

بهبود بقا بیماران مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد فاقد HLA-A3/11 برای KIR3DL2 دهنده پس از پیوند سلول های بنیادی خونساز از خواهر یا برادر با HLA مشابه بدون تخلیه سلول T

فرهاد شاهسوار^۱، کبری انتظامی^۲، کامران علی مقدم^۳

۱-استادیار گروه ایمنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان

۲-دانشیار گروه ایمنولوژی، پردیس همت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳-دانشیار مرکز هماتولوژی-انکولوژی و پیوند سلول های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

یافته / دوره سیزدهم / شماره ۲ / تابستان ۹۰ / مسلسل ۴۸

چکیده

دریافت مقاله: ۹۰/۱/۲۲، پذیرش مقاله: ۹۰/۱۲/۱۴

*** مقدمه:** یک عامل بالقوه تاثیر گذار بر نتیجه پیوند سلول های بنیادی خونساز (HSCT) حضور سلول های کشنده طبیعی (NK) آلوری اکتیو مشتق از دهنده است. در این آنالیز گذشته نگر می توان تاثیر آلوری اکتیویته NK بر اساس فقدان لیگاند KIR را بر روی بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد (AML) یا لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) تحت HSCT از خواهر یا برادر با HLA مشابه بدون تخلیه سلول T مطالعه نمود.

*** مواد و روش ها:** در کل ۷۸ بیمار، شامل ۴۰ بیمار مبتلا به AML و ۳۸ بیمار مبتلا به ALL مطالعه شدند. تقریباً تمام بیماران یک رژیم یکسان آماده سازی ریشه کن کننده مغزاستخوان و پیشگیری کننده GVHD را دریافت کرده بودند. تمام افراد برای ژن های KIR و لیگاندهای HLA به روش واکنش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی توالی (PCR-SSP) تعیین ژنوتیپ گردیدند.

*** یافته ها:** فقدان لیگاند KIR بدون HLA-A3/11 تأثیری بر روی بقا بدون بیماری (DFS)، بقا کلی (OS) یا عود در بیماران دریافت کننده پیوند به دلیل AML یا ALL نداشت. باین وجود، فقدان لیگاند KIR با HLA-A3/11 به طور معنی داری بر DFS ($P=0/04$) و OS ($P=0/02$) موثر بود.

*** بحث و نتیجه گیری:** این نتایج نشان می دهد که فقدان لیگاند HLA کلاس یک در گیرنده برای KIR مهاری دهنده می تواند یک فاکتور پیشگویی کننده برای نتایج پیوند در پیوند سلول های بنیادی خونساز از خواهر یا برادر با HLA مشابه بدون تخلیه سلول T باشد و این که فقدان HLA-A3/11 برای KIR3DL2 دهنده ممکن است به بهبود بقا در بیماران مبتلا به ALL کمک نماید.

*** واژه های کلیدی:** سلول NK، فقدان لیگاند KIR، لوسمی، پیوند سلول های بنیادی خونساز

آدرس مکاتبه: خرم آباد، کیلومتر ۳ جاده خرم آباد-بروجرد، پردیس دانشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان

پست الکترونیک: shahsavarfarhad@yahoo.com

مقدمه

پیوند سلول‌های بنیادی خونساز (Hematopoietic Stem Cells Transplantation, HSCT) آلونژنیک درمان با ارزشی برای لوسمی‌های حاد مقاوم به درمان، لوسمی‌های با خطر بالای عود، سندرم‌های میلو دیس پلاستیک (Myelodysplastic Syndromes, MDS) و لوسمی‌های میلوئیدی مزمن است. نتیجه HSCT به عوامل متعددی از جمله مرحله بیماری، میزان تشابه آنتی‌ژن لکوسیتی انسان (Human Leukocyte Antigen, HLA) بین دهنده و گیرنده، رژیم آماده‌سازی و وقوع بیماری پیوند علیه میزبان (Graft Versus Host Disease, GVHD) بستگی دارد. مطالعات اخیر نشان داده است که یکی دیگر از عوامل بالقوه تأثیر گذار بر نتیجه پیوند حضور سلول‌های کشنده طبیعی (Natural Killer, NK) آلوری اکتیو مشتق از دهنده است (۲،۱).

سلول‌های NK، لنفوسیت‌های مشتق از مغز استخوان هستند که قادر به میانجیگری در اوایل پاسخ‌های ایمنی ذاتی به سلول‌های آلوده به ویروس و سلول‌های بدخیم تغییر شکل یافته می‌باشند (۴،۳). سلول‌های NK، به عنوان اولین زیرگروه‌های لنفوسیتی جایگزین شونده خون محیطی پس از HSCT آلونژنیک (۵-۷)، در سرکوب GVHD، پیشبرد پیوند خوردگی مغز استخوان (۸-۱۱) و ایجاد اثر ضد لوسمی پیوند (۱۳،۱۲) درگیر می‌باشند.

در پیوند ها بین دهندگان و گیرندگان با HLA نیمه متشابه، مشاهده شده است که اگر ناسازگاری HLA کلاس I فقدان لیگاند را برای پذیرنده شبه ایمونوگلوبولینی سلول کشنده (Killer-cell immunoglobulin-like receptor, KIR) مهار می‌دهد. پیش بینی نماید سلول‌های NK دهنده در مواجهه با سلول‌های هدف گیرنده فاقد آل HLA کلاس I می‌تواند اثرات ضد لوسمی را در لوسمی‌های میلوئیدی میانجیگری کنند. این اثرات ضد لوسمی، شامل میزان کمتر عود، رد پیوند و GVHD است که در نهایت به

افزایش بقا کلی (Overall Survival, OS) منجر می‌گردد (۲،۱). با توجه به ناسازگاری لیگاند KIR دهنده و گیرنده به عنوان مبنایی برای واکنش‌های آلونژنیک سلول‌های NK در پیوندها با HLA نیمه متشابه، مطالعات متعددی از کاربرد انتخاب دهندگان برای برخی از بدخیمی‌های میلوئیدی بر اساس ناسازگاری لیگاند KIR در جهت GVH حمایت کرده است (۱۴،۱۳)، ولی سایر مطالعات بررسی ارزش ناسازگاری لیگاند KIR در پیوند، نتایج متناقضی را نشان داده است (۱۵-۱۸).

همان‌طور که گفته شد، واکنش آلونژنیک سلول‌های NK در ابتدا به عنوان ناسازگاری لیگاندهای KIR بین دهنده و گیرنده (مدل لیگاند- لیگاند یا ناسازگاری لیگاند) تعریف شد (۲،۱)، ولی از آنجا که ژن‌های KIR و HLA بر روی کروموزوم‌های مختلف قرار گرفته‌اند و به‌طور جداگانه به ارث می‌رسند، واکنش آلونژنیک سلول‌های NK می‌تواند در زوج‌های برادر و خواهر با HLA مشابه نیز مشاهده شود. بنابراین، یافته منطقی این است که در پیش‌بینی واکنش آلونژنیک سلول‌های NK نیاز به تکیه بر ناسازگاری HLA بین دهنده و گیرنده نیست، بلکه به جای آن فقدان لیگاند در گیرنده، سناریویی است که می‌تواند به آسانی حتی در پیوند‌های آلونژنیک با HLA مشابه یافت شود (مدل پذیرنده- لیگاند یا فقدان لیگاند) (۲۱-۱۸). در مطالعات اندک بررسی مفهوم ناسازگاری لیگاند KIR در پیوندها بین خواهر و برادر با HLA مشابه نیز مانند پیوندهای نیمه متشابه نتایج مغایری حاصل شده است (۲۲).

عدم یکنواختی در پروتکل‌های پیوند در مراکز درمانی مختلف شامل نوع و مرحله بیماری، منابع پیوند، استفاده از گلوبولین ضد تیموسیت (Anti-thymocyte Globulin, ATG) قبل از پیوند و میزان تخلیه سلول T در ایجاد نتایج متناقض نقش داشته است (۲۳). با توجه به این موضوع از یک سو و انجام HSCT در ایران غالباً به صورت پیوند بین خواهر و برادر با HLA یکسان از سوی دیگر، تصمیم گرفته شد که تأثیر ناسازگاری KIR-HLA در نتیجه

کیفیت و کمیت DNA ها توسط اسپکتروفتومتر UV مشخص گردید. اطلاعات بالینی با مروری بر اطلاعات ارائه شده در مرکز پیوند و استفاده از سوابق پزشکی به دست آمد.

تعیین ژنوتیپ نمونه های DNA برای فقدان یا وجود ۱۶ ژن KIR شامل 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 3DS1, 3DS2, 3DS3, 3DS4, 3DS5, 3DP1 و 3DP2 و ۳ لیگاند HLA کلاس یک (C1, C2 و Bw4) توسط روش واکنش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی توالی (Polymerase Chain Reaction-PCR-SSP) Sequence Specific Primers که قبلاً شرح داده شده است (۲۵،۲۶) صورت گرفت. HLA-A3/11 نیز با بررسی نتایج تعیین HLA کلاس یک به روش سرولوژیک موجود در سوابق پزشکی افراد به دست آمد.

زوج های دهنده و گیرنده بسته به فقدان یا وجود لیگاند HLA

گیرنده برای KIR مهار دهنده به دو گروه تقسیم شدند. تعیین ژنوتیپ KIR برای دهنده فقدان یا وجود KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3 و KIR3DL1 را مشخص کرد. آلل های HLA-A, HLA-B و HLA-C گیرنده توسط روش تعیین HLA از روی DNA با درجه تفکیک پایین، مشخص و به گروه های اپی توپی، HLA-C1 (HLA-C Asn80), HLA-C2, HLA-B Bw4 (HLA-C Lys80) و HLA-Bw4 (HLA-B Bw4 Thr80) تقسیم شدند. وجود لیگاند KIR به عنوان وجود اپی توپ های HLA گیرنده برای KIR های مهار دهنده تعریف گردید و فقدان لیگاند KIR به عنوان عدم وجود یک یا بیشتر اپی توپ های HLA گیرنده برای KIR های مهار دهنده تعریف شد. به این ترتیب، بیماران فاقد آلل های HLA-Bw4، اگر ژنوتیپ دهنده شامل KIR3DL1 بود، به عنوان فاقد لیگاند برای KIR3DL1 در نظر گرفته شدند. اگر ژنوتیپ دهنده شامل KIR3DL1 نبود بیمار بدون در نظر گرفتن ژنوتیپ،

پیوندهای بین خواهر و برادر با HLA مشابه در ایران تحت مطالعه قرار گیرد. ضمناً، این مطالعه به عنوان یک مطالعه کاربردی می تواند در صورت حصول نتیجه مطلوب جهت پیش بینی نتیجه پیوند مورد استفاده قرار گیرد. بنابراین، هدف از این مطالعه، آزمون این فرضیه است که گیرندگان پیوند برادر و خواهر با HLA مشابه که فاقد لیگندهای HLA برای KIR مهار دهنده هستند در نتیجه پیوند اختلاف دارند. در این مطالعه گذشته نگر، نتایج بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد (Acute myeloid leukemia, AML) یا لوسمی لنفوبلاستیک حاد (Acute lymphoblastic leukemia, ALL) را که پیوند های بدون تخلیه سلول T از دهندگان برادر و خواهر با HLA یکسان دریافت کرده و بر اساس فقدان یا وجود لیگندهای HLA گیرنده برای KIR مهار دهنده گروه بندی شده بودند، آنالیز شد.

مواد و روش ها

هیئت مورد مرکز پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی تهران استفاده از نمونه های بیماران را برای این مطالعه تصویب کرد. تمام نمونه ها با اجازه کتبی از بیماران یا قیم قانونی آنها جمع آوری شده بود. ۷۸ بیمار شامل ۴۰ بیمار مبتلا به AML (۲۵ بیمار مذکر و ۱۵ بیمار مونث با محدوده سنی ۱۱ تا ۴۶ سال) و ۳۸ بیمار مبتلا به ALL (۲۸ بیمار مذکر و ۱۰ بیمار مونث با محدوده سنی ۱۳ تا ۳۳ سال) که HSCT بدون تخلیه سلول های T از خواهر یا برادر با HLA یکسان بین سال های ۲۰۰۴ تا ۲۰۰۶ دریافت کرده بودند در این مطالعه گنجانده شدند.

دهندگان خواهر یا برادر بر اساس تعیین ژنومی لوکوس های HLA کلاس I و II انتخاب شده و یکسان بودن HLA تمامی زوج های دهنده و گیرنده تایید شده بود. DNA های دهندگان و گیرندگان از خون محیطی کامل آنها با استفاده از روش استاندارد salting out استخراج شده بودند (۲۴). این DNA ها برای تعیین HLA پیش از پیوند استفاده و سپس در °C ۲۰- ذخیره شده بودند.

فاقد لیگاند HLA-Bw4 در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل های مشابه ای برای بیماران با اپی توپ های HLA-C و KIR مهاری دهنده پیوند انجام گرفت. در یک آنالیز دیگر، علاوه بر فقدان لیگاندهای فوق، فقدان لیگاند HLA-A3/11 گیرنده برای KIR3DL2 دهنده نیز در نظر گرفته شد.

خصوصیات دهندگان و گیرندگان پیوند و جزئیات روش پیوند شامل رژیم آماده سازی، منبع سلول های بنیادی خونساز و پروفیلاکسی GVHD بودند. ۷۶ بیمار رژیم آماده سازی استاندارد بوسولفان/سیکلو فسفامید را دریافت کرده بودند. یک بیمار AML رژیم بوسولفان/فلودارابین و یک بیمار ALL رژیم فلودارابین/ملفalan را گرفته بود. ضمناً، هیچ یک از بیماران در طی رژیم آماده سازی تابش کل بدن و ATG دریافت نکرده بودند. در ۷۷ بیمار سلول های بنیادی خون محیطی و در یک بیمار ALL مغز استخوان به عنوان منبع سلول های بنیادی خونساز بدون تخلیه سلول های T استفاده شده بود. ۷۷ بیمار برای پروفیلاکسی GVHD، سیکلوسپورین و متوترکسات را پس از پیوند دریافت کرده بودند. یک بیمار AML فقط سیکلوسپورین را گرفته بود.

بقا کلی (OS) از فاصله زمانی بین پیوند تا مرگ (به هر علت مربوط به پیوند) محاسبه شد. بقا بدون بیماری (Disease-free Survival, DFS) از فاصله زمانی بین پیوند تا عود یا مرگ (در مرحله خاموشی) محاسبه گردید. عود توسط شواهد مورفولوژیک یا سیتوژنتیک در خون محیطی یا مغز استخوان تعریف گردید. GVHD حاد با توجه به معیارهای گزارش شده قبلی در بیمارانی که ۷ روز پس از پیوند زنده مانده بودند تشخیص و درجه بندی شد (۲۷). در این مطالعه OS، DFS و عود به عنوان نتایج پیوند ارزیابی گردید. عامل مرتبط با ژنوتیپ KIR و لیگاند HLA یعنی فقدان لیگاند KIR و عوامل بالینی شامل جنس، سن و وضعیت سرولوژیک CMV دهنده و گیرنده، مرحله بیماری در هنگام

HSCT و GVHD حاد برای بررسی اثر بر روی نتایج پیوند مورد ارزیابی قرار گرفت.

احتمالات OS و DFS با استفاده از روش کاپلان مایر تخمین زده شد، در حالی که میزان عود با توجه به خطر رقابتی مرگ به صورت بروز تجمعی محاسبه شد (۲۸). آزمون Log-rank برای ارزیابی اثرات تک متغیره عامل مرتبط با ژنوتیپ KIR و لیگاند HLA و عوامل بالینی بر روی OS و DFS و آزمون Gray برای ارزیابی اثرات تک متغیره این عوامل بر روی عود استفاده گردید (۲۹). در نهایت متغیرها با $p \leq 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها

نمونه‌های DNA از زوج های دهنده و گیرنده متحمل HSCT از خواهر یا برادر با HLA مشابه برای تعیین ژن های KIR و HLA تحت ارزیابی قرار گرفت. تعیین ژنوتیپ KIR ۷۸ دهنده نشان داد که ۹۷/۴٪ آنان برای KIR2DL1 و ۹۴/۹٪ آنان برای KIR3DL1 مثبت بودند. علاوه بر این، ۵۵/۱٪ برای KIR2DL2 و ۹۱٪ برای KIR2DL3 و ۱۰۰٪ برای KIR2DL2/3 مثبت شدند.

همچنین مشاهده شد که ۹۲/۳٪ دهندگان دارای KIR های مهاری برای هر یک از سه لیگاند شناخته شده HLA کلاس I هستند. به طور کلی فراوانی ژن های KIR دهندگان با فراوانی های مشاهده شده در جمعیت های سالم ایرانی (۲۵) مشابه بودند. مقایسه فراوانی ژن های KIR و لیگاندهای HLA گیرندگان با فراوانی های مشاهده شده در جمعیت های سالم ایرانی (۲۶) نیز در جایی دیگر منتشر شده است (۳۰).

تعیین ژنوتیپ HLA نشان داد که با در نظر گرفتن سه لیگاند KIR، ۴۰ زوج دهنده و گیرنده (۵۱/۳٪) فاقد لیگاند KIR گیرنده برای KIR دهنده هستند. در میان ۴۰ زوج فاقد لیگاند KIR، ۱۴ زوج فاقد آلل های گروه HLA-C1 گیرنده برای KIR2DL2/3 دهنده، ۱۳ زوج فاقد آلل های گروه HLA-C2 گیرنده برای

KIR2DL1 دهنده، ۵ زوج فاقد آلل های HLA-Bw4 گیرنده برای KIR2DL1 دهنده و ۸ زوج فاقد بیش از یک لیگاند در گیرنده برای KIR های مربوطه دهنده بودند.

همچنین، تعیین ژنوتیپ HLA نشان داد که با در نظر گرفتن چهار لیگاند KIR، ۶۵ زوج دهنده و گیرنده (۸۳/۳٪) فاقد لیگاند KIR گیرنده برای KIR دهنده هستند. در میان ۶۵ زوج فاقد لیگاند KIR، ۳ زوج فاقد آلل های گروه HLA-C1 گیرنده برای KIR2DL2/3 دهنده، ۵ زوج فاقد آلل های گروه HLA-C2 گیرنده برای KIR2DL1 دهنده، ۲ زوج فاقد آلل های HLA-Bw4 گیرنده برای KIR2DL1 دهنده، ۲۵ زوج فاقد آلل های HLA-A3/11 گیرنده برای KIR3DL2 و ۳۰ زوج فاقد بیش از یک لیگاند در گیرنده برای KIR های مربوطه دهنده بودند.

در این مطالعه، ابتدا زوج های دهنده و گیرنده بر اساس فقدان یا وجود سه لیگاند KIR به دو گروه تقسیم شده و از نظر نتایج پیوند با یکدیگر مقایسه شدند. این گروه ها هیچ اختلافی را در نتایج پیوند نشان ندادند (جدول ۱).

در این مطالعه، همچنین زوج های دهنده و گیرنده بر اساس فقدان یا وجود چهار لیگاند KIR به دو گروه تقسیم شده و از نظر نتایج پیوند با یکدیگر مقایسه شدند. این گروه ها هیچ اختلافی را در OS و عود نشان ندادند. ولی در بیماران ALL فاقد حداقل یکی از لیگاندهای KIR در مقایسه با بیماران ALL دارای هر چهار لیگاند KIR احتمال DFS ۲ ساله بالاتر بود (۲۹/۱۸ در مقابل ۹/۲) (جدول ۲). DFS ۲ ساله برای بیماران ALL فاقد حداقل یکی از لیگاندهای KIR ۶۰٪ و برای بیماران ALL دارای هر چهار لیگاند KIR ۲۰٪ به دست آمد ($p=0.04$) (شکل ۱).

جدول ۱- تأثیر فقدان لیگاند KIR بدون HLA-A3/11 بر نتیجه HSCT از خواهر یا برادر با HLA یکسان به تفکیک نوع بیماری

بقا کلی		بقا بدون بیماری		عود	
p تعیین شده توسط آزمون Log-rank		p تعیین شده توسط آزمون Log-rank		p تعیین شده توسط آزمون Gray	
ALL	AML	ALL	AML	ALL	AML
۰/۱۷۹	۰/۶۰۴	۰/۷۲۵	۰/۸۸۸	۰/۴۵۱	۰/۵۹۷
۰/۸۱	۰/۱۳۲	۰/۴۳۴	۰/۲	۰/۴۴۹	۰/۹۰۲
۰/۴۳۶	۰/۸۳۵	۰/۳۸۴	۰/۴۵۳	۰/۹۴۸	۰/۹۴۷
۰/۲۳۷	۰/۲۷۳	۰/۱۸۲	۰/۱۴	۰/۳۹۲	۰/۱۷۲

جدول ۲- تأثیر فقدان لیگاند KIR با HLA-A3/11 بر نتیجه HSCT از خواهر یا برادر با HLA یکسان به تفکیک نوع بیماری

بقا کلی		بقا بدون بیماری		عود	
p تعیین شده توسط آزمون Log-rank		p تعیین شده توسط آزمون Log-rank		p تعیین شده توسط آزمون Gray	
ALL	AML	ALL	AML	ALL	AML
۰/۵۴	۰/۰۶	۰/۷۸۶	۰/۰۴*	۰/۲۶۹	۰/۴۱۱
۰/۸۱	۰/۱۳۲	۰/۴۳۴	۰/۲	۰/۴۴۹	۰/۹۰۲
۰/۴۳۶	۰/۸۳۵	۰/۳۸۴	۰/۴۵۳	۰/۹۴۸	۰/۹۴۷
۰/۲۳۷	۰/۲۷۳	۰/۱۸۲	۰/۱۴	۰/۳۹۲	۰/۱۷۲
۰/۸۵۹	۰/۰۲*	۰/۸۸۱	۰/۰۶	۰/۴۰۷	۰/۷۷۲

* از نظر آماری معنی دار ($p \leq 0.05$)

متغیره آنالیز شدند (فقدان یا وجود هر یک از لیگاندهای KIR)، هیچ اثری بر نتایج پیوند مشاهده نگردید (جدول ۱).

همچنین، هنگامی که تأثیر فقدان یا وجود HLA-A3/11 گیرنده برای KIR3DL2 دهنده نیز بر نتایج پیوند به صورت تک متغیره آنالیز گردید این گروه ها هیچ اختلافی را در DFS و عود نشان ندادند. ولی در بیماران ALL فاقد HLA-A3/11 برای KIR3DL2 دهنده در مقایسه با بیماران ALL دارای HLA-A3/11 برای KIR3DL2 دهنده احتمال OS ۲ ساله بالاتر بود (۲۴/۱۶ در مقابل ۱۴/۸) (جدول ۲). OS ۲ ساله برای بیماران ALL فاقد HLA-A3/11 گیرنده برای KIR3DL2 دهنده ۸۰٪ و برای بیماران ALL دارای HLA-A3/11 گیرنده برای KIR3DL2 دهنده ۴۰٪ به دست آمد ($p=0.02$) (شکل ۲).

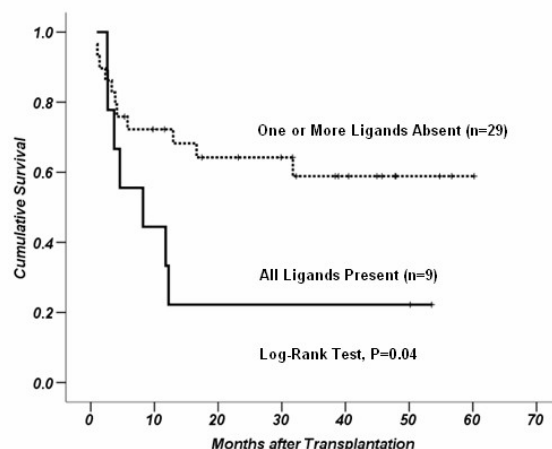
تأثیر سن بر نتیجه HSCT از خواهر یا برادر با HLA

مشابه: برای تعیین تأثیر سن بر نتیجه پیوند، ابتدا زوج های دهنده و گیرنده بر اساس سن گیرنده در هنگام پیوند به دو گروه (کمتر از ۱۸ سال و مساوی یا بیشتر از ۱۸ سال) تقسیم شده و از نظر نتایج پیوند با یکدیگر مقایسه شدند. در این گروه ها هیچ اختلافی در نتایج پیوند مشاهده نگردید.

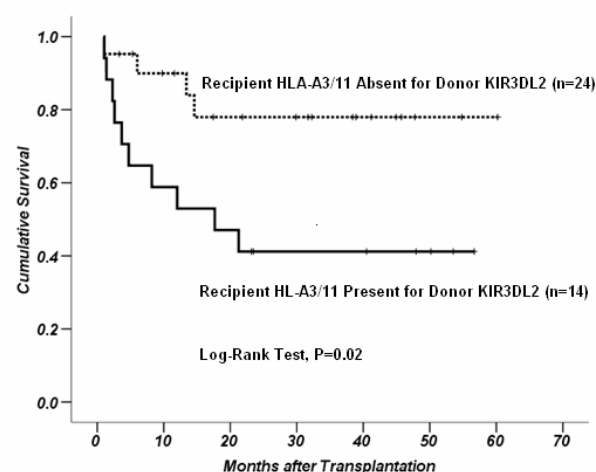
تأثیر جنس گیرنده و دهنده بر نتیجه HSCT از خواهر یا برادر با HLA مشابه: در این مطالعه، ابتدا زوج های پیوندی بر اساس جنس گیرنده و دهنده به چهار گروه (مذکر/مذکر، مذکر/مونث، مونث/مذکر و مونث/مونث) تقسیم شده و از نظر نتایج پیوند با یکدیگر مقایسه شدند. در این گروه ها هیچ اختلافی در نتایج پیوند مشاهده نشد.

تأثیر وضعیت CMV گیرنده و دهنده بر نتیجه HSCT

از خواهر یا برادر با HLA مشابه: سلول های NK با استفاده از پذیرنده های مهارى و فعال کنندگی سطحی خود که پاسخ های این سلول ها را تنظیم می کنند واسطه ایمنی ذاتی علیه ویروس ها می



شکل ۱- DFS دو ساله بیماران ALL فاقد حداقل یکی از لیگاندهای KIR و بیماران ALL دارای هر چهار لیگاند KIR



شکل ۲- OS دو ساله بیماران ALL فاقد HLA-A3/11 برای KIR3DL2 دهنده و بیماران ALL دارای HLA-A3/11 برای KIR3DL2 دهنده.

هنگامی که فقدان هر یک از سه لیگاند KIR (فقدان گروه HLA-C1 گیرنده برای KIR2DL2/3 دهنده، فقدان گروه HLA-C2 گیرنده برای KIR2DL1 دهنده و فقدان گروه HLA-Bw4 گیرنده برای KIR3DL1 دهنده) به صورت تک

مختلفی در بیماران تحت پیوند سلول های بنیادی آلوژنیک همراه شده است (۱۸،۱۴،۲،۱،۳۲). مدل ناسازگاری لیگاند KIR، واکنش آلوژنیک سلول NK دهنده ناشی از KIR های مهاری را در وضعیتی پیش بینی می نماید که در آن اختلاف HLA بین دهنندگان و گیرندگان معیاری از "فقدان خودی" تلقی می گردد (۳۳،۲،۱). از آنجایی که ژنوتیپ های KIR و HLA به طور مستقل از یکدیگر به ارث می رسند، این امکان وجود دارد که سلول های KIR NK هایی را بیان کنند که برای آنها لیگاند HLA ندارند و یا برعکس، لیگاندهایی از HLA را بیان کنند که برای آنها KIR ندارند. بنابراین، در پیش بینی واکنش آلوژنیک سلول NK نیاز به ناسازگاری HLA بین دهنده و گیرنده نیست، بلکه به جای آن فقدان لیگاند در گیرنده می تواند حتی در پیوند های آلوژنیک با HLA مشابه نیز یافت شود (۲۱-۱۸). البته واکنش آلوژنیک سلول NK متعاقب HSCT به عوامل دیگری از جمله نوع بیماری، مرحله بیماری، منبع سلول های بنیادی، وجود سلول های T و احتمالاً سرکوب های ایمنی استفاده شده برای پروفیلاکسی GVHD یا درمان نیز بستگی دارد (۲۲).

یک مطالعه مرجع در زمینه ناسازگاری لیگاند KIR در HSCT از خواهر یا برادر با HLA مشابه مطالعه Hsu و همکاران (۲۰) می باشد که در آن از پیوند سلول های بنیادی خونساز از منبع مغز استخوان با تخلیه سلول های T و رژیم آماده سازی تابش کل بدن/شیمی درمانی استفاده گردیده است. در آن مطالعه فقدان لیگاند KIR بدون HLA-A3/11 در گیرنده برای KIR دهنده با افزایش OS و DFS و بهبود معنی دار عود در بیماران AML و MDS مرتبط بود. در این مطالعه گذشته نگر که برای اولین بار در جمعیت بیمار ایران صورت گرفت، هدف اصلی آزمودن فرضیه ناسازگاری لیگاند KIR در HSCT از خواهر یا برادر با HLA مشابه بود زیرا این نوع پیوند از یک سو عمده ترین نوع پیوند در ایران است و از سوی دیگر در سراسر دنیا در این زمینه کمتر مطالعه بر روی آن صورت گرفته است. بیماران این مطالعه عمدتاً پیوند

باشند. بنابراین ممکن است که با ورود بافت آلوده به CMV سلول های NK از طریق پذیرنده های سطحی خود که محصولات ویروسی یا استرس سلولی را حس می کنند فعال شده و بر نتیجه پیوند تاثیر گذارند. بنابراین در این مطالعه برای تعیین تاثیر وضعیت CMV گیرنده و دهنده بر نتیجه پیوند، ابتدا زوج های پیوندی بر اساس وضعیت CMV به چهار گروه (مثبت/مثبت، مثبت/منفی، منفی/منفی و منفی/منفی) تقسیم شده و از نظر نتایج پیوند با یکدیگر مقایسه شدند. این گروه ها هیچ اختلافی در نتایج پیوند نداشتند.

تأثیر وضعیت بیماری بر نتیجه HSCT از خواهر یا برادر

با HLA مشابه: در این مطالعه، ابتدا زوج های پیوندی بر اساس وضعیت بیماری به هنگام پیوند به پنج گروه (خاموشی کامل اول، خاموشی کامل دوم، خاموشی کامل سوم یا بیشتر، لاعلاج و عود) تقسیم شدند ولی چون اغلب بیماران در خاموشی کامل اول پیوند گرفته بودند و تعداد بیماران پیوند شده در سایر وضعیت ها کم بود به ناچار گروه اول با سایر گروه ها از نظر نتایج پیوند مقایسه گردید. آنالیز تک متغیره نشان داد که پیوندهای انجام شده در خاموشی کامل اول در مقایسه با پیوندهای انجام شده در سایر وضعیت ها تفاوتی در نتایج پیوند نداشتند.

تأثیر GVHD حاد بر نتیجه HSCT از خواهر یا برادر با

HLA مشابه: برای تعیین تأثیر GVHD حاد بر نتیجه پیوند، ابتدا زوج های دهنده و گیرنده بر اساس وقوع یا عدم وقوع GVHD حاد به دو گروه تقسیم شده و از نظر نتایج پیوند با یکدیگر مقایسه شدند. آنالیز تک متغیره نشان داد که وقوع GVHD حاد با هیچ یک از نتایج پیوند مرتبط نبود.

بحث و نتیجه گیری

اگرچه "فرضیه فقدان خودی" مطرح شده توسط Karre و همکاران (۳۱) بیش از دو دهه قبل تنظیم فعال شدن سلول NK از طریق پذیرنده های مهاری آن را شرح داد، ولی آزمودن آن با نتایج

سلول های بنیادی خونساز از منبع خون محیطی بدون تخلیه سلول های T، رژیم آماده سازی استاندارد تخریب کننده مغزاستخوان و پروفیلاکسی GVHD یکسان دریافت کرده بودند. در این مطالعه مشاهده شد که بیش از ۵۰ درصد از زوج های دهنده و گیرنده با HLA مشابه فاقد حداقل یکی از سه لیگاند KIR گیرنده برای KIR دهنده بودند، ولی بر خلاف مطالعات قبلی (۳۴،۲۰،۱۴،۲،۱) فقدان لیگاند KIR بدون HLA-A3/11 تأثیری بر نتایج پیوند شامل OS، DFS و عود در بیماران نداشت. مسئله کلیدی در توضیح تفاوت های بین مطالعات ناسازگاری لیگاند KIR در HSCT می تواند تخلیه سلول های T پیوند یا استفاده از ATG در جریان رژیم آماده سازی یا پروفیلاکسی GVHD باشد. در واقع، تمام مطالعات گزارش شده که اثرات سودمند ناسازگاری لیگاند KIR را بر روی عود و بقا نشان داده اند آنهایی هستند که از تخلیه سلول های T دهنده به وسیله گزینش سلول های $CD34^+$ و حذف سلول های $T CD3^+$ با استفاده از آنتی بادی منوکلونال (۳۴،۲۰،۱۴،۲،۱) یا ATG (۱۴) سود برده اند. مشابه برخی مطالعات دیگر (۳۶،۳۵)، در مطالعه حاضر عدم تخلیه سلول های T پیوند، احتمالاً با ایجاد واکنش آلورژیک سلول T از بروز واکنش آلورژیک سلول NK ناشی از فقدان لیگاند KIR بدون HLA-A3/11 جلوگیری نموده است. بنابراین یکنواختی در پروتکل های درمانی ممکن است تفاوت های ناشی از درمان را در مطالعات تأثیر فقدان لیگاند KIR بر نتیجه HSCT مرتفع سازد. در این مطالعه، هنگامی که علاوه بر فقدان سه لیگاند KIR تأثیر فقدان یا وجود HLA-A3/11 گیرنده برای KIR3DL2 دهنده نیز بر نتایج پیوند آنالیز گردید مشخص شد که فقدان لیگاند KIR و به ویژه فقدان HLA-A3/11 در گیرنده با بهبود بقا در بیماران ALL تحت HSCT بدون تخلیه سلول T همراه است.

این یافته بر خلاف مطالعات قبلی بود که تأثیر ناسازگاری یا فقدان لیگاند KIR را در بیماران AML تحت HSCT با تخلیه سلول T یافته بودند (۲۰،۲،۱). از یک سو علت این اختلاف ممکن است این باشد که در مطالعات قبلی، مشابه قسمت اول مطالعه ما، اغلب تأثیر فقدان لیگاند KIR بدون HLA-A3/11 بر نتایج پیوند بررسی شده و تأثیر فقدان HLA-A3/11 بر نتایج پیوند نادیده گرفته شده است.

همان طور که در مطالعات اولیه در این زمینه تنها تأثیر فقدان دو لیگاند KIR بر نتایج پیوند بررسی شده اند (۳۲). بنابراین، قابل تصور است که در آینده با مشخص شدن بیشتر لیگاندهای KIR باز هم نتایج مغایری حاصل گردد. از سوی دیگر، اگرچه مطالعات قبلی نشان داده اند که سلول های ALL در شرایط *In vitro* به لیز توسط سلول های NK آلوری اکتیو مقاوم می باشند (۳۷،۲) ولی یک مطالعه اخیر دیگر نیز اثرات مفید آلوری اکتیویته سلول های NK را در بهبود بقا اطفال مبتلا به ALL تحت HSCT نیمه متشابه نشان داده است (۳۸).

در مجموع، فقدان HLA-A3/11 در گیرنده پیوند می تواند بقا بیشتر را در بیماران ALL تحت HSCT بدون تخلیه سلول T پیش بینی نماید. با این حال، این مطالعه یک مطالعه مقدماتی بوده و برای تأیید نتایج آن به مطالعه ای در ابعاد وسیع تر نیاز می باشد.

References

1. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*.1999;94:333-339
2. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*.2002;295:2097-2100
3. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol*.1989;47:187-376
4. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol*.1999;17:189-220
5. Inoue H, Yasuda Y, Hattori K, Shimizu T, Matsumoto M, Yabe M et al. The kinetics of immune reconstitution after cord blood transplantation and selected CD34⁺ stem cell transplantation in children: comparison with bone marrow transplantation. *Int J Hematol*.2003;77:399-407
6. Small TN, Avigan D, Dupont B, Smith K, Black P, Heller G et al. Immune reconstitution following T-cell depleted bone marrow transplantation: effect of age and posttransplant graft rejection prophylaxis. *Biol Blood Marrow Transplant*.1997;3:65-67
7. Small TN, Papadopoulos EB, Boulad F, Black P, Castro-Malaspina H, Childs BH et al. Comparison of immune reconstitution after unrelated and related T-cell depleted bone marrow transplantation: effect of patient age and donor leukocyte infusions. *Blood*.1999;93:467-480
8. Tanaka J, Tutumi Y, Mori A, Ohta S, Kobayashi S, Asaka M et al. Sequential analysis of HLA-C specific killer cell inhibitory receptor (CD158b) expressing peripheral blood mononuclear cells during chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*.2000;26:287-290
9. Tanaka J, Mori A, Ohta S, Yamamoto Y, Kobayashi S, Hashino S et al. Expression of HLA-C-specific natural killer cell receptors (CD158a and CD158b) on peripheral blood mononuclear cells after allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol*.2000;108:778-783
10. Bornhauser M, Thiede C, Brendel C, Geissler G, Oelschlagel U, Neubauer A et al. Stable engraftment after megadose blood stem cell transplantation across the HLA barrier: the case for natural killer cells as graft-facilitating cells. *Transplantation*.1999;68:87-88
11. Asai O, Longo DL, Tian Z et al. Suppression of graft-versus-host disease and amplification of graft-versus-tumor effects by activated natural killer cells after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Invest*.1998;101:1835-1842
12. Zeis M, Uharek L, Glass B, Gaska T, Steinmann J, Gassmann W et al. Allogeneic NK cells as potent anti-leukemic effector cells after allogeneic bone marrow transplantation in mice. *Transplantation*.1995;20:217-251
13. Hauch M, Gazzola MV, Small T, Bordignon C, Barnett L, Cunningham I et al. Anti-

- leukemia potential of interleukin-2 activated natural killer cells after bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood*.1990;7:2250-2262
14. Giebel S, Locatelli F, Lamparelli T, Velardi A, Davies S, Frumento G et al. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem-cell transplantation from unrelated donors. *Blood*.2003;102:814-819
 15. Davies SM, Ruggeri L, DeFor T, Wagner JE, Weisdorf DJ, Miller JS et al. Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants: killer immunoglobulin-like receptor. *Blood*.2002;100:3825-3827
 16. Bornhauser M, Schwerdtfeger R, Martin H, Frank KH, Theuser C, Ehninger G. Role of KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation using unrelated donors [letter]. *Blood*.2004;103:2860-2861
 17. Bishara A, Santis DD, Witt CC, Brautbar C, Christiansen FT, Or R et al. The beneficial role of inhibitory KIR genes of HLA class I NK epitopes in haploidentically mismatched stem cell allografts may be masked by residual donor-alloreactive T cells causing GVHD. *Tissue Antigens*.2004;63:204-211
 18. Beelen D, Ottinger H, Ferencik S, Elmaagacli AH, Peceny R, Trensche R et al. Genotypic inhibitory killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility enhances the long-term anti-leukemic effect of unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias. *Blood*.2005;105:2594-2600
 19. Dupont B, Hsu KC. Inhibitory killer Ig-like receptor genes and human leukocyte antigen class I ligands in haematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Immunol*.2004;16:1-10
 20. Hsu KC, Keever-Taylor CA, Wilton A, Pinto C, Heller G, Arkun K et al. Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood*.2005;105:4878-4884
 21. Leung W, Iyengar R, Triplett B, Turner V, Behm FG, Holladay MS et al. Comparison of killer Ig-like receptor genotyping and phenotyping for selection of allogenic blood stem cell donors. *J Immunol*.2005;174:6540-6545
 22. Bignon JD, Gagne K. KIR matching in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Immunol*.2005;17:553-559
 23. Zhao XY, Huang XJ, Liu KY, Xu LP, Liu DH. Prognosis after unmanipulated HLA-haploidentical blood and marrow transplantation is correlated to the numbers of KIR ligands in recipients. *Eur J Haematol*.2007;78:338-346
 24. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*.1988;16:1215
 25. Tajik N, Shahsavar F, Mousavi T, Radjabzadeh MF. Distribution of KIR genes in the Iranian population. *Tissue Antigens*.2009;74:22-31
 26. Tajik N, Shahsavar F, Nasiri MR, Radjabzadeh MF. Compound KIR-HLA

- genotype analyses in the Iranian population by a novel PCR-SSP assay. *Int J Immunogenetics*.2010;37:159-168
27. Storb R, Prentice RL, Sullivan KM, Shulman HM, Deeg HJ, Doney KC et al. Predictive factors in chronic graft-versus-host disease in patients with aplastic anemia treated by bone marrow transplantation from HLA-identical siblings. *Ann Intern Med*.1983;98:461.
 28. Gooley TA, Leisenring W, Crowley J, Storer BE. Estimation of failure probabilities in the presence of competing risks: new representations of old estimators. *Stat Med*.1999;18:695-706
 29. Gray R. A class of K-sample tests for comparing the cumulative incidence of a competing risk. *Ann Stat*.1988;16:1141-1154
 30. Shahsavari F, Tajik N, Entezami K, Fallah Radjabzadeh M, Asadifar B, Alimoghaddam K et al. KIR2DS3 is associated with protection against acute myeloid leukemia. *Iran J Immunol*.2010;7(1):8-17
 31. Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*.1986;319:675-678
 32. Cook MA, Milligan DW, Fegan CD, Darbyshire PJ, Mahendra P, Craddock CF et al. The impact of donor KIR and patient HLA-C genotypes on outcome following HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for myeloid leukemia. *Blood*.2004;103:1521-1526
 33. Parham P, McQueen KL. Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. *Nat Rev Immunol*.2003;3:108-122
 34. Leung W, Iyengar R, Turner V, Lang P, Bader P, Conn P et al. Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells. *J Immunol*.2004;172:644-650
 35. Linn YC, Phang CY, Lim TJ, Chong SF, Heng KK, Lee JJ et al. Effect of missing killer-immunoglobulin-like receptor ligand in recipients undergoing HLA full matched, non-T-depleted sibling donor transplantation: a single institution experience of 151 Asian patients. *Bone Marrow Transplantation*.2009;1-7
 36. Chen C, Busson M, Rocha V, Appert ML, Lepage V, Dulphy N et al. Activating KIR genes are associated with CMV reactivation and survival after non-T-cell depleted HLA-identical sibling bone marrow transplantation for malignant disorders. *Bone Marrow Transplant*.2006;38:437-344
 37. Pende D, Spaggiari GM, Marcenaro S, Martini S, Rivera P, Capobianco A et al. Analysis of the receptor-ligand interactions in the NK-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias. Evidence for the involvement of the poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood*.2005;105:2066-2073
 38. Moretta L, Locatelli F, Moretta A. Alloreactive natural killer cells in targeting high-risk Leukaemias. *Ann Rheum Dis*.2008;67(Suppl III):39-43

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.