanolis ir stiklo likučiai nuplauti vandeniu, o magnetinės dalelės nuo DNR atitrauktos magnetu.

### 3.3.4. DNR kiekio matavimas

Išskirtos DNR koncentracija nustatyta, matuojant DNR turinčio tirpalo optinio tankio absorbciją ultravioletinių spindulių spektroskopijos metodu. Prieš DNR kiekio įvertinimą, atlikti kontroliniai matavimai spektrofotometru (GeneQuant-Spectrophotometer, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburgas, Vokietija) su standartiniu DNR tirpalu. DNR koncentracija matuota prie 260 nm (nukleino rūgščių optinio tankio absorbcijos maksimumo) ir prie 320 nm (likusių magnetinių dalelių bazinei absorbcijai nustatyti). DNR koncentracija apskaičiuota pagal formulę:

$$OT_{260nm} = A_{260nm} - A_{320nm}$$

OT – optinis tankis; A – absorbcija.

$OT_{260nm}$  (optinis tankis prie 260 nm) atitiko 50 µg/ml dviejų polinukleotidų grandinių DNR. Išmatavus DNR kiekį, tirpalas skiestas iki PGR amplifikacijai optimalios koncentracijos (Nagy M. ir kt., 2005).

### 3.3.5. DNR žymenų gausinimas PGR metodu

DNR žymenų tyrimui taikyta dauginė PGR, kurios metu gausintos devynios autosominės genetinės sritys (D3S1358/vWA/FGA, D8S1179/D21S11/D18S51 ir D5S818/D13S317/D7S820) ir amelogenino genas – lyties markeris (Li H. ir kt., 1993; Sullivan K.M. ir kt., 1993). Gausinimui naudotas amplifikacijos rinkinys AmpF/STR Profiler Plus<sup>TM</sup> (PE Applied Biosystems, Darmštatas, Vokietija), kurio lokusams specifiniai pradmenys pažymėti trimis fluorescuojančiomis medžiagomis (5-FAM-mėlyna, JOE-žalia und NED-geltona).

Išmatavus DNR koncentraciją, paruoštas tirpalas skiestas destiliuotu vandeniu (Aqua ad injectabilia, Fa. Braun, Melsungenas, Vokietija). Vienai amplifikacijos reakcijai imta 1-2,5 ng DNR, 11µl AmpF/STR Profiler<sup>TM</sup> PGR reagentų mišinio, 1µl AmpliTaq Gold DNR polimerazės ir 5µl AmpF/STR

Profiler<sup>TM</sup> Plus pradmenų rinkinio. Amplifikacijos kokybės kontrolei greta tiriamosios DNR gausinta teigiama kontrolė su standartiniu DNR tirpalu ir neigiama kontrolė be DNR mėginio.

DNR žymenys gausinti termocikleryje (PTC-100, MJ Research, Biozym, Oldendorfas, Vokietija) esant tokioms amplifikacijos sąlygoms:

95°C 11 min. Taq polimerazės aktyvacija

94°C 1 min. }  
59°C 1 min. } 28 ciklai  
72°C 1 min. }

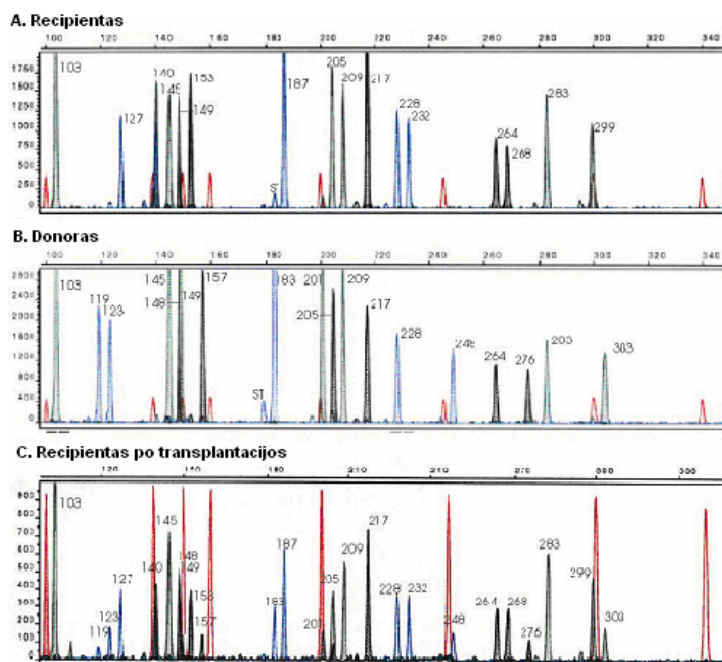
72°C 1 min.

72°C 45 min. prailginimas

### 3.3.6. Kapiliarinė elektroforezė

PGR gausinimo produktų vaizdinei analizei naudotas kapiliarinės elektroforezės analizatorius ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems, Darmštatas, Vokietija). Vienai elektroforezei naudoti šie reagentai: 1,5µl amplifikatų mišinio, 24µl dejonizuoto formamido (Amresco®, Solon, Ohajas, JAV), 1µl vidinio ilgio standarto (Genescan-500 ROX, PE Applied Biosystems, Darmštatas, Vokietija) ir 1,5µl alelių skirstymo mišinio (AmpF/STR Profiler<sup>TM</sup> Profiler Plus Allelic Ladder, PE Applied Biosystems, Darmštatas, Vokietija).

DNR fragmentų perskyrimas vyko 24 minutes nepadengto kvarcinio stiklo kapiliare, užpildytame poliakrilamido geliu esant 60°C temperatūrai. Elektroforezės gelyje amplifikatai suskirstyti pagal ilgį ir išmatuotas jų kiekis: DNR fragmentams slenkant stiklo kapiliaru, alelių ilgis ir kiekis išmatuotas argono lazeriu remiantis fluorescencijos intensyvumu. Kiekvienas alelis atvaizduotas elektroferogramoje kaip atskiras pikas, kurio dydis ir padėtis elektroferogramoje atitiko DNR fragmento kiekį ir ilgį (3-1 pav.). Pikų išsidėstymas ir jų žymėjimas elektroferogramoje atliktas kompiuterinės analizės paketo Software GeneScan 3.1.2 pagalba.



**3-1 pav.** AmpFISTR Profiler Plus™ DNR žymenų spektras, išanalizavus devynis autosominius lokusus ir amelogenino geną: recipientas (A) ir donoras (B) prieš transplantaciją, recipientas po transplantacijos (C).

Paaškinimai: vienas pikas atitinka vieną alelį. Išilginė ašis atspindi alelių dydį, kuris priklauso nuo alelių sudarančio nukleotidų bazių porų kiekio ir yra nurodytas skaičiais šalia kiekvieno piko. Pagausintų alelių kiekis išreikštas santykiniais fluorescencijos vienetais, kurie atidėti pagal skersinę ašį.

### 3.3.7. Elektroferogramos vertinimas

Prieš transplantaciją tirtas recipiento ir donoro DNR žymenų spektras (3-1 pav., A ir B). Palyginus recipiento ir donoro signalus, identifikuoti informatyvūs aleliai. Po transplantacijos analizuojama elektroferograma (3-1 pav., C) lyginta su pradiniais recipiento ir donoro spektrais. Donoro ir recipiento DNR santykis apskaičiuotas pagal informatyvių alelių, t.y. juos atitinkančių pikų plotus, kurie pateikti kompiuteriniame elektroferogramos įvertinime. Mėginiai, kuriuose donoro ir recipiento santykio tiksliai apskaičiuoti nepavyko, buvo pašalinti iš analizės.

Esant MC, donoro ir recipiento DNR santykis apskaičiuotas pagal specialias formules (Thiede C. ir kt., 1999):

I. Recipientas ir donoras yra heterozigotos, jie neturi bendrų alelių, todėl chimerizmo tyrimui yra informatyvūs visi keturi (A, B, C, D) aleliai (3-2.I pav.):

$$\text{Donoro DNR \%} = 100 \times \frac{\text{PP-C} + \text{PP-D}}{(\text{PP-A} + \text{PP-B}) + (\text{PP-C} + \text{PP-D})}$$

PP – piko plotas, A ir B – recipiento aleliai, C ir D – donoro aleliai.

II. Recipientas ir donoras yra heterozigotos, bet turi vieną bendrą alelį (3-2.II pav.):

$$\text{Donoro DNR \%} = 100 \times \frac{\text{PP-C}}{\text{PP-A} + \text{PP-C}}$$

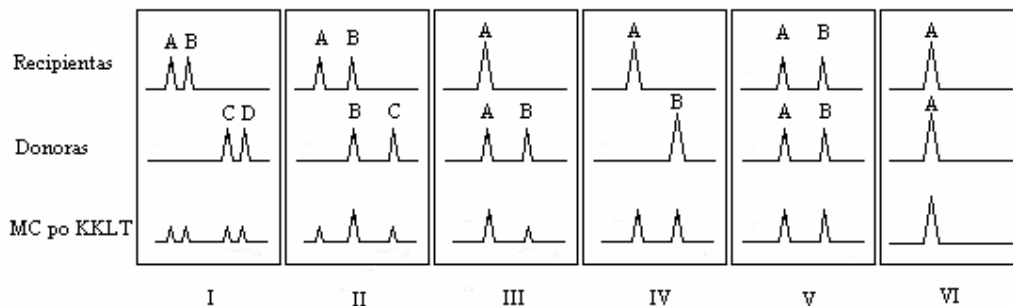
III. Recipientas yra homozigota, donoras – heterozigota. Vienas iš heterozigotinių alelių yra identiškas homozigotiniam aleliui (3-2.III pav.):

$$\text{Donoro DNR \%} = 100 \times \frac{\text{PP-B}}{(\text{PP-A} - \text{PP-B})/2 + \text{PP-B}}$$

IV. Abu individai yra homozigotos, kurių aleliai skirtingi (3-2.IV pav.). Abu aleliai informatyvūs chimerizmo tyrimui:

$$\text{Donoro DNR \%} = 100 \times \frac{\text{PP-B}}{\text{PP-A} + \text{PP-B}}$$

V,VI. Abu individai turi identišką heterozigotinį (3-2.V pav.) ar homozigotinį (3-2.VI pav.) genotipą, kurio aleliai yra neinformatyvūs MC vertinimui.



**3-2 pav.** Galimos recipiento ir donoro alelių kombinacijos DNR lokuse.

### 3.4. CHIMERIZMO APIBRĖŽIMAS IR VERTINIMAS

Išanalizavus atliktus tyrimus, chimerizmas įvertintas kiekybiškai, t.y. apskaičiuotas recipiento ir donoro DNR procentinis santykis. Aukščiau aprašytos chimerizmo tyrimo metodikos jautrumas siekia 1-5 proc. (Antin J.H. ir kt., 2001; Thiede C. ir kt., 2001; Nagy M. ir kt., 1999; Bader P. ir kt., 2005a; Baron F. ir kt., 2005a). Priklausomai nuo aptikto recipiento ir donoro DNR procentinio santykio chimerizmas buvo apibrėžtas kaip:

- 1) visiškas donoro chimerizmas (DC) – aptinkama vien tik donoro DNR;
- 2) mišrus chimerizmas (MC) – recipiento DNR  $\geq 5$  proc. viename tyrime arba recipiento DNR  $< 5$  proc. dviejuose iš eilės atliktuose tyrimuose.

Chimerizmo tyrimų rezultatai vertinti PKL ir ALP. Radus MC bet kurioje tirtoje ląstelių frakcijoje, išnagrinėta chimerizmo kinetika. Kinetikos vertinimui vadovautasi literatūroje aprašytais kriterijais (McCann S.R. ir Lawler M., 2004; Bader P. ir kt., 2005a):

- didėjantis MC – recipiento frakcija nuolat didėja;
- mažėjantis MC – recipiento frakcija palaipsniui mažėja;
- tranzitorinis (žemo lygio) MC – recipiento frakcija neviršija 10 proc. ir aptinkama pavieniuose tyrimuose;
- stabilus ilgalaikis MC – recipiento frakcija išlieka ilgą laiką apytiksliai tame pačiame lygyje.

Atsižvelgiant į recipiento frakcijos dydį PKL, klinikinių rodiklių ir chimerizmo lyginamajai analizei ligoniai buvo suskirstyti į dvi grupes: DC-grupę ir MC-grupę.

### 3.5. STATISTINĖ DUOMENŲ ANALIZĖ

Surinkti duomenys buvo sukaupti duomenų bazėse. Statistinė analizė atlikta programų paketais SPSS 13.0 ir STATISTIKA. Analizuojant duomenis, buvo skaičiuojamos aprašomosios statistikos reikšmės, tikrinamos statistinės hipotezės apie skirtumus tarp vidurkių dažnumų bei požymių tarpusavio priklausomumą.

Tikrinat statistines hipotezes, reikšmingumo lygmuo pasirinktas 0,05.

Kokybinių požymių tarpusavio priklausomumui vertinti imtas chi kvadrato ( $\chi^2$ ) kriterijus. Priklausomai nuo imčių dydžio buvo taikytas tikslus Fišerio arba Monte Karlo (mažoms imtims) kriterijus.

Dviejų grupių vidurkiams palyginti taikytas Stjudento t-testas arba Manovinio testas, o daugiau nei dviejų grupių – Fišerio arba Kruskalo-Voliso testas. Siekiant nustatyti, kurie vidurkiai tarpusavyje statistiškai reikšmingai skiriasi, pritaikytas Bonferoni daugkartinio lyginimo aposteriorinis kriterijus (post hoc).

Rezultatų dinamika vertinta naudojant Vilkoksono ženklų kriterijų priklausomiems kintamiesiems.

Išgyvenamumo analizė atlikta vertinant pagal Kaplano-Mejerio įverčius. Išgyvenamumo duomenų pasiskirstymo skirtumų reikšmingumas vertintas pagal logaritminio rango kriterijų.

Ryšiu tarp požymių nustatyti buvo vertinami koreliacijos koeficientai. Koreliacija vertinta kaip silpna ( $r < 0,3$ ), vidutinė ( $0,33 \leq r \leq 0,6$ ), stipri ( $r > 0,6$ ).

Išėities prognozavimui pagal kintamųjų požymių reikšmes naudota logistinė regresinė analizė.



## **4. REZULTATAI**

### **4.1. ŪMI LIMFOBLASTINĖ LEUKEMIJA**

#### **4.1.1. Ligonų klinikiniai rodikliai**

Per tiriamąjį laikotarpį nuo 1999 metų balandžio iki 2006 metų sausio mėnesio alogeninė KKL atlikta 48 vaikams sergantiems ŪLL. Penki ligoniai buvo pašalinti iš analizės remiantis neįtraukimo kriterijais (žr. 3.2.1 skyrių): du dėl skirto sumažinto intensyvumo kondicionavimo, trys – dėl T limfocitų pašalinimo iš transplantato. Tokiu būdu 43 ligoniai buvo įtraukti į studiją.

Pagrindiniai pacientų klinikiniai rodikliai pateikti 4.1-1 lentelėje. Tiriamųjų tarpe vyravo B printakų leukemijos fenotipas (83,7 proc., 36/43), T limfoblastinė leukemija diagnozuota 7 iš 43 ligonių (16,3 proc.). Aštuoniasdešimt šešiams procentams vaikų (37/43) nustatyta standartinė transplantacijos rizikos grupė – jiems KKL persodintos pirmoje arba antroje visiškoje remisijoje. Didelės rizikos ligoniai, kuriems transplantacija atlikta trečioje ar ketvirtoje remisijoje arba nesant visiškai remisijai, sudarė 14 proc. (6/43). Septyniolikai vaikų (39,5 proc.) buvo rastas tapatus giminingas donoras. Kitiems tiriamiesiems (26/43, 60,5 proc.) persodintos tapataus negiminingo donoro KKL. Daugiausia vaikams buvo persodinti kaulų čiulpai (69,8 proc., 30/43), periferinės KKL panaudotos 30,2 proc. ligonių (13/43). Beveik visiems pacientams (93,0 proc., 40/43) skirtas kondicionavimas viso kūno apšvita, tik trims ligoniams (7 proc.) skirtas kondicionavimas vien chemopreparatais. Persodinant negiminingo donoro KKL, naudota TPŠL profilaktika ciklosporinu ir metotreksatu kartu su antitimocitiniu globulinu. Persodinant giminingo donoro KKL skirtas vien ciklosporinas.

#### **4.1.2. ALP analizė esant visiškam donoro chimerizmui PKL**

Tiriant chimerizmą PKL, 74,4 proc. (32/43) ligonių rastas visiškas DC. Transplantatui prigijus, leukocitų frakcijoje visuose tyrimuose aptikta tik donoro DNR.

**4.1-1 lentelė.** ŪLL sergančių ligonių klinikiniai rodikliai (n = 43).

LIN	Diagnozė	Remisija prieš KKL	Donoras	KKL šaltinis	Kondicionavimas	TPŠL profilaktika	Chimerizmas PKL	Ūmi TPŠL (sunkumo laipsnis)	Lėtinė TPŠL (išplitimo laipsnis)	Neigiamas įvykis	BI (dienos po KKL)
75	pB-ŪLL	VR 2	TND	KČ	VKA/VP16/TT	CSA, MTX, ATG,	MC	I	0	Rec (KČ)	316(†)
88	pB-ŪLL	Rec	TND	KČ	VKA/VP16/TT	CSA, ATG	MC	I	0	Rec (KČ)	160(†)
96	pB-ŪLL	VR 2	TND	PK	VKA/VP16/TT	CSA, MTX, ATG,	DC	I	nevertinama <sup>1)</sup>	MTK	63(†)
98	T-ŪLL	VR 1	TGD	KČ	VKA/VP16	CSA	MC	I	0	VR	2275
107	T-ŪLL	VR 1	TND	PK	VKA/VP16	CSA, MTX, ATG	DC	I	ribota	VR	2203
109	pB-ŪLL	VR 2	TGD	KČ	VKA/VP16	CSA	DC	II	išplitusi	VR	2117
110	pB-ŪLL	DR 2	TGD	KČ	VKA/VP16	CSA	DC	I	išplitusi	VR	2156
111	pB-ŪLL	VR 1	TND	PK	VKA/VP16	CSA, ATG	MC	0	nevertinama <sup>1)</sup>	MTK	71(†)
118	pB-ŪLL	VR 1	TND	PK	VKA/VP16	CSA, MTX, ATG	MC	0	0	Rec (KČ)	216(†)
125	pB-ŪLL	VR 2	TND	PK	VKA/VP16	CSA, MTX, ATG	DC	I	0	MTK	195(†)
128	pB-ŪLL	DR 2	TND	KČ	VKA/VP16	CSA, MTX, ATG	DC	I	ribota	MTK	127(†)
136	pB-ŪLL	VR 2	TND	KČ	VKA/VP16	CSA, MTX, ATG	DC	II	0	VR	1805
152	pB-ŪLL	VR 1	TND	KČ	VKA/VP16	CSA, MTX, ATG	DC	II	ribota	VR	1615
155	pB-ŪLL	VR 2	TGD	KČ	VKA/VP16	CSA, MTX	DC	I	0	VR	1568
156	pB-ŪLL	DR 2	TND	PK	VKA/VP16	CSA, MTX, ATG	DC	I	0	Rec (EM)	1560
162	pB-ŪLL	VR 2	TGD	KČ	VKA/VP16	CSA, MTX	DC	I	0	VR	1452
167	pB-ŪLL	VR 2	TND	PK	VKA/VP16	CSA, MTX, ATG	DC	II	ribota	VR	1385
170	pB-ŪLL	VR 1	TND	KČ	VKA/VP16	CSA, MTX, ATG	DC	II	0	VR	1344
171	pB-ŪLL	VR 2	TND	PK	VKA/VP16	CSA, MTX, ATG	DC	0	0	Rec (EM)	1341
173	pB-ŪLL	VR 1	TGD	KČ	VKA/VP16	CSA, MTX	MC	0	0	MTK	132(†)
174	pB-ŪLL	VR 1	TND	KČ	VKA/VP16	CSA, MTX, ATG,	DC	I	ribota	VR	1294
177	pB-ŪLL	VR 2	TGD	KČ	VKA/VP16	CSA	DC	I	0	VR	1260
178	pB-ŪLL	VR 1	TGD	KČ	VKA/VP16	CSA	DC	I	išplitusi	VR	1259
180	pB-ŪLL	VR 2	TGD	KČ	VKA/VP16	CSA	DC	I	ribota	VR	1246
181	pB-ŪLL	VR 1	TND	PK	VKA/VP16	CSA, MTX, ATG	DC	III	nevertinama <sup>1)</sup>	MTK	65(†)
182	T-ŪLL	VR 2	TGD	KČ	VKA/VP16	CSA	DC	I	ribota	Rec (EM)	532(†)

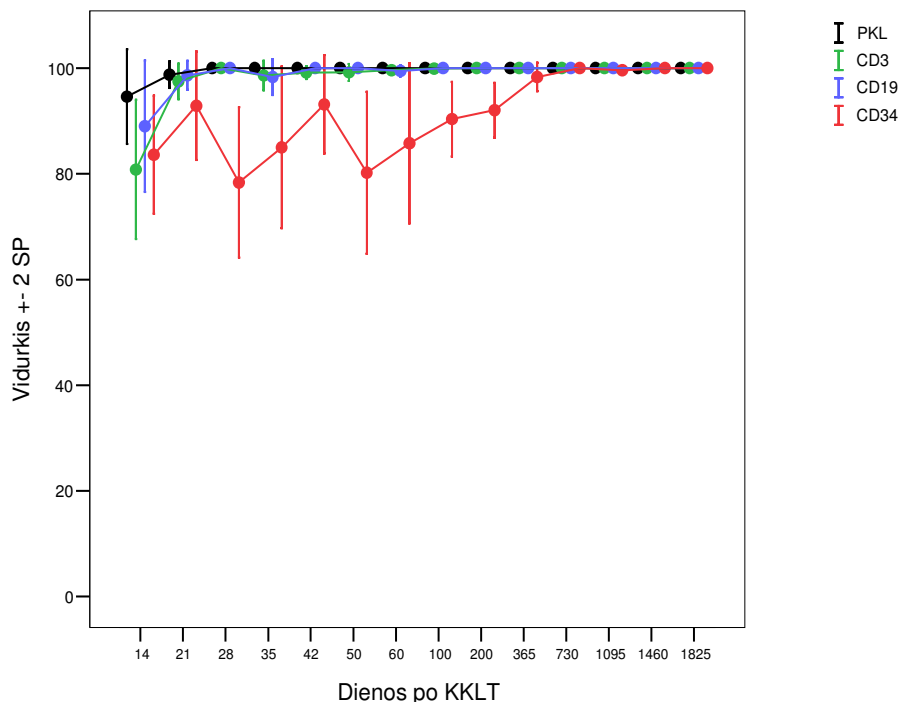
**4.1-1 lentelės tęsinys. Ligonių klinikiniai rodikliai (n = 43).**

LIN	Diagnozė	Remisija prieš KKL	Donoras	KKL šaltinis	Kondicionavimas	TPŠL profilaktika	Chimerizmas PKL	Ūmi TPŠL (sunkumo laipsnis)	Lėtinė TPŠL (išplitimo laipsnis)	Neigiamas įvykis	BI (dienos po KKL)
183	pB-ŪLL	VR 2	TGD	KČ	VKA/VP16	CSA	MC	I	ribota	VR	1225
194	pB-ŪLL	VR 1	TND	PK	VKA/VP16	CSA, MTX, ATG	DC	I	ribota	VR	1134
209	pB-ŪLL	VR 1	TGD	KČ	VKA/VP16	CSA	DC	II	išplitusi	VR	980
211	T-ŪLL	VR 1	TND	PK	VKA/VP16	CSA, MTX, ATG	DC	I	0	VR	951
212	pB-ŪLL	VR 2	TND	KČ	VKA/VP16	CSA, MTX, ATG	MC	I	ribota	Atmetimas	922
220	pB-ŪLL	VR 1	TGD	KČ	VKA/VP16	CSA	MC	0	0	Rec (KČ)	861
223	pB-ŪLL	VR 1	TND	KČ	VKA/VP16	CSA, MTX, ATG	DC	I	ribota	VR	818
224	pB-ŪLL	VR 3	TGD	KČ	VKA/VP16	CSA	DC	III	išplitusi	MTK	191(†)
230	T-ŪLL	VR 1	TGD	KČ	VKA/VP16	CSA	DC	III	ribota	VR	728
243	pB-ŪLL	VR 2	TND	PK	VKA/VP16	CSA, MTX, ATG	DC	0	ribota	VR	521
250	pB-ŪLL	VR 1	TGD	KČ	VKA/VP16	CSA	DC	I	0	VR	433
252	pB-ŪLL	VR 3	TND	PK	VKA/VP16	CSA, MTX, ATG	DC	II	ribota	VR	404
256	T-ŪLL	VR 1	TND	KČ	VKA/VP16	CSA, MTX, ATG	MC	I	0	VR	357
257	pB-ŪLL	VR 3	TGD	KČ	VKA/VP16	CSA	MC	I	ribota	VR	328
264	pB-ŪLL	VR 2	TND	KČ	VKA/VP16	CSA, MTX, ATG	DC	I	0	VR	266
265	pB-ŪLL	VR 2	TND	KČ	VKA/VP16	CSA, MTX, ATG	DC	I	0	VR	258
267	T-ŪLL	VR 1	TND	KČ	VKA/VP16	CSA, MTX, ATG	DC	I	0	VR	202

Santrumpos: ATG – antitimocitinis imunoglobulinas; BI – bendras išgyvenamumas; CSA – ciklosporinas A; DR2 – antra dalinė remisija; KČ – kaulų čiulpai; MTK – mirtis dėl toksinių komplikacijų; MTX – metotreksatas; pB-ŪLL – B pirmtakų ūmi limfoblastinė leukemija; PK – periferinis kraujas; Rec (EM) – eksramedulinis recidyvas; Rec (KČ) – kaulų čiulpų recidyvas; T-ŪLL – T pirmtakų ūmi limfoblastinė leukemija; TGD – tapatus giminingas donoras; TND – tapatus negiminingas donoras; ŪBL – ūmi bifenotipinė leukemija; TT – tiotepa; VKA – viso kūno apšvita; VP16 – etopozidas 16; VR – visiška remisija; VR1,2,3 – pirmą, antrą, trečią visišką remisiją.

<sup>1)</sup> nevertinama – ligonis mirė nesulaukęs 100 dienų po KKL, kai išsivysto lėtinė TPŠL.

(†) – ligonis mirė



**4.1-1 pav.** Chimerizmo vidurkių kinetika ALP esant visiškam DC leukocituose (n = 32).

Ištyrus chimerizmą ALP, esant visiškam DC leukocituose, atskirose ląstelių frakcijose nustatytas MC: T limfocituose recipiento DNR rasta 19,4 proc. ligonių, B limfocituose – 9,4 proc., o KKL – 70,0 proc. ligonių.

Analizuojant chimerizmo kinetiką ALP, CD3 ir CD19 populiacijose stebėtas tranzitorinis chimerizmas: recipiento DNR dalis neviršijo 17 proc., ji buvo randama pavieniuose tyrimuose, daugiausia per pirmąsias 100 dienų po KKLТ. Autologinės frakcijos procentinių vidurkių analizė parodė, kad leukocituose, T ir B limfocituose chimerizmas reikšmingai nesiskyrė per visą tyrimo laikotarpį (4.1-1 pav.). Tuo metu CD34 frakcijoje stebėtas palaipsniui mažėjantis MC. Palyginus chimerizmo vidurkius leukocituose ir CD34 populiacijoje, nustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas nuo 50 dienos iki pirmųjų metų po KKLТ (4.1-2 lentelė). Recipiento DNR kiekis CD34 populiacijoje svyravo nuo 3 iki 80 proc. Galutinė chimerizmo konversija KKL įvyko apie antruosius metus po transplantacijos.

#### 4.1-2 lentelė. Chimerizmo vidurkių palyginimas PKL ir KKL sergant ŪLL.

Diena po KKL	14	21	28	35	42	50	60	100	200	365	730	1095	1460
<i>P</i> reikšmė*	0,345	0,285	0,018	0,043	0,109	0,018	0,043	0,008	0,005	0,180	1,0	0,317	1,0

\* Vilkoksono ženklų kriterijus

#### 4.1.3. Mišrus chimerizmas PKL ir ALP

Mišrus chimerizmas PKL rastas 25,6 proc. (11/43) ligonių. Ištirus chimerizmo kinetiką leukocituose, penkiems ligoniams stebėtas didėjantis MC, keturiems – žemo lygio MC ir dviems – mažėjantis MC (4.1-3 lentelė).

Keturiems iš vienuolikos vaikų (LIN 75, 88, 118 ir 220) didėjantis MC buvo sąlygotas leukemijos recidyvo kaulų čiulpuose. Vidutinis recidyvo diagnozės laikas sudarė 204 dienas po transplantacijos (svyravo nuo 48 iki 831 dienos). Besivystant recidyvui, lygiagretus ir staigus donoro DNR mažėjimas stebėtas visose tirtose ląstelių populiacijose (4.1-2 pav.). Dviem iš šių ligonių (LIN 75 ir 118) konstatuota chimerizmo konversija po antros transplantacijos.

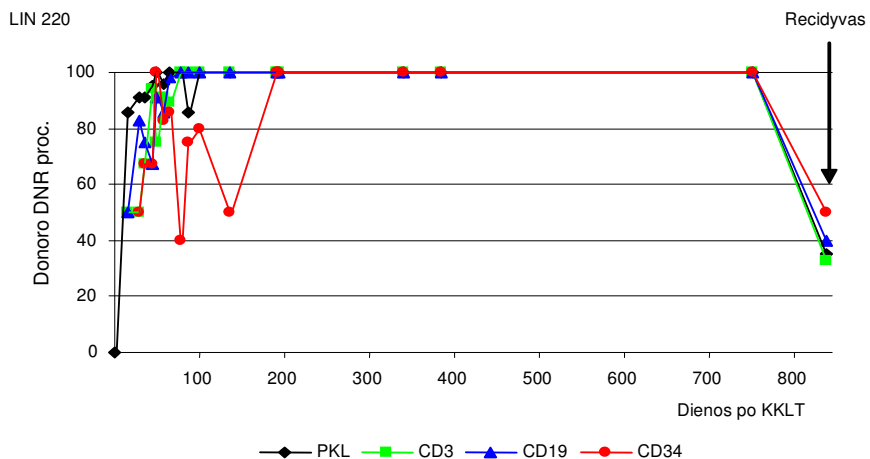
#### 4.1-3 lentelė. Mišrus chimerizmas sergant ŪLL (n = 11).

LIN	MC kinetika PKL	Recidyvo diagnozė (diena po KKL)	Skirtas gydymas	Chimerizmo konversija PKL	Chimerizmo konversija ALP	Mirties priežastis	BI (diena po KKL)
75	Didėjantis	231	KKLT 2	DC	DC	MLP	316
88	Didėjantis	48	Imatinibas	neištirta <sup>1)</sup>	neištirta <sup>1)</sup>	MLP	160
98	Žemo lygio	–	CSA nutraukimas	DC	DC	–	2275
111	Žemo lygio	–	DLI	neištirta <sup>1)</sup>	neištirta <sup>1)</sup>	MTK	71
118	Didėjantis	86	KKLT 2	DC	DC	MLP	216
173	Mažėjantis	–	CSA nutraukimas	DC	DC	MTK	132
183	Žemo lygio	–	MMF nutraukimas	DC	DC	–	1225
212	Didėjantis	–	CSA nutraukimas	MC	MC	–	922
220	Didėjantis	831	Chemoterapija	neištirta <sup>2)</sup>	neištirta <sup>2)</sup>	–	861
256	Žemo lygio	–	CSA ↓	DC	DC	–	357
257	Mažėjantis	–	CSA ↓	DC	DC	–	328

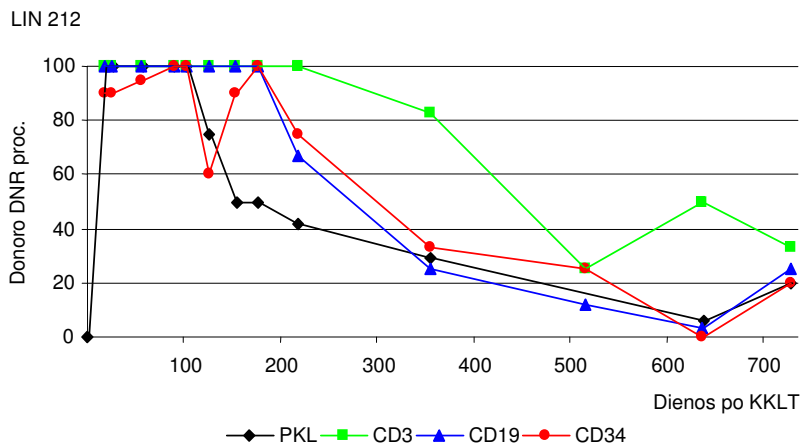
Santrumpos: BI – bendras išgyvenamumas, CSA – ciklosporinas A, CSA ↓ – ciklosporino A dozės sumažinimas; DLI – donoro limfocitų infuzija; KKL 2 – antroji transplantacija; MLP – mirtis dėl leukemijos progresavimo; MMF - mikofenolato mofetilas (Cellcept®); MTK – mirtis dėl toksinių komplikacijų.

<sup>1)</sup> chimerizmo konversija neištirta dėl staigios ligonių mirties

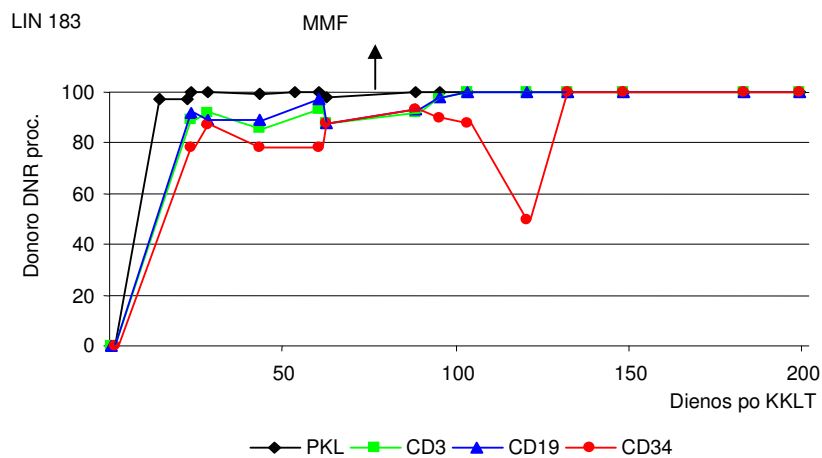
<sup>2)</sup> apie chimerizmo konversiją nėra duomenų



4.1-2 pav. Mišrus chimerizmas dėl leukemijos recidyvo.



4.1-3 pav. Mišrus chimerizmas dėl autologinės rekonstitucijos.



4.1-4 pav. Mišraus chimerizmo konversija į visišką donoro chimerizmą.

Santrumpos: MMF ↑ – mikofenolato mofetilo (Cellcept®) nutraukimas.

Kitiems dviem vaikams (LIN 88 ir 220) chimerizmas po skirto gydymo liko neištirtas dėl staigios ligonių mirties. Tyrimo duomenų vertinimo dieną vienas iš keturių ligonių, kuriems išsivystė leukemijos recidyvas, buvo gydytas chemoterapija. Likę trys vaikai mirė dėl leukemijos progresavimo nepaisant skirto gydymo.

Vienam ligoniui (LIN 212) didėjantis MC buvo nulemtas autologinės kraujodaros atsistatymo. Donoro ląstelių dalis palaipsniui mažėjo visose tirtose ląstelių populiacijose (4.1-3 pav.). Atlikus papildomus tyrimus, konstatuota normalios hemopoezės regeneracija be piktybinio klonų požymių. Pacientui tęsėsi ilgalaikė remisija.

Keturiems vaikams (LIN 98, 111, 183 ir 256) rastas žemo lygio MC – recipiento DNR kiekis leukocitų frakcijoje neviršijo 8 proc., tuo tarpu ALP MC siekė 50 proc. (4.1-4 pav.). Visiems šiems ligoniams įvyko MC konversija į DC po imunosupresinio gydymo korekcijos. Vienam iš keturių ligonių (LIN 111) buvo atlikta donoro limfocitų infuzija, po kurios išsivystė ūmi TPŠL. Šis pacientas mirė dėl su TPŠL susijusių toksinių komplikacijų. Kitiems trims vaikams tęsėsi ilgalaikė visiška remisija.

Dviem iš vienuolikos ligonių (LIN 173 ir 257) transplantatui prigijus, stebėtas mažėjantis MC, kuris palaipsniui virto visišku DC po imunosupresinio gydymo sumažinimo arba nutraukimo (4.1-3 lentelė). Vienas iš šių ligonių mirė dėl toksinių-infekcinių komplikacijų, kitam tęsėsi ilgalaikė visiška remisija.

Visais atvejais įvykus chimerizmo konversijai, chimerizmo pokyčiai leukocituose ir ALP buvo lygiagretūs (4.1-3 lentelė).

#### **4.1.4. Klinikinių rodiklių ir chimerizmo PKL lyginamoji analizė**

Pagrindiniai ligonių klinikiniai rodikliai iki transplantacijos ir jos išėties parametrai pateikti 4.1-4 lentelėje. Prieštransplantacinių veiksnių analizė parodė, kad nė vienas iš vertintų rodiklių (remisija iki KKL, donoras, KKL šaltinis, kondicionavimas) statistiškai reikšmingai nesiskyrė tarp ligonių

**4.1-4 lentelė.** ŪLL sergančių ligonių klinikinių rodiklių lyginamoji analizė priklausomai nuo chimerizmo PKL (n = 43).

	DC (n = 32)	MC (n = 11)	p-reikšmė
Dažnumas (proc.)	74,4	25,6	0,001 <sup>a</sup>
Remisija			
1-2 VR	28	9	0,637 <sup>a</sup>
> 1-2 VR	4	2	
Donoras			
TGD	12	5	0,728 <sup>a</sup>
TND	20	6	
KKL šaltinis			
kaulų čiulpai	21	9	0,456 <sup>a</sup>
periferinis kraujas	11	2	
Kondicionavimas			
su VKA	31	9	0,156 <sup>a</sup>
be VKA	1	2	
Ūmi TPŠL			0,055 <sup>a, 1)</sup>
0	2*	4*	*0,029 <sup>b</sup>
I-II	27	7	
III-IV	3	0	
Lėtinė TPŠL			
nebuvo	13	7	0,469 <sup>a, 2)</sup>
ribota	12	3	
išplitusi	5	0	
nevertinama§	2	1	
Mirtingumas dėl toksinių komplikacijų			
gyvena/mirė dėl kitų priežasčių	26	9	0,156 <sup>b</sup>
mirė	6	2	
Leukemijos recidyvas			0,004 <sup>a, 3)</sup>
remisija	29	7	
kaulų čiulpu ekstramedulinis	0*	4*	*0,003 <sup>b</sup>
ekstramedulinis	3	0	
Ilgalaikė visiška remisija			
tęsiasi	26	5#	0,091 <sup>b</sup>
mirė	6	5	
Stebėjimo laikas (dienos po KKLТ)			
Mediana	1057	328	0,092 <sup>c</sup>
[ min - max ]	[63-2203]	[71-2275]	
Vidutinis rangas	23,91 <sup>c</sup>	16,45 <sup>c</sup>	
[95 proc. PI]	[747-1220]	[178-1070]	

Santrumpos: TGD – tapatus giminingas donoras; TND – tapatus negiminingas donoras; VKA – viso kūno apšvita; VR – visiška remisija.

<sup>a</sup>Chi-kvadrato kriterijus; <sup>b</sup>Tikslus tikimybių palyginimo kriterijus; <sup>c</sup>Mano Vitnio kriterijus

<sup>1)</sup> $\chi^2 = 6,797$ ; I.I. = 2; <sup>2)</sup> $\chi^2 = 2,991$ ; I.I.=3; <sup>3)</sup> $\chi^2 = 6,93$ ; I.I. = 2; <sup>4)</sup> $\chi^2 = 7,822$ ; I.I. = 2 (I.I. – laisvės laipsnis).

§ - ligoniai mirė iki +100 dienos po KKLТ, t.y iki išsivystant lėtinei TPŠL.

# - vienas ligonis (LIN 220) gyvena nesant remisijai

turinčių DC ar MC leukocituose (atitinkamai  $p = 0,637$ ,  $p = 0,728$  ir  $p = 0,456$ ). Tik dviem iš 32 vaikų su DC nebuvo jokių ūmios TPŠL požymių, lyginant su 4 iš 11 recipientų, kuriems PKL laikėsi autologinė frakcija, šis skirtumas yra statistiškai reikšmingas ( $p = 0,029$ ). Tuo tarpu lyginant abi



grupės, neradome reikšmingo skirtumo tarp lėtinės TPŠL pasireiškimo dažnio ( $p = 0,469$ ). Analizuojant neigiamus įvykius po KKLТ, mirtis dėl toksinių komplikacijų ištiko panašų ligonių skaičių abiejose grupėse: 15,6 proc. (3/32) ligonių su DC ir 18,2 proc. (2/11) ligonių su MC ( $p = 0,156$ ). Leukemijos recidyvas buvo statistiškai reikšmingai dažniau diagnozuotas ligoniams su MC ( $p = 0,004$ ), ypatingai vertinant kaulų čiulpų recidyvo dažnį tarp abiejų grupių ( $p = 0,003$ ). Trims ligoniams turintiems DC išsivystė izoliuotas ekstramedulinis recidyvas. Tyrimo rezultatų vertinimo momentu 81,3 proc. (26/32) ligonių su DC ir 45,5 proc. (5/11) ligonių su MC tęsėsi ilgalaikė visiška remisija ( $p = 0,091$ ), esant vidutiniam stebėjimo laikui 1057 (63-2203) ir 328 (71-2275) dienų po KKLТ atitinkamai DC- ir MC-grupėse ( $p = 0,092$ ).

#### 4.1.5. Chimerizmo PKL ir ALP įtaka išgyvenamumui po transplantacijos

Analizuojant išgyvenamumo rodiklius priklausomai nuo chimerizmo PKL (4.1-5 pav.), nustatėme, kad visiškas DC leukocitų frakcijoje lemia reikšmingai geresnį išgyvenamumą be recidyvų: 90,6 proc. ligonių su DC lyginant su 63,6 proc. ligonių su MC,  $p = 0,014$  (skaičiuojant kaulų čiulpų ir ekstramedulinį recidyvus), taip pat šgyvenamumą be kaulų čiulpų recidyvo (atitinkamai 100 proc. ir 63,6 proc. ligonių,  $p < 0,01$ ) ir išgyvenamumą be

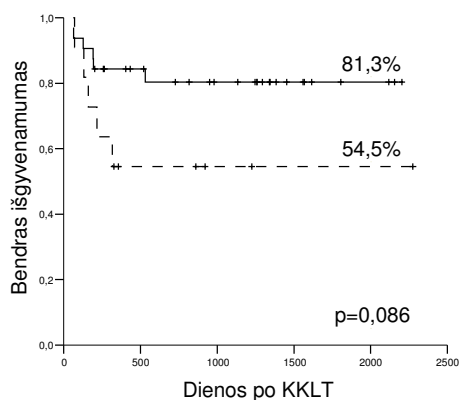
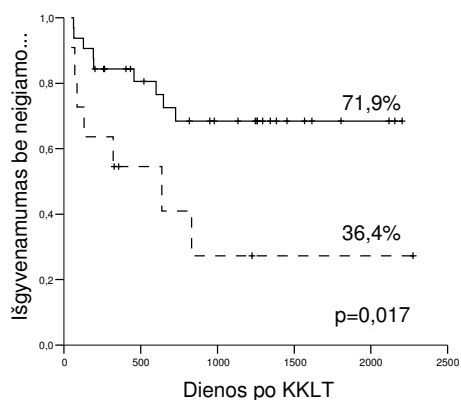
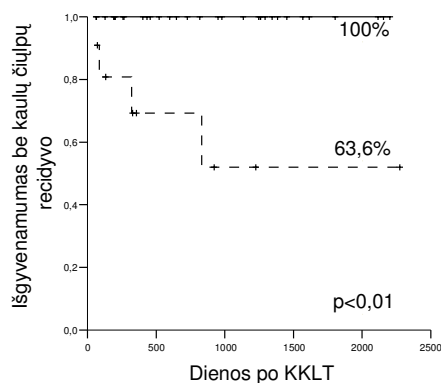
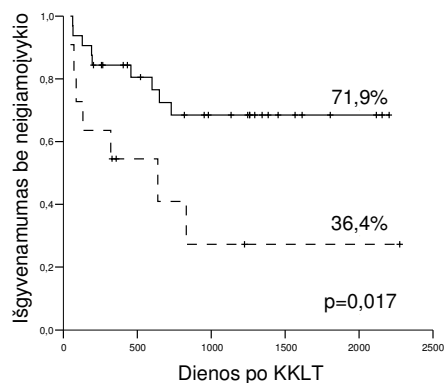
**4.1-5 lentelė.** Chimerizmo PKL ir ALP įtaka išgyvenamumo rodikliams.

	PKL			CD3			CD19			CD34		
	DC	MC	$p^*$	DC	MC	$p^*$	DC	MC	$P^*$	DC	MC	$P^*$
Išgyvenamumas be recidyvo (proc.)	90,6	63,6	0,014	92,0	75,0	0,087	90,0	77,8	0,257	88,9	85,7	0,803
Išgyvenamumas be neigiamo įvykio (proc.)	71,9	36,4	0,017	76,0	50,0	0,069	66,7	66,7	0,850	66,7	71,7	0,846
Bendras išgyvenamumas (proc.)	81,3	54,5	0,086	88,0	62,5	0,073	76,7	88,9	0,447	77,8	85,7	0,582

\* - Logaritminio rango kriterijus

neigiamo įvykio (71,9 proc. ir 36,4 proc. ligonių,  $p = 0,017$ ). Neigiamas įvykis apibrėžtas kaip kaulų čiulpų arba ekstramedulinis recidyvas, mirtingumas dėl toksinių komplikacijų ir autologinė rekonsitucija. Tačiau chimerizmas PKL neturėjo statistiškai reikšmingos įtakos bendram išgyvenamumui – išgyveno 81,3 proc. ligonių su DC ir 54,5 proc. ligonių su MC ( $p = 0,086$ ).

Išanalizavus chimerizmą atskirose ląstelių frakcijose, nustatėme, kad nė viena iš tyrinėtų ląstelių populiacijų neturėjo įtakos transplantacijos rezultatams: nei vienas iš trijų analizuotų išgyvenamumo rodiklių reikšmingai nesiskyrė priklausomai nuo chimerizmo ALP (4.1-5 lentelė).

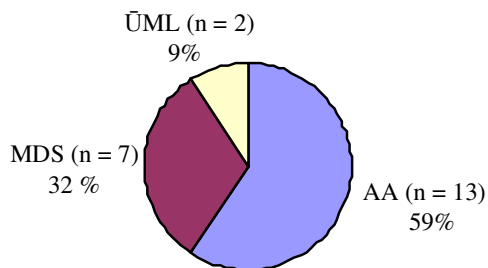


**4.1-5 pav.** Išgyvenamumo rodikliai priklausomai nuo chimerizmo PKL: — DC, - - - MC.

## 4.2. FANCONI ANEMIJA

### 4.2.1. Ligonų klinikiniai rodikliai

Per tiriamąjį laikotarpį nuo 1999 metų balandžio iki 2006 metų sausio mėnesio alogeninė KKL atlikta 24 vaikams sergantiems FA. Du ligoniai buvo pašalinti iš analizės dėl ankstyvo toksinio mirtingumo, remiantis neįtraukimo kriterijais (žr. 3.2.1 skyrių). Tokiu būdu chimerizmas išanalizuotas 22 vaikams. Ligonų klinikiniai rodikliai apibendrinti 4.2-1 lentelėje. Iki transplantacijos daugumai tiriamųjų (59 proc., 13/22) kaulų čiulpų aplazija pasireiškė aplazine anemija. Mielodisplaziniai pokyčiai kaulų čiulpuose ir transformacija į ūmią mieloblastinę leukemiją diagnozuoti atitinkamai 32 proc. (7/22) ir 9 proc. (2/22) ligonių (4.2-1 pav.). Iš septynių vaikų, kuriems iki KKL buvo diagnozuotas mielodisplazinis sindromas, keturiems periferiniame kraujyje nustatyta refrakterinė anemija, o trims rastas padidintas blastų kiekis. Daugumai vaikų (63,6 proc., 14/22) persodintos tapataus negiminingo donoro KKL. Tapatus giminingas donoras rastas šešiams recipientams (27,3 proc.), o dviem ligoniams (9,1 proc.) persodintos netapataus giminingo donoro KKL. Kiek daugiau nei pusei sergančiųjų (12/22, 54,5 proc.) persodinti kaulų čiulpai, lyginant su 45,5 proc. (10/22) vaikų, kuriems persodintos periferinio kraujo KKL.



**4.2-1 pav.** FA recipientų kaulų čiulpų aplazijos išraiška iki KKL (n = 22).

Santrumpos: AA – aplazinė anemija; MDS – mielodisplazinis sindromas; ŪML – ūmi mieloblastinė leukemija.

4.2-1 lentelė. FA sergančių ligonių klinikiniai rodikliai (n = 22).

LIN	KČ aplazija prieš KKL	Donoras	KKL šaltinis	Kondicionavimas	Ūmi TPŠL (sunkumo laipsnis)	Lėtinė TPŠL (išplitimo laipsnis)	Chimerizmas PKL	Transplantato atmetimas	Neigiamas įvykis	BI dienos po KKL
91	ŪML	TND	PK	Flu/Bu/ATG	I	ribota	DC	-	VR	2376
97	AA	NGD	KČ	Flu/Bu/ATG	0	nevertinama <sup>1)</sup>	MC	+	MTK	1943 (†)
101	MDS (RA)	TGD	KČ	Flu/ATG/OKT3	I	0	MC	-	VR	2243
106	AA	TGD	KČ	Flu/ATG	0	nevertinama <sup>1)</sup>	MC	+	VR	2205
112	MDS (RAEB)	TND	KČ	Flu/Bu/ATG/OKT3	I	ribota	DC	-	VR	2110
122	MDS (RAEB)	TND	PK	Flu/Bu/ATG/OKT3	I	nevertinama <sup>2)</sup>	DC	-	MTK	47 (†)
124	MDS (RA)	TND	PK	Flu/Bu/ATG/OKT3	I	0	DC	-	VR	1974
131	MDS (RA)	TGD	KČ	Flu/Bu/ATG/OKT3	II	ribota	DC	-	MTK	498 (†)
134	AA	TGD	KČ	Flu/ATG/OKT3	0	nevertinama <sup>1)</sup>	MC	+	MTK	672 (†)
137	ŪML	TND	PK	Flu/Bu/ATG/OKT3	0	nevertinama <sup>2)</sup>	DC	-	MTK	100 (†)
141	AA	TND	PK	Flu/Bu/ATG/OKT3	III	ribota	DC	-	MTK	321 (†)
147	AA	TND	PK	Flu/Bu/ATG/OKT3	II	ribota	DC	-	MTK	441 (†)
151	AA	TND	PK	Flu/Bu/ATG/OKT3	0	0	DC	-	VR	1607
160	AA	TND	PK	Flu/Bu/ATG/OKT3	I	0	DC	-	MTK	439 (†)
161	AA	TGD	PK	Flu/Bu/ATG/OKT3	0	0	MC	-	MTK	115 (†)
172	AA	TND	KČ	Flu/Bu/ATG/OKT3	I	0	MC	-	VR	1330
176	AA	TND	KČ	Flu/Bu/ATG/OKT3	0	0	MC	-	VR	1271
187	MDS (RA)	TND	KČ	Flu/Bu/ATG/OKT3	0	0	MC	-	VR	1174
216	AA	TND	KČ	Flu/Bu/ATG/OKT3	0	0	MC	-	VR	875
217	AA	TND	KČ	Flu/Bu/ATG/OKT3	I	nevertinama <sup>1)</sup>	MC	+	VR	881
263	MDS (RAEB)	NGD	PK	Flu/Bu/Cyc/Campath	0	0	MC	-	VR	269
266	AA	TGD	KČ	Flu/Bu/ATG/OKT3	0	0	MC	-	VR	216

Santrumpas: AA – aplazinė anemija; ATG – antitimocitinis imunoglobulinas; BI – bendras išgyvenamumas; Bu – busulfanas; Campath® – alemtuzumabas; Cyc – ciklofosfamidai; Flu – fludarabinas; KČ – kaulų čiulpai; MDS – mielodisplazinis sindromas; MTK – mirtis dėl toksinių komplikacijų; NGD – netapatus giminingas donoras; OKT3® – muromonabas; RA – refrakterinė anemija; RAEB – refrakterinė anemija su padidintu blastų skaičiumi; TGD – tapatus giminingas donoras; TND – tapatus negiminingas donoras; ŪML – ūmi mieloblastinė leukemija; VR – visiška remisija.

<sup>1)</sup> ligoniui buvo atlikta antra KKL nepraėjus 100 dienų po pirmos transplantacijos

<sup>2)</sup> ligonis mirė nesulaukęs 100 dienų po KKL, kai išsivysto lėtinė TPŠL

(†) – ligonis mirė

Visiems pacientams skirtas kondicionavimas pagal GEFA-protokolą fludarabinu 180 mg/m<sup>2</sup> ir busulfanu 2 mg/kg. Esant inkstų funkcijos sutrikimui dėl FA būdingų inkstų anomalijų, citostatikų dozė mažinta vadovaujantis farmakokinetine analize. TPŠL profilaktikai skirta standartinė ciklosporino dozė (Storb R. ir kt., 1986), antitimocitinis imunoglobulinas ir muromonabas (OKT3<sup>®</sup>).

#### **4.2.2. ALP analizė esant visiškam donoro chimerizmui PKL**

Tiriant chimerizmą PKL, 45,5 proc. (10/22) ligonių rastas visiškas DC. Transplantatui prigijus, leukocitų frakcijoje visuose tyrimuose buvo randama tik donoro DNR. Analizuojant chimerizmą ALP, visose tirtose ląstelių populiacijose taip pat aptikta 100 proc. donoro DNR. Iš visų išnagrinėtų chimerizmo tyrimų tik viename jų rasta 8 proc. tranzitorinė recipiento frakcija T limfocitų populiacijoje, kurios nepavyko aptikti sekančio tyrimo metu.

#### **4.2.3. ALP analizė esant mišriam chimerizmui PKL**

Mišrus chimerizmas PKL rastas 54,5 proc. (12/22) ligonių. Ištyrus chimerizmo kinetiką leukocituose, penkiems ligoniams nustatytas didėjantis MC, likusiems septyniems – stabilus ilgalaikis MC (4.2-2 lentelė). Keturiems vaikams (LIN 97, 106, 134 ir 217) didėjantis MC buvo sąlygotas transplantato atmetimo. Besivystant atmetimui, donoro DNR sumažėjo pirmiausia ląstelių populiacijose (4.2-2 pav.), o vėliau ir PKL. Šiems ligoniams KKL buvo persodintos pakartotinai – po antros transplantacijos visiems keturiems vaikams nustatyta pilna chimerizmo konversija. Tik vienam pacientui (LIN 106) po antros transplantacijos esant visiškam DC leukocituose, CD3, CD19 ir CD34 ląstelių populiacijose išliko autologinė kraujodara. Šiam ligoniui tęsėsi ilgalaikė visiška remisija. Dviem vaikams (LIN 97 ir 134) esant visiškam DC

**4.2-2 lentelė.** Mišrus chimerizmas sergant FA (n = 12).

LIN	MC kinetika PKL	Transplantato atmetimas po KKL	Neigiamo įvykio diena po KKL	Skirtas gydymas	Chimerizmo konversija PKL	Chimerizmo konversija ALP	Mirties priežastis	BI (diena po KKL)
97	Didėjantis	Atmetimas	26	KKL 2	DC	DC	li.TPŠL	1943
101	Stabilus	–	–	OKT3	DC	MC	–	2243
106	Didėjantis	Atmetimas	42	KKL 2	DC	MC	–	2205
134	Didėjantis	Atmetimas	55	KKL 2	DC	DC	li.TPŠL	672
161	Stabilus	–	–	DLI	MC	MC	MTK	115
172	Stabilus	–	–	OKT3	DC	DC	–	1330
176	Stabilus	–	–	OKT3	MC	MC	–	1271
187	Stabilus	–	–	OKT3	MC	MC	–	1174
216	Stabilus	–	–	OKT3	MC	MC	–	875
217	Didėjantis	Atmetimas	62	KKL 2	DC	DC	–	881
263	Stabilus	–	–	–	DC	MC	–	269
266	Didėjantis	–	–	OKT3	DC	DC	–	216

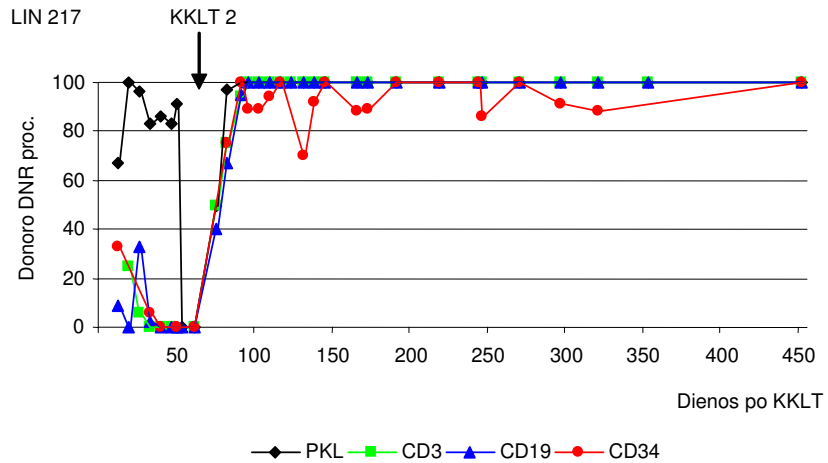
Santrumpos: BI – bendras išgyvenamumas, DLI – donoro limfocitų infuzija; KKL 2 – antroji transplantacija; li.TPŠL – lėtinė išplitusi TPŠL; MTK – mirtis dėl toksinių komplikacijų; OKT3<sup>®</sup> – moromonabas.

visose ląstelių populiacijose išsivystė lėtinė išplitusi TPŠL, dėl kurios šie vaikai mirė.

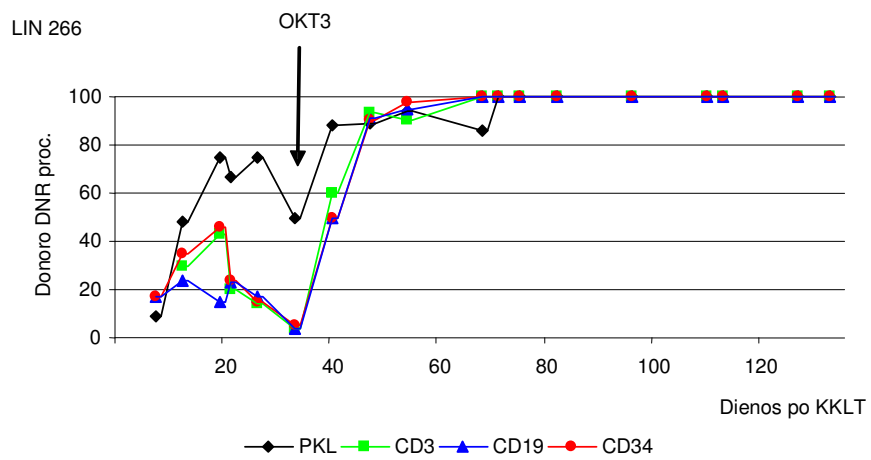
Vienam vaikui (LIN 267) padidėjus recipiento frakcijai iki 50 proc., skirtas OKT3 transplantato atmetimo profilaktikai. Tuo metu ALP donoro frakcija sudarė 4-5 proc. (4.2-3 pav.). Po gydymo OKT3 gauta pilna chimerizmo konversija į visišką DC tiek PKL, tiek ALP. Šis pacientas yra stabilioje remisijoje.

Stabilus ilgalaikis MC nustatytas septyniems ligoniams. Analizuojant chimerizmo kinetiką, rasta disociacija tarp PKL ir ALP (4.2-4 pav.): transplantatui prigijus, recipiento frakcija leukocituose neviršijo 10 proc. Tuo metu ALP stebėtas ženklus donoro DNR kiekio svyravimas nuo 0 iki 100 proc., ypač išreikštas per pirmąsias 100 dienų po transplantacijos. Lyginant šių pacientų chimerizmo kinetiką, rasti panašūs pokyčiai (4.2-5 pav.): esant nedideliame stabiliam MC leukocituose, visose ALP stebėtas palaipsniui mažėjantis MC. Atskirose ląstelių frakcijose donoro DNR laipsniškai didėjo, tačiau pilnos chimerizmo konversijos neįvyko.

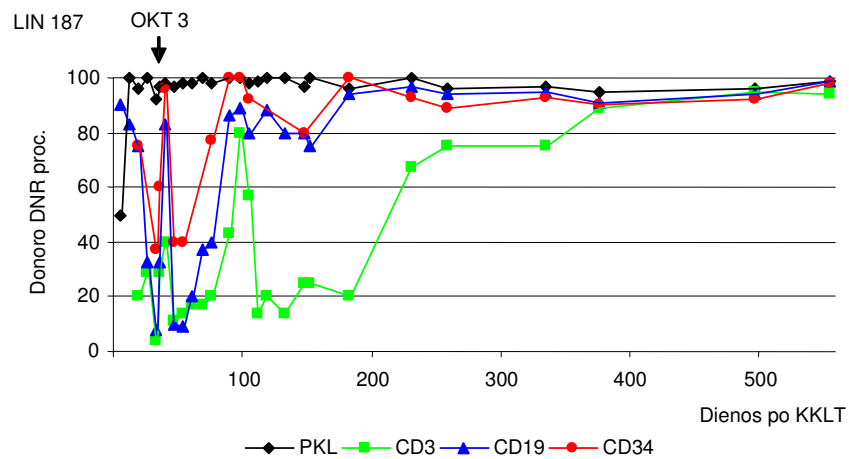
Visiems šiems ligoniams skirtas OKT3<sup>®</sup>. Po imunokorekcijos trims iš jų (LIN 101, 172 ir 263) pasiektas visiškas DC leukocituose (4.2-2 lentelė).



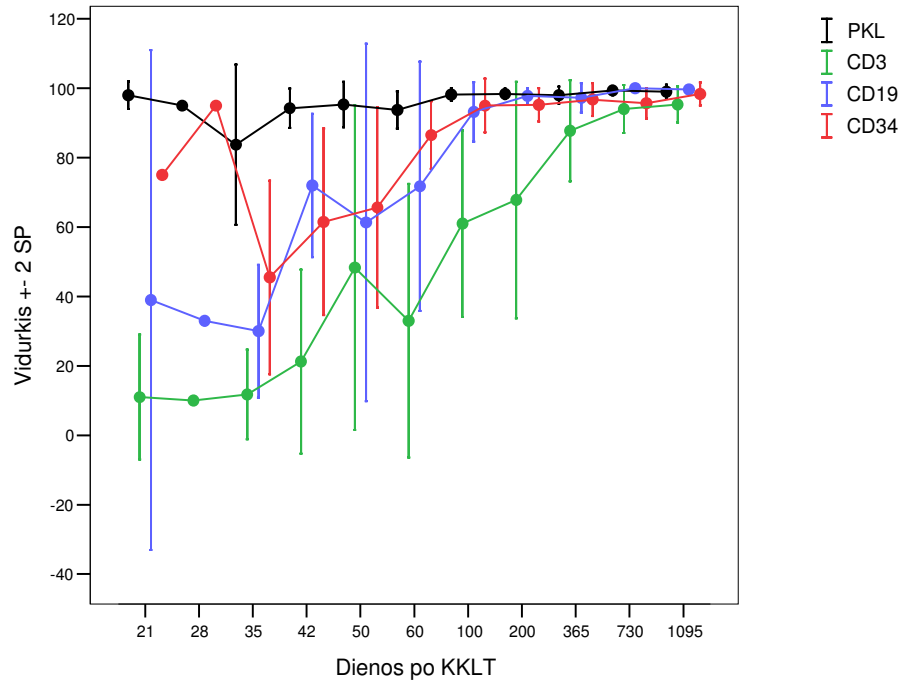
4.2-2 pav. Mišrus chimerizmas dėl transplantato atmetimo.



4.2-3 pav. Mišrus chimerizmas gręsiant transplantato atmetimui.



4.2-4 pav. Mišraus chimerizmo disociacija tarp PKL ir ALP.



**4.2-5 pav.** Chimerizmo vidurkių kinetika atskirose ląstelių frakcijose esant stabiliam ilgalaikiam MC leukocituose (n = 7).

Likusiems keturiems ligoniams (LIN 161, 176, 186 ir 216) nedidelė 1–6 proc. recipiento frakcija išliko matoma PKL. Tuo metu ALP autologinės ląstelės išnyko tik vienam ligoniui (LIN 172). Iš septynių ligonių tik vienas pacientas (LIN 161) mirė dėl infekcinių-toksinių komplikacijų, kitiems šešiams duomenų analizės momentu tęsėsi stabili remisija.

Analizuojant MC kinetikos ryšį su transplantato atmetimu, rastas statistiškai patikimas ryšys tarp didėjančio chimerizmo PKL ir transplantato atmetimo: 4 iš 5 ligonių, kuriems stebėtas didėjantis MC leukocitų frakcijoje, išsivystė transplantato atmetimas, tuo metu visiems septyniems pacientams, kuriems leukocituose stebėtas stabilus ilgalaikis MC, transplantato prigijimas buvo stabilus ( $p = 0,010^1$ ).

<sup>1</sup> - Tikslus Fišerio kriterijus.



#### 4.2.4. Klinikinių rodiklių ir chimerizmo lyginamoji analizė

Pagrindiniai ligonių klinikiniai rodikliai iki transplantacijos ir jos išėties parametrai pateikti 4.2-3 lentelėje. Prieštransplantacinių veiksnių analizė parodė, kad kaulų čiulpu aplazijos forma iki KKL persodinimo neturėjo įtakos chimerizmui PKL ( $p = 0,141$ ). Tuo tarpu abiejose grupėse nustatytas reikšmingas skirtumas tarp donoro ( $p = 0,026$ ) ir KKL šaltinio ( $p = 0,008$ ): MC-grupėje pacientams dažniau buvo persodinami giminingo donoro kaulų čiulpai, nei DC-grupėje. Įvertinus abiejų kintamųjų tarpusavio priklausomybę, rasta vidutinė koreliacija ( $r = 0,295$ ), tačiau ji buvo statistiškai nereikšminga ( $p = 0,163$ ). Vienaveiksmės logistinės regresijos modelis parodė, kad persodinus kaulų čiulpus galimybė išsivystyti MC yra 20 kartų didesnė (95 proc. PI 2,29-175,04;  $p = 0,007$ ), nei persodinus periferinio kraujo KKL (4.2-4 lentelė).

Busulfano išėmimas iš kondicionavimo neturėjo reikšmės chimerizmui ( $p = 0,221$ ). Chimerizmas PKL pasirodė esąs reikšmingas požymis tiek ūmios, tiek lėtinės TPŠL išraiškai (atitinkamai  $p = 0,031$  ir  $p = 0,026$ ): 9/12 ligoniams su MC nebuvo jokių ūmios TPŠL požymių, lyginant su 2/10 vaikų turinčių DC ( $p = 0,015$ ). Lengvo laipsnio ūmi TPŠL reikšmingai dažniau vystėsi ligoniams, turintiems visišką DC leukocitų frakcijoje (7/10 DC-grupėje, lyginant su 3/12 MC-grupėje,  $p = 0,025$ ). Aštuoniems iš dvylikos vaikų, kuriems PKL buvo randama autologinė frakcija, lėtinė TPŠL neišsivystė, lyginant su 2 iš 10 vaikų DC grupėje ( $p = 0,038$ ). Lėtinė ribota TPŠL buvo reikšmingai dažniau stebima, radus visišką DC leukocituose – ji diagnozuota 5 vaikams su DC ir nė vienam ligoniui su MC ( $p = 0,009$ ).

Transplantato atmetimas diagnozuotas iš viso 18 proc. (4/22). Lyginant transplantato atmetimo dažnį abiejose grupėse, reikšmingo skirtumo negauta ( $p = 0,096$ ). Tačiau palyginus atmetimo dažnį su chimerizmo kinetika (4.2-5 lentelė), nustatėme reikšmingą ryšį tarp didėjančio MC leukocitų frakcijoje ir transplantato atmetimo ( $p = 0,001$ ). Abiejose grupėse mirtingumas dėl toksinių komplikacijų reikšmingai nesiskyrė: DC-grupėje mirė 6 iš 10 (60 proc.),

**4.2-3 lentelė.** FA sergančių ligonių klinikinių rodiklių lyginamoji analizė priklausomai nuo chimerizmo PKL (n = 22).

	DC (n = 10)	MC (n = 12)	p-reiškė
Dažnumas (proc.)	45,5	54,5	0,670 <sup>a</sup>
KC aplazija			
AA	4	9	0,141 <sup>a, 1)</sup>
MDS	4	3	
ŪML	2	0	
Donoras			0,058 <sup>a, 2)</sup>
TGD	1	5	*0,026 <sup>b</sup>
TND	9*	5*	
NGD	0	2	
KKL šaltinis			
kaulų čiulpai	2	10	0,008 <sup>b</sup>
periferinis kraujas	8	2	
Kondicionavimas	10-Flu/Bu/ATG/OKT3	3-Flu/ATG/OKT3 9-Flu/Bu/ATG/OKT3	0,221 <sup>c</sup>
Ūmi TPŠL			0,031 <sup>a, 3)</sup>
0	2*	9*	*0,015 <sup>b</sup>
I-II	7**	3**	**0,025 <sup>b</sup>
III-IV	1	0	
Lėtinė TPŠL			0,026 <sup>a, 4)</sup>
nebuvo	2*	8*	*0,038 <sup>b</sup>
ribota	5**	0**	**0,009 <sup>b</sup>
išplitusi	0	0	
nevertinama	2 <sup>#</sup>	4 <sup>§</sup>	
Transplantato atmetimas			
nėra	10	8	0,096 <sup>b</sup>
yra	0	4	
Mirtingumas dėl toksinių komplikacijų			
gyvena	4	9	0,192 <sup>b</sup>
mirė	6	3	
Stebėjimo laikas (dienos po KKL)			
Mediana	469	1027	0,674 <sup>c</sup>
[min - max]	[47-2376]	[115-2243]	
Vidutinis rangas	10,8 <sup>c</sup>	12,08 <sup>c</sup>	
[95 proc. PI]	[1607-2376]	[216-2243]	

Santrumpos: AA – aplazinė anemija, ATG – antitimocitinis imunoglobulinas; Bu – busulfanas; Flu – fludarabinas; MDS – mielodisplazinis sindromas; NGD – netapatus giminingas donoras; OKT3<sup>®</sup> – muromonabas; TGD – tapatus giminingas donoras; TND – tapatus negiminingas donoras; ŪML – ūmi mieloblastinė leukemija.

<sup>a</sup>Chi-kvadrato kriterijus; <sup>b</sup>Tikslus tikimybių palyginimo kriterijus; <sup>c</sup>Mano Vitnio kriterijus

<sup>1)</sup> $\chi^2 = 3,916$ ; I.I. = 2; <sup>2)</sup> $\chi^2 = 5,675$ ; I.I. = 2 ; <sup>3)</sup> $\chi^2 = 6,93$ ; I.I. = 2; <sup>4)</sup> $\chi^2 = 7,822$ ; I.I. = 2 (I.I. – laisvės laipsnis).

<sup>#</sup> - ligoniai mirė nesulaukę 100 dienų po KKL, kai išsivysto lėtinė TPŠL

<sup>§</sup> - ligoniams atlikta antra KKL nepaėjus 100 dienų po pirmos KKL

**4.2-4 lentelė.** MC išsivystymo galimybė, persodinus kaulų čiulpus.

Požymis	B regresijos koeficientas	p-reiškė	Galimybių santykis	PI 95 proc.
Kaulų čiulpai	2,996	0,007	20,0	2,29; 175,04
Konstanta -1,609 (p<0,05)				

**4.2-5 lentelė.** Transplantato atmetimo priklausomybė nuo chimerizmo kinetikos.

	Išsivystė	Neišsivystė	p-reikšmė
DC (n = 10)	0	10	0,001 <sup>a, 1)</sup>
Didėjantis MC (n = 5)	4	1	
Stabilus ilgalaikis MC (n = 7)	0	7	

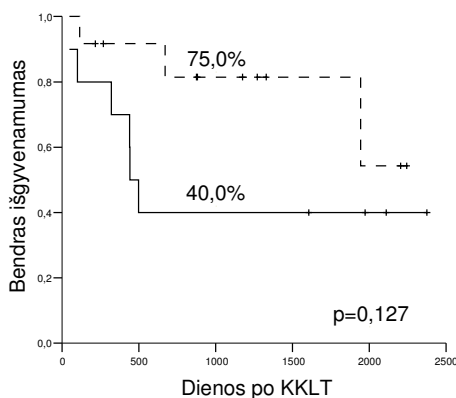
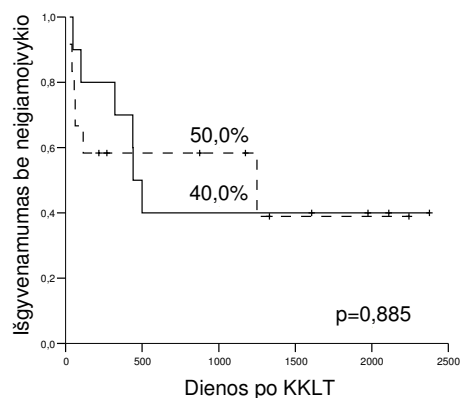
<sup>a</sup>Tikslus Monte Karlo kriterijus

<sup>1)</sup>  $\chi^2 = 16,622$ ; l.l. = 2 (l.l. – laisvės laipsnis).

lyginant su 3 iš 9 (25 proc.) pacientų MC-grupėje ( $p = 0,192$ ). Bendras mirtingumas dėl toksinių komplikacijų sudarė 41 proc. Vidutinis vaikų stebėjimo laikas abiejose grupėse taip pat reikšmingai nesiskyrė ir sudarė 469 (47-2376) dienų po transplantacijos DC grupėje ir 1024 (115-2243) dienų MC grupėje ( $p = 0,674$ ).

**4.2.5. Chimerizmo PKL ir ALP įtaka išgyvenamumui po transplantacijos**

Vertinant išgyvenamumo po transplantacijos rodiklius priklausomai nuo chimerizmo PKL (4.2-6 pav.), nustatėme, kad chimerizmas leukocituose neturėjo statistiškai reikšmingos įtakos išgyvenamumui be neigiamo įvykio: išgyveno 40,0 proc. (4/10) ligonių su DC, palyginus su 50,0 proc. (6/12) ligonių su MC ( $p = 0,885$ ). Neigiamas įvykis apibrėžtas kaip mirtingumas dėl



**4.2-6 pav.** Išgyvenamumo po transplantacijos rodikliai priklausomai nuo chimerizmo PKL: — DC, - - - MC.

**4.2-6 lentelė.** Bendro išgyvenamumo priklausomybė nuo chimerizmo kinetikos.

	Gyvena		Mirė		p-reikšmė
	Ligonių skaičius	proc.	Ligonių skaičius	proc.	
DC (n = 10)	4	40	6	60	0,214 <sup>a, 1)</sup>
Didėjantis MC (n = 5)	3	60	2	40	
Stabilus ilgalaikis MC (n = 7)	6	86	1	14	

<sup>a</sup>Tikslus Monte Karlo kriterijus

<sup>1)</sup>  $\chi^2 = 3,562$ ; l.l. = 2 (l.l. – laisvės laipsnis).

toksinių komplikacijų, transplantato atmetimas ir antrinis navikas. Ligoniams su MC diagnozuoti visi minėti neigiami įvykiai, o esant visiškam DC leukocitų frakcijoje, vienintelis neigiamas įvykis buvo toksinis mirtingumas. Bendras išgyvenamumas buvo didesnis MC-grupėje: išgyveno 75,0 proc. (9/12) ligonių su MC, lyginant su 40,0 proc. (4/10) ligonių su DC. Tačiau šis skirtumas buvo nereikšmingas ( $p = 0,127$ ). Išanalizavus chimerizmo kinetikos svarbą išgyvenamumui nustatėme, kad daugiausia išgyveno ligoniai, kuriems PKL laikėsi stabilus ilgalaikis MC (4.2-6 lentelė): duomenų vertinimo dieną gyveno 6 iš 7 (86 proc.) šių ligonių, palyginus su 3 iš 5 (60 proc.) vaikų, kuriems rastas didėjantis MC. Nors procentinė išgyvenamumo išraiška ženkliai skyrėsi, statistinis reikšmingumas nebuvo nustatytas ( $p = 0,214$ ).

Analizuojant chimerizmo ALP įtaką išgyvenamumo rodikliams, nepavyko nustatyti nė vienos tyrinėtos ląstelių frakcijos įtakos transplantacijos rezultatams (4.1-7 lentelė). Išgyvenamumas be neigiamo įvykio ir bendras išgyvenamumas reikšmingai nesiskyrė priklausomai nuo chimerizmo T limfocituose (atitinkamai  $p = 0,390$  ir  $p = 0,598$ ), B limfocituose ( $p = 0,888$  ir  $p = 0,114$ ) ar KKL frakcijoje ( $p = 0,937$  ir  $p = 0,288$ ).

**4.2-7 lentelė.** Chimerizmo PKL ir ALP įtaka išgyvenamumo rodikliams.

	PKL			CD3			CD19			CD34		
	DC	MC	p*	DC	MC	P*	DC	MC	P*	DC	MC	p*
Išgyvenamumas be neigiamo įvykio (proc.)	40,0	50,0	0,885	57,1	50,0	0,390	50,0	71,4	0,888	33,3	55,6	0,937
Bendras išgyvenamumas (proc.)	40,0	75,0	0,127	57,1	75,0	0,598	50,0	100	0,114	50,0	77,8	0,288

\* - Logaritminio rango kriterijus

### **4.3. ADRENOLEUKODISTROFIJA**

#### **4.3.1. Ligonų klinikiniai rodikliai**

Per tiriamąjį laikotarpį nuo 1999 metų balandžio iki 2006 metų sausio mėnesio alogeninė KKL atlikta 22 vaikams sergantiems ALD. Vienam ligoniui buvo atlikta haploidinė transplantacija. Remiantis neįtraukimo kriterijais (žr. 3.2.1 skyrių), jis buvo pašalintas iš analizės. Tokiu būdu chimerizmas išanalizuotas 21 vaikui sergančiam ALD.

Ligonų klinikiniai rodikliai apibendrinti 4.3-1 lentelėje. Galvos smegenų demielinizacijos laipsnis iki KKL, vertintas pagal Loes skalę (Loes D.J. ir kt., 1994), svyravo nuo 1,0 iki 14,0, o vidurkis sudarė  $6,3 \pm 3,9$ . Daugumai vaikų (71,4 proc., 15/21) persodintos tapataus negiminingo donoro KKL, tapatus giminingas donoras rastas šešiams vaikams (28,6 proc.). Daugiau negu pusė ligonių (11/21, 52,4 proc.) persodinti kaulų čiulpai. Kitiems 42,9 proc. ligonių (9/21) persodintos periferinio kraujo KKL. Vienam berniukui (4,8 proc.) panaudotos virkštelės kraujo KKL. Visiems pacientams skirtas identiškas kondicionavimas busulfanu 16 mg/kg ir ciklofosfamidą 200 mg/kg. TPŠL profilaktikai skirta standartinė ciklosporino ir metotreksato dozė (Storb R., ir kt. 1986). Persodinant giminingo ir negiminingo donoro KKL, transplantato atmetimo profilaktikai papildomai skirtas antitimocitinis globulinas (ATG). Trylikai (61,9 proc.) vaikų skirtas ATG-Fresenius<sup>®</sup>, šešiams (28,6 proc.) – ATG-Merieux<sup>®</sup>. Du pacientai (9,2 proc.) ATG profilaktikos negavo.

#### **4.3.2. ALP analizė esant visiškam donoro chimerizmui PKL**

Tiriant chimerizmą PKL, 66,7 proc. (14/21) ligonių rastas visiškasis DC. Transplantatui prigijus, visuose tyrimuose leukocitų frakcijoje buvo aptinkama tik donoro DNR.

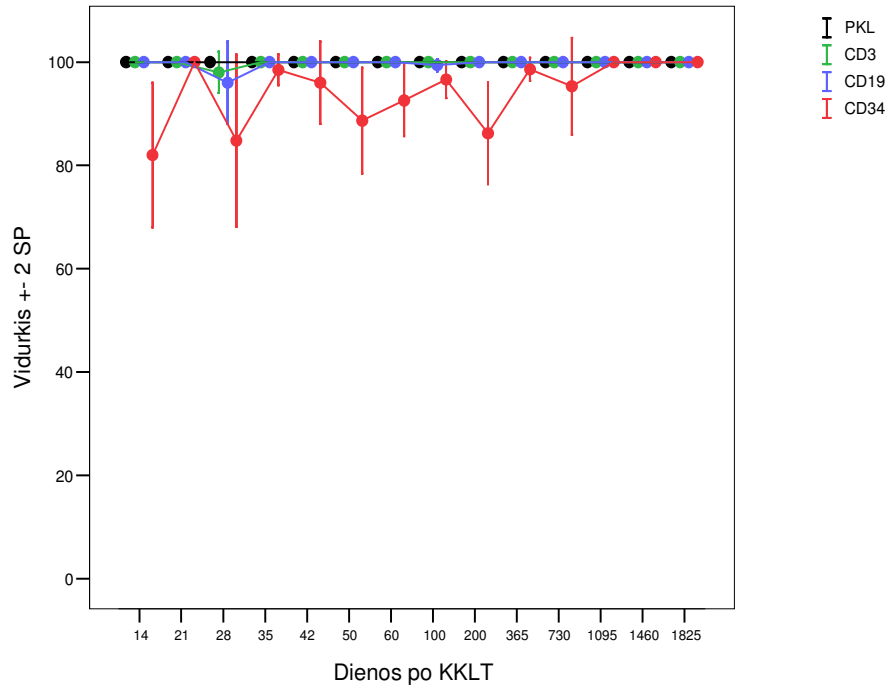
Tačiau esant visiškam DC leukocituose, atskirose ląstelių frakcijose

**4.3-1 lentelė.** ALD sergančių ligonių klinikiniai rodikliai (n = 21).

LIN	CNS pažeidimas iki KKL (Loes skalė)	Donoras	KKL šaltinis	Kondicionavimas	Ūmi TPŠL (sunkumo laipsnis)	Lėtinė TPŠL (išplitimo laipsnis)	Chimerizmas PKL	Neigiamas įvykis	BI (dienos po KKL)
86	2,0	TND	PK	Bu/Cy	I	Ribota	DC	SL	2426
93	10,0	TGD	KČ	Bu/Cy	I	Ribota	DC	SL	2364
116	10,5	TND	PK	Bu/Cy/ATG	I	0	DC	Progresas	2056
119	12,5	TND	KČ	Bu/Cy/ATG	0	0	MC	MLP	117 (†)
121	9,0	TND	KČ	Bu/Cy/ATG	0	0	MC	Progresas	1991
126	14,0	TGD	KČ	Bu/Cy/ATG	0	0	MC	Progresas	1950
127	3,0	TGD	KČ	Bu/Cy/ATG	0	0	MC	SL	1943
132	8,5	TND	PK	Bu/Cy/ATG	0	0	DC	Progresas	1859
154	3,5	TND	PK	Bu/Cy/ATG	0	0	MC	SL	1600
175	2,0	TND	PK	Bu/Cy/ATG	III	0	DC	SL	1270
191	3,5	TND	KČ	Bu/Cy/ATG	III	Išplitusi	DC	MLP	1000 (†)
198	10,0	TND	KČ	Bu/Cy/ATG	I	0	MC	MLP	322 (†)
207	4,0	TND	PK	Bu/Cy/ATG	I	0	DC	SL	985
210	7,0	TND	PK	Bu/Cy/ATG	I	0	DC	SL	951
213	8,0	TGD	KČ	Bu/Cy/ATG	0	0	DC	SL	906
215	9,5	TGD	KČ	Bu/Cy/ATG	I	Ribota	DC	SL	899
218	6,5	TGD	KČ	Bu/Cy/ATG	0	0	DC	SL	878
234	3,0	TND	PK	Bu/Cy/ATG	III	Ribota	DC	MTK	251 (†)
237	2,0	TND	VK	Bu/Cy/ATG	0	0	MC	SL	567
244	2,0	TND	PK	Bu/Cy/ATG	II	Ribota	DC	SL	508
245	1,0	TND	KČ	Bu/Cy/ATG	0	0	DC	SL	509

Santrumpos: ATG – antitimocitinis imunoglobulinas; BI – bendras išgyvenamumas; Bu – busulfanas; Cyc – ciklofosfamidai; KČ – kaulų čiulpai; MLP – mirtis dėl ligos progresavimo; MTK – mirtis dėl toksinių komplikacijų; NGD – netapatus giminingas donoras; SL – stabili liga; TGD – tapatus giminingas donoras; TND – tapatus negiminingas donoras; VK – virkštelės kraujas.

(†) – ligonis mirė



**4.3-1 pav.** Chimerizmo vidurkių kinetika atskirose ląstelių frakcijose, esant visiškam DC leukocituose (n = 14).

nustatytas MC: T limfocituose recipiento DNR rasta 7,4 proc. ligonių, B limfocituose – 15,4 proc., o KKL – 71,4 proc. ligonių.

Analizuojant chimerizmo kinetiką ALP, CD3 ir CD19 populiacijose stebėtas tranzitorinis chimerizmas: recipiento DNR neviršijo 12 proc., ji buvo randama pavieniuose tyrimuose, daugiausia per pirmąsias 100 dienų po KKL. Autologinės frakcijos procentinių vidurkių analizė parodė, kad chimerizmas leukocituose, T ir B limfocituose reikšmingai nesiskyrė per visą tyrimo laikotarpį (4.3-1 pav.). Tuo metu CD34 frakcijoje stebėtas palaipsniui mažėjantis MC. Chimerizmo procentinių vidurkių leukocituose ir CD34 populiacijoje palyginimas parodė (4.3-2 lentelė), kad DNR kiekis šiose populiacijose per visą potransplantacinį laikotarpį reikšmingai nesiskyrė,

**4.3-2 lentelė.** Chimerizmo vidurkių palyginimas PKL ir KKL sergant ALD.

Diena po KKL	14	21	28	35	42	50	60	100	200	365	730	1095	1460	1825
<i>P</i> reikšmė*	0,180	1,0	0,109	0,317	0,317	0,068	0,068	0,068	0,042	0,180	0,317	1,0	1,0	1,0

\* Vilkoksono ženklų kriterijus

išskyrus 200-ąją dieną ( $p = 0,042$ ). Recipiento KKL kiekis svyravo nuo 55 iki 98 proc. Galutinė chimerizmo konversija KKL įvyko apie trečiuosius metus po transplantacijos.

#### 4.3.3. ALP analizė esant mišriam chimerizmui PKL

Mišrus chimerizmas PKL rastas 33,3 proc. (7/21) ligonių. Ištyrus chimerizmo kinetiką leukocituose, penkiems ligoniams nustatytas stabilus ilgalaikis MC, likusiems dviem – mažėjantis MC (4.3-3 lentelė).

Penkiems pacientams (LIN 119, 121, 126, 127 ir 154), kuriems leukocitų frakcijoje buvo aptiktas stabilus ilgalaikis MC, chimerizmo kinetika visose ląstelių populiacijose buvo panaši (4.3-2 pav.). Persistuojantis MC visose tirtose ląstelėse buvo randamas iki 5 metų po transplantacijos. Nė vienam šių ligonių neišsivystė transplantato atmetimas. Imunosupresinis gydymas taip pat nebuvo koreguotas. Vienam recipientui (LIN 154) įvyko spontaniškas chimerizmo konversija iš MC į visišką DC visose ląstelių populiacijose. Vienas vaikas (LIN 119) mirė dėl ALD progresavimo, likę keturi išlieka gyvi.

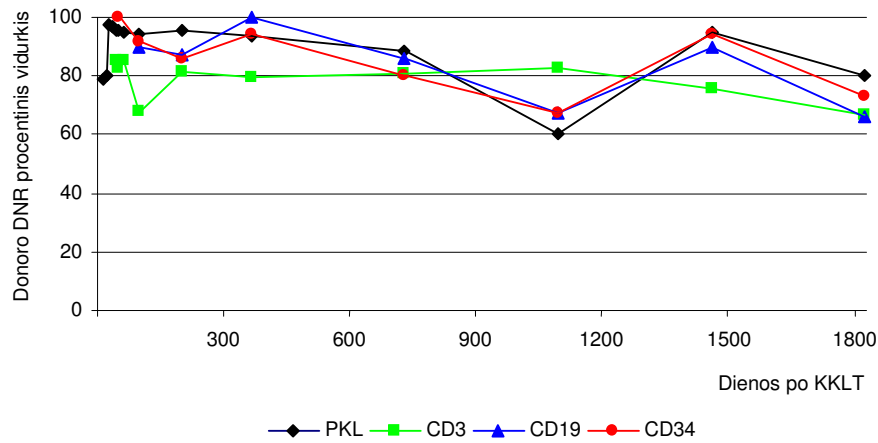
Dviem ligoniams (LIN 198 ir 237) rastas mažėjantis MC, sąlygotas užsitęsusių transplantato prigijimo (4.3-3 pav.). Tiek leukocituose, tiek ALP

#### 4.3-3 lentelė. Mišrus chimerizmas sergant ALD (n = 7).

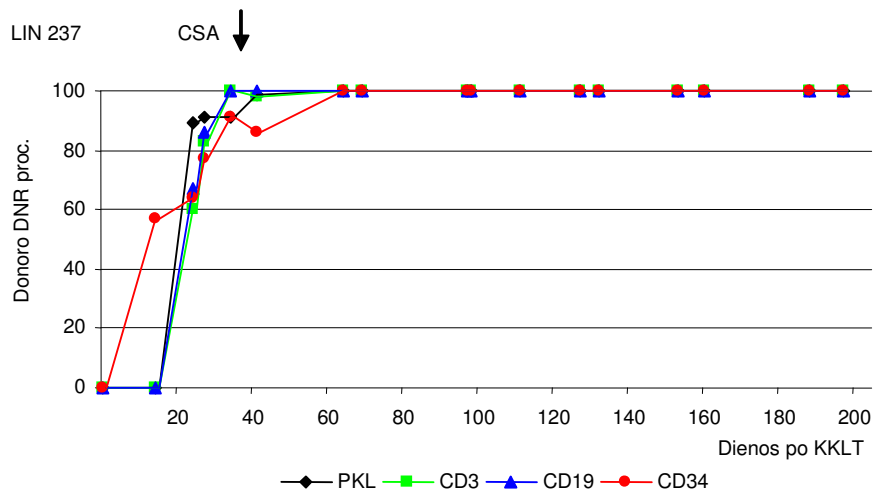
LIN	MC kinetika PKL	Skirtas gydymas	Chimerizmo konversija PKL	Chimerizmo konversija ALP	Mirties priežastis	BI (diena po KKL)
119	Stabilus	–	MC	MC	MLP	117
121	Stabilus	–	MC	MC	–	1991
126	Stabilus	–	MC	MC	–	1950
127	Stabilus	–	MC	MC	–	1943
154	Stabilus	–	DC	DC	–	1600
198	Mažėjantis	CSA nutraukimas	DC	DC	MLP	322
237	Mažėjantis	CSA ↓	DC	DC	–	567

Santrumpos: BI – bendras išgyvenamumas; CSA ↓ – ciklosporino dozės mažinimas; MLP – mirtis dėl ligos progresavimo.





**4.3-2 pav.** Chimerizmo vidurkių kinetika esant stabiliam ilgalaikiam MC (n = 5).



**4.3-3 pav.** Mažėjantis mišrus chimerizmas.

Santrumpos: CSA ↓ - ciklosporino dozės mažinimas.

dinamikoje mažėjanti recipiento frakcija stebėta iki 40 dienų po transplantacijos. Po imunosupresinio gydymo korekcijos MC palaipsniui perėjo į visišką DC visose ląstelių populiacijose. Vienas šių ligonių (LIN198) mirė dėl ALD progresavimo, o antras pacientas tyrimo rezultatų vertinimo dieną gyveno.

#### **4.3.4. Klinikinių rodiklių ir chimerizmo lyginamoji analizė**

Pagrindiniai ligonių klinikiniai rodikliai iki transplantacijos ir jos išėties parametrai pateikti 4.3-4 lentelėje. Prieštransplantacinių veiksnių analizė parodė, kad galvos smegenų demielinizacijos laipsnis reikšmingai nesiskyrė tarp ligonių su visišku DC ir MC ( $p = 0,287$ ). KKL donoras ir šaltinis taip pat neturėjo įtakos chimerizmui PKL (atitinkamai  $p = 1,0$  ir  $p = 0,098$ ). Neradome reikšmingo skirtumo ir tarp TPŠL bei transplantato atmetimo profilaktikai naudoto antitimocitinio imunoglobulino preparato ( $p = 0,172$ ). Ūmi TPŠL dažniau pasireiškė ligoniams, turintiems visišką DC leukocituose: I-II<sup>o</sup> ūmi TPŠL diagnozuota 7 iš 14 ligonių DC-grupėje, lyginant su 1 iš 7 ligonių MC-grupėje ( $p = 0,020$ ), o III-IV sunkumo laipsnis stebėtas tik DC-grupėje. Tačiau ūmios TPŠL išraiškos forma reikšmingai nesiskyrė tarp abiejų grupių ( $p = 0,055$ ). Ribota ir išplitusi lėtinės TPŠL forma diagnozuota tik esant visiškam DC leukocituose, tačiau palyginus abi grupes skirtumas tarp jų buvo nereikšmingas ( $p = 0,166$ ).

Lyginant ALD progresavimo dažnį abiejose grupėse, statistiškai reikšmingo skirtumo negauta: neurologinės simptomatikos pablogėjimas vystėsi 3 iš 14 vaikų su DC ir 4 iš 7 vaikų, turinčių MC PKL ( $p = 0,151$ ). Sergant ALD, tik vienas ligonis, turėjęs visišką DC PKL, mirė dėl toksinių komplikacijų ( $p = 1,0$ ). Pagrindinė mirties priežastis abiejose grupėse buvo neurologinės būklės blogėjimas, kuris lėmė panašų išgyvenusių ligonių skaičių abiejose grupėse: DC-grupėje išgyveno 12 iš 14 (85,7 proc.), lyginant su 5 iš 7 (71,4 proc.) pacientų MC-grupėje ( $p = 0,574$ ). Vidutinis ligonių stebėjimo laikotarpis tarp abiejų grupių taip pat reikšmingai nesiskyrė ir sudarė 968 (251-2426) dienų po transplantacijos DC-grupėje bei 1600 (117-1991) dienų MC-grupėje ( $p = 0,913$ ).

#### **4.3.5. Chimerizmo PKL ir ALP įtaka išgyvenamumui po transplantacijos**

Vertinant išgyvenamumo po transplantacijos rodiklius priklausomai nuo chimerizmo PKL (4.3-4 pav.), nustatėme kad chimerizmas leukocituose

**4.3-4 lentelė.** ALD sergančių ligonių klinikinių rodiklių lyginamoji analizė priklausomai nuo chimerizmo PKL (n = 21).

	DC (n = 14)	MC (n = 7)	p-reikšmė
Dažnumas (proc.)	66,7	33,3	0,127 <sup>a</sup>
Loes skalė iki KKL (vidutinis rangas)	9,93	13,14	0,287 <sup>c</sup>
Donoras			
TGD	4	2	1,0 <sup>b</sup>
TND	10	5	
KKL šaltinis			
kaulų čiulpai	6	5	0,098 <sup>a,1)</sup>
periferinis kraujas	8	1	
virkštelės kraujas	0	1	
Antitimocitinis imunoglobulinas			
Merieux	2	4	0,172 <sup>a,2)</sup>
Fresenius	10	3	
neskirta	2	0	
Ūmi TPŠL			0,055 <sup>a,3)</sup>
0	4*	6*	*0,020 <sup>b</sup>
I-II	7	1	
III-IV	3	0	
Lėtinė TPŠL			0,166 <sup>a,4)</sup>
nebuvo	8*	7*	*0,055 <sup>b</sup>
ribota	5	0	
išplitusi	1	0	
ALD progresavimas			
nėra	10	3	0,151 <sup>b</sup>
yra	3	4	
nevertinama	1 <sup>#</sup>	0	
Mirtingumas dėl toksinių komplikacijų			
gyvena	13	7	1,0 <sup>b</sup>
mirė	1	0	
Bendras išgyvenamumas			
gyvena	12	5	0,574 <sup>b</sup>
mirė	2	2	
Stebėjimo laikas (dienos po KKL)			
Mediana	968	1600	0,913 <sup>c</sup>
[min - max]	[251-2426]	[117-1991]	
Vidutinis rangas	11,14 <sup>c</sup>	10,71 <sup>c</sup>	
[95 proc. PI]	[802-1607]	[435-1991]	

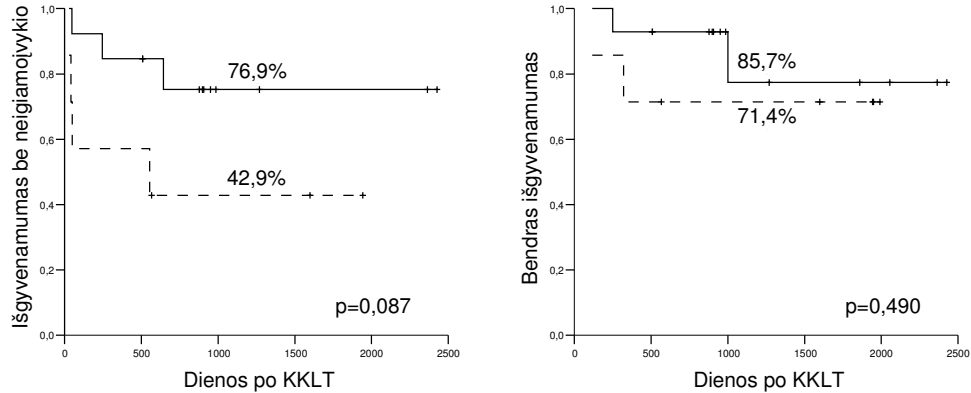
Santrumpos: ATG – antitimocitinis imunoglobulinas; TGD – tapatus giminingas donoras; TND – tapatus negiminingas donoras;

<sup>a</sup>Chi-kvadrato kriterijus; <sup>b</sup>Tikslus tikimybių palyginimo kriterijus; <sup>c</sup>Mano Vitnio kriterijus

<sup>1)</sup> $\chi^2 = 4,727$ ; l.l. = 2; <sup>2)</sup> $\chi^2 = 4,615$ ; l.l. = 2; <sup>3)</sup> $\chi^2 = 6,263$ ; l.l. = 2 <sup>4)</sup> $\chi^2 = 4,2$ ; l.l. = 2 (l.l. – laisvės laipsnis).

# - ligonis mirė praėjus 251 dienai po KKL

neturėjo statistiškai reikšmingos įtakos išgyvenamumui be neigiamo įvykio, jei neigiamas įvykis apibrėžtas kaip mirtingumas dėl toksinių komplikacijų ir ALD progresavimas: be neigiamo įvykio išgyveno 76,9 proc. (3/14) ligonių su DC, lyginant su 42,9 proc. (4/7) ligonių su MC (p = 0,087). Bendras



**4.3-4 pav.** Išgyvenamumo po transplantacijos rodikliai priklausomai nuo chimerizmo PKL: — DC, - - - MC.

išgyvenamumas taip pat reikšmingai nesiskyrė tarp abiejų grupių: išgyveno 85,7 proc. (12/14) ligonių su DC, palyginus su 71,4 proc. (5/7) ligonių su MC ( $p = 0,490$ ). Iš keturių mirusių ligonių trys mirė dėl pagrindinės ligos progreso, o vienas vaikas – dėl infekcinių-toksinių komplikacijų. Sergant ALD nepasireiškė jokie kiti neigiami įvykiai.

Įvertinus chimerizmo ALP reikšmę išgyvenamumui, nepavyko nustatyti nė vienos tyrinėtos ląstelių frakcijos įtakos transplantacijos rezultatams (4.3-5 lentelė). Išgyvenamumas be neigiamo įvykio ir bendras išgyvenamumas reikšmingai nesiskyrė priklausomai nuo chimerizmo T limfocituose (atitinkamai  $p = 0,209$  ir  $p = 0,605$ ), B limfocituose ( $p = 0,302$  ir  $p = 0,522$ ) ar KKL frakcijoje ( $p = 0,498$  ir  $p = 0,199$ ).

**4.3-5 lentelė.** Chimerizmo PKL ir ALP įtaka išgyvenamumo rodikliams.

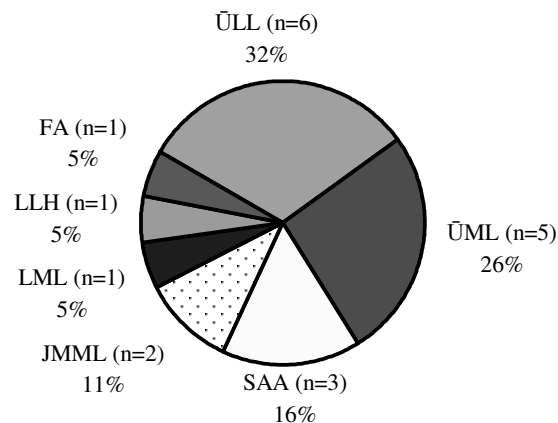
	PKL			CD3			CD19			CD34		
	DC	MC	$P^*$	DC	MC	$p^*$	DC	MC	$P^*$	DC	MC	$p^*$
Išgyvenamumas be neigiamo įvykio (proc.)	76,9	42,9	0,087	75,0	50,0	0,209	84,6	33,3	0,302	80,0	60,0	0,498
Bendras išgyvenamumas (proc.)	85,7	71,4	0,490	84,6	75,0	0,605	85,7	66,7	0,522	81,0	75,0	0,199

\* - Logaritminio rango kriterijus

#### 4.4. LIETUVOJE TRANSPLANTUOTŲ VAIKŲ CHIMERIZMO ANALIZĖ

##### 4.4.1. Ligonų klinikiniai rodikliai

Lietuvoje nuo 2002 metų vasario iki 2007 metų gegužės mėnesio alogeninė KKL atlikta 21 vaikui. Du ligoniai pašalinti iš analizės, remiantis neįtraukimo kriterijais (žr. 3.2.1 skyrių): vienas vaikas mirė anksti po transplantacijos (+16 d.), antras – dėl trumpo stebėjimo laikotarpio (mažiau nei viena savaitė). Tokiu būdu 19 pacientų buvo įtraukti į studiją.



##### 4.4-1 pav. Lietuvoje transplantuotų ligonių diagnozės.

Santrumpos: JMML – juvenilinė mielomonocitinė leukemija; LLH – Langerhanso ląstelių histiocitozė; LML – lėtine mieloidinė leukemija; SAA – sunki aplazinė anemija; ŪML – ūmi mieloblastinė leukemija.

Pagrindiniai ligonių klinikiniai rodikliai pateikti 4.4-1 lentelėje. Skirtingai nuo pirmose trijose disertacijos rezultatų dalyse aprašytų ligonių, šią tiriamąją grupę sudarė vaikai, sirgę įvairiomis ligomis, kurioms skirtas skirtingas kondicionavimas. Tikslus diagnozių pasiskirstymas pavaizduotas 4.4-1 paveiksle. Didžioji dalis ligonių (73,7 proc., 14/19) sirgo įvairiomis leukemijos formomis, likusiems penkiems iš devyniolikos vaikų (26,3 proc.) diagnozuotos nepiktybinės kraujo ligos. Visi sirgę leukemija ligoniai, išskyrus vieną, transplantuoti pirmoje arba antroje visiškoje remisijoje. Daugumai pacientų (78,9 proc., 15/19), buvo persodintos tapataus giminingo donoro (brolio ar sesers) kamieninės ląstelės, negiminingo donoro KKL buvo persodintos keturiems vaikams (21,1 proc.). Dažniausiai buvo naudoti kaulų čiulpai (68,4 proc., 13/19), periferinio kraujo KKL perpiltos 31,6 proc. (6/19) vaikų.

**4.4-1 lentelė.** Lietuvoje transplantuotų ligonių klinikiniai rodikliai (n = 19).

LIN	Diagnozė	Remisija prieš KKL	Donoras	KKL šaltinis	Kondicionavimas	Chimerizmas PKL	Ūmi TPŠL (sunkumo laipsnis)	Lėtinė TPŠL (išplitimo laipsnis)	Neigiamas įvykis	BI (dienos po KKL)
3	SAA	nevertinama	TGD	KČ	Cyc+ATG <sup>1)</sup>	MC	II	ribota	VR	1833
5	ŪML (M7)	VR 1	TGD	PK	Bu/Cyc	MC	0	ribota	Rec (KČ)	981 (†)
7	ŪML (M2)	VR 1	TGD	PK	Bu/Cyc	MC	0	0	Rec (KČ)	273 (†)
11	T-ŪLL	VR 2	TGD	PK	Bu/Cyc/Eto	MC	0	0	Rec (KČ)	270 (†)
13	ŪML (M0)	VR 1	TGD	KČ	Bu/Cyc	DC	0	0	VR	1154
16	SAA	nevertinama	TGD	KČ	Cyc+ATG <sup>1)</sup>	MC	0	0	transplantato atmetimas	1049
17	T-ŪLL	VR 1	TGD	PK	Bu/Cyc/Eto	DC	II	0	VR	1028
19	pB-ŪLL	VR 2	TGD	PK	Bu/Cyc/Eto	DC	III	nevertinama <sup>2)</sup>	MTK	85 (†)
24	LML	lėtinė fazė	TGD	KČ	Bu/Cyc	DC	II	0	VR	711
25	pB-ŪLL	VR 2	TGD	KČ	Bu/Cyc/Eto	MC	0	0	Rec (KČ)	174 (†)
26	pB-ŪLL	VR 1	TGD	KČ	Bu/Cyc/Eto	DC	IV	išplitusi	TRM	322 (†)
28	SAA	nevertinama	TGD	KČ	Cyc+ATG <sup>1)</sup>	MC	0	0	VR	664
30	FA	SAA	TND	KČ	Flu/Cyc/Campath/ATG <sup>1)</sup>	MC	0	0	VR	544
32	LLH	sisteminė forma	TND	KČ	Flu/Mel/Campath <sup>1)</sup>	MC	0	0	neprigijimas	370 (†)
33	ŪML (M1)	VR 1	TGD	KČ	Bu/Flu/Mel/ATG	DC	0	nevertinama <sup>2)</sup>	MTK	57 (†)
34	ŪML (M2)	VR 1	TGD	KČ	Bu/Mel	MC	I	0	Rec (KČ)	474
42	T-ŪLL	VR 3	TGD	KČ	Bu/Cyc/Eto	DC	III	išplitusi	MTK	116 (†)
46	JMML	nevertinama	TND	PK	Bu/Cyc/Mel/ATG	DC	II	išplitusi	VR	146
48	JMML	nevertinama	TND	KČ	Bu/Cyc/Mel/ATG	DC	0	nevertinama <sup>2)</sup>	VR	81

Santrumpos: ATG – antitimocitinis imunoglobulinas; BI – bendras išgyvenamumas; Bu – buslfanas; Campath® – alemtuzumabas; Cyc – ciklofosfamidai; Eto – etopozidas 16; Flu – fludarabinas; JMML – juvenilinė mielomonocitinė leukemija; KČ – kaulų čiulpai; LLH – Langerhanso ląstelių histiocitozė; LML – lėtinė mieloidinė leukemija; Mel – melfalanas; MTK – mirtis dėl toksinių komplikacijų; pB-ŪLL – B pirmtakų ūmi limfoblastinė leukemija; PK – periferinis kraujas; Rec (KČ) – kaulų čiulpų recidyvas; SAA – sunki aplazinė anemija; T-ŪLL – T pirmtakų ūmi limfoblastinė leukemija; TGD – tapatus giminingas donoras; TND – tapatus negiminingas donoras; ŪML – ūmi mieloblastinė leukemija; VR1,2,3 – pirma, antra, trečia visiška remisija.

<sup>1)</sup> nemieloabliacinis kondicionavimas

<sup>2)</sup> ligonis mirė nesulaukęs 100 dienų po KKL, kai išsivysto lėtinė TPŠL

(†) – ligonis mirė

Kiekvienai ligai skirti specifiniai kondicionavimai išvardinti 4.4-1 lentelėje. TPŠL profilaktikai skirtos standartinės ciklosporino ir metotreksato dozės (Storb R. ir kt., 1986). Persodinant negiminingo donoro KKL, papildomai lašintas atitimocitinis imunoglobulinas.

#### 4.4.2. Chimerizmo kinetikos analizė

Lietuvoje ALP izoliacija iki šiol neatliekama, todėl Lietuvos pacientams chimerizmas tirtas tik PKL.

Paskyrus ligai specifinį kondicionavimą, 9 iš 19 (47,4 proc.) analizuotų ligonių nustatytas visiškas DC, 10 iš 19 (52,6 proc.) ligonių – MC. Vaikams, kuriems leukocituose nustatytas DC, visuose atliktuose tyrimuose užfiksuota 100 proc. donoro DNR.

Išnagrinėjus MC kinetiką, rastas stabilus ilgalaikis ir didėjantis MC (4.4-2 lentelė).

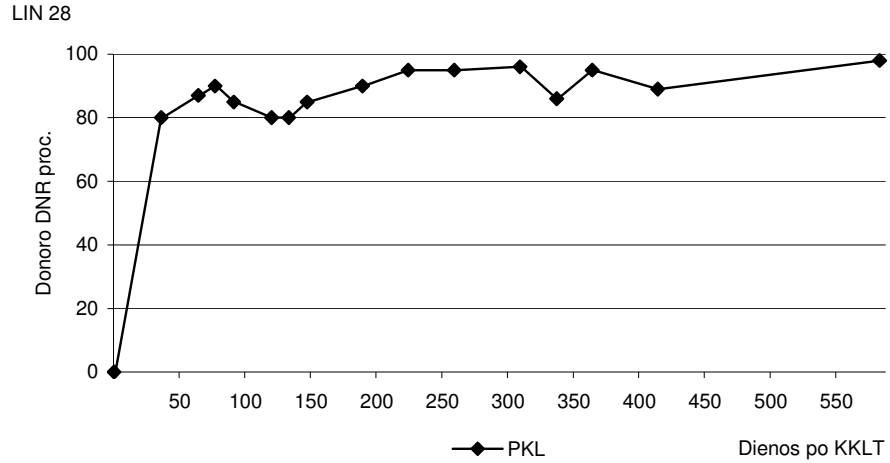
Stabilus ilgalaikis MC (4.4-2 pav.) rastas trimis ligoniams, sirgusiems nepiktybinėmis kraujo ligomis (LIN 3, 28 ir 30). Visiems jiems tęsėsi ilgalaikė visiška remisija be jokių TPŠL požymių. Donoro DNR dalis PKL svyravo nuo

#### 4.4-2 lentelė. Mišrus chimerizmas (n = 10).

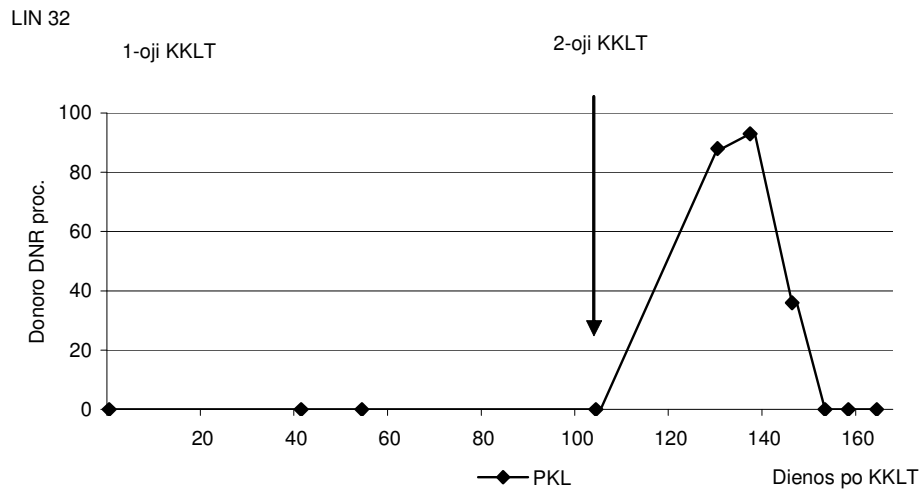
LIN	MC kinetika PKL	Neigiamas įvykis po KKL	Neigiamo įvykio diena po KKL	Taikytas gydymas	Chimerizmo konversija	Mirties priežastis	BI (diena po KKL)
3	Stabilus	–	–	–	MC	–	1833
5	Didėjantis	Recidyvas	79	DLI	MC	MLP	981
7	Didėjantis	Recidyvas	134	DLI	MC	MLP	273
11	Didėjantis	Recidyvas	186	DLI	MD	MLP	270
16	Didėjantis	Atmetimas	107	KKLT 2	DC	–	1049
25	Didėjantis	Recidyvas	50	DLI	MC	MLP	174
28	Stabilus	–	–	–	MC	–	664
30	Stabilus	–	–	–	MC	–	544
32	Didėjantis	Nepriėjimas	42	KKLT 2	MC	Antrinė ŪML	370
34	Didėjantis	Recidyvas	400	Chemoterapija	DC	–	474

\* LIN 34 – gyveno nesant remisijai

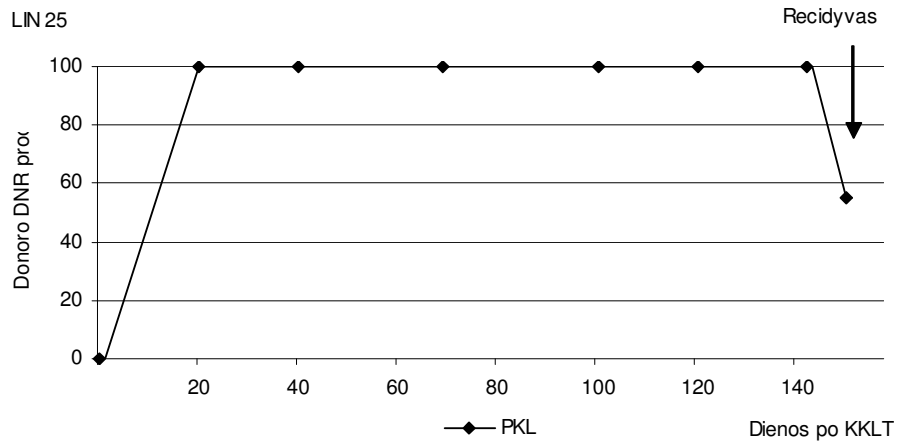
Santrumpos: BI – bendras išgyvenamumas, DLI – donoro limfocitų infuzija; KKLT 2 – antroji transplantacija; MLP – mirtis dėl leukemijos progreso; MTK – mirtis dėl toksinių komplikacijų; ŪML – ūmi mieloblastinė leukemija



**4.4-2 pav.** Stabilus ilgalaikis mišrus chimerizmas.



**4.4-3 pav.** Mišrus chimerizmas dėl transplantato neprisijimo.



**4.4-4 pav.** Mišrus chimerizmas dėl leukemijos recidyvo.



80 iki 98 proc. be imunosupresinio gydymo korekcijos. Dviem ligoniams, sirgusiems nepiktybinėmis kraujo ligomis (LIN 16 ir 32) rastas didėjantis MC: LIN 16 – dėl progresuojančio transplantato atmetimo, LIN 32 – dėl transplantato neprigijimo. Abu pacientai transplantuoti antrą kartą iš to paties donoro. Vienam jų (LIN 16) antrą kartą persodintos KKL prigijo. Tai lėmė MC konversiją į visišką DC. Kitam ligoniui (LIN 32) užfiksuotas trumpalaikis donoro frakcijos atsiradimas periferiniame kraujyje, tačiau ir antrą kartą transplantatas neprigijo (4.4-3 pav.). Ligonis mirė dėl išsivysčiusios antrinės ūmios mieloblastinės leukemijos.

Visiems leukemija sirgusiems ligoniams (LIN 5, 7, 11, 25 ir 34), nustatytas didėjantis MC. Perpylus KKL, pradžioje dokumentuotas pilnas prigijimas esant visiškam DC. MC atsiradimą sąlygojo piktybinio klonu ataugimas (4.4-4 pav.), po kurio sekė leukemijos recidyvas kaulų čiulpuose. Vidutinis laikas nuo MC radimo iki recidyvo diagnozės sudarė 134 dienas (svyravo nuo 50 iki 400 dienų po KKL). Visiems ligoniams, išskyrus LIN 34, perpilti donoro limfocitai, tačiau tai nesustabdė ligos progresavimo. LIN 34 gydytas chemoterapija, po kurios gauta chimerizmo konversija. Tyrimo rezultatų vertinimo dieną šis ligonis vienintelis iš recidyvavusių vaikų buvo likęs gyvas.

#### **4.4.3. Klinikinių rodiklių ir chimerizmo lyginamoji analizė**

Ligonų klinikiniai rodikliai priklausomai nuo chimerizmo apibendrinti 4.4-3 lentelėje. Visiems penkiems pacientams, sirgusiems nepiktybine kraujo liga išsivystė MC ( $p = 0,033$ ). Tai sietina su nemieloabliaciniu kondicionavimu, skirtu šiems ligoniams ( $p = 0,033$ ). Visi vaikai, sirgę piktybinėmis kraujo ligomis, gydyti mieloabliaciniu kondicionavimu (žr. 4.4-1 lentelę, 78 p.), po kurio 64,3 proc. (9/14) pacientų nustatytas visiškasis DC, o likusiems 35,7 proc. rastas MC (5/14). Donoro tipas ir KKL šaltinis tarp abiejų

**4.4-3 lentelė.** Ligonių klinikiniai rodikliai priklausomai nuo chimerizmo (n = 19).

	DC (n = 9)	MC (n = 10)	p-reikšmė
Dažnumas (proc.)	47,4	52,6	0,819 <sup>a</sup>
Kraujo liga			
piktybinė	9	5	0,033 <sup>b</sup>
nepiktybinė	0	5	
Kondicionavimas			
mieloabliacinis	9	5	0,033 <sup>b</sup>
nemieloabliacinis	0	5	
Donoras			
TGD	7	8	0,667 <sup>b</sup>
TND	2	2	
KKL šaltinis			
kaulų čiulpai	6	7	0,630 <sup>b</sup>
periferinis kraujas	3	3	
CD34 x10 <sup>6</sup> /kg recipientų kūno svoriui (rangų vidurkis [95 proc. PI] )	9,67[1,497-6,832]	10,3[2,220-7,948]	0,842 <sup>c</sup>
Ūmi TPŠL			0,064 <sup>a, 1)</sup>
0	3	8	*0,055 <sup>b</sup>
I-II	3	2	
III-IV	3	0	
Lėtinė TPŠL			0,017 <sup>c, 2)</sup>
nebuvo	3*	8*	*0,055 <sup>b</sup>
ribota	0	2	
išplitusi	3	0	
nevertinama <sup>§</sup>	3	0	
Mirtingumas dėl toksinių komplikacijų gyvena/mirė dėl kitų priežasčių mirė	5 4	10 0	0,033 <sup>b</sup>
Leukemijos recidyvas			
remisija	9	0	<0,001 <sup>b</sup>
recidyvas	0	5	
nevertinama	0	5‡	
Transplantato atmetimas			
išsivystė	0	2	0,474 <sup>b</sup>
neišsivystė	9	8	
Ilgalaikė visiška remisija			
tęsiasi	5	4	0,656 <sup>b</sup>
mirė	4	6 <sup>#</sup>	
Stebėjimo laikas (dienos po KKLTL)			
Mediana	146	509	0,156 <sup>c</sup>
[min - max]	[57-1154]	[174-1833]	
Vidutinis rangas	8,0 <sup>c</sup>	11,8 <sup>c</sup>	
[95 proc. PI]	[75.13-747.09]	[301.54-1024.86]	

Santrumpos: TGD – tapatus giminingas donoras; TND – tapatus negiminingas donoras.

<sup>a</sup>Chi-kvadrato kriterijus; <sup>b</sup>Tikslus tikimybių palyginimo kriterijus; <sup>c</sup>Mano Vitnio kriterijus

<sup>1)</sup> $\chi^2 = 5,435$ ; l.l. = 2; <sup>2)</sup> $\chi^2 = 10,248$ ; l.l. = 3 (l.l. – laisvės laipsnis).

§ - du ligoniai mirė nesulaukę 100 dienų po KKLTL, kai išsivysto lėtinė TPŠL; vieno ligonio stebėjimo laikas buvo trumpesnis nei 100 dienų

‡ - penki ligoniai sirgo nepiktybinėmis kraujo ligomis

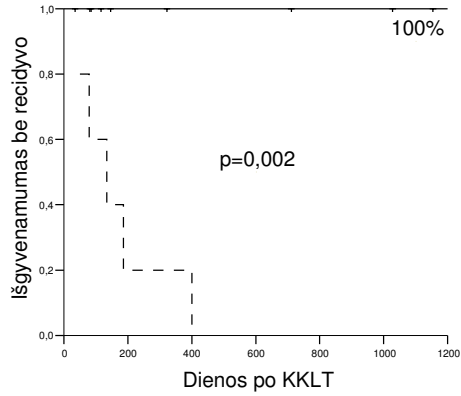
# - vienas ligonis (LIN 34) gyveno nesant remisijai

grupių reikšmingai nesiskyrė (atitinkamai  $p = 0,667$  ir  $p = 0,630$ ). KKL vidutinė dozė buvo kiek didesnė MC-grupėje, ( $4,83 \times 10^6$  CD34/kg recipiento kūno svorio, lyginant su DC-grupe  $2,50 \times 10^6$  CD34/kg recipiento kūno svorio), esant panašiam kaulų čiulpų ir periferinio kraujo KKL naudojimui, tačiau šis skirtumas buvo nereikšmingas ( $p = 0,842$ ).

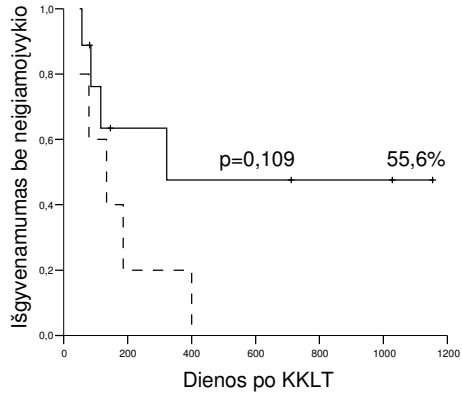
Po transplantacijos vaikams su DC dažniau pasireiškė ūmi ir lėtinė TPŠL. Dauguma ligonių, kuriems leukocitų frakcijoje rastas MC (8/10), neturėjo jokių ūmios ar lėtinės TPŠL požymių ( $p = 0,055$ ), o dviem iš jų pasireiškė tik lengva TPŠL forma (I-II<sup>o</sup> ūmi TPŠL ir ribota lėtinė TPŠL). Lyginant abi grupes skirtumas tarp ūmios TPŠL pasireiškimo laipsnio buvo nereikšmingas ( $p = 0,064$ ). Tuo tarpu lėtinė TPŠL reikšmingai dažniau stebėta DC-grupėje ( $p = 0,017$ ). Nustatėme, kad mirtingumas dėl toksinių-infekcinių komplikacijų yra reikšmingai susijęs su visišku DC ( $p = 0,033$ ), o leukemijos recidyvas – su MC ( $p < 0,001$ ). Tuo metu transplantato atmetimo dažnis lyginant abi grupes reikšmingai nesiskyrė ( $p = 0,474$ ). Penkiems iš devynių ligonių su visišku DC ir keturiems iš dešimt vaikų su MC tęsėsi ilgalaikė visiška remisija ( $p = 0,656$ ), esant panašiam stebėjimo laikui abiejose grupėse: vidutinis stebėjimo laikas DC grupėje sudarė 146 dienas po KKL (svyravo nuo 57 iki 1154 dienų), palyginus su 509 dienomis (nuo 174 iki 1183 dienų) DC grupėje ( $p = 0,156$ ).

#### **4.4.4. Chimerizmo įtaka išgyvenamumui po transplantacijos**

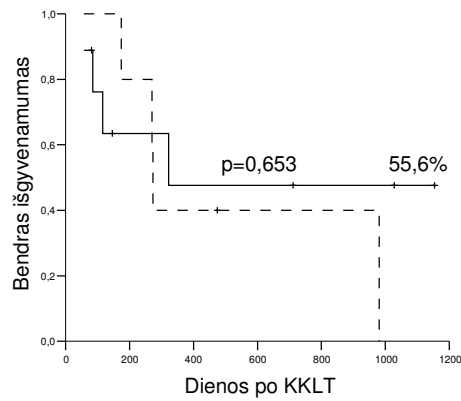
Vertinant chimerizmo įtaką išgyvenamumui ligoniams sirgusiems leukemija ( $n = 14$ ), nustatėme, kad MC buvo statistiškai reikšmingai susijęs su leukemijos recidyvu – visiems penkiems pacientams autologinės frakcijos atsiradimas periferiniame kraujyje sąlygotas piktybinio klonų ataugimo, dėl ko išgyvenamumas be recidyvo šioje grupėje buvo lygus nuliui (4.4-5 A pav.). To metu kai visiems devyniems ligoniams su visišku DC tęsėsi remisija, t.y. išgyvenamumas be recidyvo, esant visiškam DC sudarė 100 proc. Skirtumas yra statistiškai reikšmingas ( $p = 0,002$ ).



A

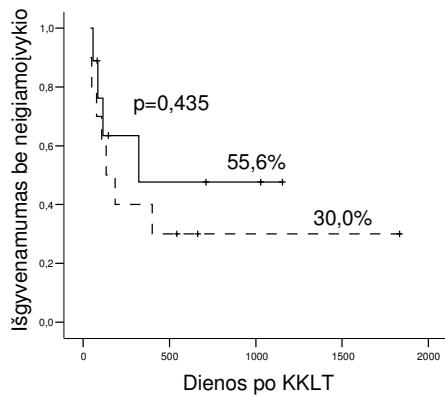


B

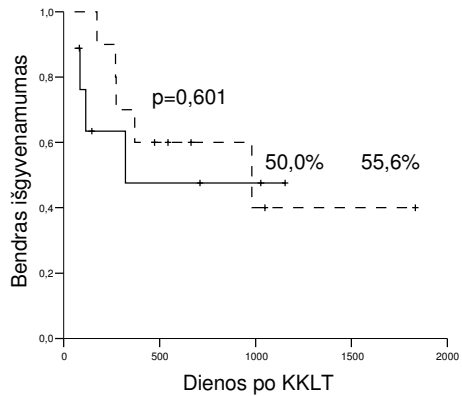


C

**4.4-5 pav.** Ligonių, sergančių leukemija išgyvenamumas priklausomai nuo chimerizmo (n = 14): — DC, - - - MC.



A



B

**4.4-6 pav.** Visų analizuotų ligonių išgyvenamumas priklausomai nuo chimerizmo (n = 19): — DC, - - - MC.

Išnagrinėjus neigiamus įvykius, infekcinės-toksinės komplikacijos buvo pagrindinis veiksnys, lėmęs ligonių su visišku DC mirtingumą po transplantacijos. Be neigiamo įvykio išgyveno 55,6 proc. vaikų (4.4-5 B pav.). MC grupėje leukemijos recidyvas buvo vienintelis neigiamas įvykis – nei vienas ligonis neišgyveno be neigiamo įvykio. Sergant leukemija, abiejų grupių lyginamoji analizė parodė, kad chimerizmas neturėjo įtakos išgyvenamumui be neigiamo įvykio ( $p = 0,109$ ). Tos pačios priežastys lėmė tai, kad bendras išgyvenamumas taip pat reikšmingai nesiskyrė priklausomai nuo chimerizmo ( $p = 0,663$ , 4.4-5 C pav.).

Vertinant chimerizmo įtaką išgyvenamumui visiems pacientams ( $n = 19$ ), nustatėme, kad be neigiamo įvykio išgyveno 55,6 proc. ligonių su DC, lyginant su 30 proc. ligonių turėjusių MC (4.4-6 A pav.). Bendras išgyvenamumas abiejose grupėse sudarė atitinkamai 55,6 proc. ir 50 proc. (4.4-6 B pav.). Taigi, nei išgyvenamumas be neigiamo įvykio, nei bendras išgyvenamumas reikšmingai nesiskyrė priklausomai nuo chimerizmo (atitinkamai  $p = 0,435$  ir  $p = 0,601$ ).

## 5. REZULTATŲ APITARIMAS

### 5.1. ŪMI LIMFOBLASTINĖ LEUKEMIJA

Tiriant chimerizmą PKL, visiškai DC rastas 74,4 proc. (32/43) ŪLL sergančių ligonių, MC – 25,6 proc. (11/43) ligonių. Vienas šio darbo uždavinių buvo nustatyti MC dažnį vaikams, sergantiems leukemija po klasikinio mieloabliacinio kondicionavimo. Ilgai chemoterapija gydyti ligoniai, kuriems skirtas sumažinto intensyvumo kondicionavimas, didinantis MC išsivystymo galimybę, buvo tikslingai pašalinti iš analizės. Absoliučiai daugumai tirtų pacientų (93,0 proc., 40/43) mieloabliacija pasiekta viso kūno apšvita ir etopozidu. Keliuose moksliniuose darbuose įrodytas viso kūno apšvitos pranašumas prieš chemokondicionavimą (pakeitus viso kūno apšvitą busulfanu) –po transplantacijos recidyvo tikimybė yra reikšmingai mažesnė, jei prieš transplantato infuziją skiriama viso kūno apšvita (Bunin N. ir kt., 2003; Jamieson C.H. ir kt., 2003; Willemze AJ. ir kt., 2007). Todėl gydant vaikų ŪLL, šis kondicionavimas yra pirmo pasirinkimo gydymas daugelyje klinikų, tame tarpe Vokietijoje ir Austrijoje, kur šiuo metu vykdomas 2003 metų vaikų ŪLL-BFM alogeninių KKL transplantacijų protokolas. Visiems ŪLL sirgusiems tiriamiesiems transplantacijos procedūra atlikta, vadovaujantis minėtu protokolu.

Didžioji dauguma studijų, nagrinėjusių chimerizmą leukemija sergantiems pacientams po mieloabliacinio kondicionavimo, tyrinėjo mišrų pacientų kolektyvą, t.y. ligonius, sergančius įvairiomis leukemijos formomis (van Leeuwen J.E. ir kt. 1994; Bader P. ir kt. 1997, 1998, 2000; Dubovsky I. ir kt., 1999; Acquaviva C. ir kt., 2003). Dalinai dėl šios priežasties šiose studijose nustatytas MC dažnis yra didesnis, nei mūsų tyrime ir svyruoja nuo 33 iki 47 proc. Tačiau netgi moksliniuose darbuose, kuriuose nagrinėti vien ŪLL sergantys recipientai, MC buvo aptinkamas kur kas dažniau: 60 proc. (Ramirez M. ir kt., 1996), 55,5 proc. (Zetterquist H. ir kt., 2000), 36 proc. ligonių (Bader P. ir kt., 2002). Pirmose dviejose studijose tirtų pacientų skaičius buvo nedidelis (atitinkamai 15 ir 9 ligoniai). Į tai reikėtų atsižvelgti, vertinant gautas

MC procentines reikšmes. Be to, Ramirez naudojo mieloabliacinį kondicionavimą busulfano pagrindu, dėl ko MC, aptinkamo prieš leukemijos recidyvą, dažnis galėtų būti didesnis. Bader ir bendraautorių tirtas pacientų kolektyvas yra pakankamai didelis (173 vaikai), tačiau straipsnyje nepateikiama duomenų apie ligonių kondicionavimą ir prieštransplantacinius rodiklius. Tokiu būdu šioje disertacijoje pateikiami duomenys apie MC dažnį po mieloabliacinio kondicionavimo ŪLL sergantiems vaikams negali būti besąlygiškai lyginami su kitų studijų rezultatais. Minėtą rezultatų skirtumą galima būtų iš dalies paaiškinti ir tuo, kad analizuojamų vaikų tarpe diagnozuotas palyginus mažas kaulų čiulpų recidyvų skaičius – 9,3 proc. (4/43), o tuo pačiu retai stebėtas ir didėjantis MC. Tokie rezultatai galimai sietini su nestandartine transplantato prieš šeimininką ligos profilaktika – persodinant identiškų giminingų donorų KKL, recipientams vietoj paprastai skiriamų ciklosporino ir metotreksato (Storb R. ir kt., 1986) skirtas tik ciklosporinas. Kelių tyrimų duomenys rodo, kad kuo mažesnė imunosupresija, tuo mažesnė ir recidyvo tikimybė (Locatelli F. ir kt., 2000; Teuffel O. ir kt., 2005). Ciklosporino ir metotreksato derinys yra daugelio plačiai paplitusių imunosupresijos režimų pagrindas (Potter V. ir Moore J., 2008), tačiau metotreksatas lėtina KKL prigijimą ir didina įvairių toksinių komplikacijų skaičių (Chao N.J. ir kt., 2000; Ho V.T. ir kt., 2001). Tuo remiantis mėginama sumažinti jo dozę (Cutler C. ir Antin J.H., 2002) arba pakeisti kitais imunosupresantais (Cutler C. ir kt., 2004). Tyrimų rezultatai rodo, kad tokia taktika nedidina recidyvo po transplantacijos rizikos, bet sumažina toksinių komplikacijų dažnį ankstyvame ir vėlyvame potransplantaciniame periode (Cutler C. ir kt., 2004; Koh L.P. ir kt., 2007).

Visuose aukščiau minėtuose darbuose, kuriuose buvo tirtas chimerizmas ŪLL sergantiems, polimorfiniai DNR žymenys analizuoti tik periferinio kraujo leukocituose (Ramirez M. ir kt., 1996; Zetterquist H. ir kt., 2000; Bader P. ir kt., 2002). Savo tyrime chimerizmui tirti taip pat rėmėmės DNR žymenų įvairove. Donorui nuo recipiento atskirti naudotas komercinis DNR žymenų rinkinys, pagausintas dauginės PGR būdu. Kiekvienai donoro ir recipiento

porai buvo rastas bent vienas informatyvus DNR žymuo. Šis praktiškas ir patogus būdas plačiai taikomas klinikinėje praktikoje (Antin J.H. ir kt., 2001; Bader P. ir kt., 2005). Metodo jautrumas leidžia aptikti iki  $1-5 \times 10^{-2}$  recipiento DNR tiriamojame medžiagoje (McCann S.R. ir Lawler M., 2004; Lion T., 2003; Schraml E. ir kt., 2003). Norėdami padidinti metodo jautrumą, iš periferinio kraujo išskyrėme ALP. Tokia metodika leidžia aptikti iki  $1 \times 10^{-3} - 10^{-4}$  recipiento ląstelių (Lion T. ir kt., 2001). Pastaruoju metu moksliniuose tyrimuose aprašomi ir kiti būdai, kurie leistų padidinti chimerizmo tyrimo jautrumą, pvz., naudojami alternatyvūs polimorfizmo žymenys – genomo sekų polimorfizmas (Willasch A. ir kt., 2007), pavienių nukleotidų skirtumai (Alizadeh M. ir kt., 2002; Maas F. ir kt., 2003; Gineikienė E. ir kt., 2009), Y chromosomai specifinės sekos (Fehse B. ir kt., 2001; Thiede C. ir kt., 2003), kurie gausinami ir vertinami kiekybine tikro laiko PGR. Tokiu būdu chimerizmo tyrimo jautrumas padidėja iki  $1 \times 10^{-3} - 10^{-5}$ .

Ištyrus chimerizmą atskirose ląstelėse paaiškėjo, kad nepaisant stabilaus DC leukocituose, ALP galima aptikti autologinę frakciją: T limfocituose ji rasta 19,4 proc. ligonių, B limfocituose – 9,4 proc., o KKL – 70,0 proc. tiriamųjų. Pažymėtina, kad ši nedidelė recipiento ląstelių dalis neturėjo įtakos klinicinei eigai – nei vienam iš šių ligonių neišsivystė leukemijos recidyvas ar transplantato atmetimas. Recipiento frakcija T ir B limfocituose gana greitai išnyko – praėjus šimtui dienų po KKL. Tuo tarpu CD34 populiacijoje recipiento signalai buvo aptinkami iki dvejų metų po transplantacijos. Ilgalaikį autologinės kraujodaros egzistavimą patvirtina ir kitų autorių skelbti duomenys, kai labai maži recipiento DNR kiekiai periferinio kraujo mononukleuose buvo randami iki penkerių metų po KKL (Koldehoff M. ir kt., 2006; Thiede C. ir kt., 2003). Skirtingai nuo mūsų tyrimo, kur recipiento DNR kiekis buvo išreikštas nuošimčiais, minėtose publikacijose pateiktas kiekybinis recipiento DNR matavimas. Tačiau abiem atvejais stebėti panašūs rezultatai – praėjus keleriems metams po transplantacijos, recipiento frakcija palaipsniui sumažėjo. Nuosavų ląstelių išlikimas po transplantacijos aprašytas ir ištyrus mezenchimines stromos ląsteles (Stute N. ir kt., 2002; Dikhut A. ir



kt., 2005; Rieger K. ir kt., 2005). Tiriant chimerizmą šiose ląstelėse, išskirtose iš recipientų kaulų čiulpu, recipiento DNR buvo aptinkama iki 5 metų po transplantacijos. Jų persistavimui neturėjo įtakos kondicionavimo intensyvumas ar KKL šaltinis (Villaron E.M. ir kt., 2004). Tranzitorinis žemo lygio chimerizmas CD3 ir CD19 frakcijose po mieloabliacinio kondicionavimo aprašytas ir kitų autorių (Serrano J. ir kt., 2000; Miura Y. ir kt., 2006). Įdomu, kad MC šiose ląstelių populiacijose buvo aptiktas taip pat ligoniams, sergantiems mieloidinės kilmės leukemija. Kol kas literatūroje nepavyko rasti panašių duomenų, patvirtinančių ilgalaikį savų KKL persistavimą ŪLL recipientams po mieloabliacinio kondicionavimo, kurias galima būtų aptikti, tiriant periferinį kraują.

Mažas ligonių, kuriems išsivystė kaulų čiulpu recidyvas, skaičius (n = 4) greičiausiai sąlygojo tai, kad mūsų tyrime nepavyko nustatyti ALP pranašumo, palyginus su PKL – priešingai negu tikėtasi, prieš išsivystant leukemijos recidyvui, visose tirtose ląstelių populiacijose autologinė frakcija užfiksuota vienu metu. Lygiagretus donoro DNR mažėjimas buvo stebimas visose tirtose ALP (4.1-2 pav., 54 p.). Dviems iš keturių recidyvavusių ligonių (LIN 88 ir 118, 4.1-3 lentelė, 53 p.) tokie tyrimų rezultatai sietini su audringu leukemijos progresavimu – jiems recidyvas po transplantacijos diagnozuotas palyginus anksti (atitinkamai 48 ir 86 dieną po KKL). Kitiems dviems ligoniams (LIN 75 ir 220, 4.1-3 lentelė, 53 p.), priešingai, recidyvas diagnozuotas kur kas vėliau: 231 ir 831 dieną po KKL, t.y. tuomet kai ligoniai sekami ambulatoriškai ir chimerizmas tiriamas žymiai rečiau. Tai prieštarauja Bader skelbtiems duomenims, kuris teigė, kad jei leukemijos recidyvas išsivysto praėjus 300 dienų po KKL, autologinė frakcija aptinkama tik blastų populiacijoje, tuo metu kai kitos eilės ląstelės lieka donoro kilmės (Bader P. ir kt., 2000). Olandų mokslininkų atliktas tyrimas patvirtina mūsų gautus rezultatus apie tai, kad tik dažnas ALP tyrimas gali būti informatyvus, norint pamatyti jose didėjančią recipiento frakciją prieš besivystantį recidyvą anksčiau, nei leukocituose (Huisman C. ir kt., 2007). Tačiau klinikinėje

praktikoje vargu ar tai gali būti įgyvendinta, kai ligonis sekamas ambulatoriškai.

Radome tik vieną studiją, kurioje buvo suabejota ALP tyrimo pranašumu ankstyvai recidyvo diagnostikai: joje buvo palygintas chimerizmo tyrimas PKL ir ALP, tame tarpe CD3 ir CD34 (Zeiser R. ir kt., 2005). Šioje studijoje tirti 168 suaugę ligoniai, sergantys ūmia mieloidine leukemija ir mielodisplaziniu sindromu po mieloabliacinio kondicionavimo. Autoriai teigia, kad chimerizmo tyrimas PKL ir ALP, atliekamas vidutiniškai kas 24 dienas, yra panašios vertės ankstyvai leukemijos recidyvo diagnostikai. Dauguma kitų mokslinių darbų, kurie tyrinėjo ALP izoliacijos reikšmę ankstyvai recidyvo diagnostikai, nurodo didesnę chimerizmo tyrimo jautrumą ALP, tačiau vieni jų tyrė chimerizmą ALP tik radus recipiento ląsteles PKL (Bader P. ir kt., 2000), kituose chimerizmo kinetika PKL ir ALP nebuvo lyginama (Zetterquist H. ir kt., 2000; Mattson J. ir kt., 2001a; Thiede C. ir kt., 2002). Todėl apibendrinančias išvadas apie ALP tyrimo tikslingumą ankstyvai kaulų čiulpų recidyvo diagnostikai po mieloabliacinio kondicionavimo daryti sunku.

Chimerizmo kinetikos analizė yra labai jautrus rodiklis kaulų čiulpų recidyvui diagnozuoti. Michallet teigė, kad chimerizmo kinetika, o būtent didėjantis MC, yra nepriklausomas ir reikšmingas prognostinis bendro išgyvenamumo rodiklis (Michallet A.S. ir kt., 2005). Mūsų tyrimo duomenimis kaulų čiulpų recidyvas diagnozuotas 4 iš 5 (80 proc.) ligonių, kuriems išsivystė didėjantis MC (4.1-3 lentelė, 53 p.). Tačiau chimerizmo tyrimas kraujo ląstelėse neturi prognostinės reikšmės ekstramedulinio recidyvo diagnostikai. Ekstramedulinių recidyvų dažnis po transplantacijos gali siekti 41 proc. ir sąlygoti bendrą nepalankią transplantacijos išeitį (Saribeyoglu E. ir kt., 2008). Mūsų tyrime visi trys ekstramedulinio recidyvo atvejai diagnozuoti ligoniams, esant visiškai DC PKL, T ir B limfocituose. Dviem iš šių ligonių (LIN 156 ir 182, 4.1-1 lentelė, 50 p.) CD34 frakcijoje rastas MC, tuo tarpu vienam ligoniui (LIN 171, 4.1-1 lentelė, 50 p.) net ir šioje frakcijoje buvo randama tik donoro DNR. Mūsų ir kitų autorių duomenimis (Wilson D.B. ir kt., 2003; Ohashi H. ir kt., 2005; Kikushige Y. ir kt., 2007) akivaizdu, kad visiškai DC kraujo

ląstelėse ir su juo susijęs transplantato prieš leukemiją efektas neapsaugo nuo ekstramedulinio recidyvo.

Didesnis chimerizmo tyrimo jautrumas, tiriant ALP gerai atsispindi ligonių, kuriems rastas žemo lygio MC, chimerizmo kinetikoje: visiems keturiems vaikams, turėjusiems žemo lygio MC (4.1-3 lentelė, 53 p.) recipiento frakcija pirmiausia buvo aptikta ALP, o vėliau ir PKL. Remiantis didėjančiu MC aptiktu būtent ALP (tuo metu kai leukocituose recipiento frakcija neviršijo 8 proc.), atlikta imunoterapijos korekcija: 3 iš 4 vaikų buvo nutraukta arba sumažinta potransplantacinė imunosupresija, o vienam pacientui perpilti donoro limfocitai. To pasekoje įvyko pilna chimerizmo konversija iš mišraus į visišką DC tiek bendroje leukocitų frakcijoje, tiek ALP. Vertinant tai, kad recipiento frakcija buvo aptikta pirmiausia ALP, o palaiptai daugėjant recipiento ląstelėms, ją tapo įmanoma aptikti ir PKL, galima susidaryti vaizdą apie didėjančio MC leukocitų frakcijoje vystymosi mechanizmą. Kaip jau ne kartą minėjome, didėjantis MC yra glaudžiai susijęs su leukemijos recidyvu (Ramirez M. ir kt., 1996, Bader P. ir kt., 1998; Barrios M. ir kt., 2003). Todėl chimerizmo konversija iš MC į visišką DC laikoma profilaktikos priemone, leidžiančia apsaugoti ligonį nuo leukemijos recidyvo. Chimerizmo konversiją galima pasiekti keičiant imunoterapiją įvairiais būdais – nutraukus ciklosporiną ar kitus po transplantacijos skiriamus imunosupresantus arba sumažinus jų dozę (Elmaagacli A.H. ir kt., 1999; Locatelli F. ir kt., 2000; Fujimaki K. ir kt., 2001; Prinz E. ir kt., 2003), perpylus donoro limfocitus. Imunokorekcijos sukelta chimerizmo konversija išprovokuoja TPŠL ir su ja susijusį transplantato prieš leukemiją efektą. Kai kurių studijų duomenys rodo, kad transplantato prieš leukemiją efektas priklauso ne vien nuo TPŠL kaip tokios, bet ir nuo jos sunkumo laipsnio: esant lengvai I<sup>o</sup> TPŠL, recidyvo tikimybė yra tokia pati kaip ir nesant jokiems TPŠL požymiams, o ligonių išgyvenamumas be recidyvo koreliuoja su TPŠL išraiškos stiprumu (Teuffel O. ir kt., 2005).

Visi imunoterapijos būdai gali būti efektyvūs, siekiant sukelti transplantato prieš leukemiją efektą. Tiek ciklosporino dozės sumažinimas (Locatelli F. ir kt., 2000) arba visiškas jo nutraukimas (Prinz E. ir kt., 2003),

tiesiog donoro limfocitų infuzija (Dey B.R. ir kt., 2003) gali sukelti stabilią remisiją, kai šių priemonių imamasi pradinėje besivystančio recidyvo stadijoje. Labiausiai diskutuotinas klausimas – kada imunomoduliacija turi būti pradėta? Šiuo metu didėjantis MC būtent leukocituose yra laikomas pagrindu profilaktinės imunoterapijos skyrimui (Massenkeil G. ir kt., 2003; Bader P. ir kt., 2005b). Tačiau net ir šiuo atveju ne visada pavyksta nugalėti recipiento kraujodarą ir piktybinį kloną (Yoshimi A. ir kt., 2005b). Kuo mažesnis navikinių ląstelių kiekis organizme, tuo didesnė tikimybė, kad imunokorekcija bus veiksminga (Bader P. ir kt., 2004). Paprastai stengiamasi koreguoti imunosupresinį gydymą, esant pirmiems didėjančio MC požymiams, tiriant PKL (Park S.J. ir kt., 2000; Gorczyńska E. ir kt., 2004). MC nustatymas minimaliame kiekybiniame lygyje tiriant ALP, gali suteikti naujų perspektyvų imunoterapijos skyrimui. Turint omenyje, kad 61 proc. ligonių imunoterapija gali sąlygoti ūmią TPŠL ir padidinti su ja susijusių infekcinių-toksinių komplikacijų riziką, o nuo 18 iki 50 proc. ligonių po donoro limfocitų infuzijos išsivysto kaulų čiulpų aplazija (Luznik L. ir Fuchs E.J., 2002; Massenkeil G. ir kt., 2003), tinkamas imunokorekcijos skyrimo momentas ir pakankamai jautrus jos poveikio sekimo būdas įgauna ypač didelę reikšmę. Chimerizmo tyrimas ALP, kuris yra žymiai jautresnis, nei PKL tyrimas yra viena tokių galimybių.

Mūsų tyrime iš keturių ligonių, kuriems aptiktas didėjantis MC (4.1-3 lentelė, 53 p.), trims didėjanti recipiento DNR atsirado dėl piktybinio klonu atsinaujinimo, o vienam ligoniui (LIN 212), konstatuota autologinės kraujodaros regeneracija, nesant leukemijos recidyvo požymių. Recipiento kraujodaros atsistatymas aprašytas ir kituose moksliniuose darbuose, daugiausia sergant mieloidinės kilmės piktybinėmis kraujo ligomis (Bader P. ir kt., 1998; Brunstein C.G. ir kt., 2000) ir nepiktybinėmis kraujo ligomis (Bader P. ir kt., 1997; Hoelle W. ir kt., 2004; Willasch A. ir kt., 2006a). Žvelgiant į chimerizmo kinetiką ALP, įdomu tai, kad mūsų atveju recipiento DNR lėčiausiai didėjo CD3 frakcijoje. Tai prieštarauja kitų studijų pastebėjimams, kad recipiento T limfocitai regeneruoja sparčiau už kitos eilės ląsteles (Baron

F. ir kt., 2003; Lee K.H. ir kt., 2003; Petersen S.L. ir kt., 2004). Šiuo atveju taip pat kol kas negalima kalbėti apie vėlyvą transplantato atmetimą, kuris visų pirma, susijęs su autologinių T limfocitų atsistatymu (Dey B.R. ir kt., 2003; Lion T., 2007; Masmas T.N. ir kt., 2008). Aukščiau minėtų studijų duomenimis daugumai (80 proc.) ligonių vidutiniškai po 11 (3-41) mėnesių po autologinės kraujodaros atsistatymo išsivystė leukemijos recidyvas (Bader P. ir kt., 1998; Brunstein C.G. ir kt., 2000). Tačiau vienareikšmiškai daryti prielaidą, kad mūsų tyrime aprašytam ligoniui taip pat išsivystys leukemijos recidyvas nereikėtų – visi minėti ligoniai sirgo lėtine mieloidine leukemija ar mielodisplaziniu sindromu, o, kaip žinia, mieloidinio piktybinio klonu proliferacija yra kur kas lėtesnė, nei limfoidinės kilmės blastų (Kolb H.J. ir kt., 1995; Collins J.R.H. ir kt., 2000). Tyrimo duomenų vertinimo dieną ligonis LIN 212 buvo stebimas 922 dienų, t.y. apyklsiai 30 mėnesių po KKLTL, kuomet jo kraujodaros ląstelių iš lėto nuolat daugėjo. Turint omenyje greitą ŪLL recidyvo vystymąsi, tikėtina, kad per šį laiką recidyvas jau būtų buvęs diagnozuotas.

Prieštransplantacinių veiksnių analizė (4.1-4 lentelė, 56 p.) neatskleidė nė vieno iš analizuotų rodiklių (remisijos prieš KKLTL, donoro, kondicionavimo, KKL šaltinio) įtakos chimerizmui. Mūsų žiniomis remisijos iki transplantacijos ir chimerizmo ryšys nėra nagrinėtas. Prielaidai apie šį ryšį paremti, pasitelkėme mokslinių tyrimų rezultatus, kurie rodo, kad minimalios liktinės ligos lygis iki transplantacijos tiesiogiai įtakoja recidyvo po KKLTL išsivystymą ir tuo būdu transplantacijos rezultatus apskritai (Goulden N. ir kt., 2003; Schilham M.W. ir kt., 2005; Sramkova L. ir kt., 2007; Bader P. ir kt., 2009). Prieš ir po transplantacijos persistuojantys recipientų blastai galėtų lemti MC radimą po KKLTL. Aptikome vieną mokslinį darbą, kuriame rasta remisijos stabilumo po transplantacijos koreliacija su chimerizmu: Wang ir bendradarbiai aprašė studiją, kurioje tyrė 21 leukemija sergantį vaiką (Wang L.J. ir kt., 2002). Šiame tyrime nustatyta reikšminga koreliacija tarp MC ir blastų kiekio kaulų čiulpuose ar periferiniame kraujyje, tirtuose po transplantacijos. Tuo tarpu visiems ligoniams, kuriems aptiktas visiškas DC,

tęsėsi stabili remisija. Kondicionavimo reikšmę chimerizmui aprašė Miura: jis pastebėjo, kad taikant mieloabliacinį kondicionavimą busulfano pagrindu, 28 dieną po KKL donorų frakcija T limfocituose neviršijo 90 proc., tuo tarpu skiriant viso kūno apšvitą, donorų DNR CD3 frakcijoje buvo >90 proc. (Miura Y. ir kt., 2006). Analizuojant chimerizmą bendroje leukocitų populiacijoje, kaip ir mūsų tyrime, reikšmingo skirtumo negauta. KKL šaltinio reikšmė chimerizmui aprašyta dviejose studijose: Nakao ir Wiesneth nustatė, kad skiriant mieloabliacinį kondicionavimą, MC dažniau vystosi persodinus kaulų čiulpus, nei periferinio kraujo KKL (Nakao S. ir kt., 1999; Wiesneth M. ir kt., 1999). Tai, kad mūsų tyrime neradome panašios koreliacijos galima paaiškinti tuo, kad pirmoje minėtoje studijoje chimerizmas tirtas labai anksti ir kur kas dažniau (periferinio kraujo mėginiai tirti kas 2-3 dienas, pradedant 8 dieną po KKL), o antrame tyrime chimerizmas tirtas po mieloabliacinio kondicionavimo, tačiau visiems ligoniams buvo atlikta T limfocitų deplecija. Donoro įtaka chimerizmui tyrinėta viename moksliniame darbe, kuriame tirti leukemija sergantys ligoniai po sumažinto intensyvumo kondicionavimo (Baron F. ir kt., 2004). Jame nenustatyta giminingo ar negiminingo donorų KKL įtakos chimerizmo kinetikai. Kol kas neradome publikuotų darbų, kurie tyrinėtų donorų įtaką chimerizmui po mieloabliacinio kondicionavimo.

Kaip ir kitose studijose nustatėme, kad ūmi TPŠL dažniau vystosi recipientams turintiems visišką DC, nei turintiems MC, aptiktame bendroje leukocitų frakcijoje (Ramirez M. ir kt., 1996; Mattsson J. ir kt., 2001b). Reikšmingą skirtumą tarp DC- ir MC-grupių nustatėme, apskaičiavus ligonių skaičių kiekvienoje grupėje, kuriems ūmi TPŠL apskritai nepasireiškė (4.1-4 lentelė, 56 p.): pirmoje grupėje jokių TPŠL požymių neatsirado 2 iš 32 ligonių, lyginant su 4 iš 11 vaikų antroje grupėje ( $p = 0,029$ ). Reikšmingo skirtumo nebuvimas tarp lėtinės TPŠL pasireiškimo dažnio abiejose grupėse ( $p = 0,441$ ) greičiausiai susijęs su chimerizmo konversija: po imunosupresinio gydymo korekcijos MC-grupės ligoniams išsivystė visiškas DC, kuris sąlygojo TPŠL išsivystymą vėlyvame periode po transplantacijos. Visiško DC svarbą lėtinei TPŠL patvirtino Balon atliktas tyrimas: autorius ištyrė 54 suaugusius ligonius,

sergančius įvairiomis leukemijos formomis, kuriems skirtas mieloabliacinis kondicionavimas (Balon J. ir kt., 2005). Išanalizavus šių ligonių chimerizmą PKL, paaiškėjo, kad kuo anksčiau nustatomas visiškas DC leukocitų frakcijoje, tuo didesnė jo koreliacija su lėtinės TPŠL išplitimu. Tiek Balon, tiek kiti mokslininkai, tyrę chimerizmo kinetiką leukemija sergantiems ligoniams po mieloabliacinio kondicionavimo (Mattsson J. ir kt., 2001b) ar po sumažinto intensyvumo kondicionavimo (Petersen S.L. ir kt., 2004; Baron F. ir kt., 2005a; Mohty M. ir kt., 2007), pabrėžia DC lygio T limfocituose svarbą tiek ūmios, tiek lėtinės TPŠL išsivystymui ir stiprumo laipsniui.

Neigiamų įvykių po transplantacijos nagrinėjimas parodė, kad mirtingumas dėl toksinių komplikacijų abiejose grupėse reikšmingai nesiskyrė: infekcinės-toksinės komplikacijos sąlygojo 6 iš 32 ligonių mirtį DC-grupėje ir 2 iš 11 MC-grupėje ( $p = 0,156$ ). Pagrindinis neigiamas veiksnys, kuris lėmė recipientų mirtingumą esant visiškam DC leukocitų frakcijoje, buvo lėtinė TPŠL. Nė vienam šių ligonių neišsivystė kaulų čiulpų recidyvas, o ekstramedulinis leukemijos atsinaujinimas diagnozuotas 3 vaikams. Chimerizmo reikšmė ekstrameduliam recidyvui aptarta aukščiau (žr. 90 p.). Mūsų rezultatai koreliuoja su Zecca pateiktais duomenimis, kuris nustatė, kad lėtinės TPŠL išsivystymas reikšmingai padidina išgyvenamumą be recidyvo, tačiau taip pat padidina vaikų mirtingumą vėlyvame potransplantaciniame periode (Zecca M. ir kt., 2002). Leukemijos atsinaujinimas kaulų čiulpuose buvo pagrindinis neigiamas įvykis, esant MC leukocitų frakcijoje, kas patvirtinta daugelyje kitų mokslinių darbų (Ramirez M. ir kt., 1996; Bader P. ir kt., 1998; Barrios M. ir kt., 2003; Koldehoff M. ir kt., 2006). Mūsų tyrime dar kartą patvirtinome reikšmingą skirtumą tarp leukemijos recidyvo kaulų čiulpuose išvystymo dažnio tarp ligonių, turinčių DC ir MC leukocituose ( $p = 0,003$ ). Mėginimai pasiekti remisiją po recidyvo dviem ligoniams (LIN 75 ir 118, 4.1-3 lentelė, 53 p.) sąlygojo chimerizmo konversiją ir TPŠL išsivystymą, dėl kurios abu vaikai mirė, o vienas jų (LIN 88) mirė dėl spartaus leukemijos progresavimo. Taigi, tiriant abi grupes, bendras ligonių skaičius,

kuriems tęsėsi ilgalaikė visiška remisija reikšmingai nesiskyrė, (6/26 turinčių DC, lyginant su 5/10 turinčių MC,  $p = 0,091$ ).

Išanalizavus tirtų ląstelių populiacijų įtaką transplantacijos baigčiai, nustatėme kad išgyvenamumas be recidyvo (skaičiuojant kaulų čiulpų ir ekstramedulinius recidyvus kartu ar vien tik kaulų čiulpų recidyvus) reikšmingai skiriasi priklausomai nuo chimerizmo PKL (atitinkamai  $p = 0,014$  ir  $p = 0,010$ , 4.1-5 pav., 58 p.). Išgyvenamumas be neigiamo įvykio mūsų tyrime taip pat pasirodė esąs reikšmingai priklausomas nuo chimerizmo PKL ( $p = 0,017$ ). Šį faktą, kuris prieštarauja kitų tyrimų rezultatams (Ramirez M. ir kt., 1996; Michallet A.S. ir kt., 2005), galima būtų paaiškinti tuo, kad du ligoniai, kuriems diagnozuoti neigiami įvykiai (autologinė regeneracija, LIN 212 ir kaulų čiulpų recidyvas, LIN 220; 4.1-3 lentelė, 53 p.) tyrimo rezultatų vertinimo dieną buvo gyvi. Bendras išgyvenamumas tarp ligonių, turinčių DC ar MC leukocitų frakcijoje reikšmingai nesiskyrė ( $p = 0,086$ ). Išanalizavus CD3, CD19 ir CD34 populiacijų įtaka transplantacijos išėičiai, nustatėme kad nė viena iš analizuotų ALP neturėjo reikšmingos įtakos nei berecidiviam išgyvenamumui, nei išgyvenamumui be neigiamo įvykio, nei bendram išgyvenamumui (4.1-5 lentelė, 57 p.).

Savo darbe, nagrinėjant chimerizmo reikšmę išgyvenamumo rodikliams, vertinome Kaplano-Mejerio įverčius. Kituose moksliniuose darbuose chimerizmo įtaka išgyvenamumui dažnai vertinama, lyginant išgyvenamumo vidurkius ( $t$ -testas) priklausomai nuo chimerizmo, rasto tam tikrą dieną tam tikroje ląstelių populiacijoje. Tokiuose tyrimuose nustatyta, kad leukemija sergančių vaikų išgyvenamumas be recidyvo reikšmingai mažesnis, jei 30 dieną po KKLТ bendroje leukocitų frakcijoje randamas visiškas DC (Lassaletta A. ir kt., 2005). Blau ir bendradarbiai teigia, kad MC leukocitų frakcijoje randamas 28 ir 56 dieną po KKLТ sumažina berecidyvį išgyvenamumą po sumažinto intensyvumo kondicionavimo (Blau I.W. ir kt., 2007). Autologinė frakcija T limfocituose aptikta 30 dieną po sumažinto intensyvumo kondicionavimo susijusi su mažesne ūmios TPŠL tikimybe, bet tuo pačiu ir su mažesniu berecidyviu išgyvenamumu (Mohty M. ir kt., 2007).



Mieloidinis chimerizmas CD14/15 populiacijoje <90 proc., tiriamas 28 dieną po KKL, reikšmingai sumažina tikimybę išgyventi vienerius metus po transplantacijos (Miura Y. ir kt., 2006). Iš pateiktų studijų matome, kad kiekvienas mokslininkų kolektyvas savaip parenka tiriamąjį kontingentą, tyrimo metodiką, todėl rezultatų apibendrinimas tokioje situacijoje yra sudėtingas. Dėl aukščiau minėtų statistinės analizės skirtumų šių rezultatų taip pat negalima besąlygiškai lyginti su mūsų tyrimo duomenimis. Greičiau jie papildo mokslo žinias šioje srityje.

Pagrindinis mūsų tyrimo rezultatas – tai gana didelis (70 proc.) MC dažnis, aptiktas KKL populiacijoje. Autologinės frakcijos kinetika CD34 populiacijoje skyrėsi nuo chimerizmo kinetikos PKL, T ir B limfocituose – recipiento DNR mažėjo palaipsniui, nors išliko matoma iki 2-ųjų metų po KKL. Šis MC, užfiksuotas nuosekliai ir ilgą laiką sekant gana homogenišką ligonių grupę, mūsų žiniomis yra pirmas tyrimas, nagrinėjęs chimerizmą CD34 populiacijoje ŪLL sergantiems vaikams. Liekamoji ilgai persistuojanti recipiento kraujodara aprašyta ir kitų autorių (Thiede C. ir kt., 2003; Koldehoff M. ir kt., 2006; Willash A. ir kt., 2006b), tačiau iki šiol nebuvo gilintasi jos kilmę ir reikšmę. Mūsų žiniomis yra aprašytos dvi studijos, kurios nagrinėjo chimerizmą CD34 ląstelėse (Thiede C. ir kt., 2002; Zeiser R. ir kt., 2005). Abiejų studijų rezultatai skiriasi: Thiede ir bendradarbiai ištyrė 87 suaugusius ligonius, kurių dauguma sirgo mieloidinės kilmės leukemijomis, tačiau tarp tiriamųjų buvo ir 10 ligonių, sirgusių ŪLL bei 1 pacientas, sirgęs neHodžkino limfoma. Visiems ligoniams skirtas mieloabliacinis kondicionavimas. Tyrėjai rado MC KKL 20 iš 22 ligonių, kuriems diagnozuotas leukemijos recidyvas. Autoriai padarė išvadą, kad chimerizmo tyrimas CD34 populiacijoje yra jautrus ir paprastas metodas minimaliai liktinei ligai sekti. Zeiser ir bendradarbiai tyrė 168 pacientus, sergančius vien mieloidinės eilės hemoblastozėmis, kuriems taip pat skirtas mieloabliacinis kondicionavimas. Šiame darbe autoriai palygino chimerizmo tyrimą PKL ir ALP (tame tarpe CD3 ir CD34 populiacijose) ir padarė išvadą, kad chimerizmo tyrimas PKL ir ALP suteikia panašios informacijos apie gresiantį leukemijos recidyvą.

Abiejose studijose tirti ligoniai sirgę daugiausia mieloidinės eilės leukemijomis. Mohty, tyręs chimerizmą T limfocituose mieloidinės ir limfoidinės eilės leukemija sergantiems pacientams, pabrėžė pagrindinės ligos svarbą chimerizmo kinetikai (Mohty M. ir kt., 2007). Todėl abiejų aukščiau minėtų tyrimų rezultatų negalima vienareikšmiškai ir besąlygiškai lyginti nei tarpusavyje, nei su mūsų tyrimo duomenimis. Savo darbe atlikus išgyvenamumo analizę priklausomai nuo chimerizmo KKL (4.1-5 lentelė, 57 p.), nustatėme, kad ši kiekybiškai nedidelė recipiento frakcija, kuri nors ir buvo rasta 70 proc. tiriamųjų, neturėjo įtakos nei išgyvenamumui be recidyvo ( $p = 0,803$ ), nei išgyvenamumui be neigiamo įvykio ( $p = 0,846$ ), nei bendram išgyvenamumui ( $p = 0,582$ ). Autologinės kraujodaros ilgalaikio persistavimo po mieloabliacinio kondicionavimo priežastys, mechanizmai ir pasekmės šiandien išlieka neaiškūs ir suteikia pagrindo moksliniams tyrinėjimams ateityje.

## 5.2. FANCONI ANEMIJA

Išanalizavus 22 ligonių, sergančių FA chimerizmo kinetiką, nustatėme, kad skiriant ligai specifinį sumažinto intensyvumo kondicionavimą fludarabinu ir busulfanu, po transplantacijos 45,5 proc. (10/22) vaikų PKL randamas visiškai DC, o 54,5 proc. (12/22) pacientų – MC. Iki šiol labiausiai žinomą ir plačiausiai naudojamą kondicionavimą FA gydyti pirmą kartą aprašė prancūzų mokslininkai 1983 metais (Gluckman E. ir kt., 1983). Jo pagrindą sudaro torakoabdominalinė apšvita ir ciklofosfamidai. Skiriant šį parengiamąjį režimą, yra pasiekti gana geri transplantacijos rezultatai – 2-jų metų bendras išgyvenamumas siekia 70 proc., persodinant tapataus giminingo donoro KKL (Gluckman E. ir kt., 1995), o persodinant tapataus negiminingo donoro KKL 3-jų metų bendras išgyvenamumas sudaro 30 proc. (Guardiola P. ir kt., 2000a). Pagrindinis šio kondicionavimo trūkumas – jo potencialus kancerogeninis poveikis, kuriam dėl FA ląstelėms būdingo chromosomų nestabilumo, šie

pacientai yra ypač jautrūs (Auerbach A.D. ir Wolman S.R., 1976; Gluckman E. ir kt., 1983). Tiek jonizuojantis spinduliavimas, tiek ciklofosfamidai, kuris tiesiogiai veikia DNR, gali sukelti negrįžtamus genomo pakitimus, kurie sąlygoja vėžio išsivystymą (Joenje H. ir Patel K.J., 2001). Dėl šios priežasties daugelis centrų mėgina skirti alternatyvų kondicionavimą be jonizuojančio spinduliavimo arba be ciklofosfamido (Harris R.E., 1999).

Svarbiausi veiksniai, kurie lemia KKLТ rezultatus FA sergantiesiems, yra toksinis kondicionavimo poveikis ir transplantato atmetimas. Pagrindinis mieloabliacinio kondicionavimo pavojus ankstyvame potransplantaciniame periode – ūmios TPŠL išsivystymas, kuriai būdingas imuninis-toksinis įvairių audinių, daugiausia epitelinių ląstelių, pažeidimas (Jacobsohn D.A. ir Vogelsang G.B., 2007; Sun Y. ir kt., 2007). Dėl FA ląstelėms būdingo DNR defektų atstatymo sutrikimo ūmi TPŠL šiems ligoniams yra ypač pavojinga – ji gali sukelti negrįžtamą audinių pažeidimą ir tuo pačiu lemti nepalankią transplantacijos išėitį, o taip pat padidinti vėžio išsivystymo riziką vėlyvame potransplantaciniame periode (Guardiola P. ir kt., 2004). Kita vertus, nuo 6 iki 22 proc. FA sergančiųjų išsivysto transplantato atmetimas (Motwani J. ir kt., 2005; Locatelli F. ir kt., 2007). Taigi, abu minėti veiksniai lėmė alternatyvaus kondicionavimo, kuris būtų minimaliai toksiškas ir sukeltų pakankamą imunosupresiją, paieškas. Fludarabinas, pasižymintis vyraujančiu imunosupresiniu poveikiu (Locatelli F., 2006; Muranski P. ir kt., 2006), tapo patraukliu preparatu šiame kelyje.

Šiuo metu yra pakankamai daug duomenų apie fludarabino taikymą FA kondicionavimui. Literatūroje gana gausu publikacijų aprašančių įvairius fludarabino derinius su torakoabdominaline apšvita ar kitais chemopreparatais, po kurių pacientams pasiekiamas stabilus transplantato prigijimas (Aker M. ir kt., 1999; Boulad F. ir kt., 2000; Elhasid R. ir kt., 2000; McCloy M. ir kt., 2001; Rossi G. ir kt., 2003; George B. ir kt., 2005; Tan P.L. ir kt., 2006). Tačiau visos išvardintos publikacijos aprašo daugiausia pavienius klinikinius atvejus. Didesnių studijų, tyrinėjančių šį gydymo metodą, iš tiesų yra nedaug. Didžiausias paskelbtas tyrimas apibendrina 13-os metų JAV rezultatus,

persodinant tapataus negiminingo donoro KKL 98 FA recipientams, kuriems skirtas kondicionavimas su fludarabinu (n = 46) arba be jo (n = 52) (Wagner J.E. ir kt., 2007). Kita publikacija aprašo 16-os metų italų mokslininkų patirtį, gydant 64 FA sergančius pacientus, daliai kurių (54 proc.) skirtas kondicionavimas fludarabino pagrindu (Locatelli F. ir kt., 2007). MacMillan, išanalizavusi 23 ligonių potransplantacinę eigą teigia, kad standartinio kondicionavimo torakoabdominaline apšvita ir ciklofosfamidų papildymas fludarabinu sumažina transplantato atmetimo riziką (MacMillan M.L. ir kt., 2001). Motwani ir Bitan aprašo savo patirtį, skiriant fludarabiną FA recipientams kartu su ciklofosfamidų (Motwani J. ir kt., 2005; Bitan M. ir kt., 2006). Kiekvienoje studijoje tirta po 7 ligonius. Keturiems ligoniams fludarabino ir ciklofosfamido derinį skyrė britų mokslininkai (de la Fuente J. ir kt., 2003). Mūsų tyrime naudotam identišką kondicionavimą fludarabinu ir busulfanu radome aprašyta tik dviejose publikacijose: šie preparatai skirti 2 iš 7 Izraelio mokslininkų gydytiems ligoniams (Bitan M. ir kt., 2006). Maschan aprašė keturių ligonių potransplantacinę eigą, skiriant šį parengiamąjį režimą (Maschan A.A. ir kt., 2004). Taigi, mūsų tyrime aprašyta 22 ligonių grupė šiai dienai yra didžiausia FA tiriamųjų grupė, kuriems skirtas kondicionavimas fludarabinu ir busulfanu.

Vertinant visiško DC ir MC radimo dažnį mūsų tyrime ir kituose moksliniuose darbuose, reikia turėti omenyje, kad kol kas radome tik vieną studiją, kuri tyrinėja chimerizmo kinetiką FA sergantiems ligoniams (Socié G. ir kt., 1993). Joje prancūzų autoriai, analizavę chimerizmą periferinio kraujo polimorfonukleuose ir bendroje limfocitų frakcijoje, rado visišką DC 13/19 (68 proc.) tirtų vaikų, o 6/19 (32 proc.) aptiktas tranzitorinis MC, kuris 5/6 ligonių palaiptai virto visišku DC. Šiame tyrime, priešingai negu mūsų nagrinėtiems pacientams, daugumai ligonių po transplantacijos išsivystė visiškas DC (mūsų duomenimis visiškas DC rastas 45,5 proc. (10/22) vaikų, MC – 54,5 proc. (12/22) pacientų). Lyginant abiejų tyrimų rezultatus, reikia atsižvelgti į tai, kad Socié ir kt. visus ligonius gydė torakoabdominaline kūno apšvita ir ciklofosfamidų. Be to, iš esmės skyrėsi tyrimų atlikimo intensyvumas

– savo tyrime vadovavomės Bader paskelbta chimerizmo tyrimo metodika, vėliau patvirtinta ir kitų tyrėjų (Lee K.H. ir kt., 2003; Lion T. ir Muller-Béat N., 2003), pagal kuria intensyvus chimerizmo sekimas PKL (vieną kartą per savaitę iki 200 dienos po KKL) lemia teisingą tiriamojo chimerizmo kinetikos interpretaciją (Bader P. ir kt., 1997). Tuo tarpu prancūzų mokslininkai tyrė chimerizmą kur kas rečiau (šešiams ligoniams chimerizmas ištirtas tik vieną kartą), nesivadovaudami kokia nors griežtai nustatyta schema. Didesni laiko tarpai tarp kraujo mėginių ėmimo galėjo sąlygoti tai, kad MC buvo aptiktas ne visiems ligoniams.

Nagrinėjant chimerizmo kinetiką PKL ir ALP, nustatėme tris chimerizmo kinetikos pavyzdžius: pirmasis – FA sergantiems vaikams visiškai DC buvo aptinkamas tiek PKL, tiek visose kitose tirtose ląstelių populiacijose. Skirtingai nuo ŪLL ar ADL tiriamųjų, jiems nė vienoje tirtose ląstelių populiacijose nebuvo stebima liekamoji recipiento kraujodara. Šie rezultatai dar kartą patvirtina ypatingą FA ląstelių jautrumą DNR veikiantiems citostatikams, kurie net sumažintomis dozėmis sunaikina visą recipiento kraujodarą. Antra vertus, daugumai ligonių, kuriems PKL ir ALP išsivystė visiškai DC (9/10), persodintos periferinio kraujo KKL. Savo tyrime nustatėme reikšmingą KKL šaltinio įtaką chimerizmui – MC išsivystymo tikimybė yra 20 kartų (95 proc. PI 2,29-175,04,  $p = 0,007$ ) didesnė, jei persodinami kaulų čiulpai, negu periferinio kraujo KKL. Kaip žinia, persodinamo transplantato sudėtis tiesiogiai veikia chimerizmą T limfocituose – kuo didesnis persodinamų T limfocitų (CD4+, CD8+, CD3+/CD56+) skaičius, tuo didesnis donoro DNR procentas aptinkamas T limfocituose, o didesnis CD34+, CD14+ ir CD3–/CD56+ skaičius sąlygoja greitesnį visiškai DC išsivystymą CD3 populiacijoje (Baron F. ir kt., 2005b; Panse J.P. ir kt., 2005). Šios išvados padarytos, tiriant leukemija sergančius ligonius, kuriems skirtas sumažinto intensyvumo kondicionavimas. Galima daryti prielaidą, kad imuniniai mechanizmai turi reikšmės taip pat ir FA sergančiųjų chimerizmo kinetikai.

Antras chimerizmo kinetikos pavyzdys – didėjantis MC, susijęs su transplantato atmetimu. Analizuojant chimerizmo kinetiką, visiems keturiems

ligoniams, kuriems išsivystė transplantato atmetimas (4.2-2 lentelė, 62 p.), donoro DNR pirmiausiai sumažėjo atskirose ląstelių frakcijose (4.2-2 pav., 63 p.). Palyginę didėjančio ir stabilaus MC ryšį su transplantato atmetimu nustatėme, kad būtent didėjantis, bet ne stabilus, MC bendroje leukocitų frakcijoje reikšmingai susijęs su transplantato atmetimu: transplantato atmetimas išsivystė 4 iš 5 ligonių, kuriems stebėtas didėjantis MC, tuo tarpu visiems ligoniams, kurių PKL recipientų frakcija ilgą laiką išliko tame pačiame lygyje transplantato prigijimas buvo stabilus ( $p = 0,01$ ). Vienam vaikui (LIN 266) gresiantį transplantato atmetimą pavyko sustabdyti, paskyrus specifinį anti-CD3 antikūną muromonabą (OKT3<sup>®</sup>).

Mūsų tyrime aprašyta chimerizmo kinetika transplantato atmetimo atveju iš esmės sutampa su kitų autorių pastebėjimais – didėjančio MC ryšys su transplantato atmetimu nustatytas sergant aplazine anemija (Hoelle W. ir kt., 2004), kitomis nepiktybinėmis kraujo ligomis (Ozyurek E. ir kt., 2008), lėtine mieloidine leukemija, metabolinėmis kaupimo ligomis, mielodisplaziniu sindromu (Woodard P. ir kt., 2003). Lyginant chimerizmo kinetiką atskirose ląstelių populiacijose, kaip ir kiti autoriai (Horan J.T. ir kt., 2005; Masmis T.N. ir kt., 2008) pastebėjome, kad donoro DNR kiekis T limfocituose yra mažesnis, nei PKL. Skirtingai nuo kitų darbų mūsų duomenys pabrėžia donoro DNR frakcijos mažėjimo PKL prognostinę reikšmę transplantato atmetimo diagnostikai ir prevencijai – jei bendroje leukocitų frakcijoje MC išlieka stabilus (nepaisant dominuojančios recipientų frakcijos ALP), transplantatas stabiliai funkcionuoja. Kadangi mūsų tirtos frakcijos (T limfocitai, B limfocitai ir KKL) kiekybiškai sudaro mažesnę bendros leukocitų frakcijos dalį manome, kad chimerizmo tyrinėjimai mieloidinės eilės ląstelėse suteiktų naujų duomenų apie transplantato atmetimo vystymosi mechanizmą ir galimą jo prevenciją. Netiesioginių šios hipotezės patvirtinimų galima aptikti Baron atliktame tyrime, kuriame nustatyta, kad didesnis CD34 kiekis, kuris perpilamas recipientui kartu su transplantatu, mažina transplantato atmetimo riziką (Baron F. ir kt., 2005b). Verti dėmesio ir chimerizmo natūraliuose klieriuose tyrinėjimai transplantato atmetimui sergant FA, kadangi šios ląstelės įrodytos

esančios svarbios šiam procesui leukemijos atveju (Matthes-Martin S. ir kt., 2003; Miura Y. ir kt., 2006).

Trečias chimerizmo kinetikos pavyzdys yra stabilus MC, aptiktas bendroje leukocitų populiacijoje. Šis MC tipas nustatytas septyniems ligoniams (4.2-2 lentelė, 62 p.). Jų PKL recipientų frakcija buvo matoma visą stebėjimo laikotarpį, tačiau autologinės DNR dalis neviršijo 10 proc., o ALP ji svyravo nuo 0 iki 100 proc. (4.2-4 pav., 63 p.). Remiantis MC ALP, ypač T limfocituose, 6 iš 7 ligonių skirta profilaktinė imunoterapija galimo transplantato atmetimo prevencijai (4.2-2 lentelė, 62 p.): 5 iš 6 ligonių skirtas muromonabas (OKT3<sup>®</sup>), o vienam vaikui (LIN 161) perpilti donoro limfocitai. Vienam pacientui (LIN 263) neskirta jokia imunoterapija. Nė vienam šių ligonių neišsivystė transplantato atmetimas. Įdomu tai, kad laikui bėgant, donoro DNR dalis atskirose ląstelių frakcijose palaipsniui didėjo ir priartėjo prie PKL lygio praėjus 2 metams po KKL (4.2-5 pav., 64 p.).

Stabilus MC, randamas ligoniams sergantiems sunkia aplazine anemija ar kitomis nepiktybinėmis kraujo ligomis, kuris lieka matomas praėjus keleriems metams po transplantacijos, aprašomas ir kitų autorių (Amrolia P.J. ir kt., 2001; Walters M.C. ir kt., 2001; Hoelle W. ir kt., 2004; Hassan R. ir kt., 2004; Willasch A. ir kt., 2006b). Nedaugelis studijų, kurios pateikia duomenis apie FA sergančiųjų chimerizmo tyrimus taip pat randa stabilų MC leukocitų frakcijoje, kuris išlieka ilgą laiką po KKL, nesukeldamas transplantato atmetimo: Socié stebėjo MC iki 511 dienos po KKL, po kondicionavimo torakoabdominaline apšvita ir ciklofosfamidų (Socié G. ir kt., 1993). Motwani aprašė ilgalaikį stabilų 98 proc. donoro chimerizmą bendroje leukocitų populiacijoje vienam iš septynių fludarabinu ir ciklofosfamidų gydytų ligonių (Motwani J. ir kt., 2005). Duomenų apie chimerizmo tyrimus ALP FA sergantiesiems radome tik viename straipsnyje: Mital aprašė chimerizmo kinetiką po kondicionavimo torakoabdominaline apšvita ir ciklofosfamidų (Mital M.K. ir kt., 1999). Polimorfiniai DNR žymenys tirti PKL ir ALP: granulocituose, CD3 ir CD19 populiacijose. Tiriant minėtas ląsteles kartą per mėnesį, Mital rado MC T limfocituose, aptinkamą iki 2 metų po

transplantacijos. Tuo pačiu metu ligoniui stebėta užsitęsusi hematologinė rekonstitucija, kuri buvo susieta su MC CD3 populiacijoje. Reikia pažymėti, kad visiems septyniems mūsų tyrinėtiems ligoniams nepaisant ilgai išliekančio MC, kraujodara po KKL atsitatė laiku ir funkcionavo gerai visą stebėjimo laikotarpį (šie duomenys disertacijoje nepateikiami).

Nagrinęjant stabilaus MC kinetiką, galima būtų diskutuoti apie skirtos imunoterapijos vaidmenį chimerizmo pokyčiams. Kaip minėjome, penkiems ligoniams remiantis vyraujančia autologine frakcija T limfocituose, skirtas muromonabas (OKT3<sup>®</sup>) (4.2-2 lentelė, 62 p.). Po vieno šio preparato kurso T limfocituose stebėtas donoro DNR procentinės dalies padidėjimas, tačiau netrukus ji vėl sumažėjo, kol galiausiai pakilo savaime (4.2-4 pav., 63 p.). Yra kelios publikacijos, kurios pateikia muromonabą kaip efektyvų preparatą transplantato atmetimo profilaktikai ir gydymui. Yen aprašė sėkmingą vėlyvą transplantato atmetimo gydymą lėtine mieloidine leukemija sergančiam pacientui (Yen C.C. ir kt., 1997). Bader sugebėjo išvengti transplantato atmetimo ligoniui, sergančiam sunkia aplazine anemija, skirdamas OKT3<sup>®</sup> kartu su metilprednizolonu (Bader P. ir kt., 1995). Tokia pati taktika vėliau buvo panaudota dar šešiams pacientams, sergantiems piktybinėmis kraujo ligomis (n = 5) ir sunkia aplazine anemija (n = 1) (Schlegel P.G. ir kt., 2000). Šiame tyrime penkiems ligoniams pavyko pasiekti chimerizmo konversiją iš MC į visišką DC. Kita vertus, vienam iš disertacijoje tyrinėtų pacientų (LIN 263), kuriam neskirta jokia imunoterapija, stebėta tokia pati chimerizmo kinetika bei jo disociacija tarp PKL ir ALP: vyraujanti donoro DNR bendroje leukocitų populiacijoje ir dominuojanti autologinė DNR atskirose ląstelėse, kuri palaipsniui savaime sumažėjo. Visa tai įvertinus, sunku nusakyti tikrąjį OKT3<sup>®</sup> vaidmenį chimerizmo kinetikai. Šis preparatas yra žinomas savo galingu limfopeniniu poveikiu (kuris lėmė DNR pokyčius T limfocitų frakcijoje), dėl ko plačiai naudojamas KKL ir solidinių organų transplantacijoje, tačiau jis nėra selektyvus donoro ar recipiento limfocitams (Renders L. ir Valerius T., 2003). Laipsniškas donoro DNR kiekio didėjimas ALP greičiausiai sietinas su natūraliu įvairių hemopozės eilių prigijimu.



Panašią chimerizmo kinetiką aprašė Ozyurek, tyręs chimerizmą 24 nepiktybinėmis kraujo ligomis sergantiems vaikams bendroje leukocitų populiacijoje ir T limfocituose (Ozyurek E. ir kt., 2008).

Prieštransplantacinių veiksnių palyginimas ligoniams, turintiems visišką DC ir MC parodė, kad kaulų čiulpų aplazijos forma iki transplantacijos reikšmingai nesiskyrė abiejose grupėse ( $p = 0,141$ ; 4.2-3 lentelė, 66 p.). Mūsų analizuotų pacientų tarpe iš visų penkių ligonių, kuriems prieš KKLТ rasti piktybinės transformacijos požymiai kaulų čiulpuose (refrakterinė anemija su padidintu blastų skaičiumi (RAEB),  $n = 3$  ir ūmi mieloblastinė leukemija,  $n = 2$ ), tik vienam pacientui (LIN 137; 4.2-1 lentelė, 60 p.) kondicionavimas fludarabinu ir busulfanu buvo neveiksmingas – jo periferiniame kraujyje ir kaulų čiulpuose pirmomis savaitėmis po transplantacijos buvo teberandami blastai. Remisiją pavyko pasiekti, paskyrus citostatikus po KKLТ, tačiau tai neišgelbėjo šio paciento. Visiems kitiems ligoniams, skiriant šį kondicionavimą, pasiekta stabili remisija.

Gydant FA, supiktybėjimo požymiai laikomi blogu prognostiniu rodikliu – radus RAEB iki transplantacijos, transplanto prigijimas po įprastinio kondicionavimo torakoabdominaline apšvita ir ciklofosfamidų tesiekia 50 proc. (Ikushima S. ir kt., 1995). Papildžius šį kondicionavimą fludarabinu, RAEB išlieka nepalankiu išgyvenamumo prognostiniu rodikliu (MacMillan M.L. ir kt., 2001). Aprašyti pavieniai klinikiniai atvejai, kai ligoniams pavyko pasiekti ilgalaikę remisiją, gydant busulfanu ir ciklofosfamidų (Maschan A.A. ir kt., 1997) ar fludarabinu ir ciklofosfamidų (McCloy M. ir kt., 2000; de la Fuente J. ir kt., 2003). Net ir pavykus pasiekti remisiją, šiems ligoniams išlieka padidėjusi fatalios TPŠL rizika (Guardiola P. ir kt., 2003). Norint sumažinti blastų skaičių, šiems pacientams dar prieš transplantaciją dažnai skiriama chemoterapija. Tyrimuose su leukemija sergančiais ligoniais įrodyta, kad prieštransplantacinė chemoterapija yra nepalankios KKLТ išėities veiksnys (Carvalho C. ir kt., 2004). Šią sąsają paaiškina kito tyrimo rezultatai – tiriant leukemija sergančiuosius nustatyta, kad pacientų, kuriems iki KKLТ buvo skiriama chemoterapija, donoro chimerizmas T limfocituose, granulocituose ir

monocituose buvo didesnis, lyginant su tais, kurie nebuvo gydyti citostatikais (Baron F. ir kt., 2004).

Palyginę abi chimerizmo grupes, radome reikšmingą skirtumą, tarp donoro ir KKL šaltinio. DC grupėje tapataus negiminingo donoro KKL buvo persodintos reikšmingai dažniau, nei MC grupėje (atitinkamai 9/10 ligonių, palyginus su 5/12,  $p = 0,026$ ). Kaulų čiulpai pacientams, kuriems išsivystė visiškas DC, buvo persodinti reikšmingai rečiau (2/10 vaikų), nei tiems, kuriems po KKL rastas MC (10/12) ( $p = 0,008$ ). Norėdami įvertinti ar tapataus arba netapataus donoro buvimas ir dažnai nuo to priklausantis KKL šaltinio pasirinkimas nėra tarpusavyje susiję, apskaičiavome abiejų veiksnių koreliaciją, kuri pasirodė esanti nereikšminga ( $p = 0,163$ ). Kaip jau minėjome aukščiau (101 p.), atlikę vienaveiksmę logistinę regresiją (4.2-1 lentelė, 66 p.), nustatėme reikšmingą KKL šaltinio įtaką chimerizmui – MC išsivystymo tikimybė yra 20 kartų didesnė (95 proc. PI 2,29-175,04;  $p = 0,007$ ), jei persodinami kaulų čiulpai, nei persodinus periferinio kraujo KKL. Apžvelgus literatūros duomenis, kol kas neapvyko rasti studijų, kurios tyrinėtų donoro ar KKL šaltinio įtaką chimerizmui FA pacientams. Italų studijoje, kurioje tirti 64 FA sergantieji, nustatyta reikšmingai geresnis bendras išgyvenamumas, jei persodinami giminingo identiško donoro KKL (Locatelli F. ir kt., 2007). Tačiau šis tyrimas neanalizuoja ligonių chimerizmo. Boelens išnagrino KKL rezultatus 146 Hurlerio sindromu sergantiems recipientams (Boelens J.J. ir kt., 2007). Šiame tyrime jis nustatė, kad visiškas DC vystosi 7,14 kartų (95 proc. PI 0,91-52,82;  $p = 0,062$ ) dažniau, jei transplantacijai naudojamas virkštelės kraujas, palyginus su jungtine kaulų čiulpų ir periferinio kraujo KKL grupe. Tiriant leukemija sergančius pacientus po sumažinto intensyvumo kondicionavimo, donoro įtakos chimerizmui nenustatyta (Baron F. ir kt., 2004). KKL šaltinio įtaka chimerizmui, sergant FA mūsų žiniomis taip pat dar nebuvo tyrinėta. Žinios apie KKL šaltinio ryšį su chimerizmu po sumažinto intensyvumo kondicionavimo gautos tyrinėjant leukemija sergančius recipientus. Persodinamo transplantato, surinkto iš periferinio kraujo, sudėtis tiesiogiai įtakoja chimerizmo kinetiką T limfocituose (žr. 101 p.) (Baron F. ir

kt., 2005b; Panse J.P. ir kt., 2005). Panašu, kad pakankamas T limfocitų kiekis transplantate turi reikšmės chimerizmui po KKLТ (Rodriguez-Luaces M. ir kt., 2004). Tačiau kol kas neradome persodinamų kaulų čiulpų ir periferinio kraujo KKL lyginamosios analizės su chimerizmo kinetika.

Visiems vaikams, kuriems išsivystė visiškas DC (10/10), buvo skirtas kondicionavimas fludarabinu ir busulfanu, tuo tarpu 3 iš 12 pacientų, kuriems PKL rastas MC, skirtas vien fludarabinas ( $p = 0,221$ ). Reikia pažymėti, kad dviem iš šių trijų pacientų vien fludarabino nepakako tam, kad galutinai sunaikintų recipiento imuninę sistemą, todėl jiems išsivystė transplantato atmetimas. Moksliniai darbai, kurie tyrinėja kondicionavimo įtaką KKLТ rezultatams, paprastai nagrinėja jo įtaką bendram išgyvenamumui. Keli moksliniai tyrimai įrodė, kad skiriant fludarabiną bendras išgyvenamumas yra reikšmingai geresnis, lyginant su kondicionavimu be fludarabino (de Medeiros C.R. ir kt., 2006; Locatelli F. ir kt., 2007; Wagner J.E. ir kt., 2007). Tačiau nė vienas šių ar kitų tyrimų netyrinėjo kondicionavimo įtakos chimerizmui.

Vertinant TPŠL dažnį abiejose chimerizmo grupėse nustatėme, kad tiek ūmios, tiek lėtinės TPŠL požymių pasireiškimas reikšmingai skyrėsi tarp abiejų chimerizmo grupių (atitinkamai  $p = 0,031$  ir  $p = 0,026$ ). Atlikus tikslią tikimybių palyginimo analizę, reikšmingas skirtumas nustatytas daugumai TPŠL sunkumo laipsnių (4.2-3 lentelė, 66 p.). Tai, kad TPŠL vystosi kur kas dažniau ligoniams, turintiems visišką DC, ypač jei visiškas DC pasiekiamas T limfocituose patvirtina ir kiti tyrimai (Antin J.H. ir kt., 2001; Amrolia P.J. ir kt., 2001; Mattsson J. ir kt., 2001b; Jaksch M. ir kt., 2005; Alimoghaddam K. ir kt., 2006). Daugiausia šiose publikacijose tyrinėjami leukemija arba nepiktybinėmis kraujo ligomis (bet ne FA) sergantys ligoniai. Įdomu, kad vienintelis tyrimas, kuris tyrinėja chimerizmą FA sergantiems ligoniams, nerado ryšio tarp chimerizmo ir TPŠL (Socié G. ir kt., 1993). Prieštarigus rezultatus galima būtų sieti su aukščiau aptartais tyrimo metodikos skirtumais, dėl kurių daliai ligonių MC galėjo likti nenustatytas (žr. 100-1 p.).

Palyginus ligonius su visišku DC ir MC, neradome reikšmingo skirtumo tarp transplantato atmetimo dažnio ( $p = 0,096$ ). Tačiau įvertinus chimerizmo

kinetiką, paaiškėjo jos tamprus ryšys su transplantato atmetimu (4.2-5 lentelė, 67 p.): transplantatas stabiliai funkcionavo visiems ligoniams, kuriems PKL nustatytas visiškas DC (n = 10) arba stabilus MC (n = 7), tuo tarpu transplantato atmetimas diagnozuotas 4 iš 5 vaikų, kuriems bendroje leukocitų populiacijoje aptiktas didėjantis MC (p = 0,001). Bendras transplantato atmetimo dažnis mūsų tyrime sudarė 18 proc. (4/22). Lyginant šį skaičių su kitomis studijomis, reikia atsižvelgti į tyrinėtų ligonių skaičių ir donorų pasiskirstymą. Mūsų tyrime analizavome 22 pacientus, kuriems buvo persodintos tiek giminingo (n = 8), iš jų dviejų neidentiškų, tiek negiminingo (n = 14) donoro KKL. Motwani, analizavęs 7 ligonius, diagnozavo transplantato atmetimą 22 proc. (2/7) recipientų (Motwani J. ir kt., 2005). Persodinant tapataus giminingo donoro KKL po kondicionavimo torakoabdominaline apšvita ir ciklofosfamidų, transplantato atmetimas vystosi 8 proc. FA sergančiųjų (Gluckman E. ir kt., 1995). Persodinant tapataus negiminingo donoro KKL, po tokio pat kondicionavimo transplantato atmetimas tikėtinas 19 proc. recipientų (Guardiola P. ir kt., 2000a). Visiems mūsų aprašytiems ligoniams, kuriems diagnozuotas transplantato atmetimas, KKL buvo persodintos pakartotinai iš to paties donoro (4.2-2 lentelė, 62 p.). Vienam jų (LIN 134) KKL atlikta tris kartus dėl antrą kartą išsivysčiusio transplantato atmetimo, pakeitus tapatą giminingą donorą į negiminingą. Iš keturių vaikų, du išgyveno (LIN 106 ir 217), o kiti du mirė dėl po pakartotinės transplantacijos išsivysčiusios lėtinės išplitusios TPŠL. Tokiu būdu bendras išgyvenamumas po antros KKL mūsų tyrime sudarė 50 proc. Tai yra didesnis, nei Guardiola, paskelbtas 30 proc. išgyvenamumas po antros transplantacijos, atliktos dėl transplantato atmetimo (Guardiola P. ir kt., 2000b), tačiau reikia turėti omenyje mažą disertacijoje analizuojamų pakartotinai persodintų pacientų skaičių.

Mirtingumas dėl toksinių komplikacijų reikšmingai nesiskyrė tarp abiejų chimerizmo grupių (p = 0,192). Neigiamų įvykių analizė parodė, kad pagrindinė mirties priežastis visišką DC leukocituose turintiems ligoniams buvo ūmi ar lėtinė TPŠL. MC grupėje mirė 3 ligoniai, dviem iš kurių

diagnozuota lėtinė išplitusi TPŠL po antros KKLТ, atliktos dėl transplantato atmetimo, o trečias ligonis (LIN 161, 4.2-2 lentelė, 62 p.) mirė dėl nekontroliuojamos citomegalovirusinės infekcijos. Reikia pažymėti, kad tai vienintelis miręs iš septynių ligonių, kuriems PKL aptiktas stabilus ilgalaikis MC. Ypatingas FA sergančiųjų jautrumas TPŠL sukeliams audinių pažeidimas pažymimas ir kitų autorių, kurie pabrėžia dažnai mirtiną TPŠL poveikį šiems ligoniams, o taip pat ir galimai sąlygotas atokias komplikacijas (Guardiola P. ir kt., 2004; Gluckman E. ir kt., 2008). Bendras mirtingumas dėl toksinių komplikacijų mūsų analizuotų pacientų tarpe sudarė 41 proc. (9/22). Wagner pažymi 24 proc. mirtingumą dėl toksinių komplikacijų, praėjus 100 dienų po KKLТ, persodinant tapataus negiminingo donoro KKL po kondicionavimo fludarabinu (Wagner J.E. ir kt., 2007). Lyginant šį skaičių su mūsų studijoje apskaičiuotu mirtingumu, reikia turėti omenyje, kad tik 1 iš 9 dėl toksinių komplikacijų mirusių ligonių mirė iki 100 dienos po KKLТ (4.2-1 lentelė, 60 p.).

Chimerizmo įtakos išgyvenamumo rodikliams analizė parodė, kad nei išgyvenamumas be neigiamo įvykio, nei bendras išgyvenamumas reikšmingai nesiskyrė tarp ligonių, turinčių visišką DC ar MC leukocitų frakcijoje (atitinkamai  $p = 0,885$  ir  $p = 0,127$ ; 4.2-6 pav., p.67). Nepavyko nustatyti ir reikšmingos chimerizmo ALP įtakos išgyvenamumo rodikliams (4.2-6 lentelė, 68 p.). Jau ne kartą minėta prancūzų mokslininkų studija, kuri tyrinėjo chimerizmą FA sergantiems vaikams, deja, neanalizuoja chimerizmo reikšmės išgyvenamumi po KKLТ (Socié G. ir kt., 1993). Todėl mūsų gautų duomenų santykis su kitų tyrėjų duomenimis iki šiol lieka neįvertinamas dėl tyrimų stokos. Reikia pažymėti, kad nepaisant to, kad savo tyrime neradome reikšmingos chimerizmo įtakos išgyvenamumo rodikliams, pastebėjome chimerizmo kinetikos svarbą transplantacijos rezultatams: išgyveno 6 iš 7 (86 proc.) ligonių, kuriems PKL laikėsi stabilus ilgalaikis MC, palyginus su 2 iš 5 (60 proc.) vaikų, kuriems rastas didėjantis MC ir su 4 iš 10 (40 proc.) pacientų, kuriems PKL ir visose kitose ląstelių populiacijose aptiktas visiškasis DC ( $p = 0,214$ ) (4.2-7 lentelė, 68 p.). Turint omenyje tai, kad mums pavyko

nustatyti reikšmingą KKL šaltinio įtaką chimerizmui po KKL, manome, kad šis radinys gali būti svarbus klinikinėje praktikoje, renkantis KKL šaltinį konkrečiam pacientui. Manome, kad chimerizmo kinetikos sekimas PKL ir ALP ir jo įtakos išgyvenamumui analizė verti tolimesnio mokslinio tyrinėjimo, tiriant didesnę ligonių skaičių.

### 5.3. ADRENOLEUKODISTROFIJA

Išanalizavus 21 ligonio, sergančio ALD chimerizmo kinetiką, nustatėme, kad skiriant kondicionavimą fludarabinu ir busulfanu, po transplantacijos 66,7 proc. (14/21) vaikų PKL randamas visiškai DC, o 33,3 proc. (7/21) pacientų – MC. Mieloabliacinis busulfano ir ciklofosfamido derinys yra vienas populiariausių kondicionavimo režimų, kuris naudojamas, gydant vaikų leukemijas ir nepiktybines kraujo ligas (Gratwohl A., 2004, Cavazzana-Calvo M. ir le Deist F., 2004; Miano M. ir Dini G., 2004). Skirtingai nuo KKL sergant leukemijomis, kuomet alogeninės transplantacijos efektyvumas grindžiamas ne tik naviko ląsteles naikinančiu kondicionavimo poveikiu, bet ir imuniniu transplantato prieš leukemiją efektu, kuris savo ruožtu neatsiejamas nuo TPŠL (Petersen S.L., 2007; Alyea E.P., 2008), persodinant KKL nepiktybinėmis kraujo ligomis sergantiems pacientams, TPŠL yra tik transplantacijos pašalinio imuninio-toksinio poveikio išraiška, kuri šiems pacientams yra nepageidaujama. Sergant medžiagų apykaitos sutrikimais, kuomet pažeidžiama centrinė nervų sistema (kaip ir ALD atveju), TPŠL gali sąlygoti ne tik mirtingumą dėl toksinių komplikacijų, bet taip pat susilpninti intelektą po KKL (Steward C.G., 2004). Siekiant sumažinti toksinį transplantacijos poveikį, mėginama skirti sumažinto intensyvumo kondicionavimą (Resnick I.B. ir kt., 2005; Shenoy S. ir kt., 2005; Hansen M.D. ir kt., 2008; Meuleman N. ir kt., 2008). Tačiau tai savo ruožtu didina transplantato atmetimo riziką (Boelens J.J. ir kt., 2007; Ozyurek E. ir kt., 2008).

Disertacijoje pateikta ALD sergančiųjų chimerizmo analizė, mūsų žiniomis, yra vienintelis tyrimas, nagrinėjantis chimerizmo pokyčius, sergant šia itin reta liga. Šioje ligonių grupėje chimerizmo kinetikos analizė išryškino du chimerizmo kinetikos tipus. Pirmas tipas – tai visiškai DC, randamas PKL ir tuo pat metu ALP aptinkamas MC. Labai įdomus radinys yra tai, kad ALD ir ŪLL sergančiųjų šis chimerizmo kinetikos pavyzdys iš esmės sutapo – esant visiškai DC leukocituose, ALD ligoniams kaip ir ŪLL recipientams, T limfocituose recipiento DNR rasta 7,4 proc. ligonių, B limfocituose – 15,4 proc., o KKL – 71,4 proc. vaikų. Kaip ir leukemijos atveju autologinė frakcija CD34 populiacijoje galutinai išnyko tik praėjus dvejiems metams po KKL (4.3-1 pav., 71 p.). Šie radiniai iš esmės skyrėsi nuo chimerizmo pokyčių, aptiktų, tiriant FA recipientus, kuriems tiek PKL, tiek visose kitose tirtose ALP rasta vien donorų DNR. Šie rezultatai byloja apie pagrindinės ligos svarbą chimerizmo kinetikai. Šis aspektas yra minimas kai kurių autorių, tyrusių chimerizmo kinetiką leukemija sergantiems recipientams (Baron F. ir kt., 2004; Mohty M. ir kt., 2007). Pritaikęs tikslią statistinę analizę, tame pačiame tyrime Baron nustatė, kad ne leukemijos tipas, o prieš transplantaciją skirtos chemoterapijos intensyvumas lemia chimerizmo kinetiką, kas taip pat buvo patvirtinta ir Carvallo atliktoje studijoje (Carvallo C. ir kt., 2003). Disertacijoje analizuojamos skirtingos recipientų grupės – piktybinėmis ir nepiktybinėmis kraujo ligomis sergantys vaikai, kurių patogenezė, gydymas iki KKL ir transplantacijos principai iš esmės skiriasi – suteikia naujų duomenų šiai diskusijai. Tas faktas, kad ŪLL ir ALD ligonių (kurie negydomi chemoterapija) chimerizmo kinetika ALP, esant visiškai DC leukocituose yra labai panaši, verčia dar kartą susimastyti apie pagrindinės ligos vaidmenį chimerizmo kinetikai. Tai, kad sergant FA (kurios patogenezės pagrindą sudaro genetinis DNR reparacijos defektas, lemiantis FA ląstelių chromosomų nestabilumą, kuris savo ruožtu sąlygoja daugybines organų anomalijas, progresuojančią kaulų čiulpų aplaziją ir polinkį vėžiniams susirgimams (Tischkowitz M.D. ir Hodgson S.V., 2003; Levitus M. ir kt., 2004))

chimerizmo kinetika ženkliai skiriasi nuo ŪLL ir ALD ligonių, yra netiesioginis šios hipotezės patvirtinimas.

Antras chimerizmo kinetikos tipas – tai MC, randamas tiek PKL, tiek ALP. Penkiems iš septynių ligonių rastas stabilus ilgalaikis MC, o dviem pacientams pirmomis savaitėmis po KKLТ stebėtas mažėjantis MC, kuris palaipsniui perėjo į visišką DC (4.3-3 lentelė, 72 p.). Esant tiek stabiliam, tiek mažėjančiam MC, chimerizmo kinetika PKL ir ALP buvo lygiagreti. Esant stabiliam ilgalaikiam MC (4.3-2 pav., 73 p.), skirtingai nuo FA recipientų, neradome disociacijos tarp donoro DNR procentinės dalies PKL ir ALP. Autologinė frakcija visose tirtose ląstelių populiacijose liko aptinkama praėjus 5 metams po KKLТ. Nė vienam iš šių pacientų nebuvo skirta jokia imunoterapija ir nė vienam jų neišsivystė transplantato atmetimas. Šis chimerizmo kinetikos tipas atitinka kitų autorių aprašytą stabilų ilgalaikį MC, kuriam esant transplantatas sėkmingai funkcionuoja. Po mieloabliacinio kondicionavimo busulfanu ir ciklofosfamidu toks chimerizmo tipas išsivystė 31 proc. pacientų, sergančių talasemija (Amrolia P.J. ir kt., 2001), taip pat jis randamas sergantiems sunkia aplazine anemija (Hoelle W. ir kt., 2004), pjautuvo pavidalo eritrocitų anemija (Walters M.C. ir kt., 2001; Bernaudin F. ir kt., 2007), Hurlerio sindromu (Boelens J.J. ir kt., 2007).

Mažėjantis MC greičiausiai buvo susijęs su uždelstu transplantato prigijimu (4.3-3 pav., 73 p.), aprašytu ir kitų autorių (Au W.Y. ir kt., 2003; Wan L.P. ir kt., 2006). Skirtingai nuo kai kurių studijų (Hoelle W. ir kt., 2004; Willasch A. ir kt., 2006b), tyrusių chimerizmą nepiktybinėmis kraujo ligomis sergantiems pacientams ir radusiems mažėjančią MC, savaime pereinantį į visišką DC, mūsų tirtiems pacientams chimerizmo konversijai pasiekti reikėjo sumažinti profilaktinę ciklosporino dozę arba visiškai ją nutraukti (4.3-3 lentelė, 72 p.). Kaip ir Taviл paskelbtu atveju, aprašiusiu talasemija sergantį pacientą (Taviл B. ir kt., 2006), ši taktika pasirodė esanti veiksminga, kadangi abiem pacientams visiškas DC pasiektas tiek PKL, tiek ALP.

Lyginant pacientų prieštransplantacinius rodiklius abiejose chimerizmo grupėse, neradome reikšmingo skirtumo tarp smegenų pažeidimo laipsnio ir



skirtingo chimerizmo (4.3-4 lentelė, 75 p.). Visos studijos, tyrinėjančios transplantacijos rezultatus ALD recipientams, vieningai skelbia, kad KKL išeitis priklauso nuo ligonių psichoneurologinės būklės iki KKL persodinimo (Shapiro E. ir kt., 2000; Baumann M. ir kt., 2003; Peters C. ir kt., 2004; Hudspeth M.P. ir Raymond G.V., 2007). Todėl buvo įdomu, ar skirtingą chimerizmą turintys recipientai skyrėsi centinės nervų sistemos pažeidimo lygiu. Tačiau Loes skalės vidurkių analizė neparodė reikšmingo skirtumo tarp abiejų grupių ( $p = 0,287$ ). Taip pat neradome skirtumo tarp donoro ir KKL šaltinio pasirinkimo visišką DC ir MC turintiems ligoniams (atitinkamai  $p = 1,0$  ir  $p = 0,098$ ). Paskutinėje ir kol kas didžiausioje studijoje, kurioje apibendrinta visos Europos patirtis, gydant 146 Hurlerio sindromu sergančius ligonius, rasta KKL šaltinio įtaka chimerizmui: visiškai DC aptiktas 91 proc. recipientų, kuriems persodintos virkštelės kraujo KKL ir 66 proc. ligonių, kuriems persodinti kaulų čiulpai ar periferinio kraujo KKL (Boelens J.J. ir kt., 2007). Panaudojus virkštelės kraują, tikimybė rasti visišką DC yra 7,14 kartus (95 proc. PI 0,91-52,82;  $p = 0,062$ ) didesnė, nei naudojant kitą KKL šaltinį. Mūsų tirtų pacientų tarpe virkštelės kraujo KKL persodintos tik vienam pacientui, todėl negalime tiesiogiai palyginti abiejų tyrimų rezultatų. Tai, kad KKL šaltinis iš tiesų turi reikšmės chimerizmui, patvirtina mūsų rezultatai, tiriant FA sergančiuosius (žr. aukščiau).

Skirtingai nuo leukemijos ar FA recipientų, sergant ALD antitimocitinis globulinas (ATG) skiriamas ne tik persodinant tapataus negiminingo donoro KKL, bet ir turint tapatą giminingą donorą (Shapiro E. ir kt., 2000; Peters C. ir kt., 2004; Martin P.L. ir kt., 2006). Tokiu būdu siekiama maksimaliai apsaugoti šiuos pacientus nuo žalingo TPŠL poveikio (Steward C.G., 2004), tuo pačiu nedidinant transplantato atmetimo rizikos. Mūsų analizuotų pacientų tarpe tik 2 iš 21 ligonio negavo ATG profilaktikos, 6 iš 21 vaikų skirtas ATG Merieux<sup>®</sup>, o likusiems 13 iš 21 – ATG Fresenius<sup>®</sup>. Išanalizavus šių preparatų ryšį su chimerizmu, reikšmingo skirtumo tarp abiejų grupių negauta ( $p = 0,172$ ). Lyginamoji minėtų preparatų studija, analizuojanti jų imunosupresinį efektyvumą, tyrė recipientus po inkstų transplantacijos (Norrby J. ir Olausson

M., 1997), tačiau KKL recipientams toks tyrimas nėra paskelbtas (Bacigalupo A., 2005). Du retrospektyvūs tyrimai palygino kitus dviejų gamintojų ATG preparatus (AGT Fresenius® ir ATG Sangstat-Genzyme®) leukemija sergantiems pacientams (Schleuning M. ir kt., 2004; Basara N. ir kt., 2005), kuriems įvertino lėtinės TPŠL išraišką, berecidyvį ir bendrą išgyvenamumą. Šių tyrimų rezultatai ganėtinai kontraversiški ir reikalauja prospektyvinio tyrimo. Be to, šiuose tyrimuose chimerizmas nebuvo analizuotas.

Lyginant TPŠL išraišką tarp abiejų chimerizmo grupių, nustatėme, kad ūmios TPŠL požymių nebuvimas reikšmingai skyrėsi tarp pacientų, turinčių visišką DC ir MC leukocitų frakcijoje – jokių TPŠL požymių neturėjo 4 iš 14 vaikų pirmoje grupėje, palyginus su 6 iš 7 antroje grupėje ( $p = 0,020$ ). Daugumai ligonių, turinčių visišką DC (10/14) diagnozota ūmi TPŠL, tuo tarpu persistuojant autologinei frakcijai PKL, ūmi TPŠL buvo diagnozuota tik vienam berniukui iš septynių, nors šių dažnių patikrinimas statistiniais metodais neparodė reikšmingo skirtumo. Lyginant lėtinės TPŠL išraišką, reikšmingo skirtumo taip pat negauta (4.3-4 lentelė, 75 p.). Didesnis ūmios TPŠL dažnis, esant visiškam DC leukocituose, rastas ir kituose tyrimuose, kurie nagrinėjo chimerizmą nepiktybinėmis kraujo ligomis sergantiems pacientams (Jaing T.H. ir kt., 2005; Willasch A. ir kt., 2006b). Tai paaiškinama greitesniu T limfocitų prigijimu, kuris lemia imuninį ūmios TPŠL komponentą (Mattsson J. ir kt., 2001b; Jaksch M. ir kt., 2005). Skirtumo tarp lėtinės TPŠL požymių nebuvimas yra įdomus ir galimai yra susijęs su aukščiau aptarta specifine TPŠL profilaktika ATG. Mokslinių tyrimų duomenimis ATG ypač svarbus lėtinės TPŠL ir jos padarinių prevencijai (Duggan P. ir kt., 2002; Remberger M. ir kt., 2002; Bacigalupo A. ir kt., 2006). Studijoje, tyrusioje pjautuvo pavidalo anemijos recipientus, įrodyta, kad ATG skyrimas turi įtakos donoro chimerizmo procentinei išraiškai (Bernaudin F. ir kt., 2007). Tai paaiškintų lėtinės TPŠL sąlyginai švelnų pasireiškimą ligoniams, turintiems visišką DC leukocitų frakcijoje (8 vaikams nepastebėta jokių lėtinės TPŠL požymių, 5 diagnozuota ribota jos forma, o išplitusi – tik vienam berniukui) ir visišką jos nebuvimą, išliekant autologinei DNR PKL.

ALD progresavimas po transplantacijos reikšmingai nesiskyrė priklausomai nuo chimerizmo ( $p = 0,151$ ). Šioje disertacijoje detaliai nenagrinėjome specifinių neurologinių, psichinių ir intelekto pokyčių bei labai ilgų grandžių riebalų rūgščių koncentracijos kraujyje, kurie atspindi ALD būdingus pažeidimus (Moser H.W. ir kt., 2007). Visų išvardintų pakitimų ir chimerizmo sąsajos nagrinėjimas vertas atskiro mokslinio darbo. Mūsų tyrime liga progresavo 35 proc. (7/20) ligonių, iš kurių trims PKL nustatytas visiškas DC, o keturiems – MC. Vienam berniukui (LIN 234) ligos progresavimas po transplantacijos liko neįvertintas, nes vaikas mirė praėjus 251 dienai po transplantacijos (4.3-1 lentelė, 70 p.). Kaip žinia, mikroglijos pasikeitimas yra labai lėtas procesas – per metus tik apie 10 proc. recipientų ląstelių pakeičiama sveikomis donoro ląstelėmis (Steward C.G., 2004). Dėl šios priežasties psichoneurologinės būklės įvertinimas atliekamas ne anksčiau kaip po 18 mėn. po KKL. Lyginant su kitų tyrimų rezultatais, jungtinėje amerikiečių studijoje, kurioje išanalizuota 98 berniukų potransplantacinė eiga, bendras mirtingumas dėl ligos progresavimo sudarė 22 proc. Jis savo ruožtu skyrėsi priklausomai nuo donoro: turint tapatų giminingą donorą, liga progresavo 15 proc. recipientų, o persodinant netapataus giminingo donoro ląsteles – 29 proc. (Peters C. ir kt., 2004). Tačiau šioje studijoje nenagrinėtas ligonių chimerizmas ir jo galimas ryšys su ligos progresavimu. Mirtingumas dėl toksinių komplikacijų mūsų analizuotų recipientų tarpe sudarė 5 proc. – mirė tik vienas aukščiau minėtas ligonis (LIN 234) dėl III<sup>o</sup> ūmios TPŠL. Mirtingumas dėl toksinių komplikacijų nepriklausė nuo chimerizmo PKL ( $p = 1,0$ ). Toje pačioje amerikiečių studijoje šis rodiklis svyravo nuo 10 proc., persodinant tapataus negiminingo donoro KKL iki 14 proc., persodinant tapataus giminingo donoro KKL (Peters C. ir kt., 2004).

Vertinant išgyvenamumo rodiklius, neradome reikšmingo skirtumo tarp abiejų ligonių grupių (4.3-4 pav., 76 p.). ALD recipientams chimerizmas neturėjo įtakos išgyvenamumui be neigiamų įvykių, kuriuos apibrėžėme kaip mirtingumą dėl ligos progresavimo arba toksinių-infekcinių komplikacijų. Be neigiamo įvykio išgyveno 76,9 proc. (3/4) ligonių su DC, lyginant su 42,9

proc. (4/7) ligonių su MC ( $p = 0,087$ ). Bendras išgyvenamumas taip pat reikšmingai nesiskyrė: išgyveno 85,7 proc. (12/14) ligonių, kuriems rastas visiškas DC, palyginus su 71,4 proc. (5/7) su MC ( $p = 0,490$ ). Įvertinę chimerizmo ALP reikšmę transplantacijos rezultatams, neradome nė vienos iš analizuotų ląstelių populiacijos reikšmingos įtakos nei išgyvenamumui bei neigiamo įvykio, nei bendram išgyvenamumui (4.3-5 lentelė, 76 p.). Visos tirtos pacientų grupės bendras išgyvenamumas sudarė 81 proc. (17/21). Lyginant su kitų tyrimų rezultatais, bendras išgyvenamumas svyruoja nuo 53 proc. iki 64 proc. priklausomai nuo tapataus giminingo ar negiminingo donoro (Peters C. ir kt., 2004), persodinant virkštelės KKL – nuo 66,7 iki 72 proc. (Beam D. ir kt., 2007; Martin P.L. ir kt., 2006). Kaip jau ne kartą esame minėję, kol kas neradome mokslinių darbų, kurie nagrinėtų chimerizmą ALD recipientais ir kurių rezultatus galima būtų palyginti su disertacijoje pateiktais duomenimis norimame kontekste.

Apibendrinant chimerizmo tyrimo rezultatus ALD recipientams, reikia pabrėžti tai, kad nepaisant mieloabliacinio kondicionavimo, 33,3 proc. ligonių randamas MC, kuris išlieka PKL ir ALP iki kelerių metų po transplantacijos. Autologinė frakcija potencialiai gali bet kuriuo momentu didėti ir sąlygoti transplantato atmetimą. Šis argumentas verčia atsargiau vertinti sumažinto intensyvumo kondicionavimo taikymo galimybes ALD sergantiems ligoniams. Įvertinus labai mažą (5 proc.) mūsų tirtų pacientų mirtingumą dėl toksinių komplikacijų, galima daryti išvadą, kad alogeninė KKL yra pakankamai saugi procedūra ir turėtų būti pirmo pasirinkimo gydymo metodas ADL sergantiems vaikams.

#### **5.4. LIETUVOJE TRANSPLANTUOTŲ VAIKŲ CHIMERIZMO ANALIZĖ**

Disertacijoje pateiktos analizės tikslas – išanalizuoti chimerizmą Lietuvos vaikams, kuriems atlikta alogeninė KKL. Visiems pacientams ( $n = 19$ ) transplantacija atlikta Vilniaus universiteto vaikų ligoninės Onkohematologijos

centre. Daugumai ligonių (78,9 proc., 15/19) persodintos tapataus giminingo donoro (brolio ar sesers) kamieninės ląstelės. Nuo 2005 metų Lietuvoje atsiradus galimybei atlikti negiminingo donoro paiešką ir užtikrinti donorinių KKL atgabenimą į mūsų šalį, keturiems vaikams (21,1 proc.) buvo persodintos negiminingo donoro KKL. Visiems tiriamiesiems chimerizmas tirtas tik bendroje leukocitų populiacijoje (ALP išskyrimas Lietuvoje kol kas neatliekamas) pagal tą pačią metodiką, kaip ir vokiečių recipientams (žr. 3 skyrių, 38 p.).

Analizuoto pacientų kolektyvo ypatumas yra mišrus diagnozių spektras – tyrime dalyvavo tiek įvairiomis leukemijos formomis, tiek nepiktybinėmis kraujo ligomis sergantys vaikai (4.4-1 pav., 77 p.). Tokią tiriamųjų grupę pasirinkome, norėdami užtikrinti pakankamą ligonių skaičių, reikalingą informatyviai statistinei analizei atlikti. Kadangi bendras Lietuvos vaikams atliktų alogeninių transplantacijų skaičius yra palyginus nedidelis, negalėjome atrinkti homogeniškos pacientų grupės (pvz., per analizuojamą penkerių metų laikotarpį donoro KKL persodintos tik 6 ŪLL sergantiems vaikams, vienam FA pacientui, o ALD sergančiųjų nebuvo nė vieno).

Alogeninių transplantacijų aktyvumas atspindi bendrą nedidelį vaikų iki 18 metų skaičių tokioje mažoje šalyje kaip Lietuva. Lyginant su kitomis Europos šalimis, pavyzdžiui su Airija, kurioje gyventojų skaičius yra panašus (<http://www.census.gov>), Lietuvoje vaikams alogeninių transplantacijų atliekama žymiai mažiau (Gratwohl A. ir kt., 2007; Miano M. ir kt., 2007). Tai galima būtų paaiškinti ženkliu vaikų skaičiaus sumažėjimu, susijusiu su pasikeitusia politine situacija – Lietuvos statistikos departamento duomenimis Lietuvoje gyvenančių vaikų iki 18 metų sumažėjo nuo 824,4 tūkstančių 2002 m. iki 695,5 tūkstančių 2007 m. ([www.stat.gov.lt](http://www.stat.gov.lt)). Antras veiksnys, ribojęs šio gydymo metodo prieinamumą visiems potencialiems recipientams – aukščiau minėtas sąlygų nebuvimas persodinti negiminingo donoro KKL. Tokiai galimybei atsiradus, tapo įmanoma atlikti alogeninę KKL visiems pacientams, kuriems ji būtina. Šis faktas lėmė alogeninių transplantacijų skaičiaus augimą nuo 2005 metų (Ragelienė L. ir kt., 2006).

Retrospektyviai išanalizavus chimerizmo tyrimus bendroje leukocitų populiacijoje, 10 iš 19 (52,6 proc.) ligonių radome MC. Šis skaičius yra didesnis, nei MC dažnis, aptiktas studijose, tyrusiose tik leukemija sergančius pacientus – po mieloabliacinio kondicionavimo MC nustatytas nuo 33 iki 47 proc. ligonių (Bader P. ir kt., 1997, 1998, 2000; Dubovsky I. ir kt., 1999; Acquaviva C. ir kt., 2003). Moksliniai tyrimai, kurie nagrinėjo chimerizmą nepiktybinėmis kraujo ligomis sergantiems pacientams, rado kur kas didesnę MC procentą: šių ligonių tarpe MC dažnis svyravo nuo 31 iki 79 proc. (Amrolia P.J. ir kt., 2001; Willasch A. ir kt., 2006b, Ozyurek E. ir kt., 2008). Kaip žinia, sergant nepiktybinėmis kraujo ligomis KKLТ toksinėms ir infekcinėms komplikacijoms išvengti, pacientams dažniau skiriamas sumažinto intensyvumo kondicionavimas (Hoelle W. ir kt., 2004, Steiner M. ir kt., 2005; Resnick I.B. ir kt., 2005; Dogu F. ir kt., 2006), po kurio MC vystosi kur kas dažniau. Tai, kad mūsų analizuota pacientų visuma buvo mišri, t.y. vaikams buvo skirtas mieloabliacinis ir sumažinto intensyvumo kondicionavimas (4.4-1 lentelė, 78 p.), lėmė tarpinį MC skaičių, palyginus su išvardintomis studijomis.

Išnagrinėjus chimerizmo kinetiką, devynių ligonių, kuriems rastas visiškas donoro DC (4.4-1 lentelė, 78 p.), donoro DNR dalis visuose chimerizmo tyrimuose buvo ne mažesnė, nei 100 proc. Dešimties pacientų, kuriems aptiktas MC, jo kinetika pasirodė esanti dvejopa: 3 iš 10 vaikų rastas stabilus ilgalaikis MC, o likusiems septyniems – didėjantis MC (4.4-2 lentelė, 79 p.). Visi trys pacientai, kuriems PKL laikėsi stabilus ilgalaikis MC sirgo nepiktybinėmis kraujo ligomis: LIN 3 ir 28 sunkia aplazine anemija, o LIN 30 – FA. Sergant sunkia aplazine anemija, šis MC tipas aptiktas keliose klinikinėse studijose (Hill R.S. ir kt., 1986; Huss R. ir kt., 1996; Hoelle W. ir kt., 2004; Hassan R. ir kt., 2004). Negausiose publikacijose, kurios tyrinėja chimerizmą sergant FA, taip pat randama duomenų apie ilgalaikį stabilų MC, aptinkamą pavieniams recipientams (Socié G. ir kt., 1993; Mital M.K. ir kt., 1999; Motwani J. ir kt., 2005). Mūsų ištirta 22 FA pacientų grupė taip pat patvirtina šio MC egzistavimą (žr. aukščiau). Radus stabilų ilgalaikį MC, visi autoriai vienbalsiai pažymi palankią KKLТ prognozę, kadangi besilaikanti

autologinė frakcija apsaugo nuo sunkios TPŠL, tuo pačiu nesutrikdydama transplantato funkcijos. Panašią potransplantacinę eigą stebėjome ir Lietuvos vaikams: II<sup>o</sup> ūmi TPŠL ir ribota lėtinė TPŠL išsivystė tik vienam vaikui (LIN 3), tuo tarpu LIN 28 ir 30 neturėjo jokių TPŠL požymių (4.4-1 lentelė, 78 p.). Visiems trims ligoniams tęsiasi ilgalaikė remisija.

Didėjantis MC buvo aptiktas septyniems pacientams (4.4-2 lentelė, 79 p.). Du iš jų sirgo nepiktybinėmis kraujo ligomis: LIN 16 sunkia aplazine anemija, o LIN 32 – Langerhanso ląstelių histiocitoze. Sergant sunkia aplazine anemija palaipsniui didėjanti autologinė frakcija sąlygojo transplantato atmetimą. Ši grėsminga didėjančio MC pasekmė pastebėta daugelio autorių (Hill R.S. ir kt., 1986; Woodard P. ir kt., 2003; Ozyurek E. ir kt., 2008). Transplantato atmetimo prevencijai siūloma koreguoti imunoterapiją (Hoelle W. ir kt., 2004; Willasch A. ir kt., 2006b; Tavit B. ir kt., 2006), o diagnozavus transplantato atmetimą, kaip ir mūsų atveju, tenka pakartotinai persodinti KKL (Wolff S.N., 2002). Sergant Langerhanso ląstelių histiocitoze, toksinėms KKLT komplikacijoms sumažinti arba išvengti mėginama skirti sumažinto intensyvumo kondicionavimą (Steiner M. ir kt., 2005). Kaip žinia, šie pacientai prieš transplantaciją gydomi kelerius metus, tame tarpe ir chemoterapija (Akkari V. ir kt., 2003), kuri pablogina transplantacijos rezultatus (Carvallo C. ir kt., 2004; Baron F. ir kt., 2004). Tačiau net skiriant tradicinį mieloabliacinį kondicionavimą, daliai ligonių išlieka ankstyvo ar vėlyvo transplantato atmetimo galimybė (Ouachée-Chardin M. ir kt., 2006). Kai kurių tyrimų duomenimis T limfocitų prigijimas turi lemiamą reikšmę stabiliam transplantato prigijimui sergant Langerhanso ląstelių histiocitoze (Steiner M. ir kt., 2007). Mūsų aprašytas ligonis, kuriam buvo skirtas sumažinto intensyvumo kondicionavimas, taip pat buvo kelerius metus gydomas prieš transplantaciją (Norkūnas M. ir Ragelienė L., 2008). Jo leukocituose aptikta autologinė frakcija sąlygojo transplantato neprigijimą po dviejų KKLT (4.4-3 pav., 80 p.).

Kitiems penkiems ligoniams (4.4-2 lentelė, 79 p.) didėjantis MC buvo susijęs su piktybinio klonu regeneracija (4.4-4 pav., 80 p.). Keturiems iš jų, mėginant pasiekti pakartotinę remisiją, skirta donoro limfocitų infuzija, tačiau

imunoterapija buvo neveiksminga ir visi keturi pacientai mirė dėl leukemijos progresavimo. Vienas pacientas (LIN 34) buvo gydomas chemoterapija, tyrimo duomenų vertinimo dieną jis vienintelis gyveno. Didėjančio MC ryšys su leukemijos recidyvu patvirtintas daugelio autorių (Ramirez M. ir kt., 1996; Bader P. ir kt., 1998; Barrios M. ir kt., 2003). Todėl donoro limfocitų infuzija pastaraisiais metais skiriama nelaukiant klinikinių–morfologinių recidyvo požymių remiantis vien chimerizmo tyrimais (Massenkeil G. ir kt., 2003; Bader P. ir kt., 2004; Yoshimi A. ir kt., 2005a; Lutz C. ir kt., 2008). Sergant ūmia leukemija, mūsų ir kitų autorių patirtis byloja, kad esant kliniškai ir morfologiškai išreikštam recidyvui, imunoterapija yra neveiksminga ir užtikrina daugiausiai laikiną ligos stabilizavimą (Collins J.R.H. ir kt., 2000; Vaitkevičienė G. ir kt., 2004; Yoshimi A. ir kt., 2005b).

Prieštransplantacinių veiksnių analizė (4.4-3 lentelė, 82 p.) parodė, kad pagrindinė liga ir kondicionavimo intensyvumas turėjo lemiamos reikšmės chimerizmui: MC dažnis reikšmingai skyrėsi tarp ligonių, sirgusių leukemija ir nepiktybinėmis kraujų ligomis ( $p = 0,033$ ), kuriems atitinkamai skirtas mieloabliacinis ir sumažinto intensyvumo kondicionavimas ( $p = 0,033$ ). Visiems penkiems gerybine kraujų liga sirgusiems vaikams išvystė MC. Didesnis MC dažnis šių ligonių tarpe aptiktas daugelio autorių ir siejamas būtent su mažesniu kondicionavimo intensyvumu (Amrolia P.J. ir kt., 2001; Willasch A. ir kt., 2006b; Dogu F. ir kt., 2006; Ozyurek E. ir kt., 2008).

Mūsų tyrime neradome reikšmingos donoro, KKL šaltinio ir perpilto KKL kiekio įtakos chimerizmui (atitinkamai  $p = 0,667$ ,  $p = 0,630$  ir  $p = 0,842$ ). Ištyręs leukemija sergančius pacientus, kuriems skirtas sumažinto intensyvumo kondicionavimas, Baron nerado reikšmingos donoro įtakos chimerizmui (Baron F. ir kt., 2005a). Moksliniuose tyrimuose, nagrinėjančiuose leukemija sergančius pacientus nustatyta, kad MC dažniau vystosi persodinant kaulų čiulpus, nei periferinio kraujų KKL (Nakao S. ir kt., 1999; Wiesneth M. ir kt., 1999). Išsami transplantato sudėties analizė parodė, kad periferinio kraujų aferezate esantis CD34+, CD4+, CD8+, CD14+, CD3–/CD56+, CD3+/CD56+ ląstelių kiekis įtakoja T limfocitų chimerizmą (Rodriguez-Luaces M. ir kt.,



2004; Panse J.P. ir kt., 2005; Baron F. ir kt., 2005b). Aukščiau minėtoje studijoje, tyrusioje Hurlerio sindromu sergančius pacientus, nusatyta, kad visiškai DC vystosi reikšmingai dažniau, persodinant virkštelės KKL, nei kaulų čiulpus ar periferinio kraujo KKL (Boelens J.J. ir kt., 2007). Disertacijoje pateikta chimerizmo analizė FA recipientams įrodė didesnę MC išsivystymo tikimybę, persodinant kaulų čiulpus, nei periferinio kraujo KKL. Didesnis perpilamų CD34 kiekis lemia greitesnę transplantato prigijimą ir didesnę donoro chimerizmą PKL ir T limfocituose (Carvallo C. ir kt., 2004; Panse J.P. ir kt., 2005; Baron F. ir kt., 2005b). Tai, kad Lietuvos pacientams neradome nei vieno iš šių rodiklių sąsajos su chimerizmu, galima būtų paaiškinti mišriu nagrinėjamų diagnozių spektru (4.4-1 pav., 77 p.). Taip pat Lietuvoje neturėjome galimybės tirti chimerizmą ALP.

Išanalizavę TPŠL ryšį su chimerizmu, neradome reikšmingo ūmios TPŠL požymių skirtumo tarp ligonių, turinčių visišką DC ir MC leukocituose. Paparastai ūmios TPŠL požymių intensyvumas koreliuoja su chimerizmu (Ramirez M. ir kt., 1996; Mattsson J. ir kt., 2001b; Jaksch M. ir kt., 2005; Jaing T.H. ir kt., 2005; Willasch A. ir kt., 2006b). Tačiau išliekanti autologinė frakcija ne visada apsaugo nuo ūmios TPŠL (Mattsson J. ir kt., 2001c). Tai pabrėžia toksinio TPŠL komponento, susijusio su audinių pažeidimu kondicionavimo metu, svarbą (Jacobsohn D.A. ir Vogelsang G.B., 2007). Tuo tarpu lėtinės TPŠL išraiška reikšmingai skyrėsi tarp visišką DC ir MC turinčių pacientų, kas patvirtinta ir kituose moksliniuose tyrimuose, tyrusiuose chimerizmo PKL ir T limfocituose įtaką TPŠL (Petersen S.L. ir kt., 2004; Baron F. ir kt., 2005b; Balon J. ir kt., 2005; Mohty M. ir kt., 2007). Panašu, kad imuniniai mechanizmai, susiję su stabiliu ląstelių, ypač limfocitų, prigijimu vaidina pagrindinį vaidmenį lėtinės TPŠL klinikai (Sánchez-García J. ir kt., 2006; Chu Y.W. ir Gress R.E., 2008).

Neigiamų įvykių analizė parodė, kad mirtingumas nuo toksinių komplikacijų reikšmingai susijęs su visišku DC leukocituose ( $p = 0,033$ ), tuo tarpu leukemijos recidyvas – su MC ( $p < 0,001$ ). Analizuojant transplantato atmetimo dažnį priklausomai nuo chimerizmo, reikšmingo skirtumo tarp abiejų

grupių neradome ( $p = 0,474$ ), tačiau abiem pacientams, kuriems transplantatas neprigijo, leukocituose rastas MC, tuo tarpu nė vienam vaikui, turėjusiam visišką DC, neišsivystė transplantato atmetimas. Tokia neigiamų įvykių priklausomybė nuo chimerizmo aprašyta ir kitose studijose, tyrusiose chimerizmą leukemija sergantiems ligoniams (Ramirez M. ir kt., 1996; Bader P. ir kt., 1997; Balon J. ir kt., 2005) ir nepiktybinėmis kraujo ligomis sergantiems recipientams (Hoelle W. ir kt., 2004; Ozyurek E. ir kt., 2008).

Atskirai analizuojant leukemija sergančių vaikų ( $n = 14$ ) transplantacijos rezultatus, nustatytas reikšmingai geresnis išgyvenamumas be recidyvo, kai periferiniame kraujyje randamas visiškas DC (4.4-5 A pav., 84 p.) – visiems 9 ligoniams su visišku DC tęsėsi remisija, tuo tarpu visiems 5 ligoniams, kuriems leukocituose buvo aptikta autologinė DNR, diagnozuotas leukemijos recidyvas ( $p = 0,002$ ). Turint 5 recidyvus iš 14 leukemija sergančių vaikų, bendra tikimybė išgyventi 3 metus be recidyvo mūsų ligoniams sudarė 64,3 proc. Kituose tyrimuose pateikiamas 3-jų metų išgyvenamumas be recidyvo svyruoja nuo 30 iki 54 proc. ŪLL sergantiems vaikams (Bader P. ir kt., 2004; Gaynon P.S., 2005), o sergant ūmia mieloblastine leukemija 2-jų metų išgyvenamumas be recidyvo sudaro 69 proc. (Trobaugh-Lotrario A.D. ir kt., 2005). Taigi, turint omenyje, kad analizavome skirtingomis leukemijos formomis sergančius vaikus, leukemijos recidyvo dažnis ir berecidivis išgyvenamumas atitinka kituose moksliniuose tyrimuose pateikiamus skaičius. Tai džiuginantis rezultatas, kadangi Lietuvoje kol kas yra neprieinamas kondicionavimas viso kūno apšvita, kuris įrodytas esąs efektyviausias vaikų ŪLL recidyvo prevencijai ir yra pirmo pasirinkimo paruošiamasis režimas šiai ligai gydyti (Bunin N. ir kt., 2003; Jamieson C.H. ir kt., 2003; Willemze A.J. ir kt., 2007).

Nagrinėjant išgyvenamumą be neigiamų įvykių, kurie apibrėžti kaip leukemijos recidyvas, transplantato atmetimas ir mirtingumas dėl toksinių komplikacijų, nei leukemija sergantiems vaikams ( $n = 14$ ) (4.4-5 B pav., 84 p.), nei visai tyrinėtai pacientų grupei ( $n = 19$ ) (4.4-6 A pav., 84 p.), reikšmingo skirtumo tarp abiejų chimerizmo grupių neradome (atitinkamai

$p = 0,109$  ir  $p = 0,435$ ). Tai lėmė vėlyvos infekcinės komplikacijos, susijusios su lėtine TPŠL, kurios pablogino visišką DC turinčių ligonių išgyvenamumo rezultatus. Lemiamą lėtinės TPŠL įtaką išgyvenamumui vėlyvame potransplantaciniame periode pabrėžia ir kitos studijos (Zecca M. ir kt., 2002; Lee S.J. ir kt., 2002; Goerner M. ir kt., 2002; Balon J. ir kt., 2005). Tos pačios priežastys sąlygojo ir reikšmingo skirtumo nebuvimą, lyginant bendrą išgyvenamumą po KKLT priklausomai nuo chimerizmo leukemija (4.4-5 C pav., 84 p.) ir kitomis kraujo ligomis sergantiems vaikams (4.4-6 B pav., 84 p.): atitinkamai  $p = 0,663$  ir  $p = 0,601$ .

Apibedrinant chimerizmo tyrinėjimus Lietuvos vaikams po alogeninės KKLT, galima teigti, kad tyrimo rezultatai iš esmės sutampa su kituose moksliniuose tyrimuose skelbtais duomenimis. Tuo remiantis galima daryti išvadą, kad dauguma Lietuvoje naudojamų transplantacijos procedūrų (gydomosios, tiriamosios, prevencinės) atitinka pasaulinius standartus (Ljungman P. ir kt., 2006). Rasti nesutapimai greičiausiai sietini su nedideliu tiriamųjų skaičiumi ir mišriu diagnozių spektru. Tolimesni chimerizmo tyrinėjimai Lietuvos pacientams, analizuojant didesnę ir labiau homogenišką pacientų kolektyvą, galėtų patvirtinti arba paneigti šią prielaidą.

## 6. IŠVADOS

1. Po mieloabliacinio kondicionavimo 74,4 proc. vaikų sergančių ŪLL ir 66,7 proc. sergančių ALD vystosi visišką DC. Nustatyta, kad esant visiškam DC leukocitų frakcijoje, visose tirtose ALP išlieka autologinė kraujodara. Tuo metu po sumažinto intensyvumo kondicionavimo, skirto FA recipientams, 45,5 proc. jų autologinės kraujodaros pėdsakų nerandama nei PKL, nei ALP.
2. Esant visiškam DC leukocitų frakcijoje, ŪLL ir ALD recipientų T ir B limfocituose autologinė frakcija pasirodė esanti tranzitorinė, o KKL populiacijoje mažėjantis MC buvo aptinkamas iki dvejų metų po transplantacijos. FA ir ALD recipientams vystosi stabilus ilgalaikis MC, išliekantis iki kelerių metų po KKL bendroje leukocitų populiacijoje ir ALP.
3. Sergant ŪLL, didėjantis MC leukocitų frakcijoje yra reikšmingai susijęs su leukemijos recidyvu, ypač su kaulų čiulpų recidyvu, o sergant FA – su transplantato atmetimu.
4. Sergantiems FA galimybė išsivystyti MC yra 20 kartų didesnė persodinus kaulų čiulpus, negu periferinio kraujo KKL.
5. ŪLL grupėje visišką DC bendroje leukocitų frakcijoje lemia reikšmingai geresnį išgyvenamumą be recidyvo ir be neigiamo įvykio, tačiau neturi įtakos bendram išgyvenamumui. FA recipientai, kuriems randamas stabilus ilgalaikis MC, linkę gyventi ilgiau. ALD recipientų išgyvenamumo rodikliai nepriklauso nuo chimerizmo PKL. Chimerizmas ALP neturėjo įtakos transplantacijos rezultatams nė vienoje tirtoje ligų grupėje.
6. Išanalizavus chimerizmą PKL Lietuvoje transplantuotiems vaikams, visišką DC rastas 47,4 proc. ligonių, MC – 52,6 proc. vaikų. Ligoniams su nepiktybinėmis kraujo ligomis stebėtas didėjantis ir stabilus MC, susijęs su nemieloabliaciniu kondicionavimu, o sergantiems leukemija rastas didėjantis MC, susijęs su leukemijos recidyvu. Chimerizmas neturėjo įtakos išgyvenamumui po transplantacijos.

## 7. PRAKTINĖ DARBO REIKŠMĖ

### 7.1 DARBO REZULTATŲ PRAKTINĖ REIKŠMĖ

Ištyrę chimerizmą PKL ir ALP trijose skirtingose ligų grupėse, nustatėme kad:

- tiriant chimerizmą ŪLL sergantiems vaikams po mieloabliacinio kondicionavimo, chimerizmo tyrimas ALP nėra pranašesnis, lyginant su PKL ankstyvai leukemijos recidyvo diagnostikai. ALP analizė geriau atspindi chimerizmo kinetiką tuo atveju, kai PKL randamas žemo lygio MC arba koreguojama imunoterapija. Taigi, sergant ŪLL rutininam chimerizmo sekimui nebūtina tirti ALP;
- sergant FA, chimerizmo tyrimas ALP tiksliau atspindi chimerizmo kinetiką ir padeda geriau atskirti ilgalaikį stabilų MC nuo didėjančio, kuriems būdinga skirtinga klinikinė eiga ir prognozė bei reikalaujantys skirtingos sekimo ir gydymo taktikos. Todėl sergant FA, chimerizmo tyrimas ALP yra būtinas;
- nepaisant mieloabliacinio kondicionavimo, daliai ALD pacientų (33,3 proc.) vystosi MC, kurio kinetiką geriau atspindi ALP analizė. Todėl šiems ligoniams reikia tirti ALP;
- sergant FA, stabilus ilgalaikis MC gali sąlygoti geresnį išgyvenamumą po transplantacijos. Nustatėme, kad KKL šaltinis turi įtakos chimerizmui: galimybė išsivystyti MC yra 20 kartų didesnė persodinus kaulų čiulpus, negu periferinio kraujo KKL. Todėl transplantuojant ligonius sergančius FA, rekomenduojama persodinti kaulų čiulpus, o ne periferinio kraujo KKL.

## **7.2 CHIMERIZMO TYRIMO REKOMENDACIJOS PO ALOGENINĖS KKL**

### **VAIKAMS**

1. Siekiant užtikrinti kokybišką ir visavertę chimerizmo analizę ligoniams po alogeninės KKL, Lietuvoje būtina įdiegti ALP išskyrimą.
2. ŪLL sergantiems vaikams po mieloabliacinio kondicionavimo rutininiam chimerizmo sekimui PKL analizė yra pakankamai informatyvi ir ALP tyrimas nėra būtinas. Radus žemo lygio MC PKL arba koreguojant imunoterapiją, tikslinga tirti ALP.
3. Skiriant sumažinto intensyvumo kondicionavimą piktybinėmis arba nepiktybinėmis kraujo ligomis sergantiems ligoniams, būtina tirti chimerizmą ALP.
4. Skiriant mieloabliacinį kondicionavimą nepiktybinėmis kraujo ligomis sergantiems pacientams, stabiliam ilgalaikiam MC sekti PKL tyrimas yra pakankamai informatyvus. Radus didėjantį arba mažėjantį MC, tikslinga tirti ALP.

## 8. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abraham R, Szer J, Bardy P, Grigg A. Early cyclosporine taper in high-risk sibling allogeneic bone marrow transplants. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20: 773-7.
2. Acquaviva C, Duval M, Mirebeau D, Bertin R, Cavé H. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Paris–Robert Debré experience. *Leukemia* 2003; 17: 241-6.
3. Adams KM, Nelson JL. Microchimerism: an investigative frontier in autoimmunity and transplantation. *JAMA* 2004; 291: 1127-31.
4. Aker M, Varadi G, Slavin S, Nagler A. Fludarabine-based protocol for human umbilical cord blood transplantation in children with Fanconi anemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 1999; 21: 237-9.
5. Akkari V, Donadieu J, Piguet C, Bordigoni P, Michel G, Blanche S et al.; French Langerhans Cell Study Group. Hematopoietic stem cell transplantation in patients with severe Langerhans cell histiocytosis and hematological dysfunction: experience of the French Langerhans Cell Study Group. *Bone Marrow Transplant*. 2003; 31: 1097-103.
6. Alimoghaddam K, Ghaffari H, Foroughi F, Chardouli B, Sanaat Z, Bahar B et al. Effects of chimerism on graft-versus-host disease, disease recurrence, and survival after HLA-identical marrow transplantation in Iran. *Arch Iran Med*. 2006; 9: 99-103.
7. Alizadeh M, Bernard M, Danic B, Dauriac C, Birebent B, Lapart C et al. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood* 2002; 99: 4618-25.
8. Al-Kasim FA, Thornley I, Rolland M, Lau W, Tsang R, Freedman MH et al. Single-centre experience with allogeneic bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukaemia in childhood: similar survival after matched-

- related and matched-unrelated donor transplants. *Br J Haematol* 2002; 116: 483-90.
9. Alter BP. Cancer in Fanconi Anemia, 1927-2001. *Cancer* 2003; 97: 425-40.
  10. Alyea EP. Modulating graft-versus-host disease to enhance the graft-versus-leukemia effect. *Best Pract Res Clin Haematol* 2008; 21: 239-50.
  11. Ambrasiene D, Popendikyte V, Mikalauskas R. Multiplex polymerase chain reaction (PCR) of short tandem repeats analysis of chimerism after allogeneic bone marrow transplantation. *Eur J Hum Genet* 2006; 14: 240.
  12. Amrolia PJ, Vulliamy T, Vassiliou G, Lawson S, Bryon J, Kaeda J et al. Analysis of chimaerism in thalassaemic children undergoing stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2001; 114: 219-25.
  13. Antin JH, Childs R, Filipovich AH, Giralt S, Mackinnon S, Spitzer T et al. Establishment of complete and mixed chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 tandem meetings. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7: 473-85.
  14. Au WY, Chan EC, Lie AK, Liang R, Leung AY, Ma SK et al. Poor engraftment after allogeneic bone marrow transplantation: role of chimerism analysis in treatment and outcome. *Ann Hematol* 2003; 82: 410-5.
  15. Auerbach AD, Wolman SR. Susceptibility of Fanconi's anemia fibroblasts to chromosome damage by carcinogens. *Nature* 1976; 261: 494-6.
  16. Auffermann-Gretzinger S, Eger L, Bornhäuser M, Schäkel K, Oelschlaegel U, Schaich M et al. Fast appearance of donor dendritic cells in human skin: dynamics of skin and blood dendritic cells after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Transplantation* 2006; 81: 866-73.
  17. Ayas M, Al-Jefri A, Al-Mahr M, Rifai S, Al-Seraihi A, Tbakhi A et al. Stem cell transplantation for patients with Fanconi anemia with low-dose cyclophosphamide and antithymocyte globulins without the use of radiation therapy. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35: 463-6.
  18. Bacigalupo A. Antilymphocyte/thymocyte globulin for graft versus host disease prophylaxis: efficacy and side effects. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35: 225-31.



19. Bacigalupo A, Lamparelli T, Barisione G, Bruzzi P, Guidi S, Alessandrino PE et al.; for the Gruppo Italiano Trapianti Midollo Osseo (GITMO). Thymoglobulin Prevents Chronic Graft-versus-Host Disease, Chronic Lung Dysfunction, and Late Transplant-Related Mortality: Long-Term Follow-Up of a Randomized Trial in Patients Undergoing Unrelated Donor Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 560-5.
20. Bader P, Klingebiel T, Klingel K, Foll J, Beck J, Handgretinger R et al. Remission of a lymphoproliferative disorder occurring after second BMT from an unrelated donor in a 5-year-old boy with severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16: 479-81.
21. Bader P, Hoelle W, Klingebiel T, Handgretinger R, Benda N, Schlegel PG et al. 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: 697-702.
22. Bader P, Beck J, Frey A, Schlegel PG, Hebarth H, Handgretinger R et al. 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: 487-95.
23. Bader P, Klingebiel T, Schaudt A, Theurer-Mainka U, Handgretinger R, Lang P et al. 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: 2079-86.
24. Bader P, Stoll K, Huber S, Gieselhart A, Handgretinger R, Niemeyer C et al. Characterization of lineage-specific chimerism in patients with acute leukemia and myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation before and after relapse. *Br J Hematol* 2000; 108: 761-8.
25. Bader P, Dückers G, Kreyenberg H, Hoelle W, Kerst G, Lang P et al. Monitoring of donor cell chimerism for the detection of relapse and early

- immunotherapeutic intervention in acute lymphoblastic leukemias. *Ann Hematol* 2002; 82: S25-7.
26. Bader P, Kreyenberg H, Hoelle W, Dueckers G, Handgretinger R, Lang P et al. 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: 1696-705.
  27. 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* 2005a; 35: 107-19.
  28. Bader P, Niemeyer C, Willasch A, Kreyenberg H, Strahm B, Kremens B, et al. Children with myelodysplastic syndrome (MDS) and increasing mixed chimaerism after allogeneic stem cell transplantation have a poor outcome which can be improved by pre-emptive immunotherapy. *Br J Haematol* 2005b; 128: 649-58.
  29. Bader P, Kreyenberg H, Henze GH, Eckert C, Reising M, Willasch A et al.; ALL-REZ BFM Study Group. Prognostic value of minimal residual disease quantification before allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: the ALL-REZ BFM Study Group. *J Clin Oncol* 2009; 27: 377-84.
  30. Balon J, Hałaburda K, Bieniaszewska M, Reichert M, Bieniaszewski L, Piekarska A et al. Early complete donor hematopoietic chimerism in peripheral blood indicates the risk of extensive graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35: 1083-8.
  31. Baron F, Schaaf-Lafontaine N, Humblet-Baron S, Meuris N, Castermans E, Baudoux E et al. T-cell reconstitution after unmanipulated, CD8-depleted or CD34-selected nonmyeloablative peripheral blood stem-cell transplantation. *Transplantation* 2003; 76: 1705-13.
  32. Baron F, Baker JE, Storb R, Gooley TA, Sandmaier BM, Maris MB et al. Kinetics of engraftment in patients with hematologic malignancies given

- allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *Blood* 2004; 104: 2254-62.
33. Baron F, Little MT, Storb R. Kinetics of engraftment following allogeneic hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity or nonmyeloablative conditioning. *Blood Rev* 2005a; 19: 153-64.
  34. Baron F, Maris MB, Storer BE, Sandmaier BM, Panse JP, Chauncey TR et al. High doses of transplanted CD34+ cells are associated with rapid T-cell engraftment and lessened risk of graft rejection, but not more graft-versus-host disease after nonmyeloablative conditioning and unrelated hematopoietic cell transplantation. *Leukemia* 2005b; 19: 822-8.
  35. Baron F, Storb R, Storer BE, Maris MB, Niederwieser D, Shizuru JA et al. Factors associated with outcomes in allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning after failed myeloablative hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol.* 2006; 24: 4150-7.
  36. Barrios M, Jiménez-Velasco A, Román-Gómez J, Madrigal ME, Castillejo JA, Torres A et al. Chimerism status is a useful predictor of relapse after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. *Haematologica* 2003; 88: 801-10.
  37. Barta A, Batai A, Kelemen E, Lengyel L, Remenyi P, Sipos A et al. Immunological importance of chimerism in transplantation: new conditioning protocol in BMT and the development of chimeric state. *Hum Immunol* 2000; 61: 101-10.
  38. Basara N, Baurmann H, Kolbe K, Yaman A, Labopin M, Burchardt A et al. Antithymocyte globulin for the prevention of graft-versus-host disease after unrelated hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: results from the multicenter German cooperative study group. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35: 1011-8.
  39. Baumann M, Korenke GC, Weddige-Diedrichs A, Wilichowski E, Hunneman DH, Wilken B et al. Haematopoietic stem cell transplantation in

- 12 patients with cerebral X-linked adrenoleukodystrophy. *Eur J Pediatr* 2003; 162: 6-14.
40. Beam D, Poe MD, Provenzale JM, Szabolcs P, Martin PL, Prasad V et al. Outcomes of unrelated umbilical cord blood transplantation for X-linked adrenoleukodystrophy. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13: 665-74.
  41. Beck O, Seidl C, Lehrnbecher T, Kreyenberg H, Schwabe D, Klingebiel T et al. Quantification of chimerism within peripheral blood, bone marrow and purified leukocyte subsets: comparison of singleplex and multiplex PCR amplification of short tandem repeat (STR) loci. *Eur J Haematol* 2006; 76: 237-44.
  42. Bernaudin F, Socie G, Kuentz M, Chevret S, Duval M, Bertrand Y et al.; SFGM-TC. Long-term results of related myeloablative stem-cell transplantation to cure sickle cell disease. *Blood* 2007; 110: 2749-56.
  43. Bertheas MF, Lafage M, Levy P, Blaise D, Stoppa AM, Viens P et al. Influence of mixed chimerism on the results of allogeneic bone marrow transplantation for leukemia. *Blood* 1991; 78: 3103-6.
  44. Bezman L, Moser AB, Raymond GV, Rinaldo P, Watkins PA, Smith KD et al. Adrenoleukodystrophy: incidence, new mutation rate, and results of extended family screening. *Ann Neurol* 2001; 49: 512-7.
  45. Bitan M, Or R, Shapira MY, Aker M, Resnick IB, Ackerstein A et al. Fludarabine-based reduced intensity conditioning for stem cell transplantation of Fanconi anemia patients from fully matched related and unrelated donors. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 712-8.
  46. Blau IW, Schmidt-Hieber M, Leschinger N, Göldner H, Knauf W, Hopfenmüller W et al., Engraftment kinetics and hematopoietic chimerism after reduced-intensity conditioning with fludarabine and treosulfan before allogeneic stem cell transplantation. *Ann Hematol* 2007; 86: 583-9..
  47. Boelens JJ, Wynn RF, O'Meara A, Veys P, Bertrand Y, Souillet G et al. Outcomes of hematopoietic stem cell transplantation for Hurler's syndrome in Europe: a risk factor analysis for graft failure. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40: 225-33.

48. Boulad F, Gillio A, Small TN, George D, Prasad V, Torok-Castanza J et al.. Stem cell transplantation for the treatment of Fanconi anaemia using a fludarabine-based cytoreductive regimen and T-cell-depleted related HLA-mismatched peripheral blood stem cell grafts. *Br J Haematol* 2000; 111: 1153-7.
49. Brunstein CG, Hirsch BA, Miller JS, McGlennen RC, Verfaillie CM, McGlave PB et al. Non-leukemic autologous reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation for Ph-positive chronic myelogenous leukemia: extended remission preceding eventual relapse. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26: 1173-7.
50. Bunin N, Aplenc R, Kamani N, Shaw K, Cnaan A, Simms S. Randomized trial of busulfan vs total body irradiation containing conditioning regimens for children with acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Blood and Marrow Transplant Consortium study. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32: 543-8.
51. Buño I, Nava P, Simón A, González-Rivera M, Jiménez JL, Balsalobre P et al. 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: 1373-9.
52. Butturini A, Gale RP, Verlander PC et al. Hematologica abnormalities in Fanconi anaemia: an international Fanconi anemia registry study. *Blood* 1994; 90: 105-10.
53. Carvallo C, Geller N, Kurlander R, Srinivasan R, Mena O, Igarashi T et al. Prior chemotherapy and allograft CD34+ dose impact donor engraftment following nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation in patients with solid tumors. *Blood*. 2004; 103: 1560-3.
54. Cavazzana-Calvo M, le Deist F. Stem cell transplantation in children. Severe combined immunodeficiency. In: Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Gratwohl A, Masszi T eds. *Haemopoietic stem cell transplantation*. Genoa: Forum Service Editore, 2004; 308-13.

55. Cazzaniga G, Biondi A. Molecular monitoring of childhood acute lymphoblastic leukemia using antigen receptor gene rearrangements and quantitative polymerase chain reaction technology. *Haematologica* 2005; 90: 382-90
56. Chao NJ, Snyder DS, Jain M, Wong RM, Niland JC, Negrin RS et al. Equivalence of 2 effective graft-versus-host disease prophylaxis regimens: results of a prospective double-blind randomized trial. *Biol Blood Marrow Transplant* 2000; 6: 254-61.
57. Chu YW, Gress RE. Murine models of chronic graft-versus-host disease: insights and unresolved issues. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14: 365-78.
58. Collins JRH, Goldstein S, Giralt S, Levine J, Porter D, Drobyski W et al. Donor leukocyte infusions in acute lymphocytic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26: 511-6.
59. Cutler C, Antin JH. Omission of day \_11 methotrexate after matched-related allogeneic peripheral blood stem cell transplantation does not increase the risk of graft-vs.-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; 8: 85.
60. Cutler C, Kim HT, Hochberg E, Ho V, Alyea E, Lee SJ et al. .Sirolimus and tacrolimus without methotrexate as graft-versus-host disease prophylaxis after matched related donor peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004; 10: 328-36.
61. Davies SM, Weisdorf DJ, Haake RJ, Kersey JH, McGlave PB, Ramsay NK et al. Second infusion of bone marrow for treatment of graft failure after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1994 Jul;14(1):73-7.
62. Deeg HJ, Socie G, Schoch G, Henry-Amar M, Witherspoon RP, Devergie A et al. Malignancies after marrow transplantation for aplastic anemia and fanconi anemia: a joint Seattle and Paris analysis of results in 700 patients. *Blood* 1996; 87: 386-92.
63. Dey BR, McAfee S, Colby C, Sackstein R, Saidman S, Tarbell N et al. Impact of prophylactic donor leukocyte infusions on mixed chimerism, graft-

- versus-host disease, and antitumor response in patients with advanced hematologic malignancies treated with nonmyeloablative conditioning and allogeneic bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; 9: 320-9.
64. Dickhut A, Schwerdtfeger R, Kuklick L, Ritter M, Thiede C, Neubauer A et al. Mesenchymal stem cells obtained after bone marrow transplantation or peripheral blood stem cell transplantation originate from host tissue. *Ann Hematol* 2005; 84: 722-7.
65. Dogu F, Kurtulus-Ulkuer M, Bilge Y, Bozdogan G, Ulkuer U, Malhatun E et al. Stable mixed chimerism after hematopoietic stem cell transplantation in Wiskott-Aldrich syndrome. *Pediatr Transplant* 2006; 10: 395-9.
66. Dubovsky I, Daxberger H, Fritsch G, Printz D, Peters C, Matthes S et al. Kinetics of chimerism during the early post-transplant period in pediatric patients with malignant and non-malignant disorders: implication for timely detection of engraftment, graft failure and rejection. *Leukemia* 1999; 13: 2060-9.
67. Dufour C, Rondelli R, Locatelli F et al. Stem cell transplantation from HLA-matched related donor for Fanconi's anaemia: a retrospective review of the multicentric Italian experience on behalf of Associazione Italiana di Ematologia ed Oncologia Pediatrica (AIEOP) – Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo (GITMO). *Br J Haematol* 2001; 112: 796-806.
68. Duggan P, Booth K, Chaudhry A, Stewart D, Ruether JD, Glück S et al.; Alberta Blood and Bone Marrow Transplant Program. Unrelated donor BMT recipients given pretransplant low-dose antithymocyte globulin have outcomes equivalent to matched sibling BMT: a matched pair analysis. *Bone Marrow Transplant* 2002; 30: 681-6.
69. Eapen M, Giralt SA, Horowitz MM, Klein JP, Wagner JE, Zhang MJ et al. Second transplant for acute and chronic leukemia relapsing after first HLA-identical sibling transplant. *Bone Marrow Transplant* 2004; 34: 721-7.

70. Eklund O, Dalianis T, Wester D, Winiarski J. Megakaryocyte chimerism after allogeneic stem cell transplantation in children. *Pediatr Transplant* 2003; 7: 31-7.
71. Elhasid R, Ben Arush MW, Katz T, Gan Y, Shechter Y, Sami I et al. Successful haploidentical bone marrow transplantation in Fanconi anemia. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26: 1221-3.
72. Elmaagacli AH, Beelen DW, Trenn G, Schmidt O, Nahler M, Schaefer UW. Induction of a graft-versus-leukemia reaction by cyclosporin A withdrawal as immunotherapy for leukemia relapsing after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 771-7.
73. Everaus H, Kaare A, Lehtmaa J. Bone marrow transplantation – organization and results in small country – Estonian experience. 3<sup>rd</sup> Baltic States Conference of Hematology. 11-13 April 2002. Vilnius, Lithuania; 11.
74. Faivre L, Guardiola P, Lewis C, Dokal I, Ebell W, Zatterale A et al. Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in Fanconi anemia. European Fanconi Anemia Research Group. *Blood* 2000; 96: 4064-70.
75. Fehse B, Chukhlovin A, Kühlcke K, Marinetz O, Vorwig O, Renges H et al. Real-time quantitative Y chromosome-specific PCR (QYCS-PCR) for monitoring hematopoietic chimerism after sex-mismatched allogeneic stem cell transplantation. *J Hematother Stem Cell Res* 2001; 10: 419-25.
76. Ford CE, Hamerton JL, Barnes DW, Loutit JF. Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature* 1956; 177: 452-4.
77. de la Fuente J, Reiss S, McCloy M, Vulliamy T, Roberts IA, Rahemtulla A et al. Non-TBI stem cell transplantation protocol for Fanconi anaemia using HLA-compatible sibling and unrelated donors. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32: 653-6.
78. Fujimaki K, Fujisawa S, Aotsuka N, Saito K, Kanamori H, Matsuzaki M et al. Feasibility of early tapering and discontinuation of cyclosporine to intensify the graft-versus-leukemia effect in patients with advanced hematologic neoplasms. *Rinsho Ketsueki* 2001; 42: 680-4.



79. Gassas A, Sung L, Saunders EF, Doyle J. Graft-versus-leukemia effect in hematopoietic stem cell transplantation for pediatric acute lymphoblastic leukemia: significantly lower relapse rate in unrelated transplantations. *Bone Marrow Transplant*. 2007; 40: 951-5.
80. Gatta G, Capocaccia R, Stiller C, Kaatsch P, Berrino F, Terenziani M; EUROCARE Working Group. Childhood cancer survival trends in Europe: a EUROCARE Working Group study. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3742-51.
81. Gaynon PS. Childhood acute lymphoblastic leukaemia and relapse. *Br J Haematol* 2005; 131: 579-87.
82. George B, Mathews V, Shaji RV, Srivastava V, Srivastava A, Chandy M. Fludarabine-based conditioning for allogeneic stem cell transplantation for multiply transfused patients with Fanconi's anemia. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35: 341-3.
83. Gineikiene E, Stoskus M, Griskevicius L. Single nucleotide polymorphism-based system improves the applicability of quantitative PCR for chimerism monitoring. *J Mol Diagn* 2009; 11: 66-74.
84. Giralt SA, Horowitz MM, Klein JP, Wagner JE, Zhang MJ et al. Second transplant for acute and chronic leukemia relapsing after first HLA-identical sibling transplant. *Bone Marrow Transplant* 2004; 34: 721-7.
85. Gluckman E, Devergie A, Dutreix J. Radiosensitivity in Fanconi anemia: application to the conditioning regimen for bone marrow transplantation. *Brit J Haematol* 1983; 54: 431-40.
86. Gluckman E, Auerbach AD, Horowitz MM, Sobocinski KA, Ash RC, Bortin MM et al. Bone marrow transplantation for Fanconi anemia. *Blood* 1995; 86: 2856-62.
87. Gluckman E, Rocha V, Ionescu I, Bierings M, Harris RE, Wagner J et al. Results of unrelated cord blood transplant in Fanconi anemia patients: risk factor analysis for engraftment and survival. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13: 1073-82.

88. Gluckman E, Wagner JE. Hematopoietic stem cell transplantation in childhood inherited bone marrow failure syndrome. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41: 127-32.
89. Goerner M, Gooley T, Flowers ME, Sullivan KM, Kiem HP, Sanders JE et al. Morbidity and mortality of chronic GVHD after hematopoietic stem cell transplantation from HLA-identical siblings for patients with aplastic or refractory anemias. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; 8: 47-56.
90. Good RA, Meuwissen HJ, Hong R, Gatti RA. Bone marrow transplantation: correction of immune deficit in lymphopenic immunologic deficiency and correction of an immunologically induced pancytopenia. *Trans Assoc Am Physicians* 1969; 82: 278-85.
91. Gorczyńska E, Turkiewicz D, Toporski J, Kalwak K, Rybka B, Ryczan R et al. 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: 211-7.
92. Goulden N, Bader P, Van Der Velden V, Moppett J, Schilham M, Masden HO et al. Minimal residual disease prior to stem cell transplant for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2003; 122: 24-9.
93. Gratwohl A. Principles of conditioning regimens. In: Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Gratwohl A, Masszi T eds. *Hematopoietic stem cell transplantation*. Genoa: Forum Service Editore, 2004; 91-104.
94. Gratwohl A, Brand R, Frassoni F, Rocha V, Niederwieser D, Reusser P et al.; Acute and Chronic Leukemia Working Parties; Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Cause of death after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time. *Bone Marrow Transplant* 2005; 36: 757-69.
95. Gratwohl A, Baldomero H, Frauendorfer K, Urbano-Ispizua A, Niederwieser D; Joint Accreditation Committee of the International Society

- for Cellular Therapy ISCT; European Group for Blood and Marrow Transplantation EBMT. Results of the EBMT activity survey 2005 on haematopoietic stem cell transplantation: focus on increasing use of unrelated donors. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39: 71-87.
96. Guardiola P, Pasquini R, Dokal I, Ortega JJ, van Weel-Sipman M, Marsh JC et al. Outcome of 69 allogeneic stem cell transplantations for Fanconi anemia using HLA-matched unrelated donors: a study on behalf of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* 2000a; 95: 422-9.
  97. Guardiola P, Kuentz M, Garban F, Blaise D, Reiffers J, Attal M et al. Second early allogeneic stem cell transplantations for graft failure in acute leukaemia, chronic myeloid leukaemia and aplastic anaemia. French Society of Bone Marrow Transplantation. *Br J Haematol* 2000b; 111: 292-302.
  98. Guardiola P, Kurre P, Vlad A, Cayuela JM, Espérou H, Devergie A et al. Effective graft-versus-leukaemia effect after allogeneic stem cell transplantation using reduced-intensity preparative regimens in Fanconi anaemia patients with myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2003; 122: 806-9.
  99. Guardiola P, Socié G, Li X, Ribaud P, Devergie A, Espérou H et al. Acute graft-versus-host disease in patients with Fanconi anemia or acquired aplastic anemia undergoing bone marrow transplantation from HLA-identical sibling donors: risk factors and influence on outcome. *Blood* 2004; 103: 73-7.
  100. Gustafsson G, Lie SO. Acute leukaemias. In: Voûte PA, Kalifa C, Barrett A eds. *Cancer in children: clinical management*. Oxford: Oxford university press, 1999; 99-118.
  101. Hancock JP, Goulden NJ, Oakhill A, Steward CG. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic bone marrow transplantation using immunomagnetic selection and fluorescent microsatellite PCR. *Leukemia* 2003; 17: 247-51.
  102. Hansen MD, Filipovich AH, Davies SM, Mehta P, Bleesing J, Jodele S et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation (HCT) in Hurler's syndrome

- using a reduced intensity preparative regimen. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41: 349-53.
103. Harris RE. Reduction of toxicity of marrow transplantation in children with Fanconi anemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 1999; 21: 175-6..
  104. Hassan R, Bonamino MH, Braggio E, Lobo AM, Seuánez HN, Tabak DG et al. A systematic approach to molecular quantitative determination of mixed chimaerism following allogeneic bone marrow transplantation: an analysis of its applicability in a group of patients with severe aplastic anaemia. *Eur J Haematol*. 2004; 73: 156-61.
  105. HersHKovitz E, Narkis G, Shorer Z, Moser AB, Watkins PA, Moser HW et al. Cerebral X-linked adrenoleukodystrophy in a girl with Xq27-Ter deletion. *Ann Neurol* 2002; 52: 234-7.
  106. Hill RS, Petersen FB, Storb R, Appelbaum FR, Doney K, Dahlberg S et al. Mixed hematologic chimerism after allogeneic marrow transplantation for severe aplastic anemia is associated with a higher risk of graft rejection and a lessened incidence of acute graft-versus-host disease. *Blood* 1986; 67: 811-6.
  107. Ho VT, Weller E, Lee SJ, Alyea EP, Antin JH, Soiffer RJ. Prognostic factors for early severe pulmonary complications after hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7: 223-9.
  108. Hochberg EP, Miklos DB, Neuberger D, Eichner DA, McLaughlin SF, Mattes-Ritz A et al. A novel rapid single nucleotide polymorphism (SNP)-based method for assessment of hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2003; 101: 363-9.
  109. Hoelle W, Beck JF, Dueckers G, Kreyenberg H, Lang P, Gruhn B et al. Clinical relevance of serial quantitative analysis of hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation in children for severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: 219-23.
  110. Horan JT, Liesveld JL, Fenton P, Blumberg N, Walters MC. Hematopoietic stem cell transplantation for multiply transfused patients with sickle cell disease and thalassemia after low-dose total body irradiation, fludarabine,

- and rabbit anti-thymocyte globulin. *Bone Marrow Transplant*. 2005 Jan;35(2):171-7.
111. Hudspeth MP, Raymond GV. Immunopathogenesis of adrenoleukodystrophy: current understanding. *J Neuroimmunol* 2007; 182: 5-12.
  112. Huisman C, de Weger RA, de Vries L, Tilanus MG, Verdonck LF. Chimerism analysis within 6 months of allogeneic stem cell transplantation predicts relapse in acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39: 285-91.
  113. Huss R, Deeg HJ, Gooley T, Bryant E, Leisenring W, Clift R et al. Effect of mixed chimerism on graft-versus-host disease, disease recurrence and survival after HLA-identical marrow transplantation for aplastic anemia or chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18: 767-76.
  114. Ikushima S, Hibi S, Todo S, Sawada T, Matsumoto Y, Iwami H et al. Successful allogeneic bone marrow transplantation in a case with myelodysplastic syndrome which developed following Fanconi anemia. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16: 621-4.
  115. Ito M, Blumberg BM, Mock DJ, Goodman AD, Moser AB, Moser HW et al. Potential environmental and host participants in the early white matter lesion of adreno-leukodystrophy: morphologic evidence for CD8 cytotoxic T cells, cytolysis of oligodendrocytes, and CD1-mediated lipid antigen presentation. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60: 1004-19.
  116. Jacobsohn DA, Vogelsang GB. Acute graft versus host disease. *Orphanet J Rare Dis* 2007; 2: 35-43.
  117. Jaing TH, Hung IJ, Yang CP, Chen SH, Sun CF, Chow R. Rapid and complete donor chimerism after unrelated mismatched cord blood transplantation in 5 children with beta-thalassemia major. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 349-53.
  118. 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: 346-9.
119. Jamieson CH, Amylon MD, Wong RM, Blume KG. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for patients with high-risk acute lymphoblastic leukemia in first or second complete remission using fractionated total-body irradiation and high-dose etoposide: a 15-year experience. *Exp Hematol* 2003; 31: 981-6.
  120. Janeliūnienė M, Matuzevičienė R, Griškevičius L., Kučinskienė Z. Optimizing detection of minimal residual disease in B-precursor acute lymphoblastic leukaemia by multiparameter flow cytometry. *Acta medica lituanica* 2007, 14: 257-66.
  121. Joenje H, Patel KJ. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 446-57.
  122. Jółkowska J, Derwich K, Dawidowska M. Methods of minimal residual disease (MRD) detection in childhood haematological malignancies. *J Appl Genet* 2007; 48: 77-83.
  123. Kaare A, Everaus H. Hematopoietic stem cell transplantation in Estonia – review of 11 year experience. 4<sup>th</sup> Baltic Conference of Hematology. 13-15 May 2004. Tallinn, Estonia; 61.
  124. Kahl C, Storer BE, Sandmaier BM, Mielcarek M, Maris MB, Blume KG et al. Relapse risk in patients with malignant diseases given allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *Blood* 2007; 110: 2744-8.
  125. Kemp S, Moser H. Clinical forms of X-linked adrenoleukodystrophy. <http://www.x-ald.nl/phenotypes.htm>
  126. Kikushige Y, Takase K, Sata K, Aoki K, Numata A, Miyamoto T, et al. Repeated relapses of acute myelogenous leukemia in the isolated extramedullary sites following allogeneic bone marrow transplantations. *Intern Med* 2007; 46: 1011-4.

127. Klingebiel T, Bader P, Hollatz G, Koehl U, Lehrnbecher T, Meisel R et al. Immunotherapy in children: report from the Reisenburg-Symposium October 20-22, 2004 and recent advances. *Klin Padiatr.* 2006; 218: 355-65.
128. Knowlton RG, Brown VA, Braman JC et al. Use of highly polymorphic DNA probes for genotyping analysis following bone marrow transplantation. *Blood* 1986; 68: 378-85.
129. Koc ON, Peters C, Aubourg P, Raghavan S, Dyhouse S, DeGasperi R et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells remain host-derived despite successful hematopoietic engraftment after allogeneic transplantation in patients with lysosomal and peroxisomal storage diseases. *Exp Hematol* 1999; 27: 1675-81.
130. Koenecke C, Shaffer J, Alexander SI, Preffer F, Dombkowski D, Saidman SL et al. NK cell recovery, chimerism, function, and recognition in recipients of haploidentical hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning using a humanized anti-CD2 mAb, Medi-507. *Exp Hematol* 2003; 31: 911-23.
131. Koh LP, Chen CS, Tai BC, Hwang WY, Tan LK, Ng HY et al. Impact of postgrafting immunosuppressive regimens on nonrelapse mortality and survival after nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplant using the fludarabine and low-dose total-body irradiation 200-cGy. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13: 790-805.
132. Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia. *Blood* 1995; 86: 2041-50.
133. Koldehoff M, Steckel NK, Hlinka M, Beelen DW, Elmaagacli AH. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by real-time polymerase chain reaction with single nucleotide polymorphisms, standard tandem repeats, and Y-chromosome-specific sequences. *Am J Hematol* 2006; 81: 735-46.

134. Krivit W, Lockman LA, Watkins PA, Hirsch J, Shapiro EG. The future for treatment by bone marrow transplantation for adrenoleukodystrophy, metachromatic leukodystrophy, globoid cell leukodystrophy and Hurler syndrome. *J Inher Metab Dis* 1995; 18: 398-412.
135. Krivit W, Aubourg P, Shapiro E, Peters C. Bone marrow transplantation for globoid cell leukodystrophy, adrenoleukodystrophy, metachromatic leukodystrophy, and Hurler syndrome. *Curr Opin Hematol* 1999; 6: 377-82.
136. Kurre P, Pulsipher M, Woolfrey A, Maris M, Sandmaier B, Kiem HP et al. Reduced toxicity and prompt engraftment after minimal conditioning of a patient with Fanconi anemia undergoing hematopoietic stem cell transplantation from an HLA-matched unrelated donor. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003; 25: 581-3.
137. Kutler DI, Singh B, Satagopan J, Batish SD, Berwick M, Giampietro PF et al. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood* 2003; 101: 1249-56.
138. Lang P, Mueller I, Greil J, Bader P, Schumm M, Pfeiffer M et al. Retransplantation with stem cells from mismatched related donors after graft rejection in pediatric patients. *Blood Cells Mol Dis* 2008; 40: 33-9.
139. Lassaletta A, Ramírez M, Montero JM, González-Vicent M, Balas A, Madero L et al. Full donor chimerism by day 30 after allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation is associated with a low risk of relapse in pediatric patients with hematological malignancies. *Leukemia* 2005; 19: 504-6.
140. Lawler M, McCann SR, Gardiner N. Mixed chimerism predicts graft rejection following BMT for severe aplastic anaemia. Final report for the EBMT working party on SAA. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 64a.
141. Lee KH, Lee JH, Choi SJ, Lee JH, Kim S, Seol M et al. Monthly prospective analysis of hematopoietic chimerism after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32: 423-31.



142. Lee SJ, Klein JP, Barrett AJ, Ringden O, Antin JH, Cahn JY et al. Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse. *Blood* 2002; 100: 406-14.
143. van Leeuwen JE, van Tol MJ, Joosten AM, Wijnen JT, Khan PM, Vossen JM. Mixed T-lymphoid chimerism after allogeneic bone marrow transplantation for hematologic malignancies of children is not correlated with relapse. *Blood*; 82: 1921-8.
144. van Leeuwen JE, van Tol MJ, Joosten AM, Wijnen JT, Verweij PJ, Khan PM et al. Persistence of host-type hematopoiesis after allogeneic bone marrow transplantation for leukemia is significantly related to the recipient's age and/or the conditioning regimen, but it is not associated with an increased risk of relapse. *Blood* 1994; 83: 3059-67.
145. Levitus M, Rooimans MA, Steltenpool J, Cool NF, Oostra AB, Mathew CG et al. Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes. *Blood* 2004; 103: 2498-503.
146. Ljungman P, Urbano-Ispizua A, Cavazzana-Calvo M, Demirer T, Dini G, Einsele H et al; European Group for Blood and Marrow. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe. *Bone Marrow Transplant* 2006; 37: 439-49.
147. Li A, Zhou J, Zuckerman D, Rue M, Dalton V, Lyons C et al. Sequence analysis of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in children with acute lymphoblastic leukemia at diagnosis and at relapse: implications for pathogenesis and for the clinical utility of PCR-based methods of minimal residual disease detection. *Blood* 2003; 102: 4520-6.
148. Li H, Schmidt L, Wei MH, Hustad T, Lerman MI, Zbar B et al. Three tetranucleotide polymorphism for loci: D3S1352; D3S1358; D3S1359. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1327.
149. Lion T, Daxberger H, Dubovsky J, Filipcik P, Fritsch G, Printz D et al. Analysis of chimerism within specific leukocyte subsets for detection of

- residual or recurrent leukemia in pediatric patients after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 2001; 15: 293-302.
150. Lion T. Summary: Reports on quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection. *Leukemia* 2003; 17: 252-4.
  151. Lion T, Muller-Bérat N. Chimerism testing after allogeneic stem cell transplantation: importance of timing and optimal technique for testing in different clinical-biological situations. *Leukemia* 2003; 17: 612.
  152. Lion T. Detection of impending graft rejection and relapse by lineage-specific chimerism analysis. *Methods Mol Med* 2007; 134: 197-216.
  153. Locatelli F, Zecca M, Rondelli R, Bonetti F, Dini G, Prete A et al. Graft versus host disease prophylaxis with low-dose cyclosporine-A reduces the risk of relapse in children with acute leukemia given HLA-identical sibling bone marrow transplantation: results of a randomized trial. *Blood* 2000; 95: 1572-9.
  154. Locatelli F. Reduced-intensity regimens in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hemoglobinopathies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006: 398-401.
  155. Locatelli F, Zecca M, Pession A, Morreale G, Longoni D, Di Bartolomeo P et al.; Italian pediatric group. The outcome of children with Fanconi anemia given hematopoietic stem cell transplantation and the influence of fludarabine in the conditioning regimen: a report from the Italian pediatric group. *Haematologica* 2007; 92: 1381-8.
  156. Loes DJ, Stillman AE, Hite S, Shapiro E, Lockman L, Latchaw RE et al. Childhood cerebral form of adrenoleukodystrophy: short-term effect of bone marrow transplantation on brain MR observations. *AJNR Am J Neuroradiol* 1994; 15: 1767-71.
  157. Lutz C, Massenkeil G, Nagy M, Neuburger S, Tamm I, Rosen O et al. 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: 805-12.
158. Luznik L, Fuchs EJ. Donor lymphocyte infusions to treat hematologic malignancies in relapse after allogeneic blood or marrow transplantation. *Cancer Control* 2002; 9: 123-37.
159. Maas F, Schaap N, Kolen S, Zoetbrood A, Buño I, Dolstra H et al. Quantification of donor and recipient hemopoietic cells by real time PCR of single nucleotide polymorphisms. *Leukemia* 2003; 17: 621-9.
160. MacMillan ML, Weisdorf DJ, DeFor TE, Champagne MA, Auerbach AD, Wagner JA. Marked reduction in graft failure and regimen related toxicity after unrelated donor hematopoietic cell transplantation in patients with Fanconi anemia: impact of disease stage and Fludarabine. *Blood* 2001; 98 (Suppl 1): 670a.
161. Mahmood A, Raymond GV, Dubey P, Peters C, Moser HW. Survival analysis of haematopoietic cell transplantation for childhood cerebral X-linked adrenoleukodystrophy: a comparison study. *Lancet Neurol* 2007; 6: 687-92
162. Martin PL, Carter SL, Kernan NA, Sahdev I, Wall D, Pietryga D et al. Results of the cord blood transplantation study (COBLT): outcomes of unrelated donor umbilical cord blood transplantation in pediatric patients with lysosomal and peroxisomal storage diseases. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 184-94.
163. Maschan AA, Kryzanovskii OI, Yourlova MI, Skorobogatova EV, Pashanov ED, Potapova YE et al. Intermediate-dose busulfan and cyclophosphamide as a conditioning regimen for bone marrow transplantation in a case of Fanconi anemia in myelodysplastic transformation. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 385-7
164. Maschan AA, Trakhtman PE, Balashov DN, Shipicina IP, Skorobogatova EV, Skvortsova et al. Fludarabine, low-dose busulfan and antithymocyte globulin as conditioning for Fanconi anemia patients receiving bone marrow

- transplantation from HLA-compatible related donors. *Bone Marrow Transplant* 2004; 34: 305-7.
165. Masmus TN, Petersen SL, Madsen HO, Ryder LP, Kornblit B, Svejgaard A et al. Graft rejection after hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. *Am J Hematol.* 2008 Feb 13. [Epub ahead of print]
  166. Massenkeil G, Nagy M, Lawang M, Rosen O, Genvresse I, Geserick G et al. Reduced intensity conditioning and prophylactic DLI can cure patients with high-risk acute leukaemias if complete donor chimerism can be achieved. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31: 339-45.
  167. Matthes-Martin S, Lion T, Haas OA, Frommlet F, Daxberger H, König M et al. Lineage-specific chimaerism after stem cell transplantation in children following reduced intensity conditioning: potential predictive value of NK cell chimaerism for late graft rejection. *Leukemia* 2003; 17: 1934-42.
  168. Mattsson J, Uzunel M, Tammik L, Aschan J, Ringden O. Leukemia lineage-specific chimerism analysis is a sensitive predictor of relapse in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 2001a; 15: 1976-85.
  169. Mattsson J, Uzunel M, Remberger M, Ringden O. T cell mixed chimerism is significantly correlated to a decreased risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Transplantation* 2001b; 71: 433-9.
  170. Mattsson J, Uzunel M, Brune M, Hentschke P, Barkholt L, Stierner U, Aschan J, Ringdén O. Mixed chimaerism is common at the time of acute graft-versus-host disease and disease response in patients receiving non-myeloablative conditioning and allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2001c; 115: 935-44.
  171. Matuzevičienė R, Kučinskienė Z. Ūminių leukemijų imunofenotipavimas tėkmės citometru. *Laboratorinė medicina* 2002; 2: 35-42.
  172. McCann SR, Lawler M. Mixed chimaerism; detection and significance following BMT. *Bone Marrow Transplant* 1993; 11: 91-4.

173. McCann SR, Lawler M. Monitoring outcome: MRD, chimaerism and relapse. In: Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Gratwohl A, Masszi T eds. Haemopoietic stem cell transplantation. Genoa: Forum Service Editore, 2004; 197-214.
174. McCloy M, Almeida A, Daly P, Vulliamy T, Roberts IA, Dokal I. Fludarabine-based stem cell transplantation protocol for Fanconi's anaemia in myelodysplastic transformation. *Br J Haematol* 2001; 112: 427-9.
175. McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA, Sandmaier BM, Molina AJ, Maloney DG et al. Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood* 2001; 97: 3390-400.
176. de Medeiros CR, Bitencourt MA, Zanis-Neto J, Maluf EC, Carvalho DS, Bonfim CS et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from an alternative stem cell source in Fanconi anemia patients: analysis of 47 patients from a single institution. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39:1297-304.
177. Meisel R, Enczmann J, Balzer S, Bernbeck B, Kramm C, Schönberger S et al. Similar survival following HLA-identical sibling transplantation for standard indication in children with haematologic malignancies: a single center comparison of mobilized peripheral blood stem cell with bone marrow transplantation. *Klin Padiatr* 2005; 217: 135-41.
178. Meissner B, Borkhardt A, Dilloo D, Fuchs D, Friedrich W, Handgretinger R et al. Relapse, not regimen-related toxicity, was the major cause of treatment failure in 11 children with Down syndrome undergoing haematopoietic stem cell transplantation for acute leukaemia. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40: 945-9.
179. Meuleman N, Vanhaelen G, Tondreau T, Lewalle P, Kwan J, Bennani J et al. Reduced intensity conditioning haematopoietic stem cell transplantation with mesenchymal stromal cells infusion for the treatment of metachromatic leukodystrophy: a case report. *Haematologica*. 2008; 93: 11-3.
180. Miano M, Dini G. Stem cell transplantation in children. Haemoglobinopathies. In: Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Gratwohl A,

- Masszi T eds. Haemopoietic stem cell transplantation. Genoa: Forum Service Editore, 2004; 336-40.
181. Miano M, Labopin M, Hartmann O, Angelucci E, Cornish J, Gluckman E et al. Haematopoietic stem cell transplantation trends in children over the last three decades: a survey by the paediatric diseases working party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39: 89-99.
  182. Michallet AS, Fürst S, Le QH, Dubois V, Paire A, Nicolini F et al. Impact of chimaerism analysis and kinetics on allogeneic haematopoietic stem cell transplantation outcome after conventional and reduced-intensity conditioning regimens. *Br J Haematol* 2005; 128: 676-89.
  183. Mikkil S, Kaare A, Everaus H. Pediatric bone marrow transplantation in Estonia. 6<sup>th</sup> Baltic Conference of Hematology. 8-10 May 2008. Vilnius, Lithuania; 20.
  184. Mital MK, Curtis A, Spencer V, Barge D, Skinner R. Delayed engraftment and mixed chimerism after HLA-identical sibling donor BMT in Fanconi anaemia. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24: 201-4.
  185. Miura Y, Tanaka J, Toubai T, Tsutsumi Y, Kato N, Hirate D et al. Analysis of donor-type chimerism in lineage-specific cell populations after allogeneic myeloablative and non-myeloablative stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2006; 37: 837-43.
  186. Mohty M, Avinens O, Faucher C, Viens P, Blaise D, Eliaou JF. Predictive factors and impact of full donor T-cell chimerism after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2007; 92: 1004-6.
  187. Möricke A, Reiter A, Zimmermann M, Gadner H, Stanulla M, Dördelmann M et al.; for the German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood* 2008; 111: 4477-89.

188. Moser HW, Tutschka PJ, Brown FR 3rd, Moser AE, Yeager AM, Singh I et al. Bone marrow transplant in adrenoleukodystrophy. *Neurology* 1984; 34: 1410-7.
189. Moser HW. Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy. *Brain* 1995; 120: 1485-508.
190. Moser HW, Raymond GV, Dubey P. Adrenoleukodystrophy: new approaches to a neurodegenerative disease. *JAMA* 2005; 294: 3131-4.
191. Moser HW, Mahmood A, Raymond GV. X-linked adrenoleukodystrophy. *Nat Clin Pract Neurol* 2007; 3: 140-51.
192. Motwani J, Lawson SE, Darbyshire PJ. Successful HSCT using nonradiotherapy-based conditioning regimens and alternative donors in patients with Fanconi anaemia – experience in a single UK centre. *Bone Marrow Transplant* 2005; 36: 405–10.
193. Muranski P, Boni A, Wrzesinski C, Citrin DE, Rosenberg SA, Childs R et al. Increased intensity lymphodepletion and adoptive immunotherapy--how far can we go? *Nat Clin Pract Oncol* 2006; 3: 668-81.
194. Nachbaur D, Kircher B, Eisendle K, Lätzer K, Haun M, Gastl G. Phenotype, function and chimaerism of monocyte-derived blood dendritic cells after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2003; 123: 119-26.
195. Nagy M, Otremba P, Krüger C, Begner-Greiner S, Anders P, Henske B, Prinz M et al. Optimization and validation of a fully automated silica-coated magnetic beads purification technology in forensics. *Forensic Science International* 2005; 152: 13-22.
196. Nagy M, Massenkeil G, Anders P et al. Short tandem repeat analysis to monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation. In: Sensabaugh GF, Lincoln PJ, Olaisen B (eds). *Progress in Forensic Genetics 8: Proceedings of the 18<sup>th</sup> International ISFH Congress, San Francisco, CA, 1999*; 561-3.
197. Nakao S, Zeng W, Yamazaki H, Wang H, Takami A, Sugimori N et al. Early establishment of hematopoietic chimerism following allogeneic

- peripheral blood stem cell transplantation in comparison with allogeneic bone marrow transplantation. *Eur J Haematol* 1999; 62: 265-70.
198. Niederwieser D, Maris M, Shizuru JA, Petersdorf E, Hegenbart U, Sandmaier BM et al. Low-dose total body irradiation (TBI) and fludarabine followed by hematopoietic cell transplantation (HCT) from HLA-matched or mismatched unrelated donors and postgrafting immunosuppression with cyclosporine and mycophenolate mofetil (MMF) can induce durable complete chimerism and sustained remissions in patients with hematological diseases. *Blood* 2003; 101: 1620-9.
  199. Norkūnas M, Ragelienė L. Transformation of Langerhans cell histiocytosis to AML. 6<sup>th</sup> Baltic Conference of Hematology. 8-10 May 2008. Vilnius, Lithuania; 13.
  200. Norrby J, Olausson M. A randomized clinical trial using ATG Fresenius or ATG Merieux as induction therapy in kidney transplantation. *Transplant Proc* 1997; 29: 3135-6.
  201. Offit K, Burns JP, Cunningham I, Jhanwar SC, Black P, Kernan NA et al. Cytogenetic analysis of chimerism and leukemia relapse in chronic myelogenous leukemia patients after T-cell depleted bone marrow transplantation. *Blood* 1990; 75: 1346-55.
  202. Ohashi H, Kato C, Fukami S, Saito H, Hamaguchi M. Leukemic relapse in the central nervous system after allogeneic stem cell transplantation with complete remission in the bone marrow and donor-type chimerism: report of two cases. *Am J Hematol* 2005; 79: 142-6.
  203. Or R, Ackerstein A, Nagler A, Amar A, Naparstek E, Varadi G, Kapelushnik J et al. Allogeneic cell-mediated and cytokine-activated immunotherapy for malignant lymphoma at the stage of minimal residual disease after autologous stem cell transplantation. *J Immunother* 1998; 21: 447-53.
  204. Ouachée-Chardin M, Elie C, de Saint Basile G, Le Deist F, Mahlaoui N, Picard C et al. Hematopoietic stem cell transplantation in hemophagocytic lymphohistiocytosis: a single-center report of 48 patients. *Pediatrics* 2006; 117: e743-50.



205. Ozyurek E, Cowan MJ, Koerper MA, Baxter-Lowe LA, Dvorak CC, Horn BN. Increasing mixed chimerism and the risk of graft loss in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for non-malignant disorders. *Bone Marrow Transplant* 2008; 42: 83-91.
206. Panse JP, Heimfeld S, Guthrie KA, Maris MB, Maloney DG, Baril BB et al. Allogeneic peripheral blood stem cell graft composition affects early T-cell chimaerism and later clinical outcomes after non-myeloablative conditioning. *Br J Haematol* 2005; 128: 659-67.
207. Park SJ, Min WS, Yang IH, Kim HJ, Min CK, Eom HS et al. Effects of mixed chimerism and immune modulation on GVHD, disease recurrence and survival after HLA-identical marrow transplantation for hematologic malignancies. *Korean J Intern Med* 2000; 15: 224-31.
208. Pasaulienė R, Rascon J, Vaitkevičienė G, Savinas A. Baltic experience in high dose therapy with stem cell support in patients with solid tumors. 1<sup>st</sup> Scientific Conference of the Baltic Society for Pediatric Oncology and Hematology. 28-30 April 2006. Vilnius, Lithuania; 40.
209. Peters C, Charnas LR, Tan Y, Ziegler RS, Shapiro EG, DeFor T et al. Cerebral X-linked adrenoleukodystrophy: the international hematopoietic cell transplantation experience from 1982 to 1999. *Blood* 2004; 104: 881-8.
210. Petersen SL, Madsen HO, Ryder LP, Svejgaard A, Masmus TN, Dickmeiss E et al. 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: 337-46.
211. Petersen SL. Alloreactivity as therapeutic principle in the treatment of hematologic malignancies. Studies of clinical and immunologic aspects of allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. *Dan Med Bull* 2007; 54:112-39.
212. Petz LD. Documentation of engraftment and characterization of chimerism following marrow transplantation. In: Donnall Thomas E, Forman SJ &

- Blume KG eds. Bone marrow transplantation. Oxford: Blackwell Science, 1994; 136-48.
213. Porter DL, Collins Jr RH, Hardy C, Kernan NA, Drobyski WR, Giralt S et al. Treatment of relapsed leukemia after unrelated donor marrow transplantation with unrelated donor leukocyte infusions. *Blood* 2000; 95: 1214-21.
214. Potter V, Moore J. Randomised trials of Graft versus Host Disease prophylaxis in haemopoietic stem cell transplantation. *Rev Recent Clin Trials*. 2008; 3: 130-8.
215. Prinz E, Keil F, Kalhs P, Mitterbauer M, Rabitsch W, Rosenmayr A et al. Successful immunotherapy in early relapse of acute myeloid leukemia after nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Ann Hematol* 2003; 82: 295-8.
216. Puga I, Ahte M, Lejniece S, Rivkina A. Experience of haemopoietic stem cell transplantation in National hematology centre in Latvia. 6<sup>th</sup> Baltic Conference of Hematology. 8-10 May 2008. Vilnius, Lithuania; 46.
217. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2008; 371: 1030-43.
218. Ragelienė L. Anemijos dėl sumažėjusios eritrocitų gamybos. *Vaikų hematologija*. Vilnius: Vaistų žinios, 2002; 49-58.
219. Ragelienė L, Vaitkevičienė G, Rutkauskaitė V. The results of pediatric HSCT in Lithuania. 5<sup>th</sup> Baltic States Conference of Haematology; 14-16 September 2006; Riga, Latvia; 14-15.
220. Ramirez M, Diaz MA, Garcia-Sanchez F, Velasco M, Casado F, Villa M et al. Chimerism after allogeneic hematopoietic cell transplantation in childhood acute leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18: 1161-5.
221. Rascon J, Vaitkevičienė G, Juškaitė R, Ragelienė L, Savinas A, Binkis K. The results of childhood hematopoietic stem cell transplantation in Lithuania. 4<sup>th</sup> Baltic Conference of Hematology. 13-15 May 2004. Tallinn, Estonia; 29.

222. Reingardienė D. Ūminis antinksčių žievės nepakankamumas. *Medicina* 2002; 38: 769-75.
223. Remberger M, Ringdén O, Ljungman P, Hägglund H, Winiarski J, Lönnqvist B et al. Booster marrow or blood cells for graft failure after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22: 73-8.
224. Remberger M, Storer B, Ringdén O, Anasetti C. Association between pretransplant Thymoglobulin and reduced non-relapse mortality rate after marrow transplantation from unrelated donors. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29: 391-7.
225. Remberger M, Mattsson J, Hausenberger D, Schaffer M, Svahn BM, Ringdén O. Genomic tissue typing and optimal antithymocyte globuline dose using unrelated donors results in similar survival and relapse as HLA-identical siblings in haematopoietic stem-cell transplantation for leukaemia. *Eur J Haematol* 2008; 80: 419-28.
226. Renders L, Valerius T. Engineered CD3 antibodies for immunosuppression. *Clin Exp Immunol* 2003; 133: 307-9.
227. Resnick IB, Abdul Hai A, Shapira MY, Bitan M, Hershkovitz E, Schwartz A et al. Treatment of X-linked childhood cerebral adrenoleukodystrophy by the use of an allogeneic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning regimen. *Clin Transplant* 2005; 19: 840-7.
228. Rieger K, Marinets O, Fietz T, Körper S, Sommer D, Mücke C et al. Mesenchymal stem cells remain of host origin even a long time after allogeneic peripheral blood stem cell or bone marrow transplantation. *Exp Hematol* 2005; 33: 605-11.
229. Robin M, Porcher R, De Castro Araujo R, de Latour RP, Devergie A et al. Risk factors for late infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from a matched related donor. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13: 1304-12.
230. Rodríguez-Luaces M, Ferrá C, Martín-Henao G, Berlanga JJ, Grañena A, Gallardo D. Mixed chimerism is frequent after allogeneic peripheral blood

- stem cell transplantation with positive CD34 selection, and is not reverted by low doses of donor T-cells add-back. *Eur J Haematol.* 2004; 73: 162-8.
231. Rosenberg PS, Greene MH, Alter BP. Cancer incidence in persons with Fanconi's anemia. *Blood* 2003; 101: 822-6.
  232. Rossi G, Giorgiani G, Comoli P, Nobili B, Salvaneschi L, De Stefano P et al. Successful T-cell-depleted, related haploidentical peripheral blood stem cell transplantation in a patient with Fanconi anaemia using a fludarabine-based preparative regimen without radiation. *Bone Marrow Transplant.* 2003; 31: 437-40.
  233. Sánchez-García J, Serrano J, Gómez P, Martínez F, Martín C, Román-Gómez J et al. The impact of acute and chronic graft-versus-host disease on normal and malignant B-lymphoid precursors after allogeneic stem cell transplantation for B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2006; 91: 340-7.
  234. Saribeyoglu E, Klingebiel T, Ebell W, Borkhardt A, Sykora K, Kremens B et al. Stem cell transplantation from family donors for children with recurrent acute lymphoblastic leukaemia in second or third complete remission. Long-term results reported by the ALL-REZ BFM Study Group and the PAED AG-KBT. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41: S298.
  235. Satwani P, Morris E, Bradley MB, Bhatia M, van de Ven C, Cairo MS. Reduced intensity and non-myeloablative allogeneic stem cell transplantation in children and adolescents with malignant and non-malignant diseases. *Pediatr Blood Cancer* 2008; 50: 1-8.
  236. Schilham MW, Balduzzi A, Bader P; PD-WP of the EBMT. Is there a role for minimal residual disease levels in the treatment of ALL patients who receive allogeneic stem cells? *Bone Marrow Transplant* 2005; 35: S49-52.
  237. Schlegel PG, Eyrich M, Bader P, Handgretinger R, Lang P, Niethammer D et al. OKT-3-based conditioning regimen for early graft failure in HLA-non-identical stem cell transplants. *Br J Haematol* 2000; 111: 668-73.

238. Schleuning M, Kaltenhauser J, Heshmat M et al. The influence of ATG source on the outcome after unrelated transplants for chronic phase CML – a single-centre experience. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: O357.
239. Schraml E, Daxberger H, Watzinger F, Lion T. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Vienna experience. *Leukemia* 2003; 17: 224-7.
240. Schrauder A, Reiter A, Gadner H, Niethammer D, Klingebiel T, Kremens B et al. Superiority of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation compared with chemotherapy alone in high-risk childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: results from ALL-BFM 90 and 95. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5742-9.
241. Serrano J, Roman J, Sanchez J, Jimenez A, Castillejo JA, Herrera C et al. Molecular analysis of lineage-specific chimerism and minimal residual disease by RT-PCR of p210(BCR-ABL) and p190(BCR-ABL) after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: increasing mixed myeloid chimerism and p190(BCR-ABL) detection precede cytogenetic relapse. *Blood* 2000; 95: 2659-65.
242. Shapiro E, Krivit W, Lockman L, Jambaque I, Peters C, Cowan M et al. Long-term effect of bone-marrow transplantation for childhood-onset cerebral X-linked adrenoleukodystrophy. *Lancet* 2000; 356: 713-8.
243. Shenoy S, Grossman WJ, DiPersio J, Yu LC, Wilson D, Barnes YJ et al. A novel reduced-intensity stem cell transplant regimen for nonmalignant disorders. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35: 345-52.
244. Siemerling E, Creutzfeldt HG. Bronzkrankheit und sklerosierende Enzephalomyelitis. *Arch Psychiatr Nervkrank* 1923; 68: 217.
245. Slavin S, Naparstek E, Nagler A, Ackerstein A, Kapelushnik J, Or R. Allogeneic cell therapy for relapsed leukemia after bone marrow transplantation with donor peripheral blood lymphocytes. *Exp Hematol* 1995; 23: 1553-62.

246. Slobinas A, Jasinskienė D, Griškevičius L, Jurgutis M, Trociukas I, Balsys J. The analysis of engraftment kinetics and early immune reconstitution as a function of CD34 content of autologous peripheral blood stem cell collections in adult patients after autologous stem cell transplantation. 4<sup>th</sup> Baltic Conference of Hematology. 13-15 May 2004. Tallinn, Estonia; 38.
247. Socié G, Gluckman E, Raynal B, Petit T, Landman J, Devergie A et al. Bone marrow transplantation for Fanconi anemia using low-dose cyclophosphamide/ thoracoabdominal irradiation as conditioning regimen: chimerism study by the polymerase chain reaction. *Blood* 1993; 82: 2249-56.
248. Socié G, Stone JV, Wingard JR, Weisdorf D, Henslee-Downey PJ, Bredeson C et al. Long-term survival and late deaths after allogeneic bone marrow transplantation. Late Effects Working Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. *N Engl J Med* 1999; 341: 14-21.
249. Soulier J, Leblanc T, Larghero J, Dastot H, Shimamura A, Guardiola P et al. Detection of somatic mosaicism and classification of Fanconi anemia patients by analysis of the FA/BRCA pathway. *Blood* 2005; 105: 1329-36.
250. Spangrude GJ, Cho S, Guedelhofer O, Vanwoerkom RC, Fleming WH. Mouse models of hematopoietic engraftment: limitations of transgenic green fluorescent protein strains and a high-performance liquid chromatography approach to analysis of erythroid chimerism. *Stem Cells* 2006; 24: 2045-51.
251. Spinelli O, Peruta B, Tosi M, Guerini V, Salvi A, Zanotti MC et al. Clearance of minimal residual disease after allogeneic stem cell transplantation and the prediction of the clinical outcome of adult patients with high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2007; 92: 612-8.
252. Sramkova L, Muzikova K, Fronkova E, Krejci O, Sedlacek P, Formankova R et al. Detectable minimal residual disease before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts extremely poor prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2007; 48: 93-100.

253. Steiner M, Matthes-Martin S, Attarbaschi A, Minkov M, Grois N, Unger E et al. Improved outcome of treatment-resistant high-risk Langerhans cell histiocytosis after allogeneic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant* 2005; 36: 215-25.
254. Steiner M, Matthes-Martin S, Attarbaschi A, Lawitschka A, Minkov M, Mittheisz E et al.. Importance of allogeneic T-cells for disease control after stem cell transplantation for high-risk Langerhans cell histiocytosis. *Haematologica* 2007; 92: e3-4.
255. Steward CG. Stem cell transplantation in children. Inherited metabolic diseases. In: Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Gratwohl A, Masszi T eds. *Haemopoietic stem cell transplantation*. Genoa: Forum Service Editore, 2004; 314-7.
256. Stock W, Yu D, Karrison T, Sher D, Stone RM, Larson RA et al. Quantitative real-time RT-PCR monitoring of BCR-ABL in chronic myelogenous leukemia shows lack of agreement in blood and bone marrow samples. *Int J Oncol* 2006; 28: 1099-103.
257. Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, Appelbaum F, Beatty P, Bensinger W et al. 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: 729-35.
258. Stumph J, Vnencak-Jones CL, Koyama T, Frangoul H. Comparison of peripheral blood and bone marrow samples for detection of post transplant mixed chimerism. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41: 589-90.
259. Stute N, Fehse B, Schröder J, Arps S, Adamietz P, Held KR et al. Human mesenchymal stem cells are not of donor origin in patients with severe aplastic anemia who underwent sex-mismatched allogeneic bone marrow transplant. *J Hematother Stem Cell Res* 2002; 11: 977-84.
260. Sullivan KM, Manucci A, Kimpton CP, Gill P. A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *Biotechniques* 1993; 15: 636-41.

261. Sun Y, Tawara I, Toubai T, Reddy P. Pathophysiology of acute graft-versus-host disease: recent advances. *Transl Res* 2007; 150: 197-214.
262. Suttorp M, Schmitz N, Dreger P, Schaub J, Loffler H. Monitoring of chimerism after allogeneic bone marrow transplantation with unmanipulated marrow by use of DNA polymorphisms. *Leukemia* 1993; 7: 679-87.
263. Tan PL, Wagner JE, Auerbach AD, Defor TE, Slungaard A, Macmillan ML. Successful engraftment without radiation after fludarabine-based regimen in Fanconi anemia patients undergoing genotypically identical donor hematopoietic cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer* 2006; 46: 630-6.
264. Tavil B, Kazik M, Kuşkonmaz B, Cetin M, Uçkan D. A prompt graft-versus-thalassemia effect upon withdrawal of cyclosporine A in a child who received allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2006; 38: 315-6.
265. Teuffel O, Schrauder A, Sykora KW, Zimmermann M, Reiter A, Welte K et al. The impact of cyclosporin A on acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2005; 36: 145-50.
266. Thiede C, Florek M, Bornhauser M, Ritter M, Mohr B, Brendel C et al. Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 1055-60.
267. Thiede C, Bornhauser M, Oelschlagel U, Brendel C, Leo R, Daxberger H et al. Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers. *Leukemia* 2001; 15: 293-30.
268. Thiede C, Lion T. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation using multiplex PCR amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Leukemia* 2001; 15: 303-6.



269. Thiede C, Lutterbeck K, Oelschlagel U, Kiehl M, Steudel C, Platzbecker U et al. Detection of relapse by sequential monitoring of chimerism in circulating CD34+ cells. *Ann Hematol* 2002; 81 Suppl 2: S27-8.
270. Thiede C, Kellermann T, Schwerdtfeger R, Baurmann H, Steudel C, Ehninger G, et al. Real-time PCR for the SRY-gene allows sensitive and quantitative chimerism analysis after allogeneic blood stem cell transplantation: clinical results in 43 patients. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31: S23–A181.
271. Thiele J, Wickenhauser C, Kvasnicka HM, Varus E, Schneider C, Müller H et al. Mixed chimerism of erythro- and megakaryopoiesis following allogeneic bone marrow transplantation. *Acta Haematol* 2003; 1094: 176-83.
272. Tischkowitz MD, Hodgson SV. Fanconi anaemia. *J Med Genet* 2003; 40: 1-10.
273. Trobaugh-Lotrario AD, Kletzel M, Quinones RR, McGavran L, Proytcheva MA, Hunger SP et al. Monosomy 7 associated with pediatric acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS): successful management by allogeneic hematopoietic stem cell transplant (HSCT). *Bone Marrow Transplant* 2005; 35: 143-9.
274. Vaitkevičienė G, Juškaitė, Tamulienė I, Rascon J, Ragelienė L, Savinas A. Salvage chemotherapy combined with donor lymphocyte infusion as successful treatment option for the relapse of acute myeloid leukaemia after allogeneic transplant in children. 30<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. 28-31 March 2004. Barcelona, Spain; S334.
275. van der Velden VH, Boeckx N, van Wering ER, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in acute leukemia. *J Biol Regul Homeost Agents* 2004; 18: 146-54.
276. Villaron EM, Almeida J, López-Holgado N, Alcoceba M, Sánchez-Abarca LI, Sanchez-Guijo FM et al. Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2004; 89: 1421-7.

277. Wagner JE, Eapen M, MacMillan ML, Harris RE, Pasquini R, Boulad F et al. Unrelated donor bone marrow transplantation for the treatment of Fanconi anemia. *Blood* 2007; 109: 2256-62.
278. Walters MC, Patience M, Leisenring W, Rogers ZR, Aquino VM, Buchanan GR et al.; Multicenter Investigation of Bone Marrow Transplantation for Sickle Cell Disease. Stable mixed hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation for sickle cell anemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7: 665-73.
279. Wan LP, Wang C, Yan SK, Li DQ, Qin YW, Xie KC. An analysis of leukocyte subsets chimerism following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2006; 45: 485-8.
280. Wang LJ, Chou P, Gonzalez-Ryan L, Huang W, Haut PR, Kletzel M. Evaluation of mixed hematopoietic chimerism in pediatric patients with leukemia after allogeneic stem cell transplantation by quantitative PCR analysis of variable number of tandem repeat and testis determination gene. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29: 51-6.
281. Watzinger F, Lion T, Steward C; Eurochimerism consortium. The RSD code: proposal for a nomenclature of allelic configurations in STR-PCR-based chimerism testing after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 2006; 20: 1448-52.
282. Wiesneth M, Schreiner T, Bunjes D, Bischof C, Erne E, Maccari B et al. Comparison of T-cell-depleted BMT and PBPCCT with respect to chimerism, graft rejection, and leukemic relapse. *J Hematother* 1999; 8: 269-74.
283. Willasch A, Hoelle W, Kreyenberg H, Niethammer D, Handgretinger R, Lang P et al. Outcome of allogeneic stem cell transplantation in children with non-malignant diseases. *Haematologica* 2006a; 91: 788-94.
284. Willasch A, Kreyenberg H, Reincke BS, Shayegi N, Klingebiel T, Bader P. Single nucleotide polymorphisms (SNP) in the quantitative real-time PCR as a highly sensitive marker for chimerism analyses in children with MDS and JMML after allogeneic stem cell transplantation. *Leuk Res* 2006b; 30: S7.

285. Willasch A, Schneider G, Reincke BS, Shayegi N, Kreyenberg H, Kuci S et al. Sequence polymorphism systems for quantitative real-time polymerase chain reaction to characterize hematopoietic chimerism-high informativity and sensitivity as well as excellent reproducibility and precision of measurement. *Lab Hematol* 2007; 13: 73-84.
286. Willemze AJ, Geskus RB, Noordijk EM, Kal HB, Egeler RM, Vossen JM. HLA-identical haematopoietic stem cell transplantation for acute leukaemia in children: less relapse with higher biologically effective dose of TBI. *Bone Marrow Transplant*. 2007; 40: 319-27.
287. Wilson DB, Michalski JM, Grossman WJ, Hayashi RJ. Isolated CNS relapse following stem cell transplantation for juvenile myelomonocytic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2003; 25: 910-3.
288. Wolff SN. Second hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of graft failure, graft rejection or relapse after allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29: 545-52.
289. Woodard P, Tong X, Richardson S, Srivastava DK, Horwitz EM, Benaim E et al. Etiology and outcome of graft failure in pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003; 25: 955-9.
290. Yam PI, Petz LD, Knowlton RG, Wallace RB, Stock AD, de Lange G et al. Use of DNA restriction fragment length polymorphisms to document marrow engraftment and mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation. *Transplantation* 1987; 43: 399-407.
291. Yen CC, Chen PM, Chiou TJ, Hsieh RK. Orthoclone OKT3 for graft failure after allogeneic bone marrow transplantation: a case report. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 1997; 59: 126-31.
292. Yoshimasu T, Tanaka R, Suenobu S, Yagasaki H, Yoshino H, Ueda T et al. Prompt and durable hematopoietic reconstitution by unrelated cord blood transplantation in a child with Fanconi anemia. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27: 767-9.
293. Yoshimi A, Niemeyer CM, Bohmer V, Duffner U, Strahm B, Kreyenberg H et al. Chimerism analyses and subsequent immunological intervention after

- stem cell transplantation in patients with juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2005a; 129: 542-9.
294. Yoshimi A, Bader P, Matthes-Martin S, Starý J, Sedlacek P, Duffner U et al.; European Working Group of MDS in Childhood (EWOG-MDS). Donor leukocyte infusion after hematopoietic stem cell transplantation in patients with juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia* 2005b; 19: 971-7.
295. Young NS, Alter BP. *Aplastic anemia: Acquired and Inherited*. Philadelphia, PA: Saunders; 1994.
296. Zecca M, Prete A, Rondelli R, Lanino E, Balduzzi A, Messina C et al.; AIEOP-BMT Group. Italian Association for Pediatric Hematology and Oncology-Bone Marrow Transplant. Chronic graft-versus-host disease in children: incidence, risk factors, and impact on outcome. *Blood* 2002; 100: 1192-200.
297. Zeiser R, Spyridonidis A, Wäsch R, Ihorst G, Grüllich C, Bertz H et al. Evaluation of immunomodulatory treatment based on conventional and lineage-specific chimerism analysis in patients with myeloid malignancies after myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Leukemia* 2005; 19: 814-21.
298. Zetterquist H, Mattsson J, Uzunel M, Nasman-Bjork I, Svenberg P, Tammik L et al. Mixed chimerism in the B cell lineage is a rapid and sensitive indicator of minimal residual disease in bone marrow transplant recipients with pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 843-51.
299. Zwaan CM, van Weel-Sipman MH, Fibbe WE, Oudshoorn M, Vossen JM. Unrelated donor bone marrow transplantation in Fanconi anaemia: the Leiden experience. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 447-53.

## **9. SPAUSDINTI DARBAI DISERTACIJOS TEMA**

### **9.1. STRAIPSNIAI LEIDINIUOSE, ĮRAŠYTUOSE Į MOKSLINĖS**

#### **INFORMACIJOS INSTITUTO (ISI) SĄRAŠĄ**

1. Nagy M, Rascon J, Massenkeil G, Ebell W, Roewer L. Evaluation of whole-genome amplification of low-copy-number DNA in chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation using STR marker typing. *Electrophoresis* 2006; 27: 3028-37.

### **9.2. STRAIPSNIAI LIETUVOS RECENZUOJAMUOSE PERIODINIUOSE**

#### **LEIDINIUOSE**

2. J.Rascon, L.Ragelienė, I.Nedzelskienė, W.Ebell, M.Nagy. Chimerizmo analizė atskirose ląstelių populiacijose po alogeninės kraujodaros kamieninių ląstelių transplantacijos vaikams. *Medicinos teorija ir praktika* 2008; 14: 140-51.
3. J.Rascon, D.Ambrasienė, G.Vaitkevičienė, R.Pasaulienė, I.Nedzelskienė, A.Savinas, L.Ragelienė. Chimerism analysis after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in Lithuanian children. *Acta medica lituanica* 2007; 14: 267-77.
4. J.Rascon, D.Ambrasienė, A.Savinas, L.Ragelienė, M.Nagy. Chimerizmo tyrimas DNR polimorfniais žymenimis po alogeninės kraujodaros kamieninių ląstelių transplantacijos. *Laboratorinė medicina* 2006; 2: 36-43.

## 10. PRIEDAI

### 10.1. LIGONIO TYRIMO ANKETA (1 PRIEDAS)

LIN						
Vardas, pavardė						
Diagnozė						
Remisija						
KKL šaltinis						
KKLT data						
Donoras						
Kondicionavimas						
<b>Chimerizmas</b>						
Mėginio paėmimo data	Diena po KKL	Donoro DNRProc.				Klinikinė eiga
		PKL	CD3	CD19	CD34	

**10.2. ASMENS INFORMAVIMO IR INFORMUOTO ASMENS SUTIKIMO FORMA  
(2 PRIEDAS)**

Jums žinoma, kad Jūsų sūnui/dukkrai ..... asmens kodas....., sergančiam/ai.....200..m.....d. atlikta alogeninė kraujodaros kamieninių ląstelių transplantacija. Po transplantacijos Jūsų sūnui/dukkrai (kaip ir visiems kitiems ligoniams po alogeninės transplantacijos) tiriamas chimerizmas (donoro ir recipiento ląstelių santykis), kuris atspindi ar persodintos donoro ląstelės prigijo.

Šiuo metu Vilniaus universiteto vaikų ligoninės Onkohematologijos skyriaus Kaulų čiulpų transplantacijos poskyryje bus atliekamas biomedicininis tyrimas „Chimerizmo kinetikos analizė po alogeninės kraujodaros kamieninių ląstelių transplantacijos vaikams”, kitap tariant, donoro ir recipiento ląstelių santykio kitimo po transplantacijos analizė. Šio tyrimo tikslas – išnagrinėti chimerizmą ir potransplantacinę eigą Lietuvos vaikams. Tyrimo metu planuojama retrospektyviai peržiūrėti vaikų, kuriems alogeninė transplantacija atlikta Lietuvoje, medicininius dokumentus. Ši analizė atliekama, rengiant disertacijos medžiagą.

Tyrimo metu bus peržiūrėtos visų vaikų iki 18 metų, kuriems alogeninė transplantacija atlikta Lietuvoje nuo 2002 vasario mėn. iki 2007 gruodžio 31 d., ligos istorijos. Jūsų sūnui/dukkrai nereikės asmeniškai dalyvauti tyrime. Jis/ji nepatirs jokių su tyrimu susijusių nepatogumų arba žalos. Šis tyrimas arba atsisakymas dalyvauti jame neturės įtakos Jūsų sūnaus/dukters įprastiniam gydymui. Sutikus dalyvauti, Jūsų sūnus/dukkra (Jūs) nepatirsite jokių išlaidų bei Jūsų sūnui/dukkrai (Jums) nebus siūloma jokia kompensacija už dalyvavimą tyrime. Visi ligos istorijų duomenys bus renkami anonimiškai, suteikiant kiekvienam ligoniui individualų kodą. Skelbiant tyrimo rezultatus, nebus galima atpažinti konkrečius asmenis. Visi surinkti duomenys bus griežtai saugomi pagrindinio tyrėjo ir nebus prieinami kitiems asmenims be ligonio/ės ir jo/jos tėvų (globėjų) sutikimo.

Iškilius neaiškumams dėl tyrimo ar ieškant su tyrimu susijusios papildomos informacijos, galite kreiptis į gydytoją vaikų hematologę Jeleną Rascon telefonu 852328703.

Aš (vardas, pavardė, giminystės ryšys su ligoniu/e)..... savo parašu patvirtinu, kad visa su biomedicininio tyrimu susijusi informacija man buvo paaiškinta suprantamai ir atsakyta į visus klausimus. Sutinku, kad mano sūnus/dukkra (įvaikis/įvaikė) dalyvautų aukščiau aprašytame biomediciniame tyrime.

Parašas.....

Data.....

Ligonis/ė (virš 14 metų).....

Parašas.....

Data.....

Pagrindinis tyrėjas Jelena Rascon, gydytoja vaikų hematologė

Parašas.....

Data.....

## 11. PADĖKA

Norėčiau nuoširdžiai padėkoti visiems tiems, be kurių šio darbo įgyvendinimas būtų neįmanomas:

- Vokietijos akademinė mainų tarnyba (Deutscher Akademischer Austausch Dienst) už suteiktą stipendiją doktorantūros studijoms Humboldto universitete (Berlynas) 2002-2003 metais, taip pat Vokietijos-Baltijos šalių gydytojų draugijai (Deutsch-baltische Ärztegesellschaft) už finansinę paramą, tęsiant darbą 2006 metais;
- Berlyno Humboldto universiteto Charité medicinos fakulteto Bendrosios pediatrijos klinikos vadovui prof. hab. dr. Gerhard Gaedicke, Vaikų kaulų čiulpų transplantacijos skyriaus vedėjui dr. Wolfram Ebell ir Teismo medicinos instituto DNR laboratorijos vedėjai dr. Marion Nagy už vadovavimą moksliniam darbui Vokietijoje;
- Vilniaus universiteto Pediatrijos centro direktoriui prof. Vytautui Usoniui, Vilniaus universiteto vaikų ligoninės Onkohematologijos centro vedėjai doc. Linai Ragelienei už visokeriopą paramą ir vadovavimą, tęsiant darbą Lietuvoje;
- Kauno medicinos universiteto Dantų ir burnos klinikos biostatistikei Irenai Nedzelskienei už pagalbą, taikant statistikos metodus rezultatų apdorojimui;
- Savo šeimai už jų begalinę kantrybę ir paramą visus tuos ilgus metus.