

ΕΘΝΙΚΑ ΙΔΡΥΜΑΤΑ ΥΓΕΙΑΣ ΤΩΝ Η.Π.Α.
ΜΟΝΑΔΑ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΕΩΝ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Α. JOHN BARRETT M.D.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ, ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ

**ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ IN VITRO ΤΩΝ ΥΠΕΥΘΥΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ
ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ ΚΑΤΑ ΞΕΝΙΣΤΗ (GRAFT-VS-HOST REACTION)
Τ-ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΤΑ Τ-ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ
ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ ΚΑΤΑ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ (GRAFT-VS-LEUKEMIA)
ΤΟΥ ΔΟΤΗ ΣΕ ΑΛΛΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΕΙΣ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ**

Από τον
ΔΗΜΗΤΡΙΟ Α. ΜΑΥΡΟΥΔΗ
ΙΑΤΡΟ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 1997

“On the one hand, the dose of X-rays which is sufficiently lethal to normal cells of the bone marrow and lymphatic tissues to cause death of the animal might well be completely lethal to leukaemic cells.....On the other hand, if the dose of X-rays sufficient to kill the animal is not 100% lethal to leukaemic cells, the malignant condition would (following isologous bone marrow transplantation) recur by growth from the surviving cells, since neither host nor graft has the ability to resist; but, if homologous bone marrow from a different strain of mouse were given, the colonizing cells might retain the capacity of the donor to destroy by the reaction of immunity these residual leukaemic cells - and perhaps the host”

Barnes et al. (1956) [1]

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ [Σ. 7]

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ [Σ. 8]

Αλλογενής μεταμόσχευση

Συγγενική μεταμόσχευση

Αυτόλογη μεταμόσχευση

II. ΒΑΣΙΚΗ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ [Σ. 14]

T-λεμφοκύτταρα

Υποδοχέας T-λεμφοκυττάρων

CD4+ και CD8+ T-κύτταρα

Th1 και Th2 κύτταρα

Κύτταρα παρουσίασης αντιγόνων

Μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας

Συνδιεγερτικό σήμα

Ανοσολογική ανοχή

Ανοσογενετική βάση αλλοαντιδραστικότητας

- HLA αντιγόνα
- Ελάσσονα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας

Κυτταρική βάση αλλοαντιδραστικότητας

III. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ ΚΑΤΑ ΞΕΝΙΣΤΗ (GVHD) [Σ. 23]

Παθογένεια: οξεία και χρόνια GVHD

Κλινική εικόνα: οξεία και χρόνια GVHD

Παράγοντες και πρόβλεψη κινδύνου GVHD

Πρόληψη GVHD

Θεραπεία: οξεία και χρόνια GVHD

IV. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ ΚΑΤΑ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ (GVL) [Σ. 43]

Κλινική μαρτυρία για την ύπαρξη GVL
Μεταγγίσεις λεμφοκυττάρων από τους δότες
GVL αντιδράσεις in vitro
Μελέτες GVL σε πειραματόζωα
Πιθανοί μηχανισμοί GVL

V. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ GVHD - GVL [Σ. 60]

Χρησιμοποίηση ανταγωνιστών των κυτοκινών
Χορήγηση IL-2 μετά την MMO
Χορήγηση λεμφοκυττάρων δότη τύπου Th2
Καθυστερημένη χορήγηση λεμφοκυττάρων δότη
Χορήγηση μικρής δόσης T-κυττάρων
Μπλοκάρισμα του συνδιεγερτικού σήματος
Εισαγωγή του γονιδίου αυτοκτονίας (TK suicide gene)
Αφαίρεση των CD8+ T-κυττάρων
Εκλεκτική ανοσοεξουδετέρωση (μέθοδος διδακτορικής διατριβής)

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

VI. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ [Σ. 82]

Ο υποδοχέας της ιντερλευκίνης-2 (IL-2R)
Εξουδετέρωση αλλοαντιδραστικότητας με την χρήση ανοσοτοξινών
Ανοσοτοξίνη της ρικίνης (ricin)
Ανοσοτοξίνες της ψευδομονάδας (pseudomonas)
Συλλογή, επεξεργασία και κατάψυξη των κυττάρων
Παραγωγή PHA-βλαστών
Παραγωγή OKT3/IL2 αυξημένων λεμφοκυττάρων
Παραγωγή EBV-λεμφοκυτταρικών γραμμών (EBV-LCLs)

Διαχωρισμός λευχαιμικών κυττάρων
Ανοσοφαινότυπος με την μέθοδο Flow Cytometry
Παραγωγή αποικιών CFU-GM από κύτταρα μυελού
Υπολογισμός συχνοτήτων HTLPf με την μέθοδο της περιορισμένης αραιώσης
Παραγωγή κλώνων T-κυττάρων

VII. ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΜΕ ΑΝΟΣΟΤΟΞΙΝΕΣ [Σ. 99]

Η διέγερση των T-κυττάρων συνοδεύεται από αύξηση του δείκτη CD25
Σημασία τοξίνης και αντισώματος στην ανοσοεξουδετέρωση
Προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών για ανοσοεξουδετέρωση

- αναλογία διεγερτών/ανταποκριτών
- συγκέντρωση ανοσοτοξίνης

Σύγκριση ανοσοτοξινών ρικίνης και ψευδομονάδας
Ανοσοεξουδετέρωση με συνδυασμό ανοσοτοξινών
Επίδραση της ανοσοτοξίνης στα μη ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα
Επίδραση της ανοσοτοξίνης στις αποικίες CFU-GM μυελού των οστών
Επίδραση της ανοσοτοξίνης στην αντιδραστικότητα ενάντια σε EBV-LCLs

VIII. ΑΦΑΙΡΕΣΗ ΑΛΛΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΣΥΓΓΕΝΙΚΟΥΣ ΔΟΤΕΣ ΜΕ ΚΟΙΝΟ ΤΟΝ ΕΝΑ ΑΠΛΟΤΥΠΟ [Σ. 119]

Αποτελέσματα 10 πειραμάτων

IX. ΑΦΑΙΡΕΣΗ ΑΛΛΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΥΣ ΑΔΕΛΦΙΚΟΥΣ ΔΟΤΕΣ [Σ. 123]

Διαχωρισμός αντιδραστικότητας ενάντια σε PHA-βλάστες και CML-κύτταρα
Σημασία αναλογίας PHA-βλαστών/CML-κυττάρων στη πρωτογενή διέγερση
Επίδραση της διέγερσης των T-κυττάρων στην συχνότητα HTLPf
Μείωση της συχνότητας HTLPf δότη → αρρώστου
Διατήρηση της συχνότητας HTLPf δότη → τρίτου μέρους

Διαχωρισμός αντιδραστικότητας δότη-κατά-ξενιστή και δότη-κατά-λευχαιμίας

Χ. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΛΩΝΩΝ Τ-ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΔΟΤΗ ΜΕ ΞΕΧΩΡΙΣΤΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΕΣ ΕΝΑΝΤΙΑ ΣΕ ΛΕΥΧΑΙΜΙΚΑ ΚΑΙ ΜΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΑΡΡΩΣΤΟΥ	[Σ. 139]
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	[Σ. 143]
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΕΙΔΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ	[Σ. 148]
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	[Σ. 152]
SUMMARY	[Σ. 153]
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	[Σ. 154]

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η αλλογενής μεταμόσχευση μυελού των οστών από ιστοσυμβατούς δότες αποτελεί αποτελεσματική θεραπεία για τις οξείες και χρόνιες λευχαιμίες. Η ίαση επιτυγχάνεται αφενός με την χορήγηση υψηλών δόσεων χημειοθεραπείας και ακτινοβολιών και αφετέρου με την ανοσολογική αντίδραση ανάμεσα στο μόσχευμα και στη λευχαιμία, η οποία εξασφαλίζει την ολοκληρωτική καταστροφή των λευχαιμικών κυττάρων. Μειονεκτήματα της αλλογενούς μεταμόσχευσης αποτελούν η έλλειψη ιστοσυμβατού δότη στη πλειονότητα των αρρώστων καθώς επίσης και τα ψηλά ποσοστά θνησιμότητας λόγω των σοβαρών λοιμώξεων και της αντίδρασης μοσχεύματος-κατά-ξενιστή (GVHD). Είναι προφανές λοιπόν ότι για τη βελτίωση των αποτελεσμάτων απαιτούνται νέοι τρόποι πρόληψης της αντίδρασης GVHD που να εξασφαλίζουν τη διατήρηση της ανοσολογικής αντίδρασης του μοσχεύματος ενάντια σε λοιμώξεις και λευχαιμία και να επιτρέπουν την ασφαλή χρησιμοποίηση μοσχευμάτων από μερικά ιστοσυμβατούς δότες.

Σε αυτή τη διδακτορική διατριβή μελετήθηκε μια καινούργια μέθοδος εξουδετέρωσης των κυττάρων του δότη που προκαλούν την αντίδραση GVHD και εξετάστηκε εάν με αυτή τη μέθοδο διατηρείται η αντιδραστικότητα του δότη ενάντια στη λευχαιμία και σε άλλα αντιγόνα. Η εργασία έγινε στο εργαστήριο της Μονάδας Μεταμοσχεύσεων Μυελού των Οστών των Εθνικών Ινστιτούτων Υγείας των Η.Π.Α. σε συνεργασία με την Αιματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το διευθυντή της Μονάδας Μεταμοσχεύσεων A. John Barrett M.D. για τη βοήθεια που μου πρόσφερε και τον ενθουσιασμό που μου εμφύσησε για τις μεταμοσχεύσεις. Επίσης ευχαριστώ τους συνεργάτες μου Yin-Zheng Jiang, Jeffrey Mollidrem, Said Dermime, Philippe Lewalle και Nancy Hensel για τη πολύπλευρη βοήθεια τους στην ολοκλήρωση αυτής της μελέτης.

Στο σεβαστό Καθηγητή Αιματολογίας Γεώργιο Ηλιόπουλο εκφράζω τη βαθειά μου ευγνωμοσύνη τόσο για την τιμή της ανάθεσης του θέματος όσο και για τις υποδείξεις του και τη συμπαράσταση του κατά την εκπόνηση της διατριβής.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

Μεταμόσχευση μυελού των οστών (ΜΜΟ) είναι η ενδοφλέβια χορήγηση αρχέγονων και προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων με σκοπό την αποκατάσταση φυσιολογικής λειτουργίας μυελού και ανοσοποιητικού συστήματος σε άρρωστο με καταστραμμένο ή ελαττωματικό μυελό των οστών [2]. Η πρώτη αναφορά για θεραπευτική χορήγηση μυελού είναι το 1939, όταν σε ένα άρρωστο με απλαστική αναιμία εχορηγήθη ενδοφλέβια 18 ml μυελού από τον αδελφό του [3]. Το ξεκίνημα της σύγχρονης μεταμόσχευσης έγινε όταν πειράματα με ποντίκια έδειξαν ότι η ενδοφλέβια χορήγηση μυελού των οστών προστάτευε από θανάσιμη βλάβη του αιμοποιητικού συστήματος [4]. Οι εκτενείς μελέτες σε μοντέλα ΜΜΟ σε πειραματόζωα καθώς επίσης και η μετέπειτα ανακάλυψη των αντιγόνων μεταμόσχευσης και των τεχνικών για κατάψυξη και ξεπάγωμα αιμοποιητικών κυττάρων, οδήγησαν στις κλινικές μελέτες σε ανθρώπους και στην σύγχρονη μεταμόσχευση. Στο τέλος της δεκαετίας του 1960 έγιναν οι πρώτες επιτυχείς ΜΜΟ, πράγμα που οδήγησε στην σταδιακή αποδοχή αυτής της θεραπείας [5,6]. Η αυτόλογη μεταμόσχευση έγινε πρώτα με επιτυχία στο τέλος της δεκαετίας του 1970 για την θεραπεία αρρώστων με λέμφωμα [7]. Πρόσφατη πρόοδος στις αυτόλογες και αλλογενείς ΜΜΟ αποτελεί η χρησιμοποίηση προγονικών κυττάρων τα οποία συλλέγονται από το περιφερικό αίμα αντί του μυελού των οστών [8]. Αυτό είναι εφικτό χάρις στην προσωρινή μετακίνηση προγονικών κυττάρων από τον μυελό στο αίμα κατόπιν χορήγησης χημειοθεραπείας ή αυξητικών παραγόντων. Τα κύτταρα αυτά μπορούν να συλλεχθούν κατόπιν φλεβοκέντησης με την μέθοδο της αφαίρεσης. Σε σύγκριση με τον μυελό, η χρησιμοποίηση προγονικών κυττάρων περιφερικού αίματος μειώνει σημαντικά το χρονικό διάστημα ουδετεροπενίας και θρομβοπενίας μετά την μεταμόσχευση [8]. Η ΜΜΟ είναι τώρα αποδεκτή θεραπεία για αρρώστους με θανατηφόρα νοσήματα όπως λευχαιμίες, λεμφώματα και ορισμένες μορφές συμπαγών όγκων αλλά και για μή κακοήθη νοσήματα για τα οποία δεν υπάρχει άλλη επιτυχής θεραπεία (ΠΙΝΑΚΑΣ I-1).

Πίνακας I-1. Κακοήθεις και μή κακοήθεις παθήσεις που θεραπεύονται με ΜΜΟ

ΚΑΚΟΗΘΕΙΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ

ΜΗ ΚΑΚΟΗΘΕΙΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ

Οξεία μυελογενής λευχαιμία	Απλαστική αναιμία
Οξεία λεμφογενής λευχαιμία	Παροξυσμική νυχτερινή αιμοσφαιρινουρία
Χρόνια μυελογενής λευχαιμία	Μεσογειακή αναιμία
Χρόνια λεμφογενής λευχαιμία	Δρεπανοκυτταρική αναιμία
Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα	Σοβαρή συνδεδεμένη ανοσοανεπάρκεια
Πολλαπλούν μυέλωμα	Σύνδρομο Wiskott-Aldrich
Νόσος Hodgkin	Σύνδρομο Chediak-Higashi
Non-Hodgkin λεμφώματα	Νόσος Gaucher
Νευροβλάστωμα	Οστεοπέτρωση
Καρκίνος του όρχεως	
Καρκίνος του μαστού	

Η **αλλογενής (allogeneic)** ΜΜΟ περιλαμβάνει την μεταφορά μυελού από ένα άτομο σε ένα άλλο. Στην ειδική περίπτωση που ο δότης και ο λήπτης είναι γενετικά ίδιοι, δηλαδή μονοζυγωτικοί δίδυμοι, τότε λέγεται **συγγενική (syngeneic)** ΜΜΟ. Για αρρώστους που δεν έχουν δίδυμα αδέρφια, η καλύτερη εκλογή για αλλογενή ΜΜΟ είναι από αδελφό ή αδελφή ιστοσυμβατό με το άρρωστο ως προς το μείζονα σύστημα ιστοσυμβατότητας (MHC). Για αρρώστους που θα μπορούσαν πιθανόν να οφεληθούν από μία αλλογενή ΜΜΟ αλλά δεν έχουν ιστοσυμβατούς αδελφικούς δότες, υπάρχουν δύο δυνατότητες.

Η μία είναι να βρεθεί ένας μη συγγενικός αλλά ιστοσυμβατός δότης (matched unrelated donor) που είναι πρόθυμος να δωρήσει μυελό, και η άλλη είναι να χρησιμοποιηθεί μυελός από ένα συγγενικό δότη που δεν είναι απόλυτα ιστοσυμβατός με τον άρρωστο (partially matched related donor). Οσον αφορά την ΜΜΟ από μη συγγενικούς ιστοσυμβατούς δότες, η δημιουργία των αρχείων (registries) εθελοντών δότων που σήμερα περιλαμβάνουν πάνω από 2.5 εκατομμύρια ονόματα και η πρόοδος που έχει επιτευχθεί στο τομέα ελέγχου ιστοσυμβατότητας (HLA typing), έχει συντελέσει στην εξάπλωση της μεθόδου με πολύ καλά αποτελέσματα [9,10]. Ακόμα πιο εύκολη είναι η επιλογή ενός μερικά ιστοσυμβατού δότη μέσα από την οικογένεια του αρρώστου. Σε αυτή την περίπτωση η πιθανότητα απόρριψης του μοσχεύματος ή εκδήλωσης σοβαρής αντίδρασης μοσχεύματος κατά ξενιστή (GVHD) κάνει την ΜΜΟ πίο επικίνδυνη αλλά

παρόλα αυτά εφικτή σήμερα χάρις στην πρόοδο στους τομείς των λοιμώξεων και ανοσοκαστολής [11,12].

Η **αυτόλογη (autologous)** ΜΜΟ περιλαμβάνει την χρησιμοποίηση του μυελού του ίδιου του αρρώστου για την αποκατάσταση αιμοποιητικής λειτουργίας μετά από την χορήγηση υψηλών δόσεων χημειοθεραπείας και ακτινοβολίας. Επειδή δεν υπάρχει διαφορά ιστοσυμβατότητας μεταξύ μοσχεύματος και αρρώστου, η μεταμόσχευση είναι λιγότερο επικίνδυνη για τον άρρωστο αλλά δυστυχώς και λιγότερο αποτελεσματική όσον αφορά την εξολόθρευση της αρρώστιας. Η ΜΜΟ μπορεί να οδηγήσει σε ίαση από μία κακοήθη νόσο αφενός λόγω των υψηλών δόσεων χημειοθεραπείας και ακτινοβολίας, που χρησιμοποιούνται πριν την χορήγηση του μυελού, που σκοτώνουν τα νεοπλασματικά κύτταρα, αλλά και αφετέρου λόγω ανοσολογικής αντίδρασης μεταξύ μοσχεύματος και λευχαιμίας (GVL). Αυτή η ανοσολογική αντίδραση οφείλεται στην ύπαρξη αλλοαντιδραστικότητας μεταξύ δότη και λήπτη και γιαυτό συμβαίνει κυρίως σε αλλογενείς ΜΜΟ από ιστοσυμβατούς και μη δότες αλλά όχι σε αυτόλογες ή συγγενικές ΜΜΟ. Επίσης ανησυχητικό στις αυτόλογες ΜΜΟ είναι η πιθανότητα ο μυελός να περιέχει νεοπλασματικά κύτταρα τα οποία εάν χορηγηθούν ξανά στον άρρωστο θα μπορούσαν να προκαλέσουν υποτροπή της νόσου [13,14]. Αυτή η πιθανότητα φυσικά δεν υπάρχει σε αλλογενείς ή συγγενικές ΜΜΟ μιά και εκεί ο μυελός προέρχεται από υγιείς δότες. Διάφορες μέθοδοι κάθαρσης (purging) του αυτόλογου μυελού από τα κακοήθη κύτταρα έχουν χρησιμοποιηθεί με όχι όμως απόλυτη επιτυχία [15,16]. Στις περισσότερες περιπτώσεις η υποτροπή της νόσου μετά από ΜΜΟ προέρχεται από νεοπλασματικά κύτταρα που δεν σκοτώθηκαν από την υψηλή δόση χημειοθεραπείας-ακτινοβολίας και βρίσκονται ακόμα ζωντανά μέσα στο σώμα του αρρώστου. Σήμερα ακόμη παραμένει άγνωστο εάν η μέθοδος της κάθαρσης οδηγεί σε καλύτερα αποτελέσματα, αλλά συνήθως δεν χρησιμοποιείται στις περισσότερες περιπτώσεις αυτόλογων ΜΜΟ [17].

Η ΜΜΟ διαφέρει σημαντικά από την μεταμόσχευση άλλων οργάνων. Στη μεταμόσχευση άλλων οργάνων, το μόσχευμα συνήθως περιέχει περιορισμένο αριθμό κυττάρων με ανοσολογική δράση και πρωταρχική κλινική μέριμνα είναι να αποφευχθεί απόρριψη του μοσχεύματος. Γιαυτό το λόγο χορηγούνται ανοσοκατασταλτικά φάρμακα συνήθως

εφόρου ζωής για να μὴν απορρηφθεὶ το μεταμοσχευμένο ὄργανο. Σε ΜΜΟ, ἡ προπαρασκευαστικὴ αγωγή (συνήθως συνδυασμὸς χημειοθεραπείας καὶ ακτινοβολιῶν ἢ μόνον χημειοθεραπείας) ποῦ δίνεται πρὶν τὴν μεταμόσχευση σκοπὸ ἔχει αφενὸς νὰ σκοτώσει τὰ νεοπλασματικὰ κύτταρα ἀλλὰ συγχρόνως καταστρέφει καὶ τὸ αἰμοποιητικὸ καὶ ανοσολογικὸ σύστημα τοῦ ἀρρώστου, ἀν καὶ ὄχι ολοκληρωτικά. Ὁ μεταμοσχευόμενος μυελὸς περιέχει μεγάλον ἀριθμὸ προγονικῶν καὶ ὠριμῶν κυττάρων ἀπὸ τὸ δότη ποῦ ἀντικαθιστοῦν αὐτὰ τοῦ ἀρρώστου. Ἐτσι, τὸ ανοσοποιητικὸ σύστημα στὸν μεταμοσχευμένο ἄρρωστο παράγεται ἀπὸ τὸ μόσχευμα καὶ προέρχεται ἀπὸ τὸν δότη. Σε αὐτὴ τὴν περίπτωση ἡ πρωταρχικὴ κλινικὴ μέριμνα εἶναι, ὄχι μόνον νὰ προληφθεὶ ἀπόρριψη τοῦ μόσχεύματος ἀπὸ τὰ κύτταρα τοῦ ἀρρώστου ποῦ τυχόν δὲν καταστράφηκαν ἀπὸ τὴ προπαρασκευαστικὴ αγωγή, ἀλλὰ καὶ νὰ προληφθεὶ καταστρεπτικὴ ανοσολογικὴ ἀντίδραση ἀπὸ τὸ μόσχευμα κατὰ τοῦ ἀρρώστου (GVHD). Γιαυτὸ τὸ σκοπὸ χορηγοῦνται ανοσοκατασταλτικὰ φάρμακα μετὰ ἀπὸ ΜΜΟ, κυρίως γιὰ νὰ ἀποφευχθεὶ ἡ GVHD ἀντίδραση. Τελικὰ εἶναι συνήθως ἐφικτὸ νὰ σταματήσῃ ἡ ανοσοκατασταλτικὴ αγωγή, ἐπειδὴ ἀναπτύσσεται ανοσολογικὴ “ανοχή” (tolerance) ἀνάμεσα στὰ λεμφοκύτταρα τοῦ δότη ποῦ παράγονται ἀπὸ τὸν μεταμοσχευμένο μυελὸ καὶ στοὺς ἰστούς τοῦ ἀρρώστου, χωρὶς GVHD, ἐνὼ διατηρεῖται ἡ ἀντιδραστικότης τῶν λεμφοκυττάρων σε ἄλλα ἀντιγόνα π.χ. λοιμῶδεις ὀργανισμοὺς, καὶ ἔτσι ἀποκαθίσταται ἡ ομαλὴ λειτουργία τοῦ ανοσολογικοῦ συστήματος.

Ἴσως πούθενά ἀλλοῦ δὲν εἶναι πῶς πολὺπλοκὴ ἡ ανοσολογία ἀπὸ τὴν ἀλλογενεῖς ΜΜΟ. Ἀνοσολογικὲς ἀντιδράσεις ὅπως ξενιστὴ κατὰ μόσχεύματος (host vs graft - HVG), μόσχεύματος κατὰ ξενιστὴ (graft vs host - GVH) καὶ μόσχεύματος κατὰ λευχαιμίας (graft vs leukemia - GVL) ἐξελίσσονται μετὰ τὴν ἀρχὴς τῆς ἀλλοαντιδραστικότητος καὶ περιλαμβάνουν ἀλληλεπίδρασεις Τ-λεμφοκυττάρων, ἀντιγόνων ἰστυστυμβατότητας καὶ κυτοκινῶν.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Barnes D., Corp M., Loutit J., et al: Treatment of murine leukaemia with X-rays and homologous bone marrow. Preliminary communication. Br Med J 1956, 2:626

2. Atkinson K: Reconstruction of the haemopoietic and immune system after marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1990, 5:209
3. Osgood E., Riddle M., Mathews T: Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous marrow; case report. *Ann Intern Med* 1939, 13:357
4. Lorenz E., Uphoff D., Reid T., et al: Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* 1951, 12:197
5. Gatti R., Meuwissen H., Allen H., et al: Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 1968, 1:1366
6. de Koning J., Dooren L., van Bekkum D., et al: Transplantation of bone marrow cells and fetal thymus in an infant with lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 1969, 1:1223
7. Appelbaum F., Herzig G., Ziegler J., et al: successful engraftment of cryopreserved autologous bone marrow in patients with malignant lymphoma. *Blood* 1978, 52:85
8. Sierra J., Anasetti C: Marrow transplantation from unrelated donors. *Current Opinion in Hematol* 1995, 2:444
9. Korbling M., Champlin R: Peripheral blood progenitor cell transplantation: a replacement for marrow auto- or allografts. *Stem Cells* 1996, 14:185
10. Gajewski J., Champlin R: Bone marrow transplantation from unrelated donors. *Current Opinion in Oncol* 1996, 8:84
11. Henslee-Downey J: Mismatched bone marrow transplantation. *Current Opinion in Oncol* 1995, 7:115
12. Henslee-Downey J: Choosing an alternative bone marrow donor among available family members. *Am J Ped Hem/Onc* 1993, 15:150
13. Hagenbeek A., Martens A: Reinfusion of leukemic cells with the autologous marrow graft: preclinical studies on lodging and regrowth of leukemia. *Leuk Res* 1985, 9:1389
14. Brenner M., Rill D., Moen R., et al: Gene-marking to trace origin of relapse after autologous bone marrow transplantation. *Lancet* 1993, 341:85
15. Sharp J., Joshi S., Armitage J., et al: Significance of detection of occult non-Hodgkin's lymphoma in histologically uninvolved bone marrow by a culture technique. *Blood* 1992, 79:1074

16. Gorin N., Aegerter P., Auvert B., et al: Autologous bone marrow transplantation for acute myelocytic leukemia in first remission: a European survey of the role of marrow purging. Blood 1990, 75:1606
17. Armitage J: Bone marrow transplantation. N Engl J Med 1994, 330:827

II. ΒΑΣΙΚΗ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ

Ήταν γνωστό από παλιά ότι τα λεμφοκύτταρα που περιέχονται στο μυελό είναι υπεύθυνα για τις ανοσολογικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μετά από αλλογενή ΜΜΟ [1]. Αργότερα όμως αποδείχθηκε καθαρά ότι ειδικά τα Τ-λεμφοκύτταρα ευθύνονται για την αντίδραση GVHD [2,3]. Τα **Τ-λεμφοκύτταρα** είναι λεμφοκύτταρα που αναπτύσσονται

και διαφοροποιούνται στο θύμο αδένα προτού μεταναστεύσουν στους δευτερογενείς λεμφικούς ιστούς. Τα T-λεμφοκύτταρα (ή απλώς T-κύτταρα) αναγνωρίζουν αντιγόνα και τα μόρια του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (MHC) μέσω του υποδοχέα των (TCR). Αυτός αποτελείται από το τμήμα σύνδεσης με το αντιγόνο που σχηματίζεται από 2 διαφορετικές πολυμορφικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες, και το σύμπλεγμα CD3 που αποτελείται από πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μετάδοση του σήματος ενεργοποίησης στο κύτταρο. Το τμήμα σύνδεσης με το αντιγόνο αποτελείται συνήθως από ένα ετεροδιμερές πολυπεπτιδικό σύμπλεγμα αβ ή πιο σπάνια γδ. Κάθε υποδοχέας είναι ειδικός για την αναγνώριση ενός αντιγόνου και κάθε T-κύτταρο έχει ενός είδους υποδοχέα στην επιφάνεια του άρα και μπορεί να διεγερθεί μόνο από ένα είδος αντιγόνου. Με ανασυνδυασμό του DNA των πολυπεπτιδικών αλυσίδων α και β, δημιουργείται μία τεράστια ποικιλία υποδοχέων που καλύπτουν σχεδόν όλα τα πιθανά αντιγόνα. Όλα τα T-κύτταρα φέρουν τους ανοσολογικούς δείκτες CD2 και CD5. Τα ενεργοποιημένα T-κύτταρα, αλλά όχι τα ανενεργά, επίσης φέρουν στην επιφάνεια τους MHC class II μόρια και τον δείκτη ενεργοποίησης CD25 ο οποίος συμμετέχει στο σχηματισμό του υποδοχέα ιντερλευκίνης 2 (IL-2R). Υπάρχουν 2 κυρίως πληθυσμοί T-κυττάρων που διακρίνονται από την ύπαρξη στην επιφάνεια του κυττάρου του δείκτη CD4 ή CD8. Αυτοί οι ανοσολογικοί δείκτες λειτουργούν σαν υποδοχείς για class II και class I MHC μορίων αντίστοιχα και συνεισφέρουν στην ανοσολογική αναγνώριση και ενεργοποίηση του κυττάρου. Τα CD4+ T-κύτταρα αναγνωρίζουν κυρίως αντιγόνα συνδεδεμένα με MHC class II μόρια και συνήθως λειτουργούν σαν βοηθητικά (helper) T-κύτταρα παράγοντας κυτοκίνες που βοηθούν στον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων. Αντιθέτως τα CD8+ T-κύτταρα αναγνωρίζουν αντιγόνα συνδεδεμένα με MHC class I μόρια και είναι πρωταρχικά υπεύθυνα για την κυτταροτοξική (cytotoxic) καταστροφή κυττάρων που έχουν προσβληθεί από ιούς. Ο ανοσοφαινότυπος όμως δέν συμβαδίζει πάντοτε με την λειτουργία του κυττάρου έτσι ώστε CD4+ T-κύτταρα μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να λειτουργήσουν σαν κυτταροτοξικά κύτταρα και τα CD8+ T-κύτταρα να παράγουν κυτοκίνες και να λειτουργήσουν σαν βοηθητικά κύτταρα [4].

Με βάση το είδος των κυτοκινών που τα CD4+ T-κύτταρα παράγουν, διακρίνονται στους τύπους Th1 και Th2. Τα Th1 κύτταρα παράγουν ιντερλευκίνη 2 (IL-2) και ιντερφερόνη γ

(INF γ) συνεισφέροντας στη δημιουργία κυτταρικής ανοσίας. Τα Th2 κύτταρα παράγουν τις ιντερλευκίνες 4, 5, 6 και 10 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) που βοηθούν στην χυμική ανοσία. Το προγονικό κύτταρο των Th1 και Th2 κυττάρων είναι το Th0 κύτταρο και παράγει IL-2, INF γ και IL-4, IL-5 [5]. Οι κυτοκίνες που παράγονται από τα CD8+ T-κύτταρα μοιάζουν με αυτές των Th1 κυττάρων αλλά η ικανότητα των CD8+ T-κυττάρων να παράγουν IL-2 είναι περιορισμένη [6]. Ορισμένες κυτοκίνες όπως IL-1, IL-12 και TNF υποβοηθούν ειδικά την δημιουργία Th1 και όχι Th2 κυττάρων [7]. Τα Th1 και Th2 κύτταρα επίσης αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους: τα Th2 κύτταρα αναστέλλουν την σύνθεση κυτοκινών από τα Th1 κύτταρα μέσω της IL-10 και τα Th1 κύτταρα αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των Th2 κυττάρων μέσω της INF γ [8,9].

Κύτταρα που παρουσιάζουν αντιγόνα στα λεμφοκύτταρα σε μορφή που μπορεί να προκαλέσει την διέγερση τους λέγονται **κύτταρα παρουσίασης αντιγόνων (APCs)**. Ενώ όλα τα εμπύρηντα κύτταρα έχουν MHC class I μόρια στην επιφάνεια τους και άρα μπορούν να παρουσιάσουν αντιγόνα για αναγνώριση στα CD8+ T-κύτταρα, τα APCs επίσης φέρουν και MHC class II μόρια και γιαυτό μπορούν να παρουσιάσουν αντιγόνα και να διεγείρουν και CD4+ T-κύτταρα. Στην κατηγορία των APCs συμπεριλαμβάνονται: τα δενδριτικά κύτταρα που μπορούν να διεγείρουν παρθενικά T-κύτταρα (virgin T-cells), τα B-κύτταρα και τα μακροφάγα που μπορούν να διεγείρουν T-κύτταρα που έχουν προηγουμένως ευαισθητοποιηθεί (primed T-cells), και τέλος διάφορα άλλα κύτταρα που μπορεί να φέρουν MHC class II μόρια και να παρουσιάζουν αντιγόνα στα T-κύτταρα αλλά δεν προκαλούν πάντα τον πολλαπλασιασμό τους. Η ικανότητα ενός κυττάρου να παρουσιάζει αντιγόνα εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η πρόσληψη και επεξεργασία του αντιγόνου, ο τρόπος που κατόπιν παρουσιάζεται το αντιγόνο στην επιφάνεια του κυττάρου συνδεδεμένο με MHC class II μόρια, η ταυτόχρονη έκφραση και άλλων βοηθητικών μορίων στην επιφάνεια των APCs και η παραγωγή των κατάλληλων κυτοκινών από τα APCs και τα γειτονικά τους κύτταρα.

Τα T-κύτταρα μπορούν να αναγνωρίσουν αντιγόνα (πεπτίδια) μόνο εάν αυτά είναι συνδεδεμένα με τα μόρια (πρωτεΐνες) του **μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (MHC)**. Το MHC σύστημα περιλαμβάνει τα class I μόρια και στα class II μόρια. Τα

class I μόρια αποτελούνται από μία πολυπεπτιδική αλυσίδα α με 3 τμήματα (domains) ($\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$) και από β_2 -μικροσφαιρίνη. Η περιοχή σύνδεσης με το αντιγόνο σχηματίζεται από τα τμήματα α_1 και α_2 . Τα class II μόρια αποτελούνται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες α και β με 4 τμήματα (domains) ($\alpha_1, \alpha_2, \beta_1, \beta_2$). Η περιοχή σύνδεσης με το αντιγόνο σχηματίζεται από τα τμήματα α_1 και β_1 . Η περιοχή σύνδεσης με το αντιγόνο στα class I μόρια μπορεί να χωρέσει πεπτίδια μέχρι 8-9 αμινοξέα ενώ αυτή των class II μορίων χωράει μεγαλύτερα πεπτίδια. Τα πεπτίδια αυτά στα class I μόρια είναι ενδογενή δηλαδή προέρχονται μέσα από το ίδιο το κύτταρο ενώ στα class II μόρια είναι εξωγενή προερχόμενα απέξω από το κύτταρο. Τόσο τα ενδογενή όσο και τα εξωγενή πεπτίδια προέρχονται από πρωτεόλυση πρωτεϊνών. Ο σχηματισμός σταθερού συμπλέγματος MHC μορίου-πεπτιδίου προϋποθέτει ότι η σειρά των αμινοξέων στο πεπτίδιο ταιριάζει με ορισμένες κρίσιμες θέσεις πρόσδεσης (key anchor positions) που βρίσκονται στη περιοχή σύνδεσης του πεπτιδίου (peptide binding cleft) στο MHC μόριο. Άρα τα πεπτίδια που μπορούν να προσδεθούν με ένα συγκεκριμένο MHC μόριο πρέπει να έχουν ένα συγκεκριμένο μοτίβο (motif) χαρακτηριστικό του κάθε MHC μορίου [10]. Αυτό το μοτίβο δεν είναι πολύ περιοριστικό μιά και συνήθως ένας μεγάλος αριθμός πεπτιδίων μπορεί να συνδεθεί με την κάθε αλληλόμορφη μορφή του MHC μορίου [11].

Στην επιφάνεια των APCs εκτός των MHC μορίων βρίσκονται επίσης και άλλοι υποδοχείς και συνδετικά μόρια όπως CD28, B7-1, LFA-1, ICAM-1, LFA-3, ICAM-3 και άλλα πολλά. Η λειτουργία αυτών είναι να ενώνονται με αντίστοιχους συνδέσμους (ligands) που βρίσκονται στην επιφάνεια των T-κυττάρων και είτε να σταθεροποιούν την σύνδεση T-κυττάρων-APCs ώστε να έρθει σε επαφή ο TCR με το σύμπλεγμα MHC-πεπτίδιο, είτε να παράγουν ένα **συνδιεγερτικό σήμα (co-stimulatory signal)** που είναι απαραίτητο στις πρωτογενείς ανοσολογικές αντιδράσεις. Εάν το πρώτο διεγερτικό σήμα προερχόμενο από το σύμπλεγμα TCR/MHC-πεπτίδιο δεν ακολουθηθεί από ένα δεύτερο συνδιεγερτικό σήμα προερχόμενο από αυτούς τους υποδοχείς τότε το T-κύτταρο αναπτύσσει **“ανοσολογική ανοχή” (tolerance)** και δεν αντιδρά πλέον στο συγκεκριμένο αντιγόνο (πεπτίδιο) [12].

Ανοσογενετική βάση αλλοαντιδραστικότητας

Οι ανοσολογικές αντιδράσεις που προκαλούνται κατά την μεταμόσχευση ιστών από ένα άνθρωπο σε ένα άλλο οφείλονται στα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας που επίσης καλούνται και αντιγόνα μεταμόσχευσης. Τα γονίδια που περιέχουν τα αντιγόνα μεταμόσχευσης βρίσκονται μέσα, αλλά και έξω, από το μείζονα σύστημα ιστοσυμβατότητας (MHC). Τα γονίδια του συστήματος MHC στον άνθρωπο βρίσκονται στο κοντό σκέλος του χρωμοσώματος 6. Αυτά περιέχουν τις γενετικές πληροφορίες για μία σειρά γλυκοπρωτεϊνών που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων, παρουσιάζουν μεγάλο πολυμορφισμό και ονομάζονται **ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα (human leukocyte antigens - HLA)**. Τα HLA class I αντιγόνα περιλαμβάνουν τις γονδιακές εστίες (locus) HLA-A, HLA-B, και HLA-C. Τα HLA class II αντιγόνα περιλαμβάνουν τις γονδιακές εστίες HLA-DR, HLA-DQ, και HLA-DP. Για κάθε ένα από αυτά έχουν περιγραφεί δεκάδες αλληλόμορφα γονίδια. Τα αντιγόνα που έχουν ιδιαίτερη σημασία στις ΜΜΟ είναι τα HLA-A, HLA-B και HLA-DR. Τα γονίδια των αντιγόνων HLA class I και class II είναι πολύ στενά συνδεδεμένα στο χρωμόσωμα έτσι ώστε να κληρονομούνται στις διάφορες οικογένειες σαν απλότυποι με μικρή πιθανότητα ανασυνδυασμού. Έτσι η πιθανότητα για κάθε αδελφό ή αδελφή του αρρώστου να έχουν κληρονομήσει τον ίδιο με το άρρωστο απλότυπο, και από τον πατέρα αλλά και από την μητέρα, άρα να είναι “HLA-γενετικά ταυτόσημοι” με τον άρρωστο, είναι 25%. Λόγω του μεγάλου πολυμορφισμού που υπάρχει στον πληθυσμό στα HLA αντιγόνα, η πιθανότητα δύο μη συγγενικά πρόσωπα να έχουν τα ίδια HLA αντιγόνα είναι πολύ μικρή [13].

Τα **ελάσσονα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας (minor histocompatibility antigens - mHA)** περιέχονται σε γονίδια που βρίσκονται έξω από το MHC σύστημα. Τα ελάσσονα αντιγόνα είναι πολυμορφικά πεπτίδια που προέρχονται από πρωτεΐνες που βρίσκονται μέσα στο κύτταρο και που συνδέονται με τα MHC μόρια για αναγνώριση από τα T-κύτταρα. Επειδή τα ελάσσονα αντιγόνα είναι διαφορετικά για το κάθε άτομο συμβάλλουν στην δημιουργία του ανοσολογικού χαρακτήρα του ατόμου (immunological self). Μέχρι τώρα ένας μικρός αριθμός από αυτά τα mHA έχει ανακαλυφθεί (HA-1, HA-2, HA-3, HA-4, HA-6, HA-7 και H-Y) ενώ αναμένεται ότι υπάρχουν πολύ περισσότερα [14]. Πρόσφατα ανακαλύφθηκαν τα γονίδια για δύο από αυτά, των HA-2 και H-Y

[15,16]. Αυτή την στιγμή δεν υπάρχει τρόπος να ελεγχθεί η ιστοσυμβατότητα δύο ατόμων ως προς τα mHA. Δεδομένου ότι βρίσκονται διεσπαρμένα στα χρωμοσώματα, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα τουλάχιστον ορισμένα από αυτά να διαφέρουν ανάμεσα σε “HLA γενετικά ταυτόσημα” αδέλφια. Σε ασυμβατότητα όσο αφορά τα mHA αποδίδονται σήμερα οι έντονες ανοσολογικές αντιδράσεις (απόρριψη μοσχεύματος, GVHD) που παρατηρούνται μερικές φορές μετά από ΜΜΟ μεταξύ HLA ιστοσυμβατών αδελφών. Φυσικά η πιθανότητα τα mHA να είναι διαφορετικά είναι μεγαλύτερη όταν ο δότης είναι μη συγγενικό πρόσωπο και αυτό εξηγεί γιατί και οι ανοσολογικές αντιδράσεις που παρατηρούνται είναι πιο έντονες. Αντιθέτως, σε μονοζυγωτικούς διδύμους τα mHA αναμένεται να είναι ίδια, γι αυτό και έντονες ανοσολογικές αντιδράσεις δεν παρατηρούνται μετά από ΜΜΟ.

Κυτταρική βάση αλλοαντιδραστικότητας

Τα Τ-κύτταρα προέρχονται από τα αρχέγονα κύτταρα του μυελού, και αφού μεταναστεύσουν στο θύμο αδένα, τα Τ-κύτταρα με υποδοχείς που αναγνωρίζουν “ημέτερα” (self) αντιγόνα καταστρέφονται με μία διαδικασία που λέγεται “αρνητική επιλογή” (negative selection). Τα δε Τ-κύτταρα με υποδοχείς που μπορούν να αναγνωρίσουν ξένα αντιγονικά πεπτίδια συνδεδεμένα με “ημέτερα” MHC μόρια, κατά προτίμηση επιλέγονται και μπαίνουν στην κυκλοφορία αίματος για μεταφορά στους λεμφαδένες, σπλήνα και άλλα όργανα. Αυτή η διαδικασία της “θετικής επιλογής” (positive selection) γίνεται από το επιθήλιο του θύμου αδένα. Η διαδικασία της “αρνητικής επιλογής” γίνεται από μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα προερχόμενα από τον μυελό, και σε κάποιο βαθμό και από το επιθήλιο του θύμου αδένα. Αυτή η αλληλεπίδραση των προγονικών Τ-κυττάρων με το επιθήλιο του θύμου αδένα, καθιστά τα Τ-κύτταρα “ανενεργή” (anergic) στα “ημέτερα” αντιγόνα, και αποτελεί το βασικό μηχανισμό δημιουργίας της ανοσολογικής “ανοχής” (self tolerance) [17-22].

Όταν το ανοσολογικό σύστημα συναντήσει ένα αντιγόνο για πρώτη φορά, προκαλείται μία πρωτογενής (primary) ανοσολογική αντίδραση που διαρκεί μερικές εβδομάδες και χαρακτηρίζεται από τον κλωνικό πολλαπλασιασμό των Τ-κυττάρων που φέρουν

υποδοχείς που αναγνωρίζουν το συγκεκριμένο αντιγόνο. Αυτά τα “κύτταρα με μνήμη” (memory cells) μπορούν να αντιδράσουν πολύ γρήγορα εάν ξανασυναντήσουν το ίδιο αντιγόνο. Τότε η δευτερογενής (secondary) ανοσολογική αντίδραση διαρκεί μερικές μέρες και είναι σφοδρότερη της πρωτογενούς.

Παρά την πρόοδο των τελευταίων χρόνων στη βασική ανοσολογία, οι μηχανισμοί της αλλοαντιδραστικότητας παραμένουν κατά ένα μέρος άγνωστοι. Τα T-κύτταρα μετά την “εκπαίδευση τους” στο θύμο αδένα αναγνωρίζουν σαν “ανοσολογικό εαυτό” (immunologic self), και κατά συνέπεια δεν αντιδρούν, όταν συναντήσουν αυτόλογα MHC μόρια που φέρουν επίσης αυτόλογα πεπτίδια. Αρα 3 πιθανοί συνδυασμοί απομένουν που θα μπορούσαν να αναγνωριστούν από τα T-κύτταρα σαν ξένοι (foreign) και να προκαλέσουν την διέγερση τους: η περίπτωση αυτόλογα MHC μόρια να φέρουν αλλογενή πεπτίδια, αλλογενή MHC μόρια να φέρουν αλλογενή πεπτίδια και τέλος αλλογενή MHC μόρια να φέρουν αυτόλογα πεπτίδια. Πειραματικά δεδομένα υπάρχουν που δείχνουν ότι όλοι αυτοί οι συνδυασμοί αναγνωρίζονται σαν ξένοι και προκαλούν αλλοαντιδράσεις [23]. Φαίνεται ότι και η στερεοδιάταξη του πεπτιδίου μέσα στο MHC μόριο (ποιοτική διαφορά) αλλά και η ποσότητα του πεπτιδίου που βρίσκεται στα MHC μόρια στην επιφάνεια των APCs (ποσοτική διαφορά) μπορούν να δημιουργήσουν αντιγονικότητα και να διεγείρουν τα T-κύτταρα [24]. Παραμένει αδιευκρίνιστο εάν στην περίπτωση MHC ασυμβατότητας, τα T-κύτταρα μπορούν να διεγερθούν και μόνο από τα αλλογενή MHC μόρια ή εάν και σε αυτή την περίπτωση απαιτείται η παρουσία πεπτιδίου [25]. Υπάρχει και η περίπτωση τα αλλογενή MHC μόρια να προσληφθούν από αυτόλογα APCs, να πρωτεολυθούν, και πεπτίδια τους να παρουσιαστούν από αυτόλογα MHCs. Επειδή οι αλλοαντιδράσεις κατά πάσα πιθανότητα χρησιμοποιούν περισσότερους από ένα μηχανισμούς, γιατί και συνήθως είναι έντονες [26].

Σαν συνέπεια αυτής της ιδιαίτερης σημασίας των πεπτιδίων στην αλλοαντιδραστικότητα, διαφορετικοί ιστοί από τον ίδιο οργανισμό αν και έχουν τα ίδια MHC μόρια, μπορεί να διαφέρουν όσο αφορά την έκφραση των mHA ή να υπάρχουν ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές στα εκφραζόμενα πεπτίδια έτσι ώστε να έχουν διαφορετική αντιγονικότητα [27]. Αυτή η θεωρία οδηγεί στην ύπαρξη ειδικών για κάθε ιστό “προφίλς MHC-

αντιγόνων” (MHC Ag profiles - MAPs) [28]. Έτσι τα κύτταρα κάθε ιστού παρουσιάζουν στα MHC μόρια τους κυρίως πεπτίδια κοινά για όλα τα κύτταρα του οργανισμού αλλά και πεπτίδια που διαφέρουν ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου ή του ιστού, γιατί και η αντιγονικότητα των διαφόρων ιστών του ίδιου οργανισμού μπορεί να είναι διαφορετική. Αυτή η θεωρία βοηθάει πολύ στην κατανόηση των αντιδράσεων GVHD και GVL, όπου τα αντιγόνα μπορεί να είναι κοινά αλλά και διαφορετικά, άρα και οι αντιδράσεις θα μπορούσαν μέχρι σε κάποιο βαθμό να διαχωριστούν [29].

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. van Bekkum D: The selective elimination of immunologically competent cells from bone marrow and lymphatic cell mixtures. *Transplantation* 1964, 2:393
2. Korngold R., Sprent J: T cell subsets and graft-versus-host disease. *Transplantation* 1987, 44:335
3. Ferrara J., Deeg H: Graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 1991, 324:667
4. Hutchinson I: Suppressor T cells in allogeneic models. *Transplantation* 1986, 41:547
5. Mosmann T., Coffman R: Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev Immunol* 1989, 7:145
6. Fong T., Mosmann T: Alloreactive murine CD8+ T cell clones secrete the Th1 pattern of cytokines. *J Immunol* 1990, 144:1744
7. Trinchieri G: Interleukin-12 and its role in the generation of Th1 cells. *Immunol Today* 1993, 14:335
8. Mosmann T., Moore K: The role of IL-10 in crossregulation of Th1 and Th2 responses. *Immunol Today* 1991, 12:49
9. Gajewski T., Fitch F: Anti-proliferative effect of $\text{INF}\gamma$ in immune regulation: $\text{INF}\gamma$ inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol* 1988, 140:4245
10. Falk K., Roetzschke O., Stevanovic S., et al: Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 1991, 351:290

11. Hunt D., Henderson R., Shabanowitz J., et al: Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* 1992, 255:1261
12. Schultze J., Nadler L., Gribben J: B7-mediated costimulation and the immune response. *Blood Reviews* 1996, 10:111
13. Beatty P: The immunogenetics of bone marrow transplantation. *Transfusion Medicine Reviews* 1994, 1:45
14. Perreault C., Decary F., Brochu S., et al: Minor histocompatibility antigens. *Blood* 1990, 76:1269
15. den Haan J., Sherman N., Blokland E., et al: Identification of a graft-versus-host disease associated human minor histocompatibility antigen. *Science* 1995, 268:1476
16. Wang W., Meadows L., den Haan J., et al: Human H-Y: a male-specific histocompatibility antigen derived from the SMCY protein. *Science* 1995, 269:1588
17. Kappler J., Roehm N., Marrack P: T-cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 1987, 49:273
18. Blackman M., Kappler J., Marrack P: The role of the T-cell receptor in positive and negative selection of developing T-cells. *Science* 1990, 248:1335
19. Pullen A., Kappler J., Marrack P: Tolerance to self antigens shapes the T-cell repertoire. *Immunol Rev* 1989, 107:125
20. von Boehmer H., Kisielow P: Self-nonsel self discrimination by T-cells. *Science* 1990, 248:1369
21. Marrack P., Lo D., Brinster R., et al: The effect of thymus environment on T-cell development and tolerance. *Cell* 1988, 53:627
22. Ramsdell F., Fowlkes B: Clonal deletion versus clonal anergy: the role of the thymus in inducing self tolerance. *Science* 1990, 248:1342
23. Eckels D., Gorski J., Rothbard J., et al: Peptide-mediated modulation of T cell allorecognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, 85:8191
24. Chattopadhyay S., Theobald M., Biggs J., et al: Conformational differences in major histocompatibility complex-peptide complexes can result in alloreactivity. *J Exp Med* 1994, 179:213

25. Ajitkumar P., Geier S., Kesari K., et al: Evidence that multiple residues on both the alpha-helices of the class I MHC molecule are simultaneously recognized by the T cell receptor. *Cell* 1988, 54:47
26. Lechler R., Lombardi G., Batchelor J: The molecular basis of alloreactivity. *Immunol Today* 1990, 11:83
27. de Bueger M., Bakker A., van Rood J., et al: Tissue distribution of human minor histocompatibility antigens. *J Immunol* 1992, 149:1788
28. Bonomo A., Matzinger P: Thymus epithelium induces tissue-specific tolerance. *J Exp Med* 1993, 177:1153
29. Datta A., Barrett J., Jiang Y., et al: Distinct T cell populations distinguish chronic myeloid leukaemia cells from lymphocytes in the same individual: a model for separating GVHD from GVL reactions. *Bone Marrow Transplant* 1994, 14:517

III. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ ΚΑΤΑ ΞΕΝΙΣΤΗ (GVHD)

Η αντίδραση μοσχεύματος κατά ξενιστή είναι μία από τις πιο σοβαρές επιπλοκές της αλλογενούς ΜΜΟ και προκαλείται από αλλοαντιδρώντα Τ-κύτταρα του δότη που διεγείρονται από τα ξένα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας του ξενιστή (αρρώστου). Οι προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούνται για να υπάρξει η αντίδραση GVHD είναι γνωστές από το 1966 (Billingham) [1] και περιλαμβάνουν: 1) το μόσχευμα πρέπει να περιέχει κύτταρα ικανά να προκαλέσουν ανοσολογική αντίδραση 2) ο άρρωστος πρέπει να έχει αντιγόνα που δεν τα έχει ο δότης 3) ο άρρωστος πρέπει να μην μπορεί να απορρίψει το μόσχευμα. Τα κύτταρα του μοσχεύματος ικανά να προκαλέσουν GVHD είναι τα Τ-κύτταρα δεδομένου ότι όταν αφαιρεθούν από το μόσχευμα δεν προκαλείται GVHD [2]. Τα αντιγόνα του αρρώστου ενάντια στα οποία αντιδρούν τα Τ-κύτταρα του μοσχεύματος είναι μείζονα (MHC) και ελάσσονα (mHA) αντιγόνα ιστοσυμβατότητας που αναγνωρίζονται σαν ξένα [3]. Πέρα όμως από τα Τ-κύτταρα, μεγάλη σημασία στην

πρόκληση και στην εξέλιξη της GVHD παίζουν και οι κυτοκίνες [4]. Τα τελευταία 10 χρόνια έχουν γίνει μεγάλοι πρόοδοι στην κατανόηση των μηχανισμών που προκαλούν την αντίδραση GVHD και εκεί βασίζονται οι σύγχρονες πειραματικές μέθοδοι για την πρόληψη και θεραπεία της.

Παθογένεια GVHD

Η **οξεία GVHD** που συμβαίνει τους πρώτους 3 μήνες μετά από αλλογενή ΜΜΟ οφείλεται σε πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ T-κυττάρων και άλλων εκτελεστικών κυττάρων (effector cells) μέσω παραγωγής κυτοκινών. Η αντίδραση μπορεί να χωριστεί σε 3 στάδια. Στο πρώτο στάδιο η προπαρασκευαστική αγωγή που γίνεται στον αρρώστο με χημειοθεραπεία και ακτινοβολίες, καθώς επίσης και η ίδια η αρρώστια και πιθανόν συνυπάρχουσες λοιμώξεις, προκαλούν βλάβη στους ιστούς του αρρώστου όπως δέρμα, γαστρεντερικό επιθήλιο, συκώτι κλπ. Οι ιστοί αντιδρούν με τη παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών όπως TNFα και IL-1 [5]. Σαν συνέπεια της δράσης αυτών των κυτοκινών είναι να επαυξάνεται η έκφραση συνδετικών μορίων (adhesion molecules) όπως ICAM-1 και VCAM-1 [6,7] και MHC class II αντιγόνων [8] στην επιφάνεια των κυττάρων του αρρώστου. Αυτό αυξάνει την πιθανότητα τα T-κύτταρα του δότη να αναγνωρίσουν αντιγονικές διαφορές στα μείζονα και ελάσσονα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας (MHCs, mHA) του αρρώστου και να διεγερθούν. Στο δεύτερο στάδιο τα διεγερμένα T-κύτταρα του δότη τύπου Th1 παράγουν IL-2 και INFγ [9]. Αυτές οι κυτοκίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραπέρα διέγερση T-κυττάρων, παραγωγή κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων (CTL) και NK κυττάρων (natural killer cells) καθώς επίσης στην υποβοήθηση και άλλων μονοπυρηνικών φαγοκυττάρων του αρρώστου ή του δότη να παράγουν IL-1 και TNFα [10]. Εκτός των κυτοκινών, και περίσσεια νιτρικού οξειδίου (NO) μπορεί να παραχθεί από ενεργοποιημένα μακροφάγα και να συνεισφέρει στην βλάβη των ιστών από GVHD [11]. Στο τρίτο στάδιο, λιποπολυσακχαρίτες (LPS) από τον βλαμμένο εντερικό βλεννογόνο μπαίνουν στην κυκλοφορία και διεγείρουν ακόμα παραπάνω τα λεμφοκύτταρα, τα μακροφάγα και τους ιστούς του αρρώστου για παραγωγή κι άλλων φλεγμονωδών κυτοκινών [12]. Κυτοκίνες, κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα (CTL) και NK κύτταρα μέσα από αυτή την αλυσιδωτή φλεγμονώδη αντίδραση καταστρέφουν τους

ιστούς του αρρώστου. Οι ΕΙΚΟΝΕΣ III-1 και III-2 περιγράφουν σχηματικά τη παθογένεια της οξείας GVHD και το ρόλο των κυτοκινών.

Η παθογένεια της χρόνιας GVHD, που συμβαίνει μετά τους 3 πρώτους μήνες, είναι λιγότερο γνωστή. Η χρόνια GVHD συχνά θεωρείται αυτοάνοση αρρώστια γιατί έχει χαρακτηριστικές ομοιότητες με διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα, και ειδικά με τα νοσήματα του κολλαγόνου. Ο συσχετισμός είναι δύσκολο να αποδειχθεί κλινικά αλλά πειραματικές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την αυτοάνοση παθογένεια της χρόνιας GVHD [13]. Σε αντίθεση με τα T-κύτταρα από ζώα με οξεία GVHD που είναι ειδικά για αλλοαντιγόνα του ξενιστή, τα T-κύτταρα των ζώων με χρόνια GVHD είναι ειδικά για ένα κοινό καθοριστικό τμήμα (public determinant) των MHC class II μορίων. Αυτά τα T-κύτταρα παράγουν ασυνήθιστες κυτοκίνες όπως IL-4 και INF γ χωρίς την παρουσία IL-2, και μπορούν να διεγείρουν την παραγωγή κολλαγόνου από ινοβλάστες. Ιδιαίτερα οι δερματικές βλάβες (ίνωση) της χρόνιας GVHD σχετίζονται άμεσα με αυτοαντιδρώντα T-κύτταρα. Αυτό εξηγεί και τον συχνό συσχετισμό ανάμεσα στην χρόνια GVHD και σε

βλάβη του θύμου αδένος. Ο θύμος αδένος μπορεί να πάθει βλάβη λόγω οξείας GVHD, χημειοθεραπείας, ακτινοβολίας ή απλώς να ατροφήσει λόγω ηλικίας. Συνεπώς η ικανότητα του θύμου αδένος να καταστρέφει τα αυτοαντιδρώντα T-κύτταρα και να προκαλεί ανοσολογική ανοχή (tolerance) είναι μειωμένη [14].

Κλινική εικόνα οξείας GVHD

Εάν δεν γίνει πρόληψη με τη χορήγηση ανοσοκατασταλτικών ή την αφαίρεση των T-κυττάρων, οι περισσότεροι άρρωστοι θα παρουσιάσουν GVHD μετά από αλλογενή ΜΜΟ. Η οξεία μορφή εμφανίζεται τις πρώτες 100 μέρες μετά την μεταμόσχευση και παρά την προληπτική αγωγή που γίνεται, αποτελεί κλινικό πρόβλημα για περίπου 35% των αρρώστων με μεταμόσχευση από HLA ιστοσυμβατά αδέρφια και > 60% όταν η μεταμόσχευση γίνει από μη απόλυτα ιστοσυμβατούς ή μη συγγενικούς δότες [15]. Η οξεία GVHD συνήθως πρωτοεμφανίζεται όταν γίνεται η εμφύτευση του μοσχεύματος (engraftment) δηλαδή 2-4 βδομάδες μετά την χορήγηση του μυελού. Προσβάλλει συνήθως το δέρμα, τον γαστρεντερικό σωλήνα και το συκώτι. Συνήθως ξεκινά σαν κηλιδοβλατιδώδες ερύθημα στο δέρμα συνοδευόμενο από κνησμό και με εντόπιση στις παλάμες, στο πέλμα των ποδιών και στα πτερύγια των αυτιών. Σε μερικές περιπτώσεις

συνοδεύεται από πυρετό και το εξάνθημα εντοπίζεται σε όλο το σώμα (καθολικό ερυθρόδερμα). Σε σοβαρές περιπτώσεις εξελίσσεται σε σχηματισμό φυσαλίδων και απολέπιση του δέρματος. Ενοχλήσεις από το γαστρεντερικό συνήθως έρχονται αργότερα και περιλαμβάνουν ναυτία, εμετό, διάρροια και παραλυτικό ιλεό. Η διάρροια μπορεί να αιμορραγική, συνοδευόμενη από σπασμούς και να οδηγήσει γρήγορα σε αφυδάτωση (2-10 λίτρα/μέρα). Το συκώτι συνήθως προσβάλλεται στο τέλος με διαταραχή της ηπατικής λειτουργίας με την μορφή της ενδοηπατικής χολόστασης (αυξημένη χολερυθρίνη και αλκαλική φωσφατάση). Η εμφάνιση οξείας GVHD, καθυστερεί την ανολογική αποκατάσταση του αρρώστου και οδηγεί σε παρατεταμένη και σοβαρή ανοσοανεπάρκεια. Έτσι ο άρρωστος είναι ευάλωτος στις λοιμώξεις και αυτό χειροτερεύει από την ανοσοκατασταλτική αγωγή που δίνεται για την θεραπεία της GVHD. Η κλινική σταδιοποίηση της σοβαρότητας της οξείας GVHD περιλαμβάνει αξιολόγηση των βλαβών στα επιμέρους όργανα και έχει μεγάλη προγνωστική αξία (ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΙΙ-1) [16].

Πίνακας ΙΙΙ-1. Κλινική σταδιοποίηση οξείας GVHD

<u>Όργανο</u>	<u>Βλάβη</u>	<u>Αξιολόγηση</u>
Δέρμα	εξάνθημα <25%	1+
	(% επιφάνεια 25-50%	2+
	δέρματος) >50%	3+
	απολέπιση	4+
Εντερο	Διάρροια >0.5	1+
	(λίτρα/μέρα) >1	2+
	>1.5	3+
	Ιλεός	4+
Συκώτι	Χολερυθρίνη 2-3	1+
	(mg%) 3-6	2+
	6-15	3+

>15

4+

Συνολικό κλινικό στάδιο

<u>Δέρμα</u>	<u>Εντερο</u>	<u>Συκώτι</u>	ΣΤΑΔΙΟ
1-2+	-	-	I
1-3+	1+	1+	II
2-3+	2-3+	2-3+	III
2-4+	2-4+	2-4+	IV

Ιστολογικά η χαρακτηριστική βλάβη της οξείας GVHD είναι η εμφάνιση της “νέκρωσης ενός κυττάρου” (single cell necrosis) στα βασικά στρώματα της επιδερμίδας, του εντερικού βλεννογόνου και των χοληφόρων πόρων. Ένα χαρακτηριστικό στοιχείο είναι η παντελής έλλειψη λεμφοκυτταρικής διήθησης σε περιοχές της βασικής στοιβάδας της επιδερμίδας και του εντερικού βλεννογόνου, γεγονός που ενισχύει την θεωρία ότι είναι κυρίως οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες και όχι τα λεμφοκύτταρα που προκαλούν την βλάβη στους ιστούς στην οξεία GVHD [17].

Κλινική εικόνα χρόνιας GVHD

Η χρόνια GVHD εμφανίζεται συνήθως σαν συνέχεια της οξείας μορφής μετά τους πρώτους 3 μήνες από την μεταμόσχευση. Σε ορισμένες περιπτώσεις εμφανίζεται de novo μήνες έως χρόνια αργότερα. Είναι συχνή επιπλοκή και συμβαίνει στο 50% των αρρώστων μετά από ΜΜΟ από ιστοσυμβατό αδελφό ενώ μπορεί να αποβεί θανατηφόρα στο 5% των αρρώστων [18]. Η χρόνια GVHD είναι ένα πολυσυστηματικό σύνδρομο που έχει πολλές ομοιότητες με αυτοάνοσα νοσήματα του κολλαγόνου. Τα όργανα που συνήθως προσβάλλονται είναι το δέρμα, το στόμα, τα μάτια, οι εξωκρινείς αδένες, το συκώτι, οι πνεύμονες, ο μυελός των οστών, οι τένοντες και οι μυς. Στο δέρμα προκαλεί βλάβες που μοιάζουν με ομαλό λειχήνα ή σε προχωρημένα στάδια σκληρόδερμα λόγω της ίνωσης της δερμίδας και του υποδόριου ιστού. Μπορεί να κάνει έλκη που αργούν να

επουλωθούν, αλωπεκία, αγκύλωση των αρθρώσεων και εικόνα ινομυοσίτιδας. Στο στόμα προκαλεί έλκη και ξηρότητα του βλεννογόνου λόγω καταστροφής των σιελογόνων αδένων. Στα μάτια κάνει ξηρή κερατο-επιπεφυκίτιδα λόγω καταστροφής των δακρυικών αδένων. Στο συκώτι προκαλεί αποφρακτικό ίκτερο και στους πνεύμονες αποφρακτική βρογχολίτιδα. Στο μυελό προκαλεί ηωσηνοφιλία και θρομβοκυτταροπενία που θεωρείται κακό προγνωστικό σημείο. Η χρόνια GVHD προκαλεί σοβαρή βλάβη στο ανοσοποιητικό σύστημα που εκδηλώνεται σαν λεμφοπενία και προδιάθεση για λοιμώξεις κυρίως από βακτηρίδια όπως ο πνευμονιόκοκκος και ιούς όπως ο ιός του απλού έρπητα και του έρπητα ζωστήρα.

Η κλινική σταδιοποίηση της χρόνιας GVHD περιλαμβάνει: την περιορισμένη μορφή με μονοσυστηματική εντόπιση π.χ. μόνο δέρμα ή συκώτι και την εκτεταμένη μορφή με πολυσυστηματική εντόπιση. Χαρακτηριστικές ιστολογικές βλάβες στην χρόνια GVHD είναι: οι επιθηλιακές βλάβες με αναγέννηση της βασικής στοιβάδας, η λεμφοκυτταρικές διηθήσεις που παρατηρούνται στις βλάβες του δέρματος και των βλεννογόνων (σε αντίθεση με την οξεία μορφή όπου δεν υπάρχουν), και η εκτεταμένη ίνωση σε προχωρημένα στάδια. Ο κυριότερος παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη χρόνιας GVHD είναι η προηγούμενη ύπαρξη οξείας GVHD.

Παράγοντες και πρόβλεψη κινδύνου GVHD

Ο πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου (risk factor) για την εκδήλωση οξείας και χρόνιας GVHD είναι αντιγονική ασυμβατότητα ανάμεσα σε δότη και λήπτη. Αυτή περιλαμβάνει την ελεγχόμενη σήμερα ασυμβατότητα ως προς τα HLA αντιγόνα καθώς επίσης και ασυμβατότητα ως προς τα ελάσσονα αντιγόνα (mHA) η οποία προς το παρών δεν μπορεί να ελεγχθεί. Άλλοι παράγοντες κινδύνου είναι: η μη χορήγηση προληπτικής αγωγής για GVHD, η προχωρημένη ηλικία του αρρώστου ή του δότη, η ασυμβατότητα φύλου ανάμεσα σε δότη και λήπτη (μεγαλύτερος κίνδυνος σε ΜΜΟ από γυναίκα σε άνδρα), ο αριθμός των προηγούμενων κυήσεων εάν ο δότης είναι γυναίκα, η χρησιμοποίηση εντατικής προπαρασκευαστικής αγωγής και η ύπαρξη ιογενών λοιμώξεων. Η πιο συχνή εμφάνιση GVHD όταν ο δότης είναι γυναίκα και ο λήπτης

άνδρας πιθανώς οφείλεται στην ύπαρξη του ανδρικού mHA H-Y, του οποίου το γονίδιο βρίσκεται στο Y χρωμόσωμα, και φυσικά αναγνωρίζεται σαν ξένο από τα γυναικεία λεμφοκύτταρα [19].

Διάφορα τεστ έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς για την εκτίμηση του κινδύνου εμφάνισης οξείας και χρόνιας GVHD. Η μικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση (mixed lymphocyte culture - MLC), που κυρίως ανιχνεύει HLA class II διαφορές [20], είναι συνήθως αρνητική σε ιστοσυμβατά αδέρφια. Η σημασία της εξετάστηκε σε 783 αρρώστους που έκαναν MMO από ιστοσυμβατούς συγγενικούς δότες και δεν βρέθηκε κανένας συσχετισμός ανάμεσα στις σποραδικά θετικές αντιδράσεις και στην εμφάνιση οξείας ή χρόνιας GVHD [21]. Σε άλλη μελέτη ασθενών με MMO από δότες με κοινό ένα μόνο απλότυπο (haploidentical) ή από μη συγγενικούς δότες δεν υπήρξε στατιστικά σημαντικός συσχετισμός ανάμεσα στην MLC και στην ύπαρξη ή την σοβαρότητα οξείας GVHD [22]. Μια πιο ευαίσθητη μέθοδος είναι η ανάλυση της περιορισμένης αραιώσης (limiting dilution analysis - LDA) που επιτρέπει τον υπολογισμό της συχνότητας των αλλοαντιδρώντων T-κυττάρων με την χρησιμοποίηση εξίσωσης πιθανοτήτων (Poisson equation) [23]. Έτσι ο υπολογισμός της συχνότητας αλλοαντιδρώντων βοηθητικών (helper) κυττάρων μπορεί να προβλέψει την ανάπτυξη σοβαρής οξείας [24,25] και χρόνιας [26] GVHD σε MMO από HLA ιστοσυμβατούς συγγενικούς δότες. Επίσης ο υπολογισμός της συχνότητας αλλοαντιδρώντων βοηθητικών (helper) ή κυτταροτοξικών (cytotoxic) T-κυττάρων προβλέπει την ανάπτυξη οξείας GVHD σε MMO από μη συγγενικούς δότες [27]. Παρά το ότι η μέθοδος LDA είναι ο καλύτερος τρόπος που υπάρχει σήμερα για την εκτίμηση του κινδύνου GVHD, δεν χρησιμοποιείται ευρέως γιατί είναι πολύπλοκη μέθοδος και χρονοβόρα.

Πρόληψη GVHD

Είναι γενικά αποδεκτό ότι πάντα χρειάζεται κάποια προληπτική αγωγή για την αποφυγή εκδήλωσης σοβαρής GVHD μετά από αλλογενή MMO. Εάν αυτή παραληφθεί, τότε η πλειονότητα των αρρώστων θα εμφανίσει οξεία GVHD (βαθμού II-IV). Φυσικά εάν ο δότης είναι μη ιστοσυμβατός ή μη συγγενικός με τον άρρωστο η πιθανότητα για σοβαρή

GVHD αυξάνει κατά πολύ [28]. Η πρόληψη της GVHD γίνεται κατά βάση με 2 τρόπους: είτε με την χορήγηση ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων στον άρρωστο μετά την μεταμόσχευση με σκοπό να εμποδίσουν την αλλοαντίδραση των T-κυττάρων του δότη με τους ιστούς του αρρώστου, είτε με την αφαίρεση των T-κυττάρων του δότη από το μυελό πριν αυτός χορηγηθεί στον άρρωστο.

Όταν χορηγηθεί συνδυασμός 2 ή 3 ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων, η συχνότητα οξείας GVHD (βαθμός II-IV) σε ΜΜΟ μεταξύ ιστοσυμβατών αδελφών μειώνεται από 50% στο $20\% \pm 10\%$ [29]. Η αποτελεσματικότητα των φαρμάκων στην πρόληψη της χρόνιας GVHD είναι λιγότερο εμφανής. Ο πιο δημοφιλής συνδυασμός είναι της κυκλοσπορίνης Α με την μεθοτρεξάτη. Η κυκλοσπορίνη εμποδίζει την ενεργοποίηση αλλοαντιδρώντων T-κυττάρων μπλοκάροντας την παραγωγή IL-2 σε επίπεδο μεταγραφής γονιδίων. Η μεθοτρεξάτη είναι αναστολέας του φυλλικού οξέως και εμποδίζει των πολλαπλασιασμό ενεργοποιημένων T-κυττάρων. Η αποτελεσματικότητα αυτού του συνδυασμού επιβεβαιώθηκε σε πρόσφατη ανάλυση των αποτελεσμάτων, με βάση τα στοιχεία του διεθνούς αρχείου ΜΜΟ (IBMTR), σε 2286 αρρώστους με λευχαιμία (αρχικά στάδια) που μεταμοσχεύτηκαν από HLA-ιστοσυμβατά αδέρφια [30]. Για την πρόληψη της GVHD χρησιμοποιήθηκε μόνο μεθοτρεξάτη (28% αρρώστων), μόνο κυκλοσπορίνη (43%) ή συνδυασμός μεθοτρεξάτης και κυκλοσπορίνης (29%). Στα παιδιά κάτω των 16 χρονών δεν υπήρχε διαφορά στην συχνότητα GVHD ή στην επιβίωση χωρίς λευχαιμία (leukemia-free survival) ανάμεσα στις 3 μεθόδους πρόληψης. Στους ενήλικες όμως υπήρχε αυξημένη συχνότητα οξείας ($p < 0.001$) και χρόνιας ($p < 0.01$) GVHD στους αρρώστους με μονοθεραπεία σε σχέση με τον συνδυασμό των δύο φαρμάκων. Έτσι η πιθανότητα οξείας GVHD (βαθμού II-IV) ήταν: $50 \pm 5\%$ για την μεθοτρεξάτη, $43 \pm 3\%$ για την κυκλοσπορίνη και $29 \pm 4\%$ για τον συνδυασμό. Η πιθανότητα χρόνιας GVHD αντίστοιχα ήταν: $50 \pm 6\%$, $53 \pm 4\%$ και $44 \pm 5\%$. Το ποσοστό επιβίωσης χωρίς λευχαιμία στα 2 χρόνια αντίστοιχα ήταν: $47 \pm 5\%$, $56 \pm 3\%$ και $62 \pm 4\%$. Με αυτή και άλλες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι ο συνδυασμός μεθοτρεξάτης και κυκλοσπορίνης είναι αποτελεσματικότερος της μονοθεραπείας με το ένα από τα δύο φάρμακα, και ότι οδηγεί σε καλύτερα ποσοστά επιβίωσης. Αλλά φάρμακα που μπορεί να χρησιμοποιηθούν είναι κορτικοστεροειδή, αντιλεμφοκυτταρική σφαιρίνη ή το καινούργιο φάρμακο παρεμφερές

της κυκλοσπορίνης FK506 [31]. Κανένα φάρμακο μόνο του ή σε συνδυασμό δεν έχει αποδειχθεί καλύτερο του συνδυασμού μεθοτρεξάτης και κυκλοσπορίνης.

Με βάση τον καθοριστικό ρόλο που παίζουν οι κυτοκίνες στην παθογένεια της GVHD, χρησιμοποιήθηκε η πεντοξυφυλλίνη η οποία *in vitro* έχει αντι-TNF δράση. Δυστυχώς δεν αποδείχθηκε αποτελεσματική σε δύο καλά σχεδιασμένες μελέτες [32,33]. Επίσης με βάση την παθογένεια της GVHD, τα μικρόβια και οι λοιμώξεις μπορεί να αυξάνουν την ενεργοποίηση των μακροφάγων και άλλων APCs, υποβοηθώντας στην εκδήλωση GVHD. Η παραμονή του αρρώστου σε περιβάλλον χωρίς μικρόβια και η εντατική αντιμικροβιακή αγωγή για την εξολόθρευση των βακτηριδίων του γαστρεντερικού σωλήνα μπορεί να μειώσουν την πιθανότητα εμφάνισης GVHD σε αρρώστους με σοβαρή απλαστική αναιμία ή λευχαιμία [34,35]. Για τους ίδιους λόγους η ενδοφλέβια χορήγηση ανοσοσφαιρίνης κάθε βδομάδα τις πρώτες 100 μέρες μετά την μεταμόσχευση έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την πιθανότητα οξείας GVHD και γιαυτό χρησιμοποιείται συχνά σαν επιπρόσθετο μέτρο προφύλαξης [36].

Αναμφισβήτητα ο πιο αποτελεσματικός τρόπος πρόληψης της GVHD σε μεταμοσχεύσεις από ιστοσυμβατούς ή μη ιστοσυμβατούς δότες είναι η αφαίρεση των T-κυττάρων [37]. Μόνο το 0-15% των αρρώστων παρουσιάζουν οξεία GVHD (συνήθως ελαφριάς μορφής) μετά από ΜΜΟ από HLA ιστοσυμβατούς αδελφικούς δότες εφόσον τα T-κύτταρα έχουν αφαιρεθεί. Και μάλιστα η συχνότητα της οξείας GVHD σχετίζεται με τον αριθμό των T-κυττάρων ή των προγονικών τους κυττάρων που παραμένουν στο μόσχευμα μετά την αφαίρεση έτσι ώστε οξεία GVHD κατά κανόνα δεν συμβαίνει εάν χορηγηθούν λιγότερα από 10^5 T-κύτταρα/kg [38]. Υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι που μπορούν να πετύχουν αφαίρεση T-κυττάρων της τάξης των 3-5 logs (ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΙΙ-2).

Πίνακας ΙΙΙ-2. Μέθοδοι για αφαίρεση των T-κυττάρων του μοσχεύματος

Φυσικοί μέθοδοι

Φυγοκεντρικός διαχωρισμός (centrifugal elutriation)

Συγκόλληση με σπέρμα σόγιας και σχηματισμός ροζεττών (soybean agglutination / E-rosetting)

Μέθοδοι με μονοκλωνικά αντισώματα ειδικά για T-κύτταρα π.χ. CD2, CD5, CD6,

Αντισώματα συν συμπλήρωμα

Αντισώματα συνδεδεμένα με τοξίνες (ανοσοτοξίνες)

Αντισώματα συνδεδεμένα με μαγνητικά σφαιρίδια

Ενώ η αφαίρεση των T-κυττάρων είναι πολύ αποτελεσματικός τρόπος πρόληψης της οξείας και χρόνιας GVHD, δυστυχώς συγχρόνως σχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα απόρριψης του μοσχεύματος και υποτροπής της λευχαιμίας [39]. Η πιθανότητα απόρριψης του μοσχεύματος με την αφαίρεση των T-κυττάρων αυξάνει από 2% (μόσχευμα με T-κύτταρα) σε 10-20% (μόσχευμα χωρίς T-κύτταρα). Αυτό συμβαίνει διότι η χημειοθεραπεία και ακτινοβολία που χορηγούνται πριν την μεταμόσχευση δεν σκοτώνουν όλα τα λεμφοκύτταρα του αρρώστου και αυτά που απομένουν μπορούν να προκαλέσουν απόρριψη. Απόρριψη δεν συμβαίνει εάν υπάρχουν τα T-κύτταρα του δότη στο μόσχευμα πιθανώς λόγω ανταγωνισμού ή παραγωγής κυτοκινών που ευνοούν την εμφύτευση του μοσχεύματος. Ο αριθμός των προγονικών κυττάρων που περιέχονται στο μόσχευμα είναι επίσης μειωμένος μετά την αφαίρεση των T-κυττάρων προφανώς λόγω συναφαίρεσης τους μαζί με τα T-κύτταρα. Σήμερα υπάρχουν τρόποι να αποφευχθεί η απόρριψη, αυξάνοντας την ένταση της προπαρασκευαστικής αγωγής [40] ή την δόση των προγονικών κυττάρων στο μόσχευμα με την χρησιμοποίηση περιφερικού αίματος [41].

Αφαίρεση των T-κυττάρων από το μόσχευμα συνήθως οδηγεί σε μερικό χιμαιρισμό (partial chimerism) [42], που τελικά οδηγεί σε υποτροπή της λευχαιμίας [43]. Ιδιαίτερα για την χρόνια μυελογενή λευχαιμία, όπου συχνά είναι δυνατή η ανίχνευση λευχαιμικών κυττάρων μετά την μεταμόσχευση [44], η πιθανότητα λευχαιμικής υποτροπής αυξάνει από 12% (μόσχευμα με T-κύτταρα) σε πάνω από 50% (μόσχευμα χωρίς T-κύτταρα) [45]. Αυτό επιβεβαιώνει την σημασία των T-κυττάρων στην καταπολέμηση της λευχαιμίας με την αντίδραση μοσχεύματος κατά λευχαιμίας (GVL). Πέρα της μειωμένης ανοσολογικής αντίδρασης ενάντια στην λευχαιμία, η αφαίρεση των T-κυττάρων συνήθως οδηγεί και σε καθυστερημένη ανοσολογική αποκατάσταση πού συνεπάγεται αυξημένο κίνδυνο λοιμώξεων για τον άρρωστο [46-48]. Σε ανοσολογική ανεπάρκεια λόγω αφαίρεσης των

T-κυττάρων, οφείλεται και η ανάπτυξη λεμφωμάτων σχετιζομένων με τον ιό Epstein-Barr, μετά από ΜΜΟ ιδιαίτερα από μή ιστοσυμβατούς δότες [49].

Το πιο δημοφιλές αντίσωμα για αφαίρεση των T-κυττάρων, τουλάχιστον στην Ευρώπη, είναι το Campath-1 [σύνοψη 50]. Αυτό είναι ένα αντίσωμα από αρουραίο που αναγνωρίζει τον υποδοχέα CDw52 που βρίσκεται στην επιφάνεια των T-κυττάρων, B-κυττάρων, και μερικών NK κυττάρων (natural killer cells). Υπάρχει σε δύο μορφές: IgM και IgG2b, και χρησιμοποιείται *in vitro* και *in vivo* για την προφύλαξη από GVHD. Σε κλινικές μελέτες με το Campath-1 λιγότεροι από το 10% των αρρώστων ανέπτυξαν GVHD αλλά 15-20% παρουσίασαν απόρριψη του μοσχεύματος. Η απόρριψη του μοσχεύματος ήταν λιγότερο συχνή εάν χορηγήτο κυκλοσπορίνη μετά την μεταμόσχευση ή εάν είχε χρησιμοποιηθεί ολική ακτινοβολία του λεμφικού συστήματος (TLI) πριν την μεταμόσχευση. Επίσης η πιθανότητα λευχαιμικής υποτροπής ήταν αυξημένη και ιδιαίτερα για την χρόνια μυελογενή λευχαιμία ήταν 40-70%. Η *in vivo* χορήγηση του Campath-1G μετά την μεταμόσχευση για την πρόληψη της GVHD έχει οδηγήσει σε καλύτερα αποτελέσματα, με αποφυγή της απόρριψης του μοσχεύματος και πιθανότητα οξείας GVHD (II-IV) 19%. Παρόλα αυτά, η πιθανότητα χρόνιας GVHD ήταν 46% και υπήρχε μία καθυστέρηση 7 ημερών στην εμφύτευση των ουδετερόφιλων.

Φαίνεται λοιπόν ότι υπάρχει ένας συσχετισμός ανάμεσα στα T-κύτταρα του δότη, στην ποσότητα προγονικών κυττάρων μέσα στο μόσχευμα, στην ένταση της προπαρασκευαστικής αγωγής και στην πιθανότητα εμφύτευσης του μοσχεύματος και ανάπτυξης GVHD και GVL [51]. Σε ΜΜΟ από ιστοσυμβατούς συγγενικούς δότες η πρόληψη με την φαρμακολογική ανοσοκαταστολή γενικά θεωρείται επαρκής γιαυτό και εφαρμόζεται ευρέως. Αντιθέτως σε ΜΜΟ από μη ιστοσυμβατούς συγγενικούς δότες ή ιστοσυμβατούς μη συγγενικούς δότες τα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα δεν επαρκούν από μόνα τους στην πρόληψη σοβαρής GVHD και συνήθως συνδυάζονται με αφαίρεση των T-κυττάρων. Σε αυτή την περίπτωση η αφαίρεση των T-κυττάρων δεν συνοδεύεται από αυξημένη πιθανότητα λευχαιμικής υποτροπής, πιθανώς λόγω διατήρησης της GVL από την έντονη αλλοαντιδραστικότητα των λίγων T-κυττάρων που χορηγούνται με το μόσχευμα [52,53].

Θεραπεία GVHD

Η διάγνωση **οξεία GVHD** δεν χρειάζεται πάντα και άμεση έναρξη θεραπείας. Άρρωστοι χωρίς γενικά συμπτώματα και με ένα εντοπισμένο εξάνθημα συνήθως ανταποκρίνονται στην τοπική χρήση κορτικοστεροειδούς αλοιφής. Συστηματική θεραπεία απαιτείται όταν ο άρρωστος έχει πυρετό και άλλα γενικά συμπτώματα καθώς και όταν το εξάνθημα εξαπλώνεται ή χειροτερεύει. Επίσης όταν έχει προσβληθεί το γαστρεντερικό σύστημα ή το συκώτι. Η πιο αποτελεσματική θεραπεία είναι τα στεροειδή σε υψηλές δόσεις όπως μεθυλπρεδνιζολόνη 1 g/m² ανά 24 ώρες. Συνολικά το 30-50% των αρρώστων ανταποκρίνεται ικανοποιητικά σε αυτή την θεραπεία [54]. Η δόση πρέπει να μειώνεται σταδιακά για να αποφευχθεί υποτροπή της GVHD. Λόγω της ανοσοκαταστολής αφενός από την GVHD, και αφετέρου από τα στεροειδή, οι άρρωστοι συχνά αναπτύσσουν λοιμώξεις από βακτηρίδια, ιούς και μύκητες. Για τους αρρώστους με GVHD που δεν ανταποκρίνεται στα στεροειδή η πρόγνωση είναι κακή. Η θνησιμότητα είναι περίπου 80% και όσοι επιβιώσουν συνήθως αναπτύσσουν χρόνια GVHD. Η χορήγηση αντιλεμφοκυτταρικής σφαιρίνης (ALG) μπορεί να είναι αποτελεσματική στο 25-30% των περιπτώσεων, αν και είναι τοξική προκαλώντας σοβαρή ανοσοκαταστολή και θρομβοκυτταροπενία. Για περιπτώσεις ανθεκτικές στην παραπάνω θεραπεία, η χορήγηση ανοσοτοξινών που καταστρέφουν τα T-λεμφοκύτταρα όπως το XomaZyme-CD5 Plus (anti-CD5+ricin-A chain) [55] ή μονοκλωνικών αντισωμάτων ειδικών για τις κυτοκίνες που θεωρούνται υπεύθυνες για την GVHD όπως IL-2, IL-1, TNFα [56-58] μπορούν να επιφέρουν παροδική συνήθως βελτίωση σε ένα σημαντικό ποσοστό των αρρώστων.

Η θεραπεία της **χρόνιας GVHD** είναι συνήθως μακροχρόνια και περιλαμβάνει συνδυασμό κυκλοσπορίνης και κορτικοστεροειδών κατά προτίμηση χορηγούμενα μέρα παρά μέρα για να αποφευχθούν παρενέργειες [59]. Ταυτόχρονα συνιστάται η χορήγηση αντιβιοτικών για την προφύλαξη από pneumocystis και πνευμονιόκοκκο ή άλλους

μικροοργανισμούς λόγω της υπολειτουργίας του σπλήνα στην χρόνια GVHD. Σε ανθεκτικές μορφές χρονίας GVHD, η θαλιδομίδη έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στο 20-30% των αρρώστων [60, 61]. Σε ανθεκτικές περιπτώσεις με προσβολή του δέρματος ή του στοματικού βλεννογόνου, η θεραπεία με PUVA ακτινοβολία έχει δώσει πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα [62]. Για την ξηρότητα του στοματικού βλεννογόνου και των ματιών χορηγούνται ενυδατικά διαλύματα. Επίσης επειδή η έκθεση στον ήλιο μπορεί να ενεργοποιήσει την χρόνια GVHD, χορηγούνται αντηλιακές κρέμες και συνιστάται στον άρρωστο να αποφεύγει τον ήλιο. Με όλα αυτά τα μέτρα η συχνότητα του σκληροδέρματος που προκαλεί αναπηρία έχει μειωθεί από 50% στο 6% [63]. Παρόλα αυτά οι λοιμώξεις παραμένουν η πιο συχνή αιτία θανάτου από χρόνια GVHD ιδιαίτερα σε αρρώστους προχωρημένης ηλικίας, με μη ιστοσυμβατούς δότες, με προοδευτική μορφή χρονίας GVHD και συσχετιζόμενη χρόνια θρομβοκυττοπενία. _

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Billingham R: The biology of graft-versus-host reactions. Harvey Lectures 1966, 62:21
2. Kernan N., Collins N., Juliano L., et al: Clonable T lymphocytes in T cell depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-versus-host disease. Blood 1986, 68:770
3. Ferrara J., Deeg H: Graft-versus-host disease. NEJM 1991, 324:667
4. Antin J., Ferrara J: Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. Blood 1992, 80:2964
5. Xun C., Thompson J., Jennings C., et al: Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2 incompatible transplanted SCID mice. Blood 1994, 83:2360

6. Cavender D., Haskard D., Joseph B., et al: Interleukin-1 increases the binding of human B and T lymphocytes to endothelial cell monolayers. *J Immunol* 1986, 136:203
7. Thornhill M., Wellicome S., Mahiouz D., et al: Tumor necrosis factor combines with IL-4 or INF γ to selectively enhance endothelial cell adhesiveness for T cells. *J Immunol* 1991, 146:592
8. Leeuwenberg J., van Damme J., Maeger T., et al: Effects of tumor necrosis factor on the interferon- γ -induced major histocompatibility complex class II antigen expression by human endothelial cells. *Eur J Immunol* 1988, 18:1469
9. Via C., Finkelman F: Critical role of interleukin-2 in the development of acute graft-versus-host disease. *Int Immunol* 1993, 5:565
10. Ferrara J., Abhyankar S., Gilliland D: Cytokine storm of graft-versus-host disease: a critical effector role for interleukin-1. *Transplant Proc* 1993, 25:1216
11. Garside P., Hutton A., severn A., et al: Nitric oxide mediates intestinal pathology in graft-versus-host disease. *Eur J Immunol* 1992, 22:2141
12. Nestel F., Price K., Seemayer T., et al: Macrophage priming and lipopolysaccharide-triggered release of tumor necrosis factor α during graft-versus-host disease. *J Exp Med* 1992, 175:405
13. Parkman R: Clonal analysis of murine graft-versus-host diseases: phenotypic and functional analysis of T lymphocyte clones. *J Immunol* 1986, 136:3543
14. Atkinson K., Storb R., Ochs H., et al: Thymus transplantation after allogeneic bone marrow grafting to prevent chronic graft-versus-host disease in humans. *Transplantation* 1982, 33:168
15. Gajewski J., Cecka M., Champlin R: Bone marrow transplantation utilizing HLA-matched marrow donors. *Blood Rev* 1990, 4:132
16. Glucksberg H., Storb R., Fefer A., et al: Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. *Transplantation* 1974, 18:295
17. Ferrara J: Paradigm shift for graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 1994, 14:183
18. Atkinson K: Chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow transplant* 1990, 5:69

19. Wang W., Meadows L., den Haan J: Human H-Y: a male-specific histocompatibility antigen derived from the SMCY protein. *Science* 1995, 269:1588
20. Tiercy J., Roosnek E., Mach B: Bone marrow transplantation with unrelated donors: HLA class II oligonucleotide typing as predictive of mixed lymphocyte culture reactivity. *Transplantation Proceedings* 1993, 25:1243
21. DeGast G., Mickelson E., Beatty P., et al: Mixed leukocyte culture reactivity and graft-versus-host disease in HLA-identical marrow transplantation for leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1992, 9:87
22. Mickelson E., Anasetti C., Choo S., et al: Role of the mixed lymphocyte culture reaction in predicting acute graft-versus-host disease after marrow transplants from haploidentical and unrelated donors. *Transplantation Proceedings* 1993, 25:1239
23. Sharrock C., Kaminski E., Man S: Limiting dilution analysis of human T cells: a useful clinical tool. *Immunology Today* 1990, 11:281
24. Theobald M., Nierle T., Bunjes D., et al: Host-specific interleukin-2-secreting donor T-cell precursors as predictors of acute graft-versus-host disease in bone marrow transplantation between HLA-identical siblings. *NEJM* 1992, 327:1613
25. Schwarzer A., Jiang Y., Brookes P., et al: Frequency of anti-recipient alloreactive helper T-cell precursors in donor blood and graft-versus-host disease after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Lancet* 1993, 341:203
26. Bunjes D., Theobald M., Nierle T., et al: Presence of host-specific interleukin-2 secreting T helper cell precursors correlates closely with active primary and secondary chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 1995, 15:727
27. Schwarzer A., Jiang Y., Deacock S., et al: Comparison of helper and cytotoxic anti-recipient T cell frequencies in unrelated bone marrow transplantation. *Transplantation* 1994, 58:1198
28. Anasetti C., Beatty P., Storb R., et al: Effect of HLA incompatibility on graft-versus-host disease, relapse, and survival after marrow transplantation for patients with leukemia or lymphoma. *Human Immunology* 1990, 29:79
29. Bron D: Graft-versus-host disease. *Current Opinion in Oncology* 1994, 6:358

30. Ringden O., Horowitz M., Sondel P., et al: Methotrexate, cyclosporine, or both to prevent graft-versus-host disease after HLA-identical sibling bone marrow transplants for early leukemia. *Blood* 1993, 81:1094
31. Nash R., Etzioni R., Storb R., et al: Tacrolimus (FK506) alone or in combination with methotrexate or methylprednisolone for the prevention of acute GVHD after marrow transplantation from HLA-matched siblings: a single center study. *Blood* 1995, 85:3746
32. Clift R., Bianco J., Appelbaum F., et al: A randomized controlled trial of pentoxifylline for the prevention of regimen-related toxicities in patients undergoing allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1993, 82:2025
33. Attal M., Huguet F., Rubie H., et al: Prevention of regimen-related toxicities after bone marrow transplantation by pentoxifylline: a prospective randomized trial. *Blood* 1993, 82:732
34. Storb R., Prentice R., Buckner C., et al: Graft-versus-host disease and survival in patients with aplastic anemia treated by bone marrow grafts from HLA-identical siblings. Beneficial effect of a protective environment. *NEJM* 1983, 308:302
35. Beelen D., Haralambie E., Brandt H., et al: Evidence that sustained growth suppression of intestinal anaerobic bacteria reduces the risk of acute GVHD after sibling marrow transplantation. *Blood* 1992, 80:2668
36. Sullivan K: Immunomodulation in allogeneic marrow transplantation: use of intravenous immune globulin to suppress acute GVHD. *Clin Exp Immunol* 1996, 104 (suppl 1):43
37. Champlin R: T-cell depletion to prevent GVHD after bone marrow transplantation. *Hematol Oncol Clin N Am* 1990, 4:687
38. Kernan N., Collins N., Juliano L., et al: Clonable T-lymphocytes in T-cell depleted bone marrow transplants correlate with development of GVHD. *Blood* 1986, 68:770
39. Marmont A., Horowitz M., Gale R., et al: T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood* 1991, 78:2120
40. Terenzi A., Lubin I., Lapidot T., et al: Enhancement of T cell-depleted bone marrow allografts in mice by thiotepa. *Transplantation* 1990, 50:717

41. Aversa F., Tabilio A., Terenzi A., et al: Successful engraftment of T-cell depleted haploidentical “three-loci” incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. *Blood* 1994, 84:3948
42. Bertheas M., Maraninchi D., Lafage M., et al: Partial chimerism after T-cell-depleted allogeneic BMT in leukemic HLA-matched patients: a cytogenetic documentation. *Blood* 1988, 72:89
43. Mackinnon S., Barnett L., Heller G., et al: Minimal residual disease is more common in patients who have mixed T-cell chimerism after bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1994, 83:3409
44. Roth M., Antin J., Ash R., et al: Prognostic significance of Philadelphia chromosome-positive cells detected by the polymerase chain reaction after allogeneic BMT for CML. *Blood* 1992, 79:276
45. Goldman J., Gale R., Botrin M., et al: BMT for CML in chronic phase: increased risk of relapse associated with T-cell depletion. *Ann Int Med* 1988, 108:806
46. Sugita K., Nojima Y., Tachibana K., et al: Prolonged impairment of very late activating antigen-mediated T cell proliferation via the CD3 pathway after T cell-depleted allogeneic BMT. *J Clin Invest* 1994, 94:481
47. Roux E., Helg C., Girard F., et al: Analysis of T-cell repopulation after allogeneic bone marrow transplantation: significant differences between recipients of T-cell depleted and unmanipulated grafts. *Blood* 1996, 87:3984
48. Bacigalupo A., Tedone E., Isaza a., et al: CMV antigenemia after allogeneic bone marrow transplantation: correlation of CMV antigen positive cell numbers with viral transplant-related mortality. *Bone Marrow Transplant* 1995, 16:155
49. Zutter m., Martin P., Sale G., et al: Epstein-Barr virus lymphoproliferation after bone marrow transplantation. *Blood* 1988, 72:520
50. Hale G., Waldmann H: Control of graft-versus-host disease and graft rejection by T cell depletion of donor and recipient with Campath-1 antibodies. Results of matched sibling transplants for malignant diseases. *Bone Marrow Transplant* 1994, 13:597

51. Truitt R., Atasoylu A: Impact of pretransplant conditioning and donor T cells on chimerism, GVHD, GVL reactivity and tolerance after allogeneic BMT. *Blood* 1991, 77:2515
52. Ash R., Horowitz M., Gale R., et al: Bone marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings: effect of T cell depletion. *Bone Marrow Transplant* 1991, 7:443
53. Hessner M., Endean D., Casper J., et al: Use of unrelated marrow grafts compensates for reduced graft-versus-leukemia reactivity after T-cell depleted allogeneic BMT for CML. *Blood* 1995, 86:3987
54. Hings I., Filipovich A., Miller W: Prednisone therapy for acute graft-versus-host disease: short-versus-long term treatment. *Transplantation* 1993, 56:577
55. Martin P., Nelson B., Appelbaum F., et al: Evaluation of a CD5-specific immunotoxin for treatment of acute GVHD after allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1996, 88:824
56. Anasetti C., Hansen J., Waldmann T., et al: Treatment of acute GVHD with humanized anti-Tac: an antibody that binds to the interleukin-2 receptor. *Blood* 1994, 84:1320
57. Antin J., Weinstein H., Guinan E., et al: Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of steroid-resistant GVHD. *Blood* 1994, 84:1342
58. Herve P., Flesch M., Tiberghien P., et al: Phase I-II trial of a monoclonal anti-tumor necrosis factor α antibody for the treatment of refractory severe acute GVHD. *Blood* 1992, 79:3362
59. Sullivan K., Storb R., Witherspoon R., et al: Alternating day cyclosporine and prednisolone for treatment of high risk chronic GVHD. *Blood* 1988, 72:555
60. Vogelsang G., Farmer E., Hess A., et al: Thalidomide for the treatment of chronic GVHD. *NEJM* 1992, 326:1055
61. Parker P., Chao N., Nademanee A., et al: Thalidomide as salvage therapy for chronic GVHD. *Blood* 1995, 86:3604
62. Vogelsang G., Wolff D., Altomonte V., et al: Treatment of chronic GVHD with ultraviolet irradiation and psoralen (PUVA). *Bone Marrow Transplant* 1996, 17:1061

63. Siadak M., Sullivan K: The management of chronic GVHD. Blood Reviews 1994, 9:154

IV. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ ΚΑΤΑ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ (GVL)

Η αλλογενής ΜΜΟ θεραπεύει τις αιματολογικές κακοήθειες αφενός λόγω των υψηλών δόσεων χημειοθεραπείας και ακτινοβολίας που χρησιμοποιούνται στην προπαρασκευαστική αγωγή πριν την μεταμόσχευση, και αφετέρου λόγω της ανοσολογικής αντιλευχαιμικής δράσης του μοσχεύματος που ονομάζεται αντίδραση μοσχεύματος κατά λευχαιμίας (graft-versus-leukemia effect - GVL). Πρώτοι οι Barnes και Loutit το 1957 περιέγραψαν μία αλλοαντίδραση ανάμεσα στα κύτταρα μυελού του δότη και σε λευχαιμικά κύτταρα [1]. Με βάση τα πειραματά τους, τα ποντίκια με λευχαιμία που τους έγινε αλλογενή μεταμόσχευση θεραπεύτηκαν από την λευχαιμία αλλά πέθαναν από GVHD, ενώ τα ποντίκια που τους έγινε συγγενική μεταμόσχευση πέθαναν από λευχαιμία χωρίς όμως GVHD. Όταν η ΜΜΟ έγινε αποδεκτή θεραπεία για τις λευχαιμίες και άρχισε να χρησιμοποιείται ευρέως, έγινε αντιληπτό ότι οι άρρωστοι με GVHD είχαν μεγαλύτερη πιθανότητα να θεραπευτούν από την λευχαιμία [2]. Επίσης, όταν στην δεκαετία του 1980, η αφαίρεση των Τ-κυττάρων από τα μυελικά μοσχεύματα έγινε δημοφιλής τρόπος πρόληψης της GVHD, τότε παρατηρήθηκε μία αύξηση των λευχαιμικών υποτροπών [3]. Αυτές οι παρατηρήσεις οδήγησαν στην αντίληψη ότι τα Τ-κύτταρα του δότη έχουν αντιλευχαιμική δράση. Το γεγονός ότι η πιθανότητα λευχαιμικής υποτροπής είναι μεγαλύτερη μετά από ΜΜΟ μεταξύ μονοζυγωτικών διδύμων αδελφών παρά μεταξύ HLA ιστοσυμβατών αδελφών [4], υποδηλώνει ότι αυτή η αντιλευχαιμική δράση οφείλεται σε αλλοαντιδραστικότητα και γιαυτό δεν υπάρχει όταν ο δότης και ο άρρωστος είναι γενετικά ίδιοι. Οι πρώτες προσπάθειες για αύξηση της GVL περιλάμβαναν χορήγηση λεμφοκυττάρων από τον δότη νωρίς μετά την μεταμόσχευση και απέτυχαν διότι προκάλεσαν στους αρρώστους οξεία GVHD σοβαρής μορφής [5]. Όμως με βάση πειραματικά δεδομένα σε ζώα [6], έγιναν με επιτυχία μεταγγίσεις λευκοκυττάρων από τους δότες στους αρρώστους που υποτροπίασαν με χρόνια μυελογενή λευχαιμία μήνες ή χρόνια μετά από ΜΜΟ [7]. Η αντίληψη για την

GVL τα τελευταία χρόνια έχει αλλάξει, και τώρα πλέον πιστεύεται ότι παίζει μεγάλο ρόλο στην θεραπεία των αιματολογικών κακοηθειών με MMΟ [8].

Κλινική μαρτυρία για την ύπαρξη GVL

Την αντιλευχαιμική δράση της GVHD πρώτος την περιέγραψε ο Weiden *et al* [9] όταν το 1979 ανακοίνωσαν ότι οι άρρωστοι με GVHD είχαν 2.5 φορές μικρότερη πιθανότητα να παρουσιάσουν λευχαιμική υποτροπή σε σύγκριση με αυτούς που δεν είχαν παρουσιάσει GVHD. Αυτό επιβεβαιώθηκε από την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του Διεθνούς Αρχείου MMΟ (International Bone Marrow Transplant Registry - IBMTR) [10]. Με βάση αυτή την ανάλυση που περιλαμβάνει την εμπειρία από τα αποτελέσματα χιλιάδων αρρώστων από όλο τον κόσμο, η οξεία και η χρόνια μορφή GVHD σχετίζονται με μειωμένη πιθανότητα λευχαιμικής υποτροπής σε αρρώστους με οξεία λευχαιμία, που τους έγινε MMΟ ενόσω βρίσκονταν στην πρώτη ύφεση της αρρώστιας τους. Για την χρόνια φάση της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (CML), μόνο η χρόνια GVHD συνοδεύεται από χαμηλότερη πιθανότητα λευχαιμικής υποτροπής. Η αφαίρεση των T-κυττάρων από το μυελικό μόσχευμα σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο λευχαιμικής υποτροπής κυρίως στην CML και σε μικρότερο βαθμό στην οξεία λεμφογενή και οξεία μυελογενή λευχαιμία. Ιδιαίτερα για την χρόνια φάση CML, η πιθανότητα υποτροπής με την αφαίρεση των T-κυττάρων είναι πενταπλάσια σε σύγκριση με αυτή άλλων αρρώστων που κάνουν MMΟ χωρίς αφαίρεση T-κυττάρων και που δεν παρουσιάζουν GVHD. Αυτή η παρατήρηση οδηγεί στο συμπέρασμα ότι στην CML, τα T-κύτταρα έχουν αντιλευχαιμική δράση που είναι ανεξάρτητη κλινικά σημαντικής GVHD. Επίσης από άλλη ανάλυση των δεδομένων του IBMTR [4], οι άρρωστοι με οξεία ή χρόνια μυελογενή λευχαιμία, αλλά όχι με οξεία λεμφογενή λευχαιμία, έχουν αυξημένη πιθανότητα υποτροπής εάν τους γίνει MMΟ από μονοζυγωτικούς δίδυμους δότες παρά από HLA ιστοσυμβατούς αδελφικούς δότες ανεξάρτητα της ύπαρξης ή όχι GVHD. Αρα υπάρχει ένα αλλογενές στοιχείο στην GVL το οποίο επίσης είναι ανεξάρτητο της GVHD. Εκτός της αφαίρεσης των T-κυττάρων, και η ανοσοκαταστολή με φάρμακα για την πρόληψη της GVHD μπορεί να αυξήσει την πιθανότητα λευχαιμικής υποτροπής [11]. Η χρησιμοποίηση μονοκλωνικών αντισωμάτων για τον αποκλεισμό του υποδοχέα της

ιντερλευκίνης-2 (IL-2R), δυστυχώς μειώνει όχι μόνο την αντίδραση GVHD αλλά συγχρόνως και την αντίδραση GVL, έτσι ώστε η πιθανότητα επιβίωσης χωρίς λευχαιμία να είναι μειωμένη [12]. Επίσης έχουν αναφερθεί περιπτώσεις αρρώστων με υποτροπή χρόνιας φάσης CML μετά από MMO, που πέτυχαν αιματολογική ύφεση της αρρώστιας τους μετά από την απότομη διακοπή της κυκλοσπορίνης, και την εμφάνιση GVHD [13].

Μεταγίσεις λεμφοκυττάρων από τους δότες

Η πιο άμεση και σημαντική μαρτυρία για την ύπαρξη GVL αντίδρασης προέρχεται από την επιτυχή χορήγηση λεμφοκυττάρων του δότη για την θεραπεία λευχαιμικής υποτροπής μετά από MMO [7]. Αυτό έχει επιβεβαιωθεί σήμερα χάρις στις πολυάριθμες αναφορές, από διάφορα μεταμοσχευτικά κέντρα, με βάση τις οποίες διάφορα προκαταρκτικά συμπεράσματα μπορούν να εξαχθούν. Η GVL αντίδραση από χορήγηση λεμφοκυττάρων του δότη είναι πιο αποτελεσματική σε αρρώστους που παρουσιάζουν μοριακή ή κυτταρογενετική ή αιματολογική σε χρόνια φάση υποτροπή της CML μετά από MMO. Αντιθέτως, η χορήγηση λεμφοκυττάρων δότη δεν είναι τόσο αποτελεσματική σε αρρώστους που υποτροπιάζουν με επιταχυνόμενη φάση ή βλαστική κρίση CML, οξεία μυελογενή ή οξεία λεμφογενή λευχαιμία και μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα. Στην αναφορά που περιλαμβάνει τον μεγαλύτερο αριθμό αρρώστων μέχρι στιγμής, ο Kolb *et al* [14] ανακοίνωσαν ότι η πιθανότητα πλήρους ύφεσης μετά από χορήγηση λεμφοκυττάρων δότη είναι 82% για κυτταρογενετική υποτροπή CML, 78% για αιματολογική υποτροπή σε χρόνια φάση CML και μόνο 12.5% για υποτροπή σε πιο προχωρημένα στάδια. Το 25% των αρρώστων με οξεία μυελογενή λευχαιμία και μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο, παρουσίασαν προσωρινή ύφεση μετά την χορήγηση λεμφοκυττάρων δότη. Αντιθέτως κανένας από τους αρρώστους με οξεία λεμφογενή λευχαιμία δεν ανταποκρίθηκε σε αυτή τη θεραπεία. Επιπρόσθετα αναφέρεται ότι οι άρρωστοι με CML, που τους είχε γίνει MMO με αφαίρεση των T-κυττάρων, και αυτοί που δεν είχαν παρουσιάσει οξεία ή χρόνια GVHD μετά την MMO, είχαν μεγαλύτερη πιθανότητα να ωφεληθούν από τις μεταγίσεις λεμφοκυττάρων δότη. Η ταυτόχρονη χορήγηση ιντερφερόνης μπορεί να αυξήσει την πιθανότητα να παρουσιάσει ο άρρωστος GVHD. Παραπάνω από τους μισούς αρρώστους παρουσίασαν GVHD μετά την

χορήγηση λεμφοκυττάρων δότη, και για τους αρρώστους η πιθανότητα ανταπόκρισης στη θεραπεία ήταν 91%. Παρόλα αυτά η εμφάνιση GVHD δεν ήταν απαραίτητη προϋπόθεση για την ανταπόκριση του ασθενή στην θεραπεία διότι το 56% των αρρώστων που δεν ανέπτυξαν GVHD, παρουσίασαν ύφεση της αρρώστιας τους. Η αρχική ανταπόκριση σε αρρώστους με CML παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο 8-10 βδομάδες μετά την μετάγγιση των λεμφοκυττάρων του δότη και συνήθως ολοκληρώθηκε με πλήρη μοριακή ύφεση (αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης αρνητική) μετά την πάροδο μερικών μηνών. Πανκυτταροπενία εμφανίστηκε στο 36% των αρρώστων, προφανώς διότι δεν μπόρεσε το αιμοποιητικό σύστημα του δότη να αναλάβει μετά την επιτυχή εξολόθρευση της λευχαιμίας από τα μεταγγισθέντα λεμφοκύτταρα του δότη. Στις περισσότερες περιπτώσεις η αιμοποίηση επανήλθε από μόνη της, αλλά ορισμένες φορές χρειάστηκε επιπλέον μετάγγιση CD34+ κυττάρων από τον δότη. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, οι μεταγγίσεις λεμφοκυττάρων δότη έχουν γίνει η θεραπεία εκλογής για αρρώστους με υποτροπή χρόνιας φάσης CML μετά από MMO. Παρά την αποτελεσματικότητα αυτής της θεραπείας, υπάρχει δυστυχώς και 15-20% θνησιμότητα λόγω GVHD και μυελικής απλασίας [14,15]. Η χορήγηση λεμφοκυττάρων δότη για την θεραπεία μοριακής ή κυτταρογενετικής υποτροπής CML, μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερα αποτελέσματα, διότι έχει λιγότερες πιθανότητες να προκαλέσει μυελική απλασία και η αντιλευχαιμική δράση των λεμφοκυττάρων μπορεί να είναι πιο αποτελεσματική εφόσον η λευχαιμία δεν είχε χρόνο να προχωρήσει [15].

Επίσης έχει αναφερθεί ότι η ιντερφερόνη α είναι αποτελεσματική θεραπεία για υποτροπή CML μετά από MMO. Ο Pigneux *et al* [17] ανακοίνωσαν ότι σε 33 αρρώστους με κυτταρογενετική ή αιματολογική υποτροπή CML μετά από MMO, 11 άρρωστοι (33%) παρουσίασαν πλήρη και διαρκή κυτταρογενετική ύφεση μετά την χορήγηση ιντερφερόνης. Πέντε από τους 10 αρρώστους που εξετάστηκαν με την αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης για τον ανασυνδυασμό BCR-ABL, βρέθηκαν αρνητικοί. Η θεραπευτική δράση της ιντερφερόνης δεν είναι γνωστό που οφείλεται αλλά πιθανολογείται ότι σχετίζεται με μια ανοσορυθμιστική δράση της στα λευχαιμικά κύτταρα ή στα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος.

Προς το παρόν, λόγω έλλειψης συστηματικής μελέτης, δεν είναι ακόμα γνωστό το καταλληλότερο θεραπευτικό σχήμα για την χορήγηση των μεταγγίσεων λεμφοκυττάρων δότη. Μέχρι τώρα έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες δοσολογίες ($0.1-15 \times 10^8/\text{kg}$) και συνήθως τα λεμφοκύτταρα του δότη χορηγούνται στον άρρωστο με πολλαπλές μεταγγίσεις, μέρες ή βδομάδες ξεχωριστά. Σε μία μελέτη για την θεραπεία υποτροπής χρόνιας φάσης CML μετά από MMO, όπου η δοσολογία των λεμφοκυττάρων του δότη αυξανώταν προοδευτικά, η δόση $1 \times 10^7/\text{kg}$ ήταν η ελάχιστη δόση που επέφερε ύφεση της λευχαιμίας χωρίς υψηλή συχνότητα GVHD [18]. Σε άλλες μελέτες όμως, μεγαλύτερες δόσεις λεμφοκυττάρων ($2.5-5 \times 10^8/\text{kg}$) έχουν απαιτηθεί για την θεραπεία πιο προχωρημένου σταδίου CML [19]. Αυτές οι δόσεις φυσικά αφορούν HLA ιστοσυμβατούς αδελφικούς δότες. Η GVH αντίδραση μπορεί να είναι εντονότερη όταν χρησιμοποιηθούν λεμφοκύτταρα από μη συγγενικούς ιστοσυμβατούς δότες και συνήθως συνοδεύεται από GVHD [16]. Λόγω του αυξημένου κινδύνου πρόκλησης GVHD, έχουν επίσης χορηγηθεί κλάσματα λεμφοκυττάρων που θεωρούνται ότι έχουν λιγότερες πιθανότητες να προκαλέσουν GVHD. Σε μερικούς αρρώστους με υποτροπή CML χορηγήθηκαν λεμφοκύτταρα δότη αφού αφαιρέθησαν τα CD8+ T-κύτταρα, και όπως αποδείχτηκε προκάλεσαν ύφεση της λευχαιμίας χωρίς να προκαλέσουν σοβαρή GVHD [20]. Σε άλλες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι μερικές οξείες και χρόνιες λευχαιμίες που δεν ανταποκρίνονται σε χορήγηση λεμφοκυττάρων δότη, μπορεί να τελικά να υποχωρήσουν εάν ταυτόχρονα χορηγηθεί ιντερφερόνη ή ιντερλευκίνη-2 [21,22].

Χημειοθεραπεία ακολουθούμενη από χορήγηση G-CSF-διεγερμένων λευκοκυττάρων του δότη έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε ορισμένες περιπτώσεις οξείας λευχαιμίας που είναι ανθεκτική σε άλλες θεραπείες [23]. Πρόσφατα αποδείχτηκε ότι υπάρχει και αντίδραση μοσχεύματος κατά πολλαπλού μυελώματος, όταν λεμφοκύτταρα δότη χορηγήθηκαν με επιτυχία σε αρρώστους με υποτροπή πολλαπλού μυελώματος μετά από αλλογενή MMO [24,25]. Επίσης μεταγγίσεις λεμφοκυττάρων δότη έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την θεραπεία λεμφωμάτων σχετιζομένων με τον ιό του Epstein-Barr που αναπτύσσονται μετά την μεταμόσχευση [26]. Αυτά τα λεμφώματα συνήθως προέρχονται από τον πολυκλωνικό, ολιγοκλωνικό, ή μονοκλωνικό πολλαπλασιασμό B-κυττάρων του δότη και συμβαίνουν κυρίως μετά από MMO με αφαίρεση των T-κυττάρων από το

μόσχευμα που προέρχεται συνήθως από μερικά ιστοσυμβατό ή μη συγγενικό δότη. Όταν το λέμφωμα είναι μονοκλωνικό, δεν ανταποκρίνεται στην χημειοθεραπεία και ακολουθεί μια γρήγορη εξέλιξη που καταλήγει στον θάνατο του αρρώστου. Σε 5 αρρώστους που χορηγήθηκαν 10^6 CD3+ κύτταρα/kg από τους δότες τους, και οι 5 άρρωστοι παρουσίασαν πλήρη ύφεση του λεμφώματος [26]. Η αντιλεμφωματική δράση των λεμφοκυττάρων σε αυτή την περίπτωση απαιτεί μικρότερο αριθμό CD3+ κυττάρων του δότη, πιθανώς λόγω προηγούμενης ευαισθητοποίησης in vivo των T-κυττάρων του δότη στα αντιγόνα του ιού Epstein-Barr. Τέλος, είναι λογικό να υποθέσει κανείς ότι οι μεταγίσεις λεμφοκυττάρων του δότη ίσως είναι πιο αποτελεσματικές εάν χρησιμοποιηθούν προληπτικά για την αποφυγή λευχαιμικής υποτροπής. Αυτό επιχειρήθηκε σε 2 μελέτες και αποδείχθηκε εφικτό χωρίς να προκληθεί υπερβολική GVHD [27,28].

GVL αντιδράσεις in vitro

Υπάρχει πληθώρα μαρτυριών in vitro που τεκμηριώνουν ότι τα T-κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στις GVL αντιδράσεις. Μυελογενή και λεμφογενή λευχαιμικά κύτταρα είναι ευπαθή στη κυτταροτοξική δράση T-κυττάρων ειδικών στην αναγνώριση ελάσσονων αντιγόνων ιστοσυμβατότητας (mHA) που παρουσιάζονται από HLA class-I μόρια [29]. Αυτά τα T-κύτταρα που είναι ειδικά για mHA, επίσης αναστέλλουν την ανάπτυξη μυελογενών λευχαιμικών προγονικών κυττάρων σε δοκιμασίες αναστολής αποικιών (colony inhibition assays) [30]. Μετά από MMO κυκλοφορούν CD4+ και CD8+ T-κύτταρα με κυτταροτοξική δράση ενάντια σε κύτταρα από CML [31,32]. Επίσης τα NK-κύτταρα είναι ικανά να καταστρέψουν φρέσκα λευχαιμικά κύτταρα [33]. Έτσι φαίνεται πιθανό ότι υπάρχουν πολλά εκτελεστικά κύτταρα (effector cells) στις GVL αντιδράσεις. Η κυτταροτοξική δραστηριότητα των T-κυττάρων αλλά και των NK-κυττάρων ενάντια στη λευχαιμία, έχει βρεθεί ότι αυξάνεται κατά το χρονικό διάστημα που παρατηρείται ανταπόκριση στην μετάγγιση λεμφοκυττάρων από τον δότη [34]. Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι τα T-κύτταρα και τα NK-κύτταρα μπορούν να υπερνικήσουν την αντίσταση στην απόπτωση (apoptosis) που προκαλεί ο

ανασυνδυασμός BCR-ABL [35,36], και έχουν την ικανότητα να εξαφανίσουν τυχόν ελάχιστη υπολειπόμενη αρρώστια (minimal residual disease) μετά από MMO.

Οι κυτοκίνες επηρεάζουν τις ανοσολογικές αντιδράσεις ποικιλοτρόπως. Η ιντερλευκίνη-2 και ιντερλευκίνη-3 αυξάνουν τον αριθμό των κυκλοφορούντων αλλοαντιδρώντων κυτταροτοξικών T-κυττάρων [37]. Επίσης η *in vivo* χορήγηση GM-CSF αυξάνει την κυτταροτοξικότητα των T-κυττάρων [38]. Η ιντερφερόνη- γ και ο TNF α που παράγονται από κυτταροτοξικά CD4⁺ T-κύτταρα αναστέλλουν την ανάπτυξη λευχαιμικών κοκκιοκυτταρικών-μακροφάγων αποικιών (granulocyte-macrophage colonies) [39]. Γιαυτό οι κυτοκίνες μπορούν να προκαλέσουν GVL αντίδραση με την αύξηση των εκτελεστικών T-κυττάρων, την ενεργοποίηση των NK-κυττάρων, την επιστράτευση δευτερογενών εκτελεστικών κυττάρων, ή απευθείας αναστέλλοντας την αύξηση των λευχαιμικών κυττάρων.

Μελέτες GVL σε πειραματόζωα

Ανάλογα με τους συνδυασμούς των γενετικών ποικιλιών που χρησιμοποιήθηκαν σαν δότες και λήπτες, καθώς επίσης και το είδος της λευχαιμικής κυτταρικής γραμμής που χρησιμοποιήθηκε, αμφότερα CD4⁺ και CD8⁺ T-κύτταρα μπορούν να προκαλέσουν αντιλευχαιμική δράση σε μοντέλα GVL με πειραματόζωα [40]. Σε μοντέλα με ποντίκια που είναι ιστοσυμβατά ως προς τα μείζονα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας (MHC), η παρουσία και CD4⁺ αλλά και CD8⁺ T-κυττάρων είναι απαραίτητη για μέγιστη GVL δράση [41]. Παραταύτα, σε συνδυασμούς που είναι ιστοσυμβατοί ως προς τα MHC αλλά όχι ως προς τα mHA, η αφαίρεση μόνο των CD8⁺ T-κυττάρων πρόλαβε ή μείωσε την GVHD σε μερικούς συνδυασμούς ποικιλιών [42]. Αντιθέτως, αμιγή CD8⁺ T-κύτταρα προκάλεσαν GVL και διευκόλυναν την εμφύτευση χωρίς να προκαλέσουν σοβαρή GVHD σε συνδυασμούς ποικιλιών που διαφέρουν ως προς τα MHC αντιγόνα [43]. Επιπρόσθετα έχει αποδειχθεί ότι τα NK-κύτταρα παίζουν ρόλο στην αντίδραση GVL σε ημιαλλογενή και αλλογενή MMO σε ποντίκια με διάφορους τύπους λευχαιμίας [44]. Πρόσφατα ποντίκια με σοβαρή συνδεδεμένη ανοσοανεπάρκεια (SCID mouse) έχουν χρησιμοποιηθεί για την μελέτη του μηχανισμού της GVL αντίδρασης του ανθρώπου.

Λόγω της σοβαρής ανοσοανεπάρκειας των ποντικών, είναι εφικτή η εμφύτευση σε αυτά ανθρώπινων κακοήθων κυττάρων και η μελέτη των αντιδράσεων που προκαλούνται από ανθρώπινα λεμφοκύτταρα. Χρησιμοποιώντας αυτό το μοντέλο με την κυτταρική γραμμή του λεμφώματος Daudi, αποδείχτηκε ότι η χορήγηση ειδικών γδ T-κυττάρων μπορεί να εξολοθρεύσει τα κύτταρα του λεμφώματος [45].

Πιθανοί μηχανισμοί GVL

Με βάση τα κλινικά και τα πειραματικά δεδομένα φαίνεται ότι υπάρχουν διάφοροι τρόποι με τους οποίους τα T-κύτταρα, τα NK-κύτταρα και οι κυτοκίνες μπορούν να ρυθμίσουν την ανάπτυξη της λευχαιμίας. Τα T-κύτταρα χρησιμοποιούν 2 διαφορετικούς μηχανισμούς για να προκαλέσουν κυτταροτοξικότητα: τον μηχανισμό perforin και τον μηχανισμό fas [46]. Ο μηχανισμός perforin περιλαμβάνει την έκκριση πρωτεολυτικών ενζύμων (granzymes) που αποθηκεύονται στα δευτερογενή κοκκία. Μέσω μιας διαδικασίας που προαπαιτεί την παρουσία ασβεστίου, απελευθερώνονται τα κοκκία από τα κυτταροτοξικά T-κύτταρα και προκαλούν λύση των κυττάρων-στόχων τους με την διάνοιξη πόρων στις κυτταρικές τους μεμβράνες [47]. Όσον αφορά τον μηχανισμό fas, η αλληλεπίδραση ανάμεσα στον σύνδεσμο fas (fas ligand) που βρίσκεται στην επιφάνεια των κυτταροτοξικών T-κυττάρων και στον υποδοχέα fas (fas receptor) που βρίσκεται στα κύτταρα-στόχους, ξεκινά την διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (programmed cell death) που λέγεται απόπτωση (apoptosis) [47]. Τα κυτταροτοξικά CD4⁺ T-κύτταρα χρησιμοποιούν τον μηχανισμό fas, τα NK-κύτταρα τον μηχανισμό perforin, και τα CD8⁺ T-κύτταρα χρησιμοποιούν και τους δύο μηχανισμούς. Πρόσφατα αποδείχτηκε ότι τα λευχαιμικά κύτταρα φέρουν στην επιφάνεια τους υποδοχείς fas [48]. Επίσης τα κυτταροτοξικά CD4⁺ T-κύτταρα μπορούν να εμποδίσουν την ανάπτυξη της λευχαιμίας με την απελευθέρωση κυτοκινών [39]. Επιπλέον οι κυτοκίνες μπορούν να αυξήσουν την έκφραση των MHC μορίων στην επιφάνεια των κυττάρων-στόχων και με αυτό τον τρόπο τα καθιστούν ευάλωτα σε αναγνώριση από τα T-κύτταρα.

Μεταξύ HLA ιστοσυμβατών αδελφών, η αντιγονικότητα καθορίζεται από τα ελάσσονα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας (mHA). Αυτά είναι μικρά πεπτίδια που προέρχονται από

κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και βρίσκονται στα MHC μόρια στην επιφάνεια των κυττάρων. Μερικά mHA βρίσκονται σε όλους τους ιστούς (HA-3, HA-4, HA-6, HA-7 και H-Y) ενώ άλλα βρίσκονται μόνο στα αιμοποιητικά κύτταρα (HA-1, HA-2) [49]. Τα μυελογενή και λεμφογενή λευχαιμικά κύτταρα επίσης φέρουν mHA, έτσι ώστε κλώνοι που είναι ειδικοί για αυτά τα αντιγόνα, αναστέλλουν την ανάπτυξη των λευχαιμικών κυττάρων [29]. Πρόσφατα ανακαλύφθηκαν τα γονίδια που περιέχουν τα mHA HA-2 και H-Y [50,51]. Ασυμβατότητα ως προς το HA-1 έχει αποδειχθεί ότι συσχετίζεται με την ανάπτυξη GVHD μετά από ΜΜΟ [52]. Σε ΜΜΟ για CML από μη συγγενικούς δότες, η αφαίρεση των T-κυττάρων δεν επηρεάζει σοβαρά την GVL αντίδραση [53], σε αντίθεση με ΜΜΟ από ιστοσυμβατά αδέρφια όπου την εκμηδενίζει. Αυτές οι παρατηρήσεις επιβεβαιώνουν το σημαντικό ρόλο που παίζουν τα mHA στις αντιδράσεις GVHD και GVL. Μερικοί ερευνητές έχουν απομονώσει κλώνους T-κυττάρων από HLA ιστοσυμβατά αδέρφια που επιλεκτικά αναγνωρίζουν λευχαιμικά ή μη λευχαιμικά κύτταρα από τον άρρωστο ή και τα δύο είδη κυττάρων [54-56]. Η ανακάλυψη αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν εκτελεστικά GVL κύτταρα με κυτταροτοξική δράση “ειδικά για την λευχαιμία” και άλλα “ειδικά για τον ξενιστή”. Τα mHA που σχετίζονται με τις GVL αντιδράσεις παραμένουν προς το παρόν άγνωστα.

Οι κυτταρικές ανοσολογικές αντιδράσεις που προκαλούνται από τα T-κύτταρα, απαιτούν σήμα διέγερσης που παρέχεται από τον υποδοχέα των T-κυττάρων καθώς επίσης και σήμα συνδιέγερσης (costimulation) που παρέχεται από την αλληλεπίδραση B7-CD28. Η διεγερτική ικανότητα των λευχαιμικών κυττάρων να προκαλούν ανοσολογικές αντιδράσεις, εξαρτάται από την έκφραση HLA-DR και B7-1 στην επιφάνεια τους [57,58]. Αν και προφανώς κυτταροτοξικοί μηχανισμοί ενάντια στην λευχαιμία αποτελούν μέρος της GVL αντίδρασης, παραταύτα ψηλές συχνότητες βοηθητικών (helper) και όχι κυτταροτοξικών προγονικών T-κυττάρων με ειδικότητα για τον ξενιστή, ανιχνεύθηκαν σε αρρώστους με υποτροπή CML που ανταποκρίθηκαν στις μεταγίσεις λεμφοκυττάρων δότη [59]. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι πολλαπλοί μηχανισμοί με κυτταροτοξική ή μη κυτταροτοξική δράση πιθανώς ευθύνονται για την ανοσολογική αντίδραση ενάντια στην λευχαιμία. Η ΕΙΚΟΝΑ IV-1 περιγράφει σχηματικά πιθανούς μηχανισμούς της αντίδρασης GVL με βάση τα υπάρχοντα πειραματικά δεδομένα.

Αν και η GVL αντίδραση παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστη και επιστημονικά αδιευκρίνιστη, υπάρχουν ορισμένα χαρακτηριστικά της που είναι γνωστά και που προέρχονται κυρίως από την κλινική εμπειρία (ΠΙΝΑΚΑΣ IV-1).

Πίνακας IV-1. Σύνοψη κλινικών χαρακτηριστικών της αντίδρασης GVL

1. Η αντίδραση GVL συχνά συνοδεύει την οξεία και χρόνια GVHD
2. Η GVL αντίδραση μπορεί να υπάρξει και χωρίς την παρουσία GVHD
3. Η προληπτική αγωγή για GVHD επηρεάζει και την αντίδραση GVL
4. Η χορήγηση λεμφοκυττάρων δότη μπορεί να προκαλέσει αντίδραση GVL
5. Η GVL αυξάνει όταν υπάρχει HLA ασυμβατότητα δότη-αρρώστου
6. Η αντίδραση GVL διάφέρει ανάλογα με τον τύπο και το στάδιο της λευχαιμίας
CML > AML > ALL
στάδιο υποτροπής CML: μοριακό>κυτταρογενετικό>αιματολογικό>βλαστικό

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Barnes D., Loutit J: Treatment of murine leukemia with x-rays and homologous bone marrow. Br J Haematol 1957, 3:241

2. Weiden P., Sullivan K., Flournoy N., et al: Antileukemic effect of chronic GVHD: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *NEJM* 1981, 304:1529
3. Goldman J., Gale R., Horowitz M., et al: Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase: increased risk of relapse associated with T-cell depletion. *Ann Intern Med* 1988, 108:806
4. Gale R., Horowitz M., Ash R., et al: Identical-twin bone marrow transplants for leukemia. *Ann Intern Med* 1994, 120:646
5. Sullivan K., Storb R., Buckner C., et al: Graft-versus-host disease as adoptive immunotherapy in patients with advanced hematologic neoplasms. *NEJM* 1989, 320:828
6. Slavin S., Or R., Naparstek W., et al: Cellular-mediated immunotherapy of leukemia in conjunction with autologous and allogeneic bone marrow transplantation in experimental animals and man. *Blood* 1988, 72(suppl 1):407a
7. Kolb H., Mittermuller J., Clemm C., et al: Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 1990, 76:2462
8. Antin J: Graft-versus-leukemia: no longer an epiphenomenon. *Blood* 1993, 82:2273
9. Weiden P., Flournoy N., Thomas E., et al: Antileukemic effects of GVHD in human recipients of allogeneic marrow grafts. *NEJM* 1979, 300:1068
10. Horowitz M., Gale R., Sondel P., et al: Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990, 75:555
11. Weaver C., Clift R., Deeg H., et al: Effect of graft-versus-host disease prophylaxis on relapse in patients transplanted for acute myeloid leukemia. *Bone marrow transplant* 1994, 14:885
12. Blaise D., Olive D., Michallet M., et al: Impairment of leukemia-free survival by addition of interleukin-2 receptor antibody to standard graft-versus-host prophylaxis. *Lancet* 1995, 345:1144
13. Collins R., Rogers Z., Bennett M., et al: Hematologic relapse of chronic myelogenous leukemia following allogeneic BMT: apparent graft-versus-leukemia effect following

- abrupt discontinuation of immunosuppression. *Bone Marrow Transplant* 1992, 10:391
14. Kolb H., Schattenberg A., Goldman J., et al: Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 1995, 86:2041
 15. van Rhee F., Kolb H: Donor leukocyte transfusions for leukemic relapse. *Curr Opin Hematol* 1995, 2:423
 16. van Rhee F., Lin F., Cullis J., et al: Relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplant: the case for giving donor leukocyte transfusions before the onset of hematologic relapse. *Blood* 1994, 83:3377
 17. Pigneux A., Devergie A., Pochitaloff M., et al: Recombinant alpha-interferon as treatment for chronic myelogenous leukemia in relapse after allogeneic bone marrow transplantation: a report from the Societe Francaise de Greffe de Moelle. *Bone Marrow Transplant* 1995, 15:819
 18. Mackinnon S., Papadopoulos E., Carabasi M., et al: Adoptive immunotherapy evaluating escalating doses of donor leukocytes for relapse of CML after bone marrow transplantation: separation of graft-versus-leukemia responses from graft-versus-host disease. *Blood* 1995, 86:1261
 19. Drobyski W., Keever C., Roth M., et al: Salvage immunotherapy using donor leukocyte infusions as treatment for relapsed CML after allogeneic bone marrow transplantation: efficacy and toxicity of a defined T-cell dose. *Blood* 1993, 82:2310
 20. Giralt S., Hester J., Huh Y., et al: CD8-depleted donor lymphocyte infusion as treatment for relapsed CML after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1995, 86:4337
 21. Slavin S., Naparstek E., Nagler A., et al: Allogeneic cell therapy with donor peripheral blood cells and recombinant human interleukin-2 to treat leukemia relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1996, 87:2195
 22. Mehta J., Powles R., Singhal S., et al: Cytokine-mediated immunotherapy with or without donor leukocytes for poor risk acute myeloid leukemia relapsing after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1995, 16:133

23. Sica S., Di Mario A., Salutari P., et al: Chemotherapy and recombinant human G-CSF primed donor leukocyte infusion for treatment of relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1995, 16:483
24. Tricot G., Vesole D., Jagannath S., et al: Graft-versus-myeloma effect: proof of principle. *Blood* 1996, 87:1196
25. Verdonck L., Lokhorst H., Dekker A., et al: Graft-versus-myeloma effect in two cases. *Lancet* 1996, 347:800
26. Papadopoulos E., Ladanyi M., Emanuel D., et al: Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *NEJM* 1994, 330:1185
27. Naparstek E., Or R., Nagler et al: T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemia using campath-1 antibodies and posttransplant administration of donor's peripheral blood lymphocytes for prevention of relapse. *Br J Haematol* 1995, 89:506
28. Barrett AJ: Strategies to enhance the graft-versus-malignancy effect in allogeneic marrow transplants. *Ann N Y Acad Sci* 1995, 770:203
29. van der Harst D., Goulmy E., Falkenburg F., et al: Recognition of minor histocompatibility antigens on lymphocytic and myeloid leukemic cells by cytotoxic T-cell clones. *Blood* 1994, 83:1060
30. Falkenburg F., Goselink H., van der Harst D., et al: Growth inhibition of clonogenic leukemic precursor cells by minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1991, 174:27
31. Faber L., Luxemburg-Heijs S., Veenhof W., et al: Generation of CD4+ cytotoxic T-lymphocyte clones from a patient with severe graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation: implications for graft-versus-leukemia reactivity. *Blood* 1995, 86:2821
32. Jiang YZ., Kanfer E., MacDonald D., et al: Graft-versus-leukemia following allogeneic bone marrow transplantation: emergence of cytotoxic T lymphocytes reacting to host leukemia cells. *Bone Marrow Transplant* 1991, 8:253
33. Harris D: In vitro and in vivo assessment of the graft-versus-leukemia activity of cord blood. *Bone Marrow Transplant* 1995, 15:17

34. Jiang YZ., Cullis J., Kanfer E., et al: T cell and NK cell mediated graft-versus-leukemia reactivity following donor buffy coat transfusion to treat relapse after marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1993, 11:133
35. Fuchs E., Bedi A., Jones R., et al: Cytotoxic T cells overcome BCR-ABL mediated resistance to apoptosis. *Cancer Res* 1995, 55:463
36. Roger R., Isaad C., Pallardy M., et al: BCR-ABL does not prevent apoptotic death induced by human natural killer or lymphokine activated killer cells. *Blood* 1996, 87:1113
37. Hladik F., Kolbe K., Irschick E., et al: IL-2, IL-3 and INF-gamma differently affect in vivo frequencies of circulating precursors of cytotoxic T lymphocytes. *Ann Hematol* 1993, 67:67
38. Richard C., Alsar M., Calavia A., et al: Recombinant human GM-CSF enhances T cell-mediated cytotoxic function after ABMT for hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant* 1993, 11:473
39. Jiang YZ., Barrett AJ: Cellular and cytokine-mediated effects of CD4-positive lymphocyte lines generated in vitro against chronic myelogenous leukemia. *Exp Hematol* 1995, 23:1167
40. Truitt R., Johnson B: Principles of graft-versus-leukemia reactivity. *Biol Blood Marrow Transplant* 1995, 1:61
41. Truitt R., Atasoylu A: Contribution of CD4+ and CD8+ T cells to graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia reactivity after transplantation of MHC compatible bone marrow. *Bone Marrow Transplant* 1991, 8:51
42. Korngold R., Sprent J: T-cell subsets and graft-versus-host disease. *Transplantation* 1987, 44:335
43. Palathumpat V., Dejbakhsh-Jones S., Strober S., et al: The role of purified CD8+ T cells in graft-versus-leukemia activity and engraftment after allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 1995, 60:355
44. Glass B., Uharek L., Zeis M., et al: Graft-versus-leukemia activity can be predicted by natural cytotoxicity against leukemia cells. *Br J Haematol* 1996, 93:412

45. Malkovska V., Cigel F., Armstrong N., et al: Antilymphoma activity of human gamma/delta T-cells in mice with severe combined immune deficiency. *Cancer Res* 1992, 52:5610
46. Kagi D., Vignaux F., Ledermann B., et al: Fas and perforin pathways as major mechanisms of T-cell mediated cytotoxicity. *Science* 1994, 265:528
47. Berke G: The CTL's kiss of death. *Cell* 1995, 81:9
48. Munker R., Lubbert M., Yonehara S., et al: Expression of the fas antigen on primary human leukemia cells. *Ann Hematol* 1995, 70:15
49. de Bueger M., Bakker A., van Rood J., et al: Tissue distribution of human minor histocompatibility antigens. *J Immunol* 1992, 149:1788
50. den Haan J., Sherman N., Blokland E., et al: Identification of a graft-versus-host disease associated human minor histocompatibility antigen. *Science* 1995, 268:1476
51. Wang W., Meadows L., den Haan J., et al: Human H-Y: a male-specific histocompatibility antigen derived from the SMCY protein. *Science* 1995, 269:1588
52. Goulmy E., Schipper R., Pool J., et al: Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *NEJM* 1996, 334:281
53. Hessner M., Endean D., Casper J., et al: Use of unrelated marrow grafts compensates for reduced graft-versus-leukemia reactivity after T-cell-depleted allogeneic marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1995, 86:3987
54. Hoffmann T., Theobald M., Bunjes D., et al: Frequency of bone marrow T cells responding to HLA-identical nonleukemic and leukemic stimulator cells. *Bone Marrow Transplant* 1993, 12:1
55. van Lochem E., de Gast B., Goulmy E., et al: In vitro separation of host specific graft-versus-host and graft-versus-leukemia cytotoxic T cell activities. *Bone Marrow Transplant* 1992, 10:181
56. Oettel K., Wesly O., Albertini M., et al: Allogeneic T-cell clones able to selectively destroy Philadelphia chromosome-bearing (Ph+) human leukemia lines can also recognize Ph- cells from the same patient. *Blood* 1994, 83:3390

57. Delain M., Tiberghien P., Racadot E., et al: Variability of the alloreactive T-cell response to human leukemic blasts. *Leukemia* 1994, 8:642
58. Matulonis U., Dosiou C., Lamont C., et al: Role of B7-1 in mediating an immune response to myeloid leukemia cells. *Blood* 1995, 85:2507
59. Bunjes D., Theobald M., Hertenstein B., et al: Successful therapy with donor buffy coat transfusions in patients with relapsed chronic myeloid leukemia after bone marrow transplantation is associated with high frequencies of host-reactive interleukin-2 secreting T helper cells. *Bone Marrow Transplant* 1995, 15:713

V. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ GVHD - GVL

Η αλλογενής ΜΜΟ έχει 2 βασικά πλεονεκτήματα σε σχέση με την αυτόλογη ΜΜΟ. Εφόσον το μυελικό μόσχευμα προέρχεται από υγιή δότη, δεν υπάρχει πιθανότητα να περιέχει λευχαιμικά κύτταρα που θα μπορούσαν να προκαλέσουν υποτροπή της αρρώστειας στον ασθενή. Επίσης η τυχόν υπολειπόμενη νόσος (minimal residual disease) μετά την χορήγηση του προπαρασκευαστικού σχήματος που στην αυτόλογη ΜΜΟ θα μπορούσε να προκαλέσει υποτροπή, στην αλλογενή ΜΜΟ μπορεί να εξαλειφθεί από την ανοσολογική αντίδραση του μοσχεύματος κατά της λευχαιμίας.

Όμως η αλλογενής ΜΜΟ έχει και 2 εγγενή μειονεκτήματα σε σχέση με την αυτόλογη ΜΜΟ. Οι αντιγονικές διαφορές (MHC και mHA) ανάμεσα στον άρρωστο και στο μόσχευμα προκαλούν ανοσολογική αντίδραση ανάμεσα στα λεμφοκύτταρα του δότη και τους ιστούς του αρρώστου με συνέπεια την εκδήλωση GVHD. Η GVHD προκαλεί βλάβη σε όργανα ζωτικής σημασίας όπως το σπυκώτι, οι πνεύμονες, το δέρμα και οι εξωκρινείς αδένες και συνοδεύεται από σοβαρή ανοσολογική ανεπάρκεια που προδιαθέτει τον άρρωστο να εμφανίσει κοινές ή ευκαιριακές λοιμώξεις. Επιπλέον, μόνο το 25-30% των αρρώστων διαθέτουν ιστοσυμβατούς αδελφικούς δότες ενώ οι υπόλοιποι άρρωστοι θα πρέπει να χρησιμοποιήσουν μη συγγενικούς HLA-ιστοσυμβατούς δότες ή συγγενικούς δότες που διαφέρουν από τον άρρωστο σε 1-3 HLA αντιγόνα ιστοσυμβατότητας. Και στις δύο περιπτώσεις τα αποτελέσματα είναι χειρότερα των ΜΜΟ από ιστοσυμβατούς αδελφικούς δότες κυρίως λόγω της μεγάλης πιθανότητας να εμφανιστεί σοβαρή και συχνά θανατηφόρα GVHD.

Απο τα παραπάνω είναι προφανές ότι για την βελτίωση των αποτελεσμάτων των αλλογενών ΜΜΟ απαιτείται πρόοδος στην πρόληψη και θεραπεία της GVHD, η οποία όμως να εξασφαλίζει την διατήρηση της GVL αντίδρασης και να συμβάλλει στην γρήγορη ανοσολογική αποκατάσταση του αρρώστου. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να μειώσει την θνησιμότητα της αλλογενούς μεταμόσχευσης από 20-30% που είναι σήμερα σε λιγότερο από 10%, ποσοστό παρόμοιο με την θνησιμότητα μιας αυτόλογης ΜΜΟ. Με την διατήρηση ή την αύξηση της GVL, τα ποσοστά λευχαιμικής υποτροπής θα μπορούσαν να διατηρηθούν σε χαμηλά επίπεδα έτσι ώστε το συνολικό ποσοστό επιβίωσης των αρρώστων μετά από αλλογενή ΜΜΟ να αυξηθεί σημαντικά. Αυτός ο διαχωρισμός των δύο ανοσολογικών αντιδράσεων GVHD και GVL παραμένει προς το παρόν ακατόρθωτος [1]. Είναι φυσικό λοιπόν ένα μεγάλο μέρος της έρευνας στον τομέα των ΜΜΟ να έχει εστιάσει σε αυτό τον στόχο. Είναι όμως, θεωρητικά τουλάχιστον, εφικτός ένας τέτοιος διαχωρισμός ? Υπάρχει πράγματι η πιθανότητα να προκληθεί αντίδραση GVL χωρίς την ταυτόχρονη εμφάνιση GVHD ?

Από την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του αρχείου IBMTR προκύπτει ότι η αφαίρεση των T-κυττάρων από το μόσχευμα, αυξάνει στο πενταπλάσιο την πιθανότητα

λευχαιμικής υποτροπής σε χρόνια φάση CML, ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι GVHD [2]. Αρα στην περίπτωση αυτή η παρουσία των T-κυττάρων στο μόσχευμα συνοδεύεται από GVL αντίδραση χωρίς κλινικά εμφανή GVHD. Το ίδιο προκύπτει από την ανάλυση των αποτελεσμάτων σε μονοζυγωτικούς διδύμους αδελφούς όπου τα ποσοστά υποτροπής για CML και AML είναι μεγαλύτερα απότι σε ΜΜΟ από ΗΛΑ ιστοσυμβατούς αδελφικούς δότες ανεξάρτητα από την ύπαρξη GVHD [3]. Σε αυτή την περίπτωση υπάρχει ένα αλλογενές στοιχείο (διαφορές στα mHA) στη GVL αντίδραση που λειτουργεί ανεξάρτητα από την εμφάνιση GVHD. Η πιό πειστική κλινική μαρτυρία προέρχεται από τις μεταγγίσεις λεμφοκυττάρων δότη για την θεραπεία λευχαιμικής υποτροπής μετά από ΜΜΟ. Αν και οι περισσότεροι άρρωστοι που ανταποκρίνονται εμφανίζουν ταυτόχρονα GVHD, 40% των αρρώστων παρουσιάζουν ύφεση της λευχαιμίας χωρίς GVHD [4]. Σε αυτούς τους αρρώστους προφανώς λειτούργησαν GVL μηχανισμοί οι οποίοι κλινικά τουλάχιστον είναι ξεχωριστοί από την αντίδραση GVHD. Τέτοιος διαχωρισμός GVHD-GVL έχει επιτευχθεί και σε μελέτες με πειραματόζωα που όμως εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τις ποικιλίες των ζώων και το είδος της λευχαιμίας που μελετάται [5]. Επιπλέον επιβεβαίωση για την ύπαρξη τέτοιων μηχανισμών προσφέρουν in vitro μελέτες που έχουν αποδείξει ότι είναι εφικτή η απομόνωση T-κυττάρων του δότη τα οποία αντιδρούν εκλεκτικά με λευχαιμικά κύτταρα του αρρώστου αλλά όχι με άλλα μη λευχαιμικά κύτταρα [6,7]. Με βάση τα κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα (ΠΙΝΑΚΑΣ V-1) συμπεραίνεται ότι GVHD και GVL δεν αποτελούν την ίδια ανοσολογική αντίδραση αλλά μάλλον αντιδράσεις που προκαλούνται από κοινά και μή κοινά αντιγόνα.

Τα αντιγόνα που επιτρέπουν τον διαχωρισμό των δύο αντιδράσεων μπορεί να είναι ειδικά για την μυελική σειρά (lineage restricted) από την οποία προέρχεται η λευχαιμία ή ειδικά για την ίδια την λευχαιμία (leukemia specific) [8]. Στην πρώτη κατηγορία (lineage restricted) υπάγονται mHA με περιορισμένη κατανομή στους ιστούς όπως τα HA-1 και HA-2 που βρίσκονται μόνο σε κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος [9] καθώς επίσης και πρωτείνες (πεπτίδια) που υπάρχουν μόνο σε κύτταρα της μυελογενούς ή λεμφοκυτταρικής σειράς όπως CD33 και CD19 αντίστοιχα. Στην δεύτερη κατηγορία (leukemia specific) υπάγονται τα πεπτίδια που παράγονται από τις χρωμοσωματικές

αλλαγές που χαρακτηρίζουν την λευχαιμία όπως τα προϊόντα των BCR-ABL (CML), PML-RARA (AML-M3). Τέλος είναι δυνατόν αντιγόνα που εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα (λευχαιμικά και μή) να ευθύνονται για αυτό τον διαχωρισμό των αντιδράσεων, εάν η ειδικότητα της ανοσολογικής αντίδρασης οφείλεται σε ποσοτική και όχι ποιοτική διαφορά στην έκφραση του αντιγόνου (ΠΙΝΑΚΑΣ V-2).

Ο ΠΙΝΑΚΑΣ V-3 παρουσιάζει συνοπτικά διάφορες μεθόδους που έχουν αναπτυχθεί στο εργαστήριο ή έχουν χρησιμοποιηθεί στην κλινική πράξη για τον διαχωρισμό των αντιδράσεων GVHD-GVL. Αυτές οι πειραματικές μέθοδοι επιχειρούν, με τον επηρεασμό των T-κυττάρων του δότη ή των κυτοκινών, να μειώσουν την αντίδραση GVHD και να διατηρήσουν, εάν είναι δυνατό, αντιδραστικότητα GVL.

Πίνακας V-1. Σύνοψη δεδομένων για τον διαχωρισμό GVHD-GVL

1. T-κύτταρα του δότη σε MMO για CML προκαλούν GVL χωρίς GVHD
2. Διαφορές σε mHA μπορούν να προκαλέσουν GVL χωρίς GVHD
3. Μεταγγίσεις λεμφοκυττάρων δότη προκαλούν GVL χωρίς GVHD
4. Μεταμοσχεύσεις σε πειραματόζωα με GVL χωρίς GVHD
5. In vitro T-κύτταρα αντιδρούν εκλεκτικά με τα λευχαιμικά κύτταρα

Πίνακας V-2. Πιθανά αντιγόνα για τον διαχωρισμό GVHD-GVL

1. Αντιγόνα ειδικά της μυελικής σειράς (lineage specific)
 - mHA με περιορισμένη έκφραση στους ιστούς π.χ. HA-1, HA-2
 - πρωτείνες ειδικές για μυελοκύτταρα ή λεμφοκύτταρα π.χ. CD33, CD19
2. Αντιγόνα ειδικά της λευχαιμίας (leukemia specific)
 - BCR-ABL σε CML
 - PML-RARA σε AML-M3
3. Ποσοτικές διαφορές στην έκφραση αντιγόνων ανάμεσα σε φυσιολογικά και λευχαιμικά κύτταρα

Πίνακας V-3. Πειραματικές προσεγγίσεις του διαχωρισμού GVHD-GVL

A. ΕΠΗΡΕΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΚΥΤΟΚΙΝΩΝ

- χρησιμοποίηση ανταγωνιστών των κυτοκινών
- χορήγηση IL-2 μετά την ΜΜΟ
- χορήγηση λεμφοκυττάρων δότη τύπου Th2
- καθυστερημένη χορήγηση λεμφοκυττάρων δότη

B. ΕΠΗΡΕΑΣΜΟΣ ΤΩΝ Τ-ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΔΟΤΗ

- χορήγηση μικρής δόσης Τ-κυττάρων
- μπλοκάρισμα του συνδιεγερτικού σήματος
- εισαγωγή του γονιδίου αυτοκτονίας TK (TK suicide gene)
- αφαίρεση των CD8+ Τ-κυττάρων
- εκλεκτική ανοσοεξουδετέρωση (μέθοδος αυτής της διατριβής)

Χρησιμοποίηση ανταγωνιστών των κυτοκινών

Με βάση πειραματικά δεδομένα, τα τελευταία χρόνια έχει αλλάξει η αντίληψη για την παθογένεια της οξείας GVHD [10]. Ενώ προηγουμένως τα Τ-κύτταρα του δότη εθεωρούντο ότι είναι εξ'ολοκλήρου υπεύθυνα για την εμφάνιση GVHD και τις βλάβες που προκαλούνται στους ιστούς, σήμερα πιστεύεται ότι αποτελούν μέρος μόνο της αντίδρασης και όχι πιά το μοναδικά σημαντικό. Έτσι ενώ η αντίδραση ξεκινά με την αναγνώριση από τα Τ-κύτταρα ξένων αντιγόνων στους ιστούς του αρρώστου, και την παραγωγή Th1 κυτοκινών, άλλα κύτταρα όπως μονοκύτταρα και μακροφάγα συμπαρασύρονται στην αντίδραση και παράγουν μεγάλες ποσότητες φλεγμονοδών κυτοκινών που τελικά προκαλούν την βλάβη στους ιστούς του αρρώστου. Επειδή διάφορες κυτοκίνες έχουν κατά καιρούς ενοχοποιηθεί και φαίνεται ότι τελικά πρόκειται για ένα σύνθετο σύμπλεγμα κυτοκινών, ο όρος “θύελλα κυτοκινών” (cytokine storm) έχει

προταθεί για την περιγραφή της παθογένειας της οξείας GVHD [10]. Είναι φυσικό λοιπόν επακόλουθο να δοκιμαστούν ανταγωνιστές των κυτοκινών σαν μέτρο πρόληψης και θεραπείας της οξείας GVHD.

Ανταγωνιστές των υποδοχέων των κυτοκινών IL-2, IL-1 και TNFα έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες με αρρώστους και πειραματόζωα [11-15]. Περιληπτικά τα αποτελέσματα μέχρι στιγμής έχουν ως εξής: Όταν οι ανταγωνιστές χορηγούνται μετά την μεταμόσχευση προκαλούν μετρίου βαθμού μείωση της συχνότητας και σοβαρότητας της GVHD, συνήθως παροδικά κατά την διάρκεια της χορήγησης του αντισώματος [11]. Μάλιστα σε μία ερευνητική μελέτη, οι άρρωστοι που έπαιρναν κυκλοσπορίνη με μεθοτρεξάτη και το αντίσωμα για τον υποδοχέα της IL-2 είχαν χειρότερα ποσοστά επιβίωσης χωρίς λευχαιμία (leukemia free survival) απ'ότι οι άρρωστοι που έπαιρναν μόνο κυκλοσπορίνη και μεθοτρεξάτη για την πρόληψη της GVHD [12]. Όταν οι ανταγωνιστές χορηγούνται σε αρρώστους που έχουν ήδη αναπτύξει GVHD, μία μειονότητα των αρρώστων οφελείται και η βελτίωση σε αυτούς είναι συνήθως μερική και συχνά παροδική [13-15].

Τα παραπάνω αποτελέσματα, αν και δεν προσφέρουν καμμία σημαντική βελτίωση, είναι αναμενόμενα δεδομένου ότι περισσότερες από μία κυτοκίνες ευθύνονται για την GVHD. Γιαυτό η ταυτόχρονη χορήγηση πολλών ανταγωνιστών μαζί και σε συνδυασμό με άλλες θεραπείες ίσως είναι πιο αποτελεσματική. Το βασικό μειονέκτημα αυτής της προσέγγισης είναι ότι οι κυτοκίνες μπορεί να είναι εξίσου σημαντικές για την εκδήλωση GVL αντίδρασης, οπότε η χορήγηση των ανταγωνιστών θα προκαλούσε ταυτόχρονη μείωση της GVHD και GVL. Μελλοντικές μελέτες αναμένεται ότι θα εξετάσουν διαφορετικά προγράμματα χορήγησης και διαφορετικούς συνδυασμούς ανταγωνιστών που ίσως επιτρέψουν τον διαχωρισμό των δύο αντιδράσεων.

Χορήγηση IL-2 μετά την MMΟ

Τα κύτταρα που προκαλούν την GVL αντίδραση, είτε είναι T-κύτταρα είτε NK-κύτταρα θα μπορούσαν να διεγερθούν και να αυξηθούν σε αριθμό από την χορήγηση IL-2. Σε in vitro πειράματα, η χορήγηση IL-2 σε κύτταρα αρρώστων μετά από αλλογενή ή συγγενική MMO προκάλεσε την παραγωγή LAK κυττάρων (lymphokine-activated killer cells) τα οποία είχαν κυτταροτοξική δράση σε κύτταρα CML, αλλά όχι σε φυσιολογικά κύτταρα, και αυτή η κυτταροτοξικότητα ήταν ανεξάρτητη από την συμβατότητα ως προς τα MHC μόρια (MHC unrestricted) [16]. Επειδή η χορήγηση IL-2 in vivo θα μπορούσε επίσης να χειροτερέψει μία αντίδραση GVHD γιαυτό και χορηγήθηκε μετά από αλλογενείς MMO όπου είχε γίνει αφαίρεση των T-κυττάρων του μοσχεύματος και άρα ο κίνδυνος GVHD ήταν μικρός [17]. Στην ίδια μελέτη IL-2 χορηγήθηκε επίσης σε αρρώστους μετά από αυτόλογη MMO για την πρόκληση GVL αντιδράσεως. Η δόση ήταν μικρή (2×10^5 U/m²/d) και η χορήγηση συνεχής για 90 μέρες ξεκινώντας 85 μέρες μετά την μεταμόσχευση. Η τοξικότητα ήταν ελάχιστη και κανένας άρρωστος δεν παρουσίασε GVHD. Σε όλους τους αρρώστους παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των NK-κυττάρων (5-40 φορές). In vitro τα NK-κύτταρα ήταν τοξικά στα λευχαιμικά κύτταρα. Επειδή αυτή η μελέτη δεν περιελάμβανε ομάδα ασθενών ελέγχου (controls) δεν είναι δυνατόν να βγούν συμπεράσματα για την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Άλλοι ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει την IL-2 σε καλλιέργειες με αυτόλογο μυελό για κάθαρση του μυελού από τα λευχαιμικά κύτταρα και δημιουργία κυττάρων που θα μπορούσαν να προκαλέσουν αυτόλογη αντίδραση GVL [18].

Μια τελείως διαφορετική και πρωτότυπη μέθοδος χορήγησης IL-2 έχει προταθεί για τον διαχωρισμό των αντιδράσεων GVHD και GVL. Σε πειράματα με ποντίκια που διαφέρουν σε MHC και mHA (πλήρης ασυμβατότητα), η βραχεία χορήγηση υψηλών δόσεων IL-2 αρχίζοντας την μέρα της μεταμόσχευσης, προστατεύει από την εμφάνιση GVHD χωρίς να επηρεάζει αρνητικά την εμφύτευση του μοσχεύματος και την GVL [19]. Τα καλύτερα αποτελέσματα επιτυγχάνονται με την ταυτόχρονη χορήγηση αυτόλογου ή συγγενικού μυελού που του έχει γίνει προηγουμένως αφαίρεση των T-κυττάρων. Μάλιστα σε ένα πειραματικό μοντέλο οξείας μυελογενούς λευχαιμίας σε ποντίκια, η χορήγηση IL-2 εκλεκτικά επέδρασε στα CD4⁺ T-κύτταρα με GVHD δράση χωρίς να επηρεάσει άλλα

CD4+ T-κύτταρα που είχαν GVL δράση [20]. Αυτή η προστατευτική δράση της IL-2 δεν αναστέλλεται από την ταυτόχρονη χορήγηση κυκλοσπορίνης [21]. Ο μηχανισμός προστασίας από GVHD και εκλεκτικής δράσης της IL-2 σε αυτό το μοντέλο δεν εξαρτάται από NK ή LAK κύτταρα και βασικά παραμένει άγνωστος [22]. Σίγουρα όμως αυτή η μέθοδος είναι ενδιαφέρουσα και, τουλάχιστον στα ποντίκια, επιτυχής και χρειάζεται παραπέρα έλεγχο.

Χορήγηση λεμφοκυττάρων δότη τύπου Th2

Αυτή η μέθοδος στηρίζεται στην πρόσφατη θεωρία ότι οι κυτταρικές ανοσολογικές αντιδράσεις και η συστηματική φλεγμονώδης αντίδραση που αναπτύσσονται μετά από αλλογενή ΜΜΟ, ελέγχονται σε μεγάλο βαθμό από την δυναμική σχέση μεταξύ των κυτοκινών τύπου Th1 (IL-2, INF γ) και Th2 (IL-4, IL-10) [23]. Με βάση αυτή την θεωρία, οι κυτοκίνες τύπου Th2 μπορούν να αναστείλλουν την παραγωγή κυτοκινών με φλεγμονώδη δράση όπως IL-1 και TNF α . Συνεπώς μια αλλαγή από Th1 σε Th2 τύπο στην αρχική αντίδραση των λεμφοκυττάρων του δότη κατά των αλλοαντιγόνων του αρρώστου, θα μπορούσε να σταματήσει την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών μετά από αλλογενή ΜΜΟ, και να αποτελέσει ένα καινούργιο τρόπο πρόληψης και θεραπείας της οξείας GVHD.

Σε πειράματα με ποντίκια, η χορήγηση κυττάρων του δότη με Th2 φαινότυπο κυτοκινών, έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την σοβαρότητα και την θνησιμότητα της αντίδρασης GVHD [24-26]. Η παραγωγή κυττάρων με Th2 φαινότυπο έγινε με την *in vivo* χορήγηση στα ποντίκια συνδυασμού κυτοκινών IL-2 και IL-4 [24,25] ή G-CSF [26]. Αν και επιτυχής αυτή η μέθοδος για την πρόληψη GVHD σε πειραματόζωα, θα μπορούσε να προκαλέσει ταυτόχρονα αναστολή και άλλων κυτταρικών ανοσολογικών αντιδράσεων τύπου Th1 που επίσης προκαλούνται από τα T-κύτταρα του δότη όπως πιθανώς της αντίδρασης

GVL. Έτσι για κακοήθεις αρρώστιες όπου η αντίδραση GVL είναι απαραίτητη για την εκρίζωση της λευχαιμίας, αυτή η Th1 \Rightarrow Th2 στρατηγική παρουσιάζει προβλήματα και χρειάζεται παραπάνω μελέτη για να επιτρέψει την διατήρηση της GVL. Θα μπορούσε όμως να εφαρμοσθεί με επιτυχία σε MMO για καλοήθεις παθήσεις όπως απλαστική αναιμία και μεταβολικά νοσήματα, με την προϋπόθεση ότι ένας τέτοιος χειρισμός δεν θα οδηγούσε σε απόρριψη του μοσχεύματος.

Καθυστερημένη χορήγηση λεμφοκυττάρων δότη

Μια ακόμα εφαρμογή της νέας γνώσης για την σπουδαιότητα των κυτοκινών στην GVHD αντίδραση, αποτελούν τα πειράματα των Johnson και Truitt [27,28]. Σε αυτά τα πειράματα απέδειξαν ότι σε μοντέλα MMO σε ποντίκια που διαφέρουν ως προς τον ένα απλότυπο ή τα mHA, η χορήγηση λεμφοκυττάρων δότη που γίνεται με καθυστέρηση 21 ημερών μετά την μεταμόσχευση δεν προκαλεί GVHD αλλά προσφέρει σημαντική και μακρόχρονη αντιλευχαιμική προστασία. Η απουσία της GVHD αποδίδεται στην αποφυγή της “θύελλας των κυτοκινών” που συμβαίνει τις πρώτες μέρες μετά την μεταμόσχευση. Σε αυτά τα πειράματα τα αλλοαντιδρώντα λεμφοκύτταρα του δότη συμπεριφερόταν διαφορετικά ανάλογα με το χρονικό διάστημα που μεσολαβούσε ανάμεσα στην MMO και στην χορήγηση τους.

Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις έγιναν οι πρώτες κλινικές μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν μυελικά μοσχεύματα κατόπιν αφαίρεσης των T-κυττάρων, για να επιτευχθεί εμφύτευση κυττάρων του δότη χωρίς την εμφάνιση GVHD, και χορηγήθηκαν λεμφοκύτταρα του δότη σε μετέπειτα χρονικό διάστημα για την αντιλευχαιμική και πιθανά αντιλοιμική τους δράση [29,30]. Στην πρώτη μελέτη [29] χρησιμοποιήθηκε campath-1 αντίσωμα για την αφαίρεση των T-κυττάρων από το μόσχευμα, και η χορήγηση των λεμφοκυττάρων του δότη έγινε είτε ξεκινώντας νωρίς μετά την

μεταμόσχευση με προοδευτικά αυξανόμενες δόσεις κάθε βδομάδα, είτε ξεκινώντας 28 μέρες αργότερα και μόνο για αρρώστους που δεν είχαν ήδη εμφανίσει οξεία GVHD. Σε αυτή την μελέτη που περιλάμβανε κυρίως νεαρής ηλικίας αρρώστους με διάφορους τύπους λευχαιμίας, η καθυστερημένη χορήγηση λεμφοκυττάρων δότη προκάλεσε οξεία GVHD στο 42-53% των αρρώστων και συνοδευόταν από χαμηλή πιθανότητα υποτροπής της λευχαιμίας. Στην άλλη μελέτη [30] χρησιμοποιήθηκαν μυελικά μοσχεύματα κατόπιν φυγοκεντρικής αφαίρεσης των T-κυττάρων (elutriation) και επιπλέον εχορηγήθηκε κυκλοσπορίνη σαν επιπρόσθετο μέτρο πρόληψης της GVHD. Δύο προγράμματα χορήγησης λεμφοκυττάρων δότη εξετάστηκαν: είτε χορήγηση 2×10^6 /kg T-κυττάρων 30 μέρες και 5×10^7 /kg 45 μέρες μετά την MMO (26 άρρωστοι - πρόγραμμα 1), είτε χορήγηση 1×10^7 /kg T-κυττάρων 30 μέρες μετά την MMO (12 άρρωστοι - πρόγραμμα 2). Ολοι οι άρρωστοι στο πρόγραμμα 2 ανέπτυξαν GVHD και μάλιστα ήταν θανατηφόρα σε 2 αρρώστους. Αντίθετα, μόνο το 20% των αρρώστων στο πρόγραμμα 1 παρουσίασε οξεία GVHD και ήταν συνήθως ελαφριάς μορφής. Η πιθανότητα λευχαιμικής υποτροπής ήταν παρόμοια με MMO χωρίς αφαίρεση των T-κυττάρων. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι ο χρόνος χορήγησης αλλά και η δόση των λεμφοκυττάρων επηρεάζουν την εμφάνιση οξείας GVHD.

Σε μια άλλη μελέτη η ίδια μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την αποφυγή GVHD σε MMO από μερικώς ιστοσυμβατούς συγγενικούς δότες [31]. Δεδομένου ότι σε αυτές τις περιπτώσεις τα λεμφοκύτταρα του δότη αναγνωρίζουν μεγάλες αντιγονικές διαφορές στους ιστούς του αρρώστου, παρατηρήθηκαν, όπως εξάλλου αναμενόταν, μεγάλα ποσοστά GVHD ιδιαίτερα όταν χορηγήθηκαν περισσότερα από 1×10^6 /kg T-κύτταρα. Απο τα μέχρι στιγμής ανακοινωθέντα αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι, η πιθανότητα πρόκλησης οξείας GVHD από την καθυστερημένη χορήγηση των T-κυττάρων είναι πράγματι μειωμένη σε σχέση με την χορήγηση τους μαζί με το μυελικό μόσχευμα, αλλά εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον χρόνο και την δόση χορήγησης καθώς επίσης και από τις διαφορές ιστοσυμβατότητας ανάμεσα στο δότη και στον άρρωστο. Παραμένει αδιευκρίνιστο εάν η χρησιμοποίηση κυκλοσπορίνης σε αυτή την μέθοδο μειώνει την GVL αντίδραση. Επίσης λόγω της διαφορετικής ευαισθησίας των αρρώστων στην

εμφάνιση GVHD, ίσως θα ήταν προτιμότερο να χορηγούνται αρχικά μικρές δόσεις λεμφοκυττάρων, προοδευτικά αυξανόμενες και αφήνοντας μεταξύ τους ικανό χρονικό διάστημα για παρατήρηση κλινικών σημείων εμφάνισης GVHD. Ένα τέτοιο πρόγραμμα θα επέτρεπε την ελαχιστοποίηση του κινδύνου ανάπτυξης GVHD και την εξατομίκευση αυτής της “ανοσολογικής κυτταροθεραπείας” για τον συγκεκριμένο άρρωστο.

Χορήγηση μικρής δόσης T-κυττάρων

Εκτός από την πρόκληση καταστρεπτικής GVHD, τα T-κύτταρα που περιέχονται στο μυελικό μόσχευμα διευκολύνουν την εμφύτευση του μοσχεύματος και παρέχουν ανοσολογική δράση ενάντια σε λομώξεις και λευχαιμία. Γιαυτό και η πλήρης αφαίρεση τους δεν βελτιώνει το συνολικό αποτέλεσμα αφού οι άρρωστοι ναι μεν δεν παθαίνουν GVHD αλλά είτε το μόσχευμα δεν πιάνει είτε παραμένουν ευάλωτοι σε ευκαιριακές λοιμώξεις και υποτροπή της λευχαιμίας. Διάφορες έρευνες έχουν δείξει ότι υπάρχει ποσοτική σχέση ανάμεσα στη πιθανότητα πρόκλησης GVHD και στον αριθμό των T-κυττάρων του μοσχεύματος [32]. Μάλιστα με την μέθοδο της περιορισμένης αραιώσης έχει προσδιοριστεί ότι η δόση $1 \times 10^5/\text{kg}$ T-κυττάρων αποτελεί την καθοριστική δοσολογία και ότι η χορήγηση μικρότερης δόσης δεν συνοδεύεται από εμφάνιση GVHD ακόμα και εάν παραληφθεί η φαρμακολογική προληπτική θεραπεία μετά την μεταμόσχευση [33].

Με βάση αυτές τις μελέτες, έγινε προσπάθεια από μια ερευνητική ομάδα να χορηγηθεί σταθερή δόση $1 \times 10^5/\text{kg}$ T-κυττάρων με το μυελικό μόσχευμα. Σε μια σειρά 70 αρρώστων με αιματολογικές κακοήθειες που τους έγινε ΜΜΟ από ιστοσυμβατούς αδελφικούς δότες, αυτή η δόση επιτεύχθηκε με αρχικά ολική αφαίρεση των T-κυττάρων, και κατόπιν υπολογισμό και επιστροφή στο μόσχευμα κλάσματος των T-κυττάρων, που να αντιστοιχεί σε συνολική δόση $1 \times 10^5/\text{kg}$ [34]. Όλα τα μοσχεύματα έπιασαν και στο

70% των αρρώστων εμφανίστηκε ελαφριάς μορφής οξεία GVHD που αφορούσε μόνο το δέρμα και δεν χρειάστηκε ιδιαίτερη θεραπεία. Το ποσοστό χρόνιας GVHD ήταν 31% και ήταν επίσης ελαφριάς μορφής. Συνολικά η θνησιμότητα από την μεταμόσχευση ήταν μόλις 11%. Τα ποσοστά λευχαιμικής υποτροπής ήταν ιδιαίτερα χαμηλά και σε όλους τους αρρώστους που τους έγινε ανάλυση χιμαιρισμού βρέθηκε ότι τα T-κύτταρα προέρχονταν από το δότη [35]. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σαφώς καλύτερα του μέσου όρου από συμβατικές μεταμοσχεύσεις χωρίς ή με αφαίρεση των T-κυττάρων, πιθανώς διότι με την δοσολογία αυτή επιτεύχθηκε η “χρυσή τομή”. Θα πρέπει τα αποτελέσματα αυτά να επιβεβαιωθούν με την εφαρμογή της μεθόδου αυτής και σε άλλα κέντρα.

Μπλοκάρισμα του συνδιεγερτικού σήματος

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει έντονη ερευνητική δραστηριότητα στην προσπάθεια τροποποίησης των διαφόρων ανοσολογικών αντιδράσεων με την μέθοδο του μπλοκαρίσματος του συνδιεγερτικού σήματος. Είναι πλέον γνωστό ότι για την παραγωγική διέγερση των T-κυττάρων απαιτούνται 2 σήματα: Το πρώτο σήμα διέγερσης παρέχεται από τον υποδοχέα (TCR) των T-κυττάρων όταν αυτός συνδεθεί με το σύμπλεγμα MHC-πεπτιδίου που βρίσκεται στην επιφάνεια των κυττάρων παρουσίασης αντιγόνων (APCs). Το δεύτερο σήμα (συνδιεγερτικό σήμα) παρέχεται από την σύνδεση βοηθητικών υποδοχέων όπως του CD28 με άλλα συνδετικά μόρια όπως B7-1 και B7-2 που βρίσκονται στην επιφάνεια των APCs. Εάν το T-κύτταρο δεχθεί το πρώτο σήμα διέγερσης χωρίς το δεύτερο συνδιεγερτικό σήμα, τότε αναπτύσσεται ανοχή και το T-κύτταρο δεν αντιδρά πλέον στο συγκεκριμένο αντιγόνο [36]. Αυτός ο μηχανισμός λειτουργεί in vivo μετά από MMO και οδηγεί σε ανοχή μοσχεύματος-ξενιστή [37]. Σε αρκετές in vitro και in vivo μελέτες με πειραματόζωα έχει διερευνηθεί εάν αυτή η

μέθοδος θα μπορούσε να οδηγήσει σε ανοχή του μοσχεύματος ειδική για το ξενιστή και εάν έτσι θα μειωνόταν ή θα εξέλειπε η GVHD.

Διάφορα αντισώματα όπως τα anti-B7-1, anti-B7-2, CTLA4-Ig και anti-LFA1, έχουν χρησιμοποιηθεί για το μπλοκάρισμα του συνδिएγερτικού σήματος [38,39]. Σε πειραματικά μοντέλα με ποντίκια όπου έγινε ΜΜΟ από ΜHC-μη συμβατούς δότες, η χρήση των CTLA4-Ig και anti-LFA1 χορηγουμένων μαζί, επέτρεψε να γίνει εμφύτευση με κύτταρα δότη και να αποτραπεί θανατηφόρα GVHD χωρίς την ύπαρξη γενικευμένης ανοσοκαταστολής [38]. Σε άλλες in vitro μελέτες αποδείχτηκε ότι η ταυτόχρονη χρήση των anti-B7-1 και anti-B7-2 οδηγεί σε ανοχή ειδική για τα αλλοαντιγόνα του ξενιστή χωρίς την εξουδετέρωση των άλλων λεμφοκυττάρων του δότη που έχουν άλλες αντιγονικές ειδικότητες [39]. Η χρήση αυτής της μεθόδου για την πρόκληση ειδικής ανοχής στον ξενιστή μπορεί να φανεί χρήσιμη τακτική για την πρόληψη της οξείας GVHD ιδιαίτερα σε ΜHC-μη συμβατές μεταμοσχεύσεις. Είναι όμως απίθανο να διατηρηθεί σημαντική αντιλευχαιμική δράση εφόσον τα Τ-κύτταρα του δότη θα αναπτύξουν ανοχή όχι μόνο στα φυσιολογικά αλλά και στα λευχαιμικά κύτταρα του αρρώστου. Επίσης υπάρχει πάντα η πιθανότητα αντιστροφής της κατάστασης ανοχής μετά την πάροδο ενός χρονικού διαστήματος, πράγμα που θα οδηγούσε στην καθυστερημένη εμφάνιση οξείας GVHD.

Εισαγωγή του γονιδίου αυτοκτονίας TK (TK suicide gene)

Με την πρόοδο της τεχνολογίας είναι τώρα εφικτή η μεταγωγή γονιδιακού υλικού στα Τ-κύτταρα του δότη, που θα τα κάνει ευάλωτα σε φαρμακευτικές ουσίες οι οποίες θα μπορούσαν να τα εξολοθρεύσουν όταν η παρουσία τους στον ξενιστή κριθεί ότι είναι επιζήμια. Για αυτό τον σκοπό, έχει εισαχθεί ex vivo στα Τ-κύτταρα του δότη το γονίδιο θυμιδική κινάση (thymidine kinase - TK) του ιού του έρπητα [40,41]. Ο χειρισμός

αυτός κάνει δυνατή την εκλεκτική εξόντωση τους, σε περίπτωση που εμφανισθεί GVHD, χρησιμοποιώντας το φάρμακο ganciclovir που έχει ειδική αντι-ιογενή δράση. Αυτός ο έξυπνος τρόπος αφαίρεσης των T-κυττάρων θα μπορούσε να αποτελέσει “ασφαλιστική δικλίδα”, βεβαίως με την προϋπόθεση ότι η μόνιμη απομάκρυνση των T-κυττάρων δεν θα οδηγήσει σε λευχαιμική υποτροπή, συχνές λοιμώξεις ή ανάπτυξη EBV-σχετιζομένων λεμφωμάτων. Δυστυχώς όμως αυτό μπορεί να συμβεί, ειδικά στην CML, όπου σε μερικούς αρρώστους το λευχαιμικό γονίδιο BCR-ABL ανιχνεύεται για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την μεταμόσχευση, χωρίς εμφανή υποτροπή της λευχαιμίας. Αυτές οι παρατηρήσεις έχουν οδηγήσει στην αντίληψη ότι η GVL αντίδραση δεν είναι ένα μόνο ανοσολογικό “κτύπημα” (immunological hit) κατά της λευχαιμίας αλλά μία συνεχιζόμενη ενεργή διαδικασία που κρατά τον κακοήθη κλώνο κάτω από έλεγχο και ότι η απομάκρυνση των κατασταλτικών (suppressor) κυττάρων θα οδηγούσε σε λευχαιμική υποτροπή [42].

Για την πραγματοποίηση αυτής της εκλεκτικής αφαίρεσης λεμφοκυττάρων του δότη, χρησιμοποιήθηκε ένας φορέας γονιδίων από ρετροϊό (retroviral vector) που περιείχε το γονίδιο TK του έρπητα [40]. Η χορήγηση ganciclovir προκάλεσε την εξόντωση των αλλοαντιδρώντων κυττάρων που περιείχαν το γονίδιο TK. Επίσης αποδείχτηκε ότι το γονίδιο είχε σταθερή έκφραση για τουλάχιστον 3 μήνες. Σε μία άλλη πρόσφατη μελέτη το γονίδιο TK εισήχθη μέσα σε CD4+ κυτταροτοξικούς κλώνους T-κυττάρων, και οι κλώνοι διατήρησαν την ειδική δράση τους και την ευαισθησία τους στο ganciclovir με σταθερή έκφραση του γονιδίου για τουλάχιστον 6 μήνες [41]. Αυτές οι μελέτες ανοίγουν τον δρόμο για κλινικές έρευνες χρησιμοποιώντας γενετικά τροποποιημένα T-κύτταρα για την πρόκληση και τον έλεγχο αλλοαντιδράσεων όπως των GVHD και GVL.

Αφαίρεση των CD8+ T-κυττάρων

Αυτή η μέθοδος βασίζεται σε παρατηρήσεις από πειράματα με ποντίκια, όπου η αφαίρεση των CD8+ κυτταροτοξικών/κατασταλτικών T-κυττάρων, είναι ικανή να

μειώσει ή να προφυλάξει από την GVHD σε ορισμένους, αν και όχι σε όλους, τους συνδυασμούς δότη-λήπτη που είναι συμβατοί ως προς τα μείζονα (MHC) αλλά ασύμβατοι ως προς τα ελάσσονα (mHA) αντιγόνα [43,44]. Με βάση αυτές τις μελέτες έγιναν οι πρώτες προσπάθειες πρόληψης της GVHD σε ανθρώπους με την αφαίρεση των CD8+ T-κυττάρων από το μυελικό μόσχευμα [45-49].

Η πρώτη κλινική μελέτη [45] περιελάμβανε 36 αρρώστους με λευχαιμία που τους έγινε ΜΜΟ από HLA ιστοσυμβατούς αδελφικούς δότες. Η αφαίρεση των CD8+ T-κυττάρων από το μόσχευμα σε συνδυασμό με χορήγηση κυκλοσπορίνης μετά την μεταμόσχευση είχε σαν αποτέλεσμα 28% οξεία GVHD η οποία ήταν συνήθως ελαφριάς μορφής και περιοριζόταν κυρίως στον δέρμα. Σε 4 αρρώστους το μόσχευμα δεν έπιασε, και αυτό επιβεβαιώνει τον σημαντικό ρόλο των CD8+ T-κυττάρων στην εμφύτευση. Το ποσοστό λευχαιμικής υποτροπής ήταν μόνο 11% και κανένας από τους 13 αρρώστους με CML δεν υποτροπίασε το οποίο σημαίνει ότι η αντίδραση GVL είχε διατηρηθεί. Σε μία άλλη προοπτική τυχαία (randomized) μελέτη [46] 38 αρρώστων με λευχαιμία που υποβλήθηκαν σε ΜΜΟ από HLA ιστοσυμβατούς αδελφικούς δότες, χρησιμοποιήθηκαν είτε ανέπαφα μόσχευματα είτε μόσχευματα κατόπιν αφαίρεσης των CD8+ T-κυττάρων, και στις δύο περιπτώσεις σε συνδυασμό με χορήγηση κυκλοσπορίνης μετά την μεταμόσχευση. Οξεία GVHD εμφανίστηκε στο 20% των αρρώστων με αφαίρεση των CD8+ T-κυττάρων σε σύγκριση με 80% στους αρρώστους-μάρτυρες (5 θάνατοι από GVHD). Τα ποσοστά λευχαιμικής υποτροπής ήταν τα ίδια και στις δύο ομάδες ενώ το μόσχευμα δεν έπιασε σε 2 αρρώστους της ομάδας με αφαίρεση των CD8+ T-κυττάρων. Αν και η προληπτική αγωγή για GVHD που χορηγήθηκε ήταν ανεπαρκής στην ομάδα των μαρτύρων, φαίνεται από αυτές τις μελέτες ότι ο συνδυασμός αφαίρεσης των CD8+ T-κυττάρων και κυκλοσπορίνης είναι αποτελεσματικός για την πρόληψη οξείας GVHD σε ΜΜΟ από HLA ιστοσυμβατούς αδελφικούς δότες, χωρίς απώλεια της αντίδρασης GVL αλλά με αντίτιμο την αποτυχία εμφύτευσης για μερικούς αρρώστους.

Σε μία άλλη μελέτη [47] η αφαίρεση των CD8+ T-κυττάρων μαζί με την χορήγηση κυκλοσπορίνης ήταν αποτελεσματική στην πρόληψη οξείας GVHD σε ΜΜΟ από ΗΛΑ ιστοσυμβατούς αδελφικούς δότες αλλά όχι σε ΜΜΟ από άλλους λιγότερο ιστοσυμβατούς δότες. Επιπλέον πρόσφατα χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία μεταγγίσεις λεμφοκυττάρων δότη που τους είχε γίνει αφαίρεση των CD8+ κυττάρων, σε αρρώστους που υποτροπίασαν με CML ή πολλαπλούν μυέλωμα μετά από αλλογενή ΜΜΟ, και μάλιστα με μικρό ποσοστό εμφάνισης οξείας GVHD [48,49]. Η εφαρμογή της μεθόδου αφαίρεσης των CD8+ T-κυττάρων στην θεραπεία λευχαιμικών υποτροπών μετά από ΜΜΟ, προσφέρει το πλεονέκτημα της GVL αντίδρασης, με μειωμένο τον κίνδυνο πρόκλησης οξείας GVHD, σε αρρώστους που η εμφύτευση με κύτταρα του δότη έχει ήδη επιτευχθεί.

Εκλεκτική ανοσοεξουδετέρωση

Τα αντιδρώντα κύτταρα σε ανοσολογικές αντιδράσεις μεταξύ ΗΛΑ ιστοσυμβατών ατόμων, θεωρητικά τουλάχιστον, δεν φαίνεται να περιορίζονται σε ένα συγκεκριμένο ανοσοφαινότυπο, επειδή οι αντιγονικές διαφορές ως προς τα mHA μπορεί να παρουσιάζονται στα T-κύτταρα είτε από MHC class I είτε από MHC class II μόρια [50]. Επίσης στην περίπτωση των ΗΛΑ μη ιστοσυμβατών ατόμων, τα πρωταρχικώς αλλοαντιδρώντα κύτταρα αναμένεται να είναι CD4+ T-κύτταρα για τις ΗΛΑ class II διαφορές και CD8+ T-κύτταρα για τις ΗΛΑ class I διαφορές. Μία διαφορετική προσέγγιση του προβλήματος της εκλεκτικής αφαίρεσης των αλλοαντιδρώντων κυττάρων, ανεξάρτητα από τον ανοσοφαινότυπο, είναι η αφαίρεση να βασίζεται στην ικανότητα των κυττάρων του δότη να αντιδρούν σε διέγερση ενάντια στα κύτταρα του αρρώστου. Σε αυτή την μέθοδο, λεμφοκύτταρα του δότη διεγείρονται από κύτταρα του αρρώστου σε μια μεικτή λεμφοκυτταρική καλλιέργεια (mixed lymphocyte culture - MLC) και τα αλλοαντιδρώντα κύτταρα που θα εκφράσουν δείκτες ενεργοποίησης όπως τον CD25 (υποδοχέας IL-2 υψηλής συγγένειας), CD69 ή ΗΛΑ-DR μπορούν να

εξουδετερωθούν με την χρήση ανοσοτοξινών που έχουν στόχο αυτούς τους δείκτες ενεργοποίησης [51] ή να αφαιρεθούν με την μέθοδο του διαχωρισμού κυττάρων (cell sorting) χρησιμοποιώντας φθορίζοντα αντισώματα ειδικά για τους δείκτες ενεργοποίησης [52]. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι αφαιρούνται ή εξουδετερώνονται μόνο τα κύτταρα εκείνα του δότη που αντιδρούν ενάντια στον επιλεγμένο διεγέρτη και έτσι παραμένουν ανέπαφα τα κύτταρα με άλλες χρήσιμες ανοσολογικές αντιδραστικότητες. Η εφαρμογή αυτής της μεθόδου σε ΜΜΟ θα μπορούσε να πετύχει εκλεκτική αφαίρεση των κυττάρων που προκαλούν την GVHD με ταυτόχρονη διατήρηση των κυττάρων του δότη με ανοσολογική δράση ενάντια σε λοιμώξεις και πιθανώς την λευχαιμία.

Ερευνητικό αντικείμενο αυτής της διδακτορικής διατριβής αποτελεί η εκλεκτική ανοσοεξουδετέρωση με τη χρήση ανοσοτοξινών, των κυττάρων που ευθύνονται για την αντίδραση GVHD.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Champlin R: Graft-versus-leukemia without graft-versus-host disease: an elusive goal of bone marrow transplantation. *Seminars in Hematology* 1992, 29 (suppl 2): 46-52
2. Horowitz M., Gale R., Sondel P., et al: Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990, 75:555
3. Gale R., Horowitz M., Ash R., et al: Identical twin bone marrow transplants for leukemia. *Ann Intern Med* 1994, 120:646
4. Kolb H., Schattenberg A., Goldman J., et al: Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 1995, 86:2041
5. Glass B., Uharek L., Gassmann W., et al: Graft-versus-leukemia activity after bone marrow transplantation does not require graft-versus-host disease. *Annals of Hematology* 1992, 64:255
6. van Lochem E., de Gast B., Goulmy E: In vitro separation of host specific graft-versus-host and graft-versus-leukemia cytotoxic T cell activities. *Bone Marrow Transplant* 1992, 10:181

7. Hoffmann T., Theobald M., Bunjes D., et al; Frequency of bone marrow T cells responding to HLA-identical non-leukemic and leukemic stimulator cells. *Bone Marrow Transplant* 1993, 12:1
8. Barrett AJ., Malkovska V: Graft-versus-leukemia: understanding and using the alloimmune response to treat haematological malignancies. *Brit J Haematol* 1996, 93:754
9. de Bueger M., Bakker A., van Rood J., et al: Tissue distribution of human minor histocompatibility antigens. *Transplantation* 1992, 149:1788
10. Ferrara J: Paradigm shift for graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 1994, 14:183
11. Anasetti C., Martin PJ., Storb R. et al: Prophylaxis of graft-versus-host disease by administration of the murine anti-IL-2 receptor antibody 2A3. *Bone Marrow Transplant* 1991, 7: 375
12. Blaise D., Olive D., Michallet M., et al: Impairment of leukaemia-free survival by addition of interleukin-2 receptor antibody to standard graft-versus-host prophylaxis. *Lancet* 1995, 345: 1144
13. Anasetti C., Hansen JA., Waldman TA., et al: Treatment of acute graft-versus-host disease with humanized anti-Tac: an antibody that binds to the interleukin-2 receptor. *Blood* 1994, 84: 1320
14. Antin JH., Weinstein HJ., Guinan EC., et al: Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of steroid-resistant graft-versus-host disease. *Blood* 1994, 84: 1342
15. Herve P., Flesch M., Tiberghien P., et al: Phase I-II trial of a monoclonal anti-tumor necrosis factor α antibody for the treatment of refractory severe acute graft-versus-host disease. *Blood* 1992, 79: 3362
16. Mackinnon S., Hows J., Goldman J: Induction of in vitro graft-versus-leukemia activity following bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood* 1990, 76:2037
17. Soiffer R., Murray C., Cochran K., et al: Clinical and immunologic effects of prolonged infusion of low dose recombinant IL-2 after autologous and T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1992, 79:517

18. Verma U., Bagg A., Brown E., et al: IL-2 activation of human bone marrow in long-term cultures: an effective strategy for purging and generation of anti-tumor cytotoxic effectors. *Bone Marrow Transplant* 1994, 13:123
19. Sykes M., Romick M., Hoyles K., et al: In vivo administration of IL-2 plus T cell-depleted syngeneic marrow prevents graft-versus-host disease mortality and permits alloengraftment. *J Exp Med* 1990, 171:645
20. Sykes M., Harty M., Szot G., et al: IL-2 inhibits GVHD-promoting activity of CD4+ cells while preserving CD4 and CD8 mediated GVL effects. *Blood* 1994, 83:2560
21. Sykes M., Pearson D., Szot: Il-2-induced GVHD protection is not inhibited by cyclosporine and is maximal when IL-2 is given over a 25h period beginning on the day following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1995, 15:395
22. Sykes M., Abraham S: The mechanism of IL-2 mediated protection against GVHD in mice. *Transplantation* 1992, 53:1063
23. Krenger W., Ferrara J: Graft-versus-host disease and the Th1/Th2 paradigm. *Immunologic Research* 1996, 15:50
24. Fowler DH., Kurasawa K., Husebekk A., et al: Cells of the Th2 cytokine phenotype prevent LPS-induced lethality during graft-versus-host reaction. *J. of Immunol* 1994, 152: 1004
25. Fowler DH., Kurasawa K., Smith R., et al: Donor CD4-enriched cells of Th2 cytokine phenotype regulate graft-versus-host disease without impairing allogeneic engraftment in sublethally irradiated mice. *Blood* 1994, 84: 3540
26. Pan L., Delmonte J., Jalonon CK., et al: Pretreatment of donor mice with granulocyte colony-stimulating factor polarizes donor T lymphocytes toward type-2 cytokine production and reduces severity of experimental graft-versus-host disease. *Blood* 1995, 86: 4422
27. Johnson BD., Drobyski WR., Truitt R: Delayed infusion of normal donor cells after MHC-matched bone marrow transplantation provides an antileukemia reaction without graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 1993, 11: 329

28. Johnson BD., Truitt R: Delayed infusion of immunocompetent donor cells after bone marrow transplantation breaks graft-host tolerance and allows for persistent antileukemic reactivity without severe graft-versus-host disease. *Blood* 1995, 85: 3302
29. Naparstek E., Or R., Nagler A., et al: T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation for acute leukaemia using Campath-1 antibodies and post-transplant administration of donor's peripheral blood lymphocytes for prevention of relapse. *Brit. J. Haematol* 1995, 89: 506
30. Barrett AJ., Mavroudis D., Molldrem J., et al: Optimizing the dose and timing of lymphocyte add-back in T-cell depleted BMT between HLA-identical siblings. *Blood* 1996, 88 (suppl 1): 460a
31. Pati AR., Godder K., Parrish R., et al: Pre-emptive therapy with donor leukocyte infusions to prevent relapse following partially mismatched related donor bone marrow transplantation. *Blood* 1996, 88 (suppl 1): 259a
32. Atkinson K., Farrelly H., Cooley M., et al: Human marrow T cell dose correlates with severity of subsequent acute GVHD. *Bone Marrow Transplant* 1987, 2:51
33. Kernan N., Collins N., Juliano L., et al: Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of GVHD. *Blood* 1986, 68:770
34. Verdonck L., Dekker A., de Gast G., et al: Allogeneic bone marrow transplantation with a fixed low number of T cells in the marrow graft. *Blood* 1994, 83:3090
35. Verdonck L., van Blokland W., Bosboom-Kalsbeek E., et al: Complete donor T cell chimerism is accomplished in patients transplanted with bone marrow grafts containing a fixed low number of T cells. *Bone Marrow Transplant* 1996, 18:389
36. Schultze J., Nadler LM., Gribben JG: B7-mediated costimulation and the immune response. *Blood Reviews* 1996, 10: 111
37. Theobald M: Allorecognition and graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 1995, 15: 489
38. Blazar BR., Taylor PA., Panoskaltis-Mortari A., et al: Coblockade of the LFA1:ICAM and CD28/CTLA4:B7 pathways is a highly effective means of preventing acute lethal graft-versus-host disease induced by fully major histocompatibility complex-disparate donor grafts. *Blood* 1995, 85: 2607

39. Gribben JG., Guinan EC., Boussiotis VA., et al: Complete blockade of B7 family-mediated costimulation is necessary to induce human alloantigen-specific energy: a method to ameliorate graft-versus-host disease and extend the donor pool. *Blood* 1996, 87: 4887
40. Tiberghien P., Reynolds CW., Keller J., et al: Ganciclovir treatment of herpes simplex thymidine kinase-transduced primary T lymphocytes: an approach for specific in vivo donor T-cell depletion after bone marrow transplantation? *Blood* 1994, 84: 1333
41. Gallot G., Hallet M., Gaschet J., et al: Human HLA-specific T-cell clones with stable expression of a suicide gene: a possible tool to drive and control a graft-versus-host-graft-versus-leukemia reaction? *Blood* 1996, 88: 1098
42. Barrett AJ., Malkovska V: Graft-versus-leukemia: understanding and using the alloimmune response to treat haematological malignancies. *Brit. J. Haematol* 1996, 93: 754
43. Korngold R., Sprent J: T-cell subsets and graft-versus-host disease. *Transplantation* 1987, 44: 335
44. Korngold R., Sprent J: Variable capacity of L3T4+ T cells to cause lethal graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers in mice. *J. Exp. Med.* 1987, 165: 52
45. Champlin R., Ho W., Gajewski J., et al: Selective depletion of CD8+ T lymphocytes for prevention of graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1990, 76: 418
46. Nimer SD., Giorgi J., Gajewski J., et al: Selective depletion of CD8+ cells for prevention of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Transplantation* 1994, 57: 82

47. Jansen J., Hanks S., Akard L., et al: Selective T cell depletion with CD8-conjugated magnetic beads in the prevention of graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Leukemia* 1995, 9: 271
48. Giralt S., Hester J., Huh Y., et al: CD8-depleted donor lymphocyte infusion as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1995, 86: 4337
49. Alyea EP., Schlossman RL., Canning C., et al: CD8-depleted donor lymphocyte infusions mediate graft-versus-multiple myeloma effect. *Blood* 1996, 88 (suppl 1): 258a
50. Sosman J., Oettel K., Smith S., et al: Specific recognition of human leukemic cells by allogeneic T cells: Evidence for HLA-D restricted determinants on leukemic cells that are crossreactive with determinants present on unrelated nonleukemic cells. *Blood* 1990, 75:2005
51. Mavroudis D., Jiang YZ., Hensel N., et al: Specific depletion of alloreactivity against haplotype mismatched related individuals by a recombinant immunotoxin: a new approach to graft-versus-host disease prophylaxis in haploidentical bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1996, 17:793
52. Rencher S., Houston J., Lockey T., et al: Eliminating graft-versus-host potential from T cell immunotherapeutic populations. *Bone Marrow Transplant* 1996, 18:415

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

VI. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Ο υποδοχέας της ιντερλευκίνης-2 (IL-2R)

Η ιντερλευκίνη 2 (IL-2) είναι μία από τις πρώτες κυτοκίνες που ανακαλύφθηκαν και αρχικά ονομάστηκε αυξητικός παράγοντας των T-κυττάρων λόγω του σημαντικού ρόλου που παίζει στον πολλαπλασιασμό τους. Παράγεται κυρίως από ενεργοποιημένα βοηθητικά (helper) T-κύτταρα τύπου Th1. Ο πολλαπλασιασμός των T-κυττάρων ξεκινά όταν ο υποδοχέας τους (TCR) συνδεθεί παραγωγικά με το σύμπλεγμα MHC-πεπτίδιο και η μεταγωγή σήματος (signal transduction) προκαλέσει την παραγωγή IL-2 και την έκφραση του υποδοχέα της (IL-2R) στην επιφάνεια του κυττάρου. Εκτός από το πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων, η IL-2 έχει επίδραση σε πολλά άλλα κύτταρα όπως στην ανάπτυξη των B-κυττάρων, δημιουργία των LAK-κυττάρων και αύξηση των NK-κυττάρων. Όλες αυτές οι δράσεις της IL-2 προκαλούνται από την σύνδεση της με τον IL-2R. Ο IL-2R αποτελείται από τουλάχιστον 3 πολυπεπτιδικές αλυσίδες [1]:

- IL-2R α (55 kDa) - εκφράζεται μόνο σε ενεργοποιημένα T-κύτταρα
- IL-2R β (75 kDa) - εκφράζεται στα NK-κύτταρα και σε μερικά CD8⁺ T-κύτταρα
- IL-2R γ (64 kDa) - εκφράζεται στα μονοκύτταρα και σε μερικά NK-κύτταρα

Η έκφραση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων καθορίζει τον βαθμό συγγένειας σύνδεσης του IL-2R με την IL-2. Έτσι ανάλογα με την σύνθεση των αλυσίδων στον IL-2R διακρίνονται 3 βαθμοί συγγένειας σύνδεσης [2]:

- υψηλής συγγένειας IL-2Rαβγ (10^{-11} M) - μόνο σε ενεργοποιημένα T-κύτταρα
- ενδιάμεσης συγγένειας IL-2Rαβ, IL-2Rβγ (10^{-10} , 10^{-9} M)
- χαμηλής συγγένειας IL-2Rα, IL-2Rβ (10^{-8} , 10^{-7} M)

Σε φυσιολογικά άτομα η IL-2Rα αλυσίδα εκφράζεται στην επιφάνεια μόνο των διεγερμένων T-κυττάρων και όχι στα T-κύτταρα που είναι σε ηρεμία. Επίσης βρίσκεται σε νεοπλασματικά κύτταρα όπως HTLV-1 λευχαιμίας, νόσος Hodgkin, λευχαιμίας τριχωτών κυττάρων, καθώς επίσης και στα λεμφοκύτταρα αρρώστων με αυτοάνοσα νοσήματα όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα, ερυθματώδης λύκος κ.α.

Η IL-2Rα αλυσίδα αναγνωρίζεται ειδικά από το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-Tac (anti-CD25) [3]. Επειδή λοιπόν τα T-κύτταρα σε ηρεμία δεν εκφράζουν την αλυσίδα IL-2Rα αλλά όταν ενεργοποιηθούν από κάποιο αντιγόνο και μέσα σε χρονικό διάστημα 6-48 ωρών αυξάνεται σημαντικά η παραγωγή και έκφραση της IL-2Rα στην επιφάνεια του κυττάρου, γιατί έχει καθιερωθεί να θεωρείται σαν ένας ευαίσθητος και ειδικός δείκτης ενεργοποίησης των T-κυττάρων [4].

Εξουδετέρωση αλλοαντιδραστικότητας με την χρήση ανοσοτοξινών

Η εκλεκτική έκφραση της IL-2Rα αλυσίδας στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων T-κυττάρων αποτελεί την βάση για την εξουδετέρωση της αλλοαντιδραστικότητας ενάντια σε ένα διεγέρτη. Η μέθοδος της εκλεκτικής ανοσοεξουδετέρωσης περιλαμβάνει 3 στάδια:

Στο πρώτο στάδιο διεγείρονται τα λεμφοκύτταρα του δότη ενάντια σε κύτταρα του αρρώστου. Αυτό επιτυγχάνεται με μια μονόδρομη μεικτή λεμφοκυτταρική καλλιέργεια (MLC) όπου τα κύτταρα-ανταποκριτές είναι μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος

(PBMNC) του δότη και τα κύτταρα-διεγέρτες είναι κύτταρα του αρρώστου ενάντια στα οποία γίνεται εξουδετέρωση της αλλοαντιδραστικότητας. Ανάλογα με το πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν σαν κύτταρα-διεγέρτες, PBMNC του αρρώστου ή PHA-βλάστες ή OKT3/IL2 αυξημένα λεμφοκύτταρα πάντοτε ακτινοβολημένα με 5000 rads για να σταματήσει ο πολλαπλασιασμός τους. Το υγρό μέσο της καλλιέργειας σε όλα τα πειράματα ήταν RPMI 1640 εμπλουτισμένο με 10% ανθρώπινου AB ορού, 2 mM L-γλουταμίνης και 0.625 mg/ml γενταμικίνης (πλήρες μέσο καλλιέργειας). Σε όλες τις καλλιέργειες τα κύτταρα-ανταποκριτές και τα κύτταρα-διεγέρτες βρισκόταν σε συγκέντρωση 1 εκατομμύριο κύτταρα/ml μέσα σε αεριζόμενα φιαλίδια χωρητικότητας 50 ή 250 ml. Οι καλλιέργειες έγιναν μέσα σε ειδικούς θαλάμους καλλιέργειας κυττάρων (incubators) που διατηρούσαν σταθερή την θερμοκρασία στους 37⁰ C και την περιεκτικότητα του αέρα σε 5% CO₂. Η πρωτογενής καλλιέργεια (primary MLC) των κυττάρων δότη-αρρώστου διήρκεσε 2-5 μέρες ανάλογα με το πείραμα.

Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει την προσθήκη της ανοσοτοξίνης για την καταστροφή των διεγερμένων T-κυττάρων του δότη που αντιδρούν ενάντια στα κύτταρα του αρρώστου. Η ανοσοτοξίνη προστέθηκε στο τέλος της πρωτογενούς καλλιέργειας, έγινε ανάμειξη των κυττάρων και συνεχίστηκε η καλλιέργεια με την παρουσία της ανοσοτοξίνης για επιπλέον 24-36 ώρες. Η ανοσοτοξίνη αποτελείται από το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-Tac (anti-CD25) που αναγνωρίζει ειδικά την IL-2Ra αλυσίδα και μία τοξίνη (ρικίνης ή ψευδομονάδας) που προκαλεί τον θάνατο του κυττάρου. Οι ανοσοτοξίνες αυτές είναι τοξικές μόνο για τα κύτταρα που φέρουν τον υποδοχέα CD25. Έτσι επιτυγχάνεται η εκλεκτική καταστροφή των αλλοαντιδρώντων (ενάντια στον άρρωστο) T-κυττάρων του δότη χωρίς να βλάπτονται τα υπόλοιπα T-κύτταρα του δότη που έχουν άλλες αντιδραστικότητες.

Στο τρίτο στάδιο γίνεται ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας και την ειδικότητας της ανοσοεξουδετέρωσης. Αφού ξεπλυθούν τα κύτταρα από την ανοσοτοξίνη, χρησιμοποιούνται σαν κύτταρα-ανταποκριτές σε μια δευτερογενή μονόδρομη μεικτή λεμφοκυτταρική καλλιέργεια (secondary MLC). Τα κύτταρα-διεγέρτες είναι είτε τα ίδια κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν σαν διεγέρτες στην πρωτογενή καλλιέργεια (μέτρηση

αποτελεσματικότητας μεθόδου) είτε άλλα κύτταρα του αρρώστου ή κύτταρα τρίτου μέρους (μέτρηση ειδικότητας μεθόδου). Η παραμένουσα αντιδραστικότητα στις δευτερογενείς MLC μετρήθηκε σε δοκιμασίες πολλαπλασιασμού των κυττάρων που έγιναν μέσα σε πλακίδια 96 φρεατίων. Προστέθηκαν 10^5 κύτταρα-ανταποκριτές και 10^5 ακτινοβολημένα κύτταρα-διεγέρτες σε κάθε φρεάτιο σε συνολικό όγκο 200 μ l/φρεάτιο. Για κάθε αντίδραση φτιάχθηκαν 6 πανομοιότυπα φρεάτια με κύτταρα-ανταποκριτές και κύτταρα-διεγέρτες ενώ στα φρεάτια ελέγχου υπήρχαν μόνο κύτταρα-ανταποκριτές ή μόνο κύτταρα-διεγέρτες. Οι καλλιέργειες έγιναν σε σταθερή θερμοκρασία 37⁰ C και 5% CO₂ για 5 μέρες. Τις τελευταίες 18 ώρες προστέθηκε ραδιενεργός θυμιδίνη (tritiated thymidine - ³HT) 1 μ Ci/φρεάτιο. Κατόπιν έγινε συγκομιδή των κυττάρων από κάθε φρεάτιο και μέτρηση της ενσωμάτωσης ραδιενεργού θυμιδίνης με το μηχάνημα Wallac 1205 Betaplate (Wallac, Turku, Finland). Σε άλλα πειράματα η παραμένουσα αντιδραστικότητα μετά την χρήση των ανοσοτοξινών μετρήθηκε με τον υπολογισμό των συχνοτήτων αλλοαντιδρώντων προγονικών βοηθητικών T-κυττάρων (HTLPf) που περιγράφεται παρακάτω.

Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας και ειδικότητας της μεθόδου έγινε σύγκριση της παραμένουσας αντιδραστικότητας μετά την χρήση των ανοσοτοξινών με την αρχική αντιδραστικότητα ενάντια στους ίδιους διεγέρτες. Το αναμενόμενο αποτέλεσμα είναι ότι στη πρωτογενή MLC τα κύτταρα του δότη που αντιδρούν ενάντια στα κύτταρα του αρρώστου θα διεγερθούν και θα εκφράσουν τον δείκτη ενεργοποίησης CD25 στην επιφάνεια τους. Η ανοσοτοξίνη θα προκαλέσει την επιλεκτική καταστροφή αυτών των αλλοαντιδρώντων κυττάρων. Στη δευτερογενή MLC η αντιδραστικότητα των κυττάρων ενάντια στον αρχικό διεγέρτη θα είναι σημαντικά μειωμένη ενώ η αντιδραστικότητα ενάντια σε άλλα κύτταρα-διεγέρτες θα παραμείνει αναλλοίωτη.

Η μέθοδος της εξουδετέρωσης αλλοαντιδραστικότητας με την χρήση ανοσοτοξινών περιγράφεται σχηματικά στην παρακάτω εικόνα (EIKONA VI-1)

Ανοσοτοξίνες

Κατά κανόνα τα μονοκλωνικά αντισώματα που είναι ειδικά για διάφορους υποδοχείς στην επιφάνεια των Τ-κυττάρων, απλώς μπλοκάρουν τους υποδοχείς αλλά δεν προκαλούν την καταστροφή του κυττάρου. Γιαυτό η χρήση αντισωμάτων κατά του IL-2R προκάλεσε παροδική αναστολή της λειτουργίας των Τ-κυττάρων (ανοσοκαταστολή) αλλά όχι και την καταστροφή τους [5,6]. Οι ανοσοτοξίνες αποτελούν σύνθετα μόρια με διπλή λειτουργική δράση: το ένα μέρος του μορίου είναι τμήμα ενός μονοκλωνικού αντισώματος και είναι υπεύθυνο για την σύνδεση με τον ειδικό υποδοχέα στην επιφάνεια του κυττάρου-στόχου, ενώ το άλλο μέρος είναι μία τοξίνη που προκαλεί την καταστροφή του κυττάρου-στόχου. Οι ανοσοτοξίνες κατασκευάζονται με χημική σύνδεση των δύο μορίων ή με γενετικούς χειρισμούς που επιτρέπουν την παραγωγή χημικών μορίων με διπλή λειτουργία. Για τα πειράματα αυτή της διατριβής χρησιμοποιήθηκαν ανοσοτοξίνες της ρικίνης (ricin) και της ψευδομονάδας (pseudomonas).

Ανοσοτοξίνη της ρικίνης (ricin)

Η τοξίνη της ρικίνης είναι μία πρωτεΐνη που καταστρέφει τα ριβοσώματα και παράγεται από τα κουκιά του κάστορα (castor bean). Αποτελείται από 2 πολυπεπτιδικές αλυσίδες: την Β αλυσίδα που συνδέεται στην επιφάνεια των κυττάρων με υπολείμματα μορίων γαλακτόζης, και την Α αλυσίδα που με ενζυμική δράση αφαιρεί την αδενίνη 4324 από το 28S rRNA της υπομονάδας 60S των ριβοσωμάτων των ευκαρυωτικών κυττάρων. Για να αποκτήσει ειδικότητα η τοξίνη αφαιρέθηκε η Β αλυσίδα και χρησιμοποιήθηκε η καθαρή Α αλυσίδα της ρικίνης (RTA) για την παραγωγή ανοσοτοξινών. Κατόπιν βρέθηκε ότι τα υπολείμματα μαννόζης και φρουκτόζης της Α αλυσίδας συνδέονται με τα

ηπατικά κύτταρα και προκαλούν ηπατοτοξικότητα. Για να αποφευχθεί αυτό παρήχθησαν οι απογλυκοζηλιομένες (deglycosylated) μορφές RTA που χρησιμοποιούνται σήμερα στην παραγωγή των ανοσοτοξινών. Επιπλέον επειδή εθεωρήθηκε ότι η Β αλυσίδα μπορεί να είναι χρήσιμη για την μετάβαση της RTA από το ενδόσωμα στο κυτταρόλυμα, κατασκευάστηκαν τοξίνες όπου γίνεται χρήση ολόκληρου του μορίου της τοξίνης αλλά τα σημεία σύνδεσης με γαλακτόζη στην Β αλυσίδα έχουν αποκλειστεί με την ομοιοπολική (covalent) πρόσδεση ολιγοσακχαριτών. Έτσι φτιάχθηκε το μόριο της μπλοκαρισμένης ρικίνης (“blocked” ricin) που επίσης χρησιμοποιείται για την παραγωγή ανοσοτοξινών.

Για τα πειράματα αυτής της διατριβής χρησιμοποιήθηκε η ανοσοτοξίνη anti-CD25-ricin RTA η οποία αποτελείται από το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-CD25 που αναγνωρίζει την IL-2Rα αλυσίδα και που είναι συνδεδεμένο με μία απογλυκοζηλιομένη Α αλυσίδα της ρικίνης (RTA). Αυτή η ανοσοτοξίνη έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματική στην καταστροφή φυσιολογικών και νεοπλασματικών κυττάρων που φέρουν στην επιφάνεια τους την IL-2Rα αλυσίδα [7]. Η ανοσοτοξίνη anti-CD25-ricin RTA αποκτήθηκε με την ευγενική προσφορά του Καθηγητή Philip Thorpe από το University of Texas Southwestern.

Ανοσοτοξίνες της ψευδομονάδας (pseudomonas)

Η εξωτοξίνη της ψευδομονάδας (pseudomonas exotoxin -PE) αποτελείται από 613 αμινοξέα και έχει 3 λειτουργικά τμήματα που είναι απαραίτητα για την κυτταροτοξική της δράση. Το τμήμα Ia (1-252 αμινοξέα) είναι το τμήμα σύνδεσης με τον υποδοχέα PE που βρίσκεται σε πολλά ζωικά κύτταρα, το τμήμα II (253-364 αμινοξέα) είναι υπεύθυνο για την μετακίνηση της τοξίνης στο κυτταρόλυμα, και το τμήμα III (440-613 αμινοξέα) περιέχει το ένζυμο που αδρανοποιεί τον παράγοντα επιμήκυνσης 2 (elongation factor 2 - EF-2) αναστέλλοντας την παραγωγή πρωτεϊνών και προκαλώντας τον θάνατο του κυττάρου [8]. Η λειτουργία του τμήματος Ib (365-399 αμινοξέα) παραμένει άγνωστη. Για την παραγωγή των ανοσοτοξινών, το τμήμα Ia της τοξίνης αντικαθίσταται από το Fv τμήμα ενός αντισώματος το οποίο και καθορίζει την ειδικότητα της ανοσοτοξίνης.

Το anti-Tac αντισώμα έχει μεγάλη συγγένεια σύνδεσης με την IL-2Rα αλυσίδα ($K_d \sim 10^{-10}$ M), περίπου 100 φορές μεγαλύτερη της IL-2 [9]. Το μικρότερο κομμάτι ενός αντισώματος που θα μπορούσε να συνδεθεί αποτελεσματικά με το αντιγόνο είναι το κομμάτι Fv, το οποίο αποτελείται από ένα μεταβλητό βαρύ (variable heavy - V_H) και ένα μεταβλητό ελαφρύ (variable light - V_L) τμήμα. Το anti-Tac(Fv) κατασκευάστηκε με την ένωση των V_H και V_L τμημάτων του αντισώματος μέσω ενός συνδέσμου 15 αμινοξέων και το προϊόν Fv κομμάτι συνδέθηκε με την τοξίνη PE μέσω ενός άλλου μικρότερου πεπτιδικού συνδέσμου (C3) [10]. Αφού η τοξίνη μπει μέσα στο κύτταρο, το τμήμα II της τοξίνης χωρίζεται στα δύο με πρωτεόλυση από το ένζυμο φουρίνη (furin) και διαλύεται ο δισουλφιδικός δεσμός που συγκρατεί τα δύο τμήματα μαζί. Το τμήμα III της τοξίνης και μέρος από το τμήμα II κατόπιν μεταφέρονται από την συσκευή Golgi στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου το τμήμα III με ενζυμική δράση αδρανοποιεί τον παράγοντα επιμήκυνσης 2 (EF-2) και αναστέλλει την παραγωγή πρωτεϊνών [10].

Οι ανοσοτοξίνες της ψευδομονάδας που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την διατριβή κατασκευάστηκαν στο εργαστήριο μοριακής βιολογίας (Καθηγητής Ira Pastan) του Εθνικού Ινστιτούτου Καρκίνου των Η.Π.Α. Είναι μονές πρωτεϊνικές αλυσίδες που κατασκευάστηκαν με μεθόδους ανασυνδυασμού του DNA (recombinant immunotoxins) και αποτελούνται από τμήματα μονοκλωνικών αντισωμάτων ειδικών για υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, τα οποία συνδέονται με μία περικομμένη μορφή της τοξίνης PE. Οι παρακάτω ανοσοτοξίνες χρησιμοποιήθηκαν σε επιμέρους πειράματα:

anti-Tac(Fv)-PE38 : η βασική ανοσοτοξίνη που χρησιμοποιήθηκε, στόχο έχει κύτταρα που εκφράζουν την IL-2Rα αλυσίδα [11]

anti-Tac(Fv)-PE38KDEL : το PE38KDEL είναι μία πύο τοξική παραλλαγή του PE38 όπου τα αμινοξέα KDEL έχουν αντικαταστήσει τα αμινοξέα REDLK στο carboxyl-τελικό τμήμα της τοξίνης PE [12]

Mik-β₁(Fv)-PE38KDEL : το Mik-β₁ είναι ένα αντισώμα που αναγνωρίζει ειδικά την

IL-2Rβ αλυσίδα στην επιφάνεια των κυττάρων [13]

IL4(38-37)-PE38KDEL : περιέχει μία μεταλλαγμένη μορφή της IL-4 που συνδέεται με τον υποδοχέα της IL-4 στην επιφάνεια των κυττάρων [14]

B3(Fv)-PE38 : περιέχει την ενεργό τοξίνη συνδεδεμένη με ένα “άσχετο” αντίσωμα (B3) που αναγνωρίζει τον υποδοχέα Le^y στην επιφάνεια των κυττάρων επιθηλιακών όγκων. Αυτός ο υποδοχέας δεν βρίσκεται στα λεμφοκύτταρα και γιατί η ανοσοτοξίνη χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα ελέγχου μη ειδικής τοξικότητας [15]

Anti-Tac(Fv)-PE38KDEL^{ASP553} : περιέχει μία αδρανοποιημένη μορφή της τοξίνης που στερείται κυτταροτοξικότητας και χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα ελέγχου τοξικότητας του anti-Tac(Fv) αντισώματος [16]

Η παρακάτω εικόνα περιγράφει σχηματικά την ανοσοτοξίνη anti-Tac(Fv)-PE38 και τον μηχανισμό δράσης της (EIKONA VI-2)

Συλλογή, επεξεργασία και κατάψυξη των κυττάρων

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στα διάφορα πειράματα προήλθαν από τα μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMNC) και τα κύτταρα μυελού των οστών υγριών δότων και αρρώστων με χρόνια μυελογενή λευχαιμία (CML). Η συλλογή έγινε με φλεβοκέντηση σε σύριγγες που περιείχαν ηπαρίνη χωρίς συντηρητικές ουσίες ή με λευκαφαίρεση του αρρώστου ή του δότη και συλλογή των κυττάρων σε σακκούλες που περιείχαν το αντιπηκτικό ACD. Η συλλογή των κυττάρων μυελού έγινε με αναρρόφηση μυελού από τις λαγόνιες ακρολοφίες μέσα σε σύριγγες που περιείχαν ηπαρίνη.

Τα μονοπύρηννα κύτταρα ξεχωρίστηκαν από τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια με την φυγοκέντρηση πάνω από πρηνές πυκνότητας (density gradient) Ficoll-Hypaque με 400g για 30 λεπτά. Τα PBMNC περισυλλέγησαν, ξεπλύθηκαν με RPMI 1640 και καταψύχθηκαν σε μείγμα RPMI 1640 με 20% AB ορό και τελική περιεκτικότητα 10% της κρυοπροστατευτικής ουσίας DMSO. Η απόψυξη έγινε σε ψυγεία υγρού αζώτου και τα κύτταρα παρέμειναν σε θερμοκρασία -180° C μέχρι την χρησιμοποίησή τους στα πειράματα.

Παραγωγή PHA-βλαστών

Με την βοήθεια μαγνητικών σφαιριδίων επικαλυμμένων με το αντίσωμα anti-CD2 (Dynabeads, Dynal, Oslo, Norway) περισυλλέγησαν τα T-κύτταρα από τα PBMNC αρρώστων με CML. Για την παραγωγή PHA-βλαστών τα T-κύτταρα αραιώθηκαν σε συγκέντρωση 1 εκατομμύριο κύτταρα/ml μέσα σε πλήρες μέσο καλλιέργειας στο οποίο είχε προστεθεί φυτοαιμαγλουτίνη (PHA) 2 μ g/ml. Μετά από 4 μέρες καλλιέργειας, προστέθηκε πλήρες μέσο καλλιέργειας και PHA 1 μ g/ml. Μετά από επιπλέον 4 μέρες καλλιέργειας, τα κύτταρα (PHA-βλάστες) χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ή καταψύχθηκαν σε υγρό άζωτο μέσα σε μείγμα που περιείχε 10% DMSO για μελλοντική χρήση.

Παραγωγή OKT3/IL2 αυξημένων λεμφοκυττάρων

Για την παραγωγή μεγάλου αριθμού T-κυττάρων από αρρώστους με CML, καλλιεργήθηκαν PBMNC αρρώστων αραιωμένα σε συγκέντρωση 1 εκατομμύριο κύτταρα/ml μέσα στο ειδικό υγρό καλλιέργειας λεμφοκυττάρων ex-vivo 15 εμπλουτισμένο με 10% AB ορού. Η διέγερση και πολλαπλασιασμός των T-κυττάρων έγινε με την προσθήκη του αντισώματος OKT3 σε συγκέντρωση 100 ng/ml και IL-2 100 IU/ml στην αρχή της καλλιέργειας και κατόπιν μόνο IL-2 100 IU/ml κάθε 3-4 μέρες για συνολικό χρονικό διάστημα 10-15 μερών. Στο τέλος της καλλιέργειας τα OKT3/IL2 αυξημένα λεμφοκύτταρα χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ή καταψύχθηκαν για μελλοντική χρήση.

Παραγωγή EBV-λεμφοκυτταρικών γραμμών (EBV-LCLs)

PBMNC από υγιείς δότες επώασθησαν μέσα σε υπεραιώρημα της B95.8 marmoset κυτταρικής γραμμής που περιέχει τον ιό του Epstein-Barr. Η συγκέντρωση των PBMNC ήταν 10 εκατομμύρια κύτταρα/ml και η επώαση διήρκεσε για τουλάχιστον 1 ώρα σε σταθερή θερμοκρασία 37⁰ C. Κατόπιν τα κύτταρα αραιώθηκαν σε συγκέντρωση 1 εκατομμύριο κύτταρα/ml σε μέσο RPMI 1640 εμπλουτισμένο με γλουταμίνη, αντιβιοτικά και 20% βοδινού ορού. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε φρεάτια πλακιδίων 96 φρεατίων για 1-3 βδομάδες. Κάθε φρεάτιο περιείχε 100 μl κυττάρων και στο 1/3 των φρεατίων προστέθηκε διαλυμένη φυτοαιμαγλουτίνη P 10 μl/ml, στο άλλο 1/3 των φρεατίων κυκλοσπορίνη A 10 μl/ml ενώ στο τελευταίο 1/3 των φρεατίων δεν προστέθηκε τίποτα. Τα κύτταρα των φρεατίων που παρουσίασαν έντονο πολλαπλασιασμό κυττάρων μεταφέρθηκαν σε αεριζόμενα φιαλίδια των 25 ml για παραπέρα καλλιέργεια. Τα EBV-LCLs χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ή καταψύχθηκαν σε υγρό άζωτο όταν ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων ήταν συνήθως 24-36 ώρες.

Διαχωρισμός λευχαιμικών κυττάρων

Σε αρρώστους με χρόνια φάση CML το περιφερικό αίμα περιέχει συνήθως μεγάλο αριθμό λευχαιμικών κυττάρων που ανήκουν στην μυελο-μονοκυτταρική σειρά και βρίσκονται σε διάφορα στάδια ωρίμανσης. Τα T-κύτταρα αρρώστων με CML συνήθως δεν περιέχουν το λευχαιμικό ανασυνδυασμό bcr-abl και γι' αυτό θεωρούνται ότι δεν ανήκουν στον λευχαιμικό κλώνο [17,18]. Με φλεβοκέντηση ή λευκαφαίρεση αρρώστων περισυλλέχτηκε μεγάλος αριθμός PBMNC και κατόπιν τα λεμφοκύτταρα αφαιρέθηκαν με τη χρήση ειδικών φιαλιδίων επικαλυμμένων με τα αντισώματα anti-CD5/CD8 (MicroCELLector cell culture flasks, Applied Immune Sciences, Santa Clara, CA) ή με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων επικαλυμμένων με τα αντισώματα anti-CD2/CD19 (Dynabeads, Dynal, Oslo, Norway). Ο ανοσοφαινότυπος των κυττάρων που προήλθαν από την αφαίρεση μελετήθηκε με την χρήση ειδικών αντισωμάτων για μυελο-μονοκυτταρικούς και λεμφοκυτταρικούς δείκτες με την μέθοδο flow cytometry.

Ανοσοφαινότυπος με την μέθοδο flow cytometry

Για χρώση με μονοκλωνικά αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν περίπου 50-100 χιλιάδες κύτταρα ανά σωλήνα συμπεριλαμβανομένου και κυττάρων ελέγχου για κάθε δείγμα. Μετά από φυγοκέντρηση και ξέπλυμα με διάλυμα PBS, αφαιρέθηκε το εναίωρημα και αφού προστέθηκε στην κυτταρική κηλίδα (pellet) 10-15 μl μονοκλωνικού αντισώματος (MoAb), οι σωλήνες στροβιλίσθηκαν και τοποθετήθηκαν σε υγρό πάγο για 30 λεπτά προστατευμένοι από το φώς. Κατόπιν τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με παγωμένο διάλυμα PBS και προστέθηκε σε κάθε κυτταρική κηλίδα (pellet) 5 σταγόνες κρύου PBS για άμεση ανάλυση με flow cytometry ή 5 σταγόνες κρύου διαλύματος 4% παραφορμαλδεύδης και οι σωλήνες τοποθετήθηκαν στο ψυγείο (4⁰ C) προστατευμένοι από το φώς για μελλοντική ανάλυση με flow cytometry. Σε κάθε περίπτωση η ανάλυση έγινε με μηχανήμα (κυτταρομετρητή) της Becton Dickinson, San Jose, CA.

Παραγωγή αποικιών CFU-GM από κύτταρα μυελού

Για την παραγωγή CFU-GM αποικιών χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα μυελού από υγιείς δότες κατόπιν διαχωρισμού των από τα άλλα κύτταρα με το πρανές πυκνότητας Ficoll-Hyraque. Τα κύτταρα αραιώθηκαν σε συγκέντρωση 100 χιλιάδες κύτταρα ανά ml μέσα σε μεθυλσελουλόζη με 20% βοδινό ορό και 25 ng/ml rhGM-CSF (Immunex, Seattle, WA, USA). Σε κάθε πινάκιο καλλιέργειας μεγέθους 35 mm τοποθετήθηκε 1 ml κυττάρων και για κάθε δείγμα παρασκευάστηκαν 3 πανομοιότυπα πινάκια. Η επώαση διήρκεσε 14 μέρες σε θαλάμους πλήρους υγρασίας με σταθερή θερμοκρασία 37⁰ C και 5% CO₂. Στο τέλος της επώασης οι αποικίες που περιείχαν πάνω από 50 κύτταρα, μετρήθηκαν με την βοήθεια ενός αναστρεμένου μικροσκοπίου.

Υπολογισμός συχνότητας HTLPf με την μέθοδο της περιορισμένης αραιώσης

Για την πιο ακριβή μέτρηση της αλλοαντιδραστικότητας μεταξύ HLA ιστοσυμβατών αδελφών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της περιορισμένης αραιώσης (limiting dilution analysis) [19]. Αυτή η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της συχνότητας κλωνικών λεμφοκυττάρων που αντιδρούν με ένα ειδικό αντιγόνο ή έχουν μία συγκεκριμένη εκτελεστική δράση. Ο υπολογισμός της συχνότητας αλλοαντιδρώντων προγονικών βοηθητικών T-κυττάρων (helper T-lymphocyte precursor frequency, HTLPf) στην κατεύθυνση δότη εναντίον αρρώστου, αποτελεί μια αξιόπιστη μέτρηση η οποία παρέχει την δυνατότητα πρόβλεψης της πιθανότητας ανάπτυξης οξείας και χρόνιας GVHD [20-22]. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα εκλεκτικής ανοσοεξουδετέρωσης μεταξύ HLA ιστοσυμβατών αδελφών όπου μετρήθηκαν HTLPf δότη εναντίον αρρώστου και δότη εναντίον λευχαιμίας ή εναντίον λεμφοκυττάρων τρίτου μέρους πριν και μετά την χρήση των ανοσοτοξινών.

Η μέθοδος βασίζεται στην ανίχνευση παραγωγής ιντερλευκίνης 2 (IL-2) από τους αντιδρώντες κλώνους λεμφοκυττάρων με την χρήση της κυτταρικής γραμμής 9.12 που προήλθε από ποντίκια και που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη και πολλαπλασιάζεται σε παρουσία απειροελαχίστων ποσοτήτων IL-2. Η 9.12 κυτταρική γραμμή αποτελεί προσφορά του Dr. Charles Shih (Medical College of Wisconsin). Διατηρήθηκε σε συγκέντρωση 100 χιλιάδων κυττάρων/ml σε RPMI 1640 εμπλουτισμένου με

γενταμυκίνη, L-γλουταμίνη, 2 mM πυρουβικού νατρίου, 5×10^{-5} M 2-μερκαμπτοαιθανόλης, 10% βοδινού ορού και 7.5% Rat T-stim με Con A (περιέχει IL-2). Καινούργιο μέσο καλλιέργειας προστίθετο 3 φορές την εβδομάδα και πριν την χρησιμοποίηση στις HTLPf τα κύτταρα της γραμμής 9.12 υποβαλλόταν σε υποχρεωτική καλλιέργεια 4 ωρών μέσα σε RPMI 1640 με 10% βοδινό ορό και χωρίς την παρουσία Rat T-stim (νηστεία IL-2).

Τα κύτταρα-διεγέρτες ακτινοβολημένα με 5000 rads μοιράστηκαν σε 100 χιλιάδες κύτταρα ανά φρεάτιο σε πλακίδια 96 φρεατίων. Σε αυτά προστέθηκαν 6 αραιώσεις των κυττάρων-ανταποκριτών με συγκεντρώσεις 10,8,6,4,2 και 1×10^4 κύτταρα ανά φρεάτιο σε επαναλήψεις 24 πανομοιότυπων φρεατίων ανά αραιώση ανταποκριτή. Σε 24 πανομοιότυπα φρεάτια υπήρχαν μόνο κύτταρα-διεγέρτες. Σαν φρεάτια ελέγχου υπήρχαν 6 πανομοιότυπα φρεάτια με κύτταρα-ανταποκριτές τρίτου μέρους και τα κύτταρα-διεγέρτες του πειράματος ενώ σε άλλα 6 φρεάτια υπήρχαν τα κύτταρα-ανταποκριτές του πειράματος στην μεγαλύτερη συγκέντρωση τους, μαζί με ακτινοβολημένα κύτταρα-διεγέρτες τρίτου μέρους. Μετά από επώαση 64 ωρών στους 37° C και 5% CO_2 , τα πλακίδια καταψύχθηκαν σε -80° C για να σταματήσει ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και κατόπιν τους έγινε απόψυξη σε θερμοκρασία δωματίου. Σε κάθε φρεάτιο προστέθηκαν 2000 κύτταρα της κυτταρικής γραμμής 9.12 και συνεχίστηκε η επώαση για άλλες 20 ώρες. Τότε προστέθηκε ραδιενεργός θυμιδίνη (tritiated thymidine - ^3HT) 1 μCi /φρεάτιο και 18 ώρες αργότερα μετρήθηκε η ενσωμάτωση ^3HT στα κύτταρα της γραμμής 9.12 με το μηχάνημα Wallac 1205 Betaplate (Wallac, Turku, Finland). Σαν ουδός για να χαρακτηριστεί ένα φρεάτιο θετικό για παραγωγή IL-2, χρησιμοποιήθηκε η μέση τιμή συν 3 φορές την σταθερή απόκλισης (mean + 3SD) των τιμών των 24 φρεατίων που περιείχαν μόνο ακτινοβολημένα κύτταρα-διεγέρτες. Με βάση τον αριθμό των φρεατίων που ήταν αρνητικά για παραγωγή IL-2 σε κάθε αραιώση των κυττάρων-ανταποκριτών, υπολογίστηκε η συχνότητα των λεμφοκυττάρων που παρήγαγαν IL-2 χρησιμοποιώντας την μέθοδο των μέγιστων πιθανοτήτων (maximum likelihood method). Αυτή βασίζεται στην εξίσωση Poisson που αποδεικνύει με στατιστική ανάλυση πιθανοτήτων ότι στην αραιώση των κυττάρων-ανταποκριτών που το 37% των φρεατίων είναι αρνητικά για παραγωγή IL-2, θα υπάρχει κατά μέσο όρο ένα προγονικό κλωνικό

κύτταρο ανά φρεάτιο [19]. Ο υπολογισμός των συχνοτήτων έγινε με την βοήθεια ειδικού προγράμματος (software) σε ηλεκτρονικό υπολογιστή (computer). Μόνο αποτελέσματα από HTLPf όπου οι αντιδράσεις ελέγχου τρίτου μέρους ήταν θετικές και η πιθανότητα λάθους μικρή (Chi-squared value < 15) περιλαμβάνονται σε αυτή την ερευνητική εργασία.

Παραγωγή κλώνων T-κυττάρων

Σαν κύτταρα-ανταποκριτές χρησιμοποιήθηκαν λεμφοκύτταρα από ένα υγιή δότη (HLA A2,30; B13,44; DR1,7) και καλλιεργήθηκαν με ισοδύναμο αριθμό κυττάρων-διεγέρτες από τον ιστοσυμβατό αδελφό του που έπασχε από CML και διέφερε με τον δότη ως προς ένα HLA αντιγόνο (HLA A24,30; 13,44; DR1,7). Τα κύτταρα-διεγέρτες ήταν ακτινοβολημένα (2500 rads) CML κύτταρα που είχαν διαχωριστεί από τα PBMNC του αρρώστου κατόπιν αφαίρεσης των λεμφοκυττάρων με μαγνητικά σφαιρίδια επικαλυμμένα με τα αντισώματα anti-CD2/19 (DynaI, Oslo, Norway). Μετά από 2 βδομάδες και αφού είχαν συμπληρωθεί 2 κύκλοι διέγερσης των κυττάρων, τα κύτταρα μοιράστηκαν σε πλακίδια Terasaki 60 φρεατίων σε περιορισμένη αραιώση 0.3 έως 1 κύτταρο ανά φρεάτιο. Επίσης όλα τα φρεάτια περιείχαν 10^4 /φρεάτιο ακτινοβολημένα CML κύτταρα από τον αρχικό διεγέρτη και η καλλιέργεια έγινε σε πλήρες μέσο καλλιέργειας στο οποίο είχε προστεθεί IL-2 (100 U/ml) και 20% αυξητικός παράγοντας ειδικός για T-κύτταρα (TCGF, Biotest, NY). Μετά από 7-10 μέρες καλλιέργειας, τα κύτταρα των φρεατίων που παρουσίαζαν έντονο πολλαπλασιασμό μεταφέρθηκαν σε φρεάτια αρχικά πλακιδίων 96 φρεατίων και κατόπιν πλακιδίων 24 φρεατίων για παραπέρα ανάπτυξη. Τα κύτταρα παρέμειναν σε συνεχή καλλιέργεια για 2-3 μήνες και περιοδικά γινόταν επαναδιέγερση με κύτταρα από τον αρχικό διεγέρτη. Η παρακάτω εικόνα απεικονίζει την διαδικασία παραγωγής κλώνων T-κυττάρων (EIKONA VI-3).

VII. ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΜΕ ΤΙΣ ΑΝΟΣΟΤΟΞΙΝΕΣ

Η διέγερση των T-κυττάρων συνοδεύεται από αύξηση του δείκτη CD25

Χρησιμοποιώντας PBMNC από άτομα με κοινό τον ένα απλότυπο (haploidentical) π.χ. γονείς και παιδιά, στήθηκαν μεικτές λεμφοκυτταρικές καλλιέργειες με PBMNC σαν

κύτταρα-ανταποκριτές και ακτινοβολημένα (2500 rads) PBMNC ή ακτινοβολημένους (5000 rads) PHA-βλάστες σαν κύτταρα-διεγέρτες σε αναλογία διεγέρτες/ανταποκριτές 1:1. Οι καλλιέργειες κράτησαν 5 μέρες και στο τέλος τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με RPMI και μελετήθηκε ο ανοσοφαινότυπος των κυττάρων με την χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων για τους δείκτες CD4, CD8, CD25. Με τον ίδιο τρόπο μελετήθηκε και ο ανοσοφαινότυπος των κυττάρων-ανταποκριτών πριν την έναρξη της καλλιέργειας. Τα αποτελέσματα από τα πειράματα 5 ζευγαριών φαίνονται στην ΕΙΚΟΝΑ VII-1.

Βρέθηκε ότι μόνο το 5% περίπου των μη ενεργοποιημένων T-κυττάρων εκφράζουν τον δείκτη CD25. Μετά από διέγερση 5 μερών με PHA-βλάστες που διαφέρουν ως προς τον ένα απλότυπο, το ποσοστό των CD4+ ή CD8+ T-κυττάρων που εκφράζουν τον δείκτη CD25 ανέβηκε στο 60% (ΕΙΚ. VII-1A). Αντιθέτως όταν τα κύτταρα-διεγέρτες ήταν PBMNC, το ποσοστό των CD25+ T-κυττάρων ήταν περίπου 12% (ΕΙΚ. VII-1B).

Τα αποτελέσματα αυτά φανερώνουν ότι η διέγερση των T-κυττάρων συνοδεύεται από αύξηση της έκφρασης του δείκτη CD25 και ότι και τα CD4+ αλλά και τα CD8+ T-κύτταρα συμμετέχουν στην αλλοαντίδραση. Όπως αναμένονταν οι PHA-βλάστες αποδείχτηκαν πιο ισχυροί διεγέρτες από τα PBMNC.

Σημασία τοξίνης και αντισώματος στην ανοσοεξουδετέρωση

Για να είναι αποτελεσματική μία ανοσοτοξίνη θα πρέπει να περιέχει αφενός το κατάλληλο αντίσωμα που θα επιτρέψει την προσκόλληση της στο κύτταρο-στόχος και αφετέρου την ενεργό τοξίνη που θα προκαλέσει το θάνατο του κυττάρου. Αυτό αποδείχτηκε με το παρακάτω πείραμα χρησιμοποιώντας τις ανοσοτοξίνες ελέγχου B3(Fv)-PE38 (ενεργός τοξίνη με λάθος αντίσωμα) και anti-Tac(Fv)-PE38KDEL^{ASP553} (ανενεργός τοξίνη με σωστό αντίσωμα).

Χρησιμοποιώντας PBMNC ατόμων με κοινό τον ένα απλότυπο σαν διεγέρτες και ανταποκριτές, στήθηκαν 3 πρωτογενείς MLC. Μετά απο 1 μέρα καλλιέργειας, προστέθηκε από μία ανοσοτοξίνη στη κάθε MLC για την εξουδετέρωση των αλλοαντιδρώντων κυττάρων. Στη πρώτη MLC προστέθηκε η ανοσοτοξίνη B3(Fv)-PE38, στην δεύτερη MLC η ανοσοτοξίνη anti-Tac(Fv)-PE38KDEL^{ASP553} και στην τρίτη MLC η ανοσοτοξίνη anti-Tac(Fv)-PE38. Οι συγκεντρώσεις όλων των ανοσοτοξινών στις MLC ήταν 0.1 µg/ml. Μετά από έκθεση στις ανοσοτοξίνες για 24 ώρες, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σαν κύτταρα-ανταποκριτές σε δευτερογενείς MLC εναντίον είτε του αρχικού διεγέρτη (haploidentical) που είχε χρησιμοποιηθεί στη πρωτογενή MLC είτε εναντίον διεγέρτη τρίτου μέρους. Ο πολλαπλασιασμός των αντιδρώντων κυττάρων μετρήθηκε μετά από 5 μέρες καλλιέργειας με ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης (³HT uptake). Η παραμένουσα αντιδραστικότητα των κυττάρων ενάντια στους 2 διαφορετικούς διεγέρτες συγκρίθηκε με την αρχική αντιδραστικότητα τους ενάντια στους ίδιους διεγέρτες, πριν τα κύτταρα εκτεθούν στις ανοσοτοξίνες.

Βρέθηκε ότι οι ανοσοτοξίνες B3(Fv)-PE38 και anti-Tac(Fv)-PE38KDEL^{ASP553} δεν εξουδετέρωσαν την αλλοαντιδραστικότητα ενάντια στον διεγέρτη με κοινό τον ένα απλότυπο (haploidentical), σε αντίθεση με την κανονική ανοσοτοξίνη anti-Tac(Fv)-PE38 που μείωσε σημαντικά την αντίδραση στην δευτερογενή MLC (EIKONA VII-2).

Προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών για ανοσοεξουδετέρωση

Για το προσδιορισμό των συνθηκών που θα επέτρεπαν τη μέγιστη και ειδική μείωση της αλλοαντιδραστικότητας με την χρήση των ανοσοτοξινών, χρησιμοποιήθηκαν PBMNC από άτομα με κοινό τον ένα απλότυπο (haploidentical) σε πρωτογενείς MLC όπου η αναλογία διεγέρτες/ανταποκριτές (S/R) ήταν 2:1 ή 1:1 ή 1:2. Μετά από 1 μέρα καλλιέργειας, προστέθηκε η ανοσοτοξίνη anti-Tac(Fv)-PE38 σε δόσεις 0.05 ή 0.1 ή 0.5 $\mu\text{g/ml}$ και συνεχίστηκαν οι καλλιέργειες για άλλες 24 ώρες. Στο τέλος τα κύτταρα ξεπλύθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σαν ανταποκριτές σε δευτερογενείς MLC όπου ο

διεγέρτης ήταν είτε ο ίδιος με τον αρχικό διεγέρτη (haploidentical) της πρωτογενούς MLC είτε PBMNC τρίτου μέρους. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων στις δευτερογενείς MLC μετρήθηκε μετά από 3, 5 και 7 μέρες καλλιέργειας με ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης.

ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΔΙΕΓΕΡΤΩΝ/ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΤΩΝ (ΕΙΚΟΝΑ VII-3)

Σε αναλογία S/R 2:1 παρατηρήθηκε μείωση της αντιδραστικότητας ενάντια σε κύτταρα τρίτου μέρους (ΕΙΚ. VII-3B) ενώ σε αναλογία S/R 1:2 η ανοσοεξουδετέρωση ήταν ατελής και υπήρξε καθυστερημένος πολλαπλασιασμός των κυττάρων ενάντια στο διεγέρτη με κοινό τον ένα απλότυπο μετά από 7 μέρες καλλιέργειας (ΕΙΚ. VII-3A).

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΑΝΟΣΟΤΟΞΙΝΗΣ (ΕΙΚΟΝΑ VII-4)

Με συγκέντρωση ανοσοτοξίνης 0.05 $\mu\text{g/ml}$ η εξουδετέρωση της αλλοαντιδραστικότητας ήταν ατελής (ΕΙΚ. VII-4A) ενώ με συγκέντρωση 0.5 $\mu\text{g/ml}$ υπήρξε μη ειδική απώλεια αντιδραστικότητας (ΕΙΚ. VII-4B).

Σύγκριση ανοσοτοξινών ρικίνης και ψευδομονάδας

Οι ανοσοτοξίνες anti-CD25-ricin και anti-Tac(Fv)-PE38 συγκρίθηκαν μεταξύ τους για την αποτελεσματικότητα τους στην εξουδετέρωση αλλοαντιδρώντων λεμφοκυττάρων. Χρησιμοποιώντας PBMNC από άτομα με κοινό τον ένα απλότυπο (haploidentical) στήθηκαν πρωτογενείς MLC με αναλογία κυττάρων διεγέρτες/ανταποκριτές 1:1. Μετά από καλλιέργεια 1 μέρας χωρίστηκαν τα κύτταρα της κάθε MLC στα δύο και στα μισά κύτταρα προστέθηκε anti-CD25-ricin σε συγκέντρωση 3×10^{-9} M ενώ στα άλλα μισά προστέθηκε anti-Tac(Fv)-PE38 0.1 $\mu\text{g/ml}$. Οι καλλιέργειες συνεχίστηκαν για άλλες 24

ώρες και κατόπιν τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν σαν ανταποκριτές σε δευτερογενείς MLC είτε εναντίον των αρχικών διεγερτών που διέφεραν ως προς τον ένα απλότυπο (haploidentical) είτε εναντίον PBMNC τρίτου μέρους. Ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης μετρήθηκε μετά από 5 μέρες καλλιέργειας.

Σε 6 πειράματα με διαφορετικούς συνδυασμούς κυττάρων, βρέθηκε ότι και οι δύο ανοσοτοξίνες ήταν πολύ αποτελεσματικές και προκάλεσαν σημαντική μείωση της αντιδραστικότητας ενάντια στους διεγέρτες με κοινό τον ένα απλότυπο (haploidentical) ενώ διατηρήθηκε σε μεγάλο βαθμό η αντίδραση τρίτου μέρους. Συγκεκριμένα η anti-CD25-ricin μείωσε την αντιδραστικότητα στον haploidentical διεγέρτη στο $18\pm 4\%$ και διατήρησε την αντίδραση τρίτου μέρους στο $74\pm 9\%$ της αρχικής τιμής. Αντίστοιχα η anti-Tac(Fv)-PE38 μείωσε την αντιδραστικότητα στον haploidentical διεγέρτη στο $7\pm 3\%$ και διατήρησε την αντίδραση τρίτου μέρους στο $66\pm 10\%$ (EIKONA VII-5).

Ανοσοεξουδετέρωση με συνδυασμό ανοσοτοξινών

Είναι γνωστό ότι κατά την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων, πέρα από την αύξηση του δείκτη CD25, αυξάνεται και η έκφραση της IL-2Rβ αλυσίδας καθώς επίσης και του υποδοχέα της IL-4. Εξετάσθηκε λοιπόν εάν ο συνδυασμός ανοσοτοξινών που στοχεύουν αυτούς τους υποδοχείς θα μπορούσε να βελτιώσει τα αποτελέσματα της ανοσοεξουδετέρωσης. Χρησιμοποιήθηκαν οι ανοσοτοξίνες IL4(38-37)-PE38KDEL (ειδική για τον υποδοχέα της IL4) και Mik-β₁(Fv)-PE38KDEL (ειδική για την IL-2Rβ αλυσίδα) από μόνες τους ή σε συνδυασμό με τις ανοσοτοξίνες anti-Tac(Fv)-PE38KDEL

και anti-Tac(Fv)-PE38. Οι ανοσοτοξίνες προστέθηκαν μετά από 1 μέρα καλλιέργειας σε πρωτογενείς MLC με PBMNC ανταποκριτές και διεγέρτες που είχαν κοινό μεταξύ τους τον ένα απλότυπο (haploidentical). Οι συγκεντρώσεις των ανοσοτοξινών ήταν 0.1 $\mu\text{g/ml}$ για τις IL4(38-37)-PE38KDEL, anti-Tac(Fv)-PE38KDEL και anti-Tac(Fv)-PE38 και 0.5 $\mu\text{g/ml}$ για την Mik- β_1 (Fv)-PE38KDEL. Κατόπιν σε δευτερογενείς MLC τα κύτταρα ξαναδιεγέρθηκαν εναντίον των αρχικών διεγερτών (haploidentical) ή εναντίον διεγερτών τρίτου μέρους. Μετρήθηκε πολλαπλασιασμός των κυττάρων με πρόσληψη ραδιενεργού θυμιδίνης.

Αποτελέσματα από διάφορα πειράματα φαίνονται στις ΕΙΚΟΝΕΣ VII-6 και VII-7. Οι ανοσοτοξίνες IL4(38-37)-PE38KDEL και Mik- β_1 (Fv)-PE38KDEL μοναχές τους δεν ήταν αποτελεσματικές στην εξουδετέρωση αλλοαντιδραστικότητας και σε συνδυασμούς με τις anti-Tac(Fv)-PE38KDEL και anti-Tac(Fv)-PE38 δεν επέτυχαν σημαντική βελτίωση των αποτελεσμάτων γιατί και δεν χρησιμοποιήθηκαν σε περαιτέρω πειράματα.

Επίδραση της ανοσοτοξίνης στα μη ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα

Σε αυτά τα πειράματα μελετήθηκε εάν η έκθεση στην ανοσοτοξίνη είναι τοξική για τα μη ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα. PBMNC από υγιείς δότες εκτέθησαν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις της ανοσοτοξίνης anti-Tac(Fv)-PE38KDEL πριν διεγερθούν σε καλλιέργειες με άλλα κύτταρα. Οι συγκεντρώσεις της ανοσοτοξίνης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από 0.1 έως 1.0 µg/ml και τα PBMNC εκτέθησαν στην ανοσοτοξίνη για 24 ώρες. Σε κάθε πείραμα, ο έλεγχος περιλάμβανε και PBMNC που δεν εκτέθησαν στην ανοσοτοξίνη. Κατόπιν τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με το διάλυμα RPMI και

χρησιμοποιήθηκαν σαν κύτταρα-ανταποκριτές σε MLC εναντίον κυττάρων-διεγερτών με κοινό τον ένα απλότυπο (haploidentical) ή εναντίον κυττάρων-διεγερτών τρίτου μέρους. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων μετρήθηκε με πρόσληψη ραδιενεργού θυμιδίνης μετά από 3,5 και 7 μέρες καλλιέργειας.

Βρέθηκε ότι σε όλες τις συγκεντρώσεις της ανοσοτοξίνης τα PBMNC διατήρησαν στο ακέραιο την ικανότητα τους να αντιδρούν ενάντια σε διεγέρτες με κοινό τον ένα απλότυπο (haploidentical) ή σε διεγέρτες τρίτου μέρους. Τα αποτελέσματα στις δοκιμασίες πολλαπλασιασμού δεν διέφεραν καθόλου ανάμεσα στα κύτταρα που εκτέθησαν ή δεν εκτέθησαν στην ανοσοτοξίνη (EIKONA VII-8). Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι η ανοσοτοξίνη δεν είναι τοξική στα μη ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα.

Επίδραση της ανοσοτοξίνης στις αποικίες CFU-GM μυελού των οστών

Σε πειράματα ανάπτυξης αποικιών CFU-GM εξετάσθηκε το ενδεχόμενο τοξικής δράσης της ανοσοτοξίνης στα προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών. Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα μυελού των οστών από 4 υγιείς δότες. Τα κύτταρα διαχωρίστηκαν με πρανές πυκνότητας Ficoll-Hyraque και κατόπιν εκτέθησαν σε αυξανόμενες δόσεις της ανοσοτοξίνης anti-Tac(Fv)-PE38 πριν χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη αποικιών. Οι συγκεντρώσεις της ανοσοτοξίνης που μελετήθηκαν ήταν 0.05 έως 0.5 µg/ml και η έκθεση των κυττάρων στην ανοσοτοξίνη διάρκησε 24 ώρες. Τα κύτταρα-ελέγχου

αποτελούσαν κύτταρα μυελού που δεν εκτέθησαν στην ανοσοτοξίνη. Για κάθε συγκέντρωση της ανοσοτοξίνης παρασκευάστηκαν 3 πανομοιότυπα πινάκια καλλιέργειας μεγέθους 35 mm. Η καταμέτρηση των αποικιών έγινε μετά από 10-14 μέρες καλλιέργειας (βλέπε κεφάλαιο Υλικό και Μέθοδος).

Όπως φαίνεται στην ΕΙΚΟΝΑ VII-9, η έκθεση στην ανοσοτοξίνη των κυττάρων του μυελού, ακόμα και σε πενταπλάσια συγκέντρωση από αυτή που ήταν αποτελεσματική στα πειράματα εξουδετέρωσης αλλοαντιδραστικότητας, δεν προκάλεσε μείωση του αριθμού των αποικιών CFU-GM.

Επίδραση της ανοσοτοξίνης στην αντιδραστικότητα ενάντια σε EBV-LCLs

Έχει παρατηρηθεί ότι ορισμένοι άρρωστοι εμφανίζουν λεμφώματα μετά από μεταμόσχευση μυελού των οστών που οφείλονται στον ιό του Epstein-Barr [23,24]. Η επιπλοκή αυτή είναι σπάνια (συχνότητα 0.6%) μετά από μεταμόσχευση από ιστοσυμβατούς αδελφικούς δότες στην οποία δεν αφαιρέθηκαν τα T-κύτταρα του μοσχεύματος [23]. Είναι όμως αρκετά συχνή επιπλοκή (συχνότητα μέχρι 24% έχει αναφερθεί) μετά από μεταμόσχευση από μερικά ιστοσυμβατούς συγγενικούς ή μη συγγενικούς δότες ιδιαίτερα εάν αφαιρεθούν τα T-κύτταρα από το μόσχευμα για την

πρόληψη σοβαρής μορφής GVHD [24]. Τα λεμφώματα αυτά είναι συνήθως μονοκλωνικά ή ολιγοκλωνικά και στις περισσότερες περιπτώσεις προέρχονται από τα Β-κύτταρα του δότη [23,24]. Εμφανίζονται συνήθως μέσα στους πρώτους 6 μήνες μετά την μεταμόσχευση και έχουν πολύ επιθετική πορεία προκαλώντας συνήθως το θάνατο του αρρώστου. Η μόνη αποτελεσματική θεραπεία που μπορεί να οδηγήσει σε ίαση είναι να γίνουν μεταγγίσεις λεμφοκυττάρων από τον δότη [25]. Πιστεύεται ότι η ανάπτυξη των λεμφωμάτων οφείλεται σε Β-λεμφοκύτταρα του δότη που έχουν μολυνθεί από τον ιό του Epstein-Barr και πολλαπλασιάζονται χωρίς έλεγχο λόγω της έλλειψης Τ-λεμφοκυττάρων του δότη με ειδική κατασταλτική δράση ενάντια στον ιό [26]. Μελετήσαμε λοιπόν εάν η μέθοδος της εξουδετέρωσης της αλλοαντιδραστικότητας με τις ανοσοτοξίνες επηρεάζει την αντιδραστικότητα των Τ-λεμφοκυττάρων ενάντια σε αυτόλογα Β-λεμφοκύτταρα μολυσμένα από τον ιό (EBV-LCLs).

Χρησιμοποιήθηκαν PBMNC από HLA ιστοσυμβατά αδέρφια και ζεύγη γονέα-παιδιού που έχουν κοινό τον ένα απλότυπο (haplidentical). Στήθηκαν πρωτογενείς MLC με κύτταρα-διεγέρτες ακτινοβολημένα PBMNC αρρώστου στις περιπτώσεις γονέα-παιδιού και OKT3/IL2 αυξημένα λεμφοκύτταρα αρρώστου στις περιπτώσεις HLA ιστοσυμβατών αδελφών. Τα κύτταρα-ανταποκριτές ήταν PBMNC δότη. Μετά από 1-2 μέρες καλλιέργειας η εξουδετέρωση της αλλοαντιδραστικότητας έγινε με έκθεση στην ανοσοτοξίνη anti-Tac(Fv)-PE38 0.1μg/ml για 24 ώρες. Αφού ξεπλύθηκαν τα κύτταρα από την ανοσοτοξίνη, χρησιμοποιήθηκαν σαν κύτταρα-ανταποκριτές σε δευτερογενείς MLC ενάντια σε ακτινοβολημένα αυτόλογα EBV-LCLs διεγέρτες. Σαν κύτταρα ελέγχου για το κάθε ζευγάρι χρησιμοποιήθηκαν PBMNC δότη που δεν είχαν εκτεθεί στην ανοσοτοξίνη ενάντια στους ίδιους αυτόλογους EBV-LCLs διεγέρτες. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων μετρήθηκε μετά από 5 μέρες καλλιέργειας με πρόσληψη ραδιενεργού θυμιδίνης.

Η ΕΙΚΟΝΑ VII-10 δείχνει τα αποτελέσματα σε 4 ζεύγη HLA ιστοσυμβατών αδελφών και η ΕΙΚΟΝΑ VII-11 τα αποτελέσματα σε 2 ζεύγη γονέα-παιδιού (haplidentical). Είναι προφανές ότι σε καμμία περίπτωση η έκθεση στην ανοσοτοξίνη δεν επηρέασε αισθητά την αντιδραστικότητα του δότη ενάντια σε αυτόλογα Β-κύτταρα μολυσμένα από

τον ιό EBV. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι η μέθοδος αυτή επιτρέπει την διατήρηση της ανοσίας του δότη ενάντια στον ιό EBV και γιατί δεν αναμένεται ότι θα οδηγήσει στην ανάπτυξη EBV-λεμφωμάτων μετά από την μεταμόσχευση.

VIII. ΑΦΑΙΡΕΣΗ ΑΛΛΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΣΥΓΓΕΝΙΚΟΥΣ ΔΟΤΕΣ ΜΕ ΚΟΙΝΟ ΤΟΝ ΕΝΑ ΑΠΛΟΤΥΠΟ

Η αποτελεσματικότητα των ανοσοτοξινών anti-Tac(Fv)-PE38KDEL και anti-Tac(Fv)-PE38 δοκιμάστηκε σε μια σειρά 10 πειραμάτων εξουδετέρωσης της αντιδραστικότητας ανάμεσα σε μη ιστοσυμβατούς δότες και αρρώστους. Σαν διεγέρτες και ανταποκριτές χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα (PBMNC) από γονείς και τα παιδιά τους που ως γνωστόν αναμένεται ότι έχουν κοινό τον ένα μόνο απλότυπο (haploidentical) δεδομένου ότι ο άλλος απλότυπος στα παιδιά έχει κληρονομηθεί από τον άλλο γονέα. Στήθηκαν πρωτογενείς MLC, με αναλογία κυττάρων διεγερτών/ανταποκριτών 1:1, στις οποίες τα κύτταρα-ανταποκριτές διεγέρθηκαν κατόπιν συνκαλλιέργειας με τα ακτινοβολημένα κύτταρα-διεγέρτες επί 1 μέρα. Στο τέλος της καλλιέργειας προστέθηκε η ανοσοτοξίνη που για τα πρώτα 5 πειράματα ήταν η anti-Tac(Fv)-PE38KDEL και για τα επόμενα 5 η

anti-Tac(Fv)-PE38. Η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε και για τις δύο ανοσοτοξίνες ήταν 0.1 μg/ml και η έκθεση των κυττάρων στις ανοσοτοξίνες διήρκεσε 24 ώρες.

Κατόπιν τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με διάλυμα RPMI και χρησιμοποιήθηκαν σαν κύτταρα-ανταποκριτές σε δευτερογενείς MLC στις οποίες οι διεγέρτες ήταν είτε τα κύτταρα-διεγέρτες της πρωτογενούς MLC (έλεγχος αποτελεσματικότητας ανοσοεξουδετέρωσης) είτε κύτταρα τρίτου μέρους (έλεγχος ειδικότητας ανοσοεξουδετέρωσης). Σαν κύτταρα τρίτου μέρους χρησιμοποιήθηκαν PBMNC από 3 τυχαίους υγιείς δότες, αναμειγμένα μεταξύ τους σε ίσες αναλογίες. Σε όλα τα πειράματα υπήρχαν κύτταρα-ανταποκριτές ελέγχου, που δεν είχαν εκτεθεί στις ανοσοτοξίνες και των οποίων η αντιδραστικότητα ενάντια στους ίδιους διεγέρτες θεωρήθηκε σαν 100% και χρησιμοποιήθηκε σαν μέτρο σύγκρισης για την παραμένουσα αντιδραστικότητα των κυττάρων μετά την ανοσοεξουδετέρωση. Οι δευτερογενείς MLC κράτησαν 5 μέρες και στο τέλος ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων μετρήθηκε με την μέθοδο της ενσωμάτωσης ραδιενεργού θυμιδίνης (^3HT uptake). Σε ορισμένες δευτερογενείς MLC ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων μετρήθηκε επίσης και κατόπιν 3 ή 7 ημερών καλλιέργειας.

Βρέθηκε ότι οι ανοσοτοξίνες ήταν πολύ αποτελεσματικές στην εξουδετέρωση της αλλοαντιδραστικότητας ανάμεσα στα άτομα που διέφεραν ως προς ένα απλότυπο (haploidentical) ενώ επέτρεψαν τη διατήρηση της αντίδρασης τρίτου μέρους. Εάν θεωρηθεί ότι η αντίδραση των κυττάρων-ανταποκριτών ελέγχου (αρχική αντιδραστικότητα) είναι 100%, τότε η παραμένουσα αντιδραστικότητα, μετά την έκθεση στην ανοσοτοξίνη, εναντίον του διεγέρτη με κοινό τον ένα απλότυπο (haploidentical) ήταν $7.6 \pm 1.4\%$ (μέση τιμή \pm σταθερά απόκλισης 10 πειραμάτων). Αντίστοιχα η παραμένουσα αντιδραστικότητα εναντίον του διεγέρτη τρίτου μέρους ήταν $64 \pm 5\%$.

Ο ΠΙΝΑΚΑΣ VIII-1 παρουσιάζει αναλυτικά τα αποτελέσματα των 10 πειραμάτων.

Η ΕΙΚΟΝΑ VIII-1 παρουσιάζει σχηματικά την παραμένουσα αντιδραστικότητα ενάντια στους 2 διεγέρτες μετά την ανοσοεξουδετέρωση.

ΙΧ. ΑΦΑΙΡΕΣΗ ΑΛΛΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΥΣ ΑΔΕΛΦΙΚΟΥΣ ΔΟΤΕΣ

Διαχωρισμός αντιδραστικότητας ενάντια σε ΡΗΑ-βλάστες και CML-κύτταρα

Ανάμεσα σε ιστοσυμβατούς αδελφικούς δότες και αρρώστους οι αντιγονικές διαφορές οφείλονται αποκλειστικά στα ελάσσονα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας (mHA) τα οποία και μπορεί να παρουσιάζουν περιορισμένη κατανομή στους διάφορους ιστούς (tissue restricted distribution) έτσι ώστε διαφορετικοί ιστοί από τον ίδιο οργανισμό πιθανόν να έχουν διαφορετική αντιγονικότητα [27]. Οι αντιγονικές διαφορές ανάμεσα στους ιστούς μπορεί να είναι ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές στην παρουσίαση των διαφόρων πεπτιδίων από τα MHC μόρια. Σε αρρώστους με CML, τα κύτταρα της μυελομονοκυτταρικής σειράς ανήκουν στο λευχαιμικό κλώνο και γιαυτό θα μπορούσαν επίσης να παρουσιάζουν πεπτίδια χαρακτηριστικά της λευχαιμίας. Αντιθέτως όμως τα T-κύτταρα αρρώστων με CML συνήθως δεν είναι λευχαιμικά [17,18] και γιαυτό αναμένεται ότι παρουσιάζουν πεπτίδια αντιπροσωπευτικά των υγιών ιστών του αρρώστου.

Με την χρήση των ανοσοτοξινών στην μέθοδο της εκλεκτικής ανοσοεξουδετέρωσης επιχειρήθηκε ο διαχωρισμός της αντιδραστικότητας του δότη ενάντια σε λευχαιμικά κύτταρα (μυελογενή κύτταρα και μονοκύτταρα) και μή λευχαιμικά κύτταρα (T-κύτταρα →PHA-βλάστες) του αρρώστου. Χρησιμοποιήθηκαν PBMNC από 10 αρρώστους που έπασχαν από χρόνια φάση CML και τους HLA-ιστοσυμβατούς αδελφικούς τους δότες. Ο τρόπος διαχωρισμού των λευχαιμικών κυττάρων και της ανάπτυξης των PHA-βλαστών περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικό και Μέθοδος. Μέσα σε αεριζόμενες φιάλες των 50 ml, στήθηκαν πρωτογενείς MLC με PBMNC του δότη σαν ανταποκριτές και PHA-βλάστες του αρρώστου (ακτινοβολημένους με 5000 rads) σαν διεγέρτες. Η αναλογία κυττάρων διεγέρτες/ανταποκριτές ήταν 1:1 και η συγκέντρωση των κυττάρων 5×10^5 /ml. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε 37° C και 5% CO_2 για 5 μέρες, μετά ξεπλύθηκαν με διάλυμα RPMI και αραιώθηκαν σε συγκέντρωση 2×10^6 /ml. Προστέθηκε η ανοσοτοξίνη anti-CD25- α σε συγκέντρωση 3×10^{-9} M για 36 ώρες. Κατόπιν τα κύτταρα ξεπλύθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σαν ανταποκριτές σε δευτερογενείς MLC εναντίον ακτινοβολημένων PHA-βλαστών ή CML-κυττάρων του αρρώστου. Οι δευτερογενείς MLC έγιναν σε πλακίδια 96 φρεατίων με 10^4 κύτταρα-ανταποκριτές και 10^5 κύτταρα-διεγέρτες ανά φρεάτιο. Μετά από 5 μέρες καλλιέργειας μετρήθηκε ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων με πρόσληψη ραδιενεργού θυμιδίνης. Ταυτόχρονα για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της μεθόδου μετρήθηκε και ο αρχικός πολλαπλασιασμός των PBMNC του δότη (πριν εκτεθούν στην ανοσοτοξίνη) ενάντια στους ίδιους διεγέρτες.

Σε όλα τα πειράματα μειώθηκε κατά πολύ η αντιδραστικότητα του δότη ενάντια στους PHA-βλάστες του αρρώστου ενώ διατηρήθηκε η αντιδραστικότητα ενάντια στα λευχαιμικά κύτταρα. Στα 10 ζεύγη δότη-αρρώστου που μελετήθηκαν, η μέση τιμή της παραμένουσας (μετά την ανοσοεξουδετέρωση) αντιδραστικότητας δότη ενάντια σε PHA-βλάστες του αρρώστου ήταν 7.5% της αρχικής τιμής ενώ ενάντια σε CML-κύτταρα ήταν 76.5% της αρχικής τιμής (ΕΙΚΟΝΑ IX-1).

Σημασία αναλογίας PHA-βλαστών/CML-κυττάρων στη πρωτογενή διέγερση

Η χρήση της ανοσοτοξίνης στην εκλεκτική ανοσοεξουδετέρωση επιτυγχάνει την μείωση της αντιδραστικότητας ενάντια στον διεγέρτη της πρωτογενούς MLC. Για να αποδειχθεί αυτό, στήθηκαν πρωτογενείς MLC με διαφορετική πρόσμειξη PHA-βλαστών και CML-κυττάρων στους διεγέρτες π.χ. 100-0% ή 90-10% ή 80-20% ή 60-40% ή 0-100%. Στο τέλος της καλλιέργειας έγινε η εξουδετέρωση της αντιδραστικότητας με την ανοσοτοξίνη όπως περιγράφηκε προηγουμένως και τα κύτταρα που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν σε δευτερογενείς MLC σαν ανταποκριτές εναντίον CML-κυττάρων διεγέρτες.

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα των πειραμάτων στο ΠΙΝΑΚΑ ΙΧ-1, η παραμένουσα αντιδραστικότητα στην δευτερογενή MLC ενάντια στα CML-κύτταρα ήταν περίπου αντιστρόφως ανάλογη με την πρόσμειξη του πρωτογενή διεγέρτη σε CML-κύτταρα. Σε απουσία CML-κυττάρων από την πρωτογενή διέγερση διατηρήθηκε στο ακέραιο η αντιδραστικότητα ενάντια σε αυτά, ενώ αντιθέτως παρατηρήθηκε σημαντική μείωση όταν η πρόσμειξη σε CML-κύτταρα του πρωτογενή διεγέρτη ήταν $\geq 10\%$. Με

πρωτογενή διεγέρτη αμιγή για CML-κύτταρα επιτεύχθηκε σχεδόν πλήρης αφαίρεση της αντιδραστικότητας.

Επίδραση της διέγερσης των T-κυττάρων στην συχνότητα HTLPf

Η μεικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση (MLR) είναι συνήθως ανενεργής ανάμεσα σε ιστοσυμβατούς αδελφικούς δότες και αρρώστους και γενικά δεν θεωρείται χρήσιμη δοκιμασία για την πρόβλεψη του κινδύνου ανάπτυξης οξείας ή χρόνιας μορφής GVHD [28]. Αντιθέτως έχει αποδειχθεί ότι, ο υπολογισμός της συχνότητας αλλοαντιδρώντων προγονικών βοηθητικών T-κυττάρων (helper T-lymphocyte precursor frequency, HTLPf) στην κατεύθυνση δότη εναντίον αρρώστου με την μέθοδο της περιορισμένης αραίωσης, αποτελεί αξιόπιστη μέτρηση του κινδύνου εμφάνισης οξείας και χρόνιας GVHD σε ΜΜΟ από ιστοσυμβατούς αδελφικούς δότες [20-22]. Γιαυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε αυτή η μέθοδος για την μέτρηση της αλλοαντιδραστικότητας δότη εναντίον αρρώστου πριν και μετά την εκλεκτική ανοσοεξουδετέρωση με την ανοσοτοξίνη. Η περιγραφή της μεθόδου έχει γίνει στο κεφάλαιο VI (Υλικό και Μέθοδος).

Για να ελεγχθεί η επίδραση που έχει προηγούμενη έκθεση στον ίδιο διεγέρτη (priming effect), στο μετέπειτα προσδιορισμό της συχνότητας HTLPf, καλλιεργήθηκαν PBMNC δότη με ακτινοβολημένα PBMNC αρρώστου για 2 μέρες σε αναλογία

διεγέρτη/ανταποκριτή 1:1. Κατόπιν τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν σαν ανταποκριτές εναντίον του αρχικού διεγέρτη (PBMNC αρρώστου) σε δοκιμασίες HTLPf. Η σύγκριση έγινε πάντα με τις αρχικές συχνότητες HTLPf δότη→αρρώστου. Τα αποτελέσματα από 5 ζεύγη αρρώστων και HLA-ιστοσυμβατών δότων έδειξαν ότι σε κάθε περίπτωση η προηγούμενη έκθεση στο διεγέρτη (priming) προκάλεσε αύξηση της συχνότητας HTLPf (EIKONA IX-2).

Μείωση της συχνότητας HTLPf δότη → αρρώστου

Διατήρηση της συχνότητας HTLPf δότη → τρίτου μέρους

Μετρήθηκαν αρχικές συχνότητες HTLPf χρησιμοποιώντας PBMNC από 7 αρρώστους που έπασχαν από χρόνια φάση CML και τους HLA-ιστοσυμβατούς αδελφικούς τους δότες. Σαν PBMNC τρίτου μέρους χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα από 3 τυχαίους υγιείς δότες αφού προηγουμένως αναμείχθηκαν σε ίσες αναλογίες. Για την εξουδετέρωση της αντιδραστικότητας δότη → αρρώστου, PBMNC δότη καλλιεργήθηκαν για 2 μέρες με ακτινοβολημένα PBMNC αρρώστου σε αναλογία 1:1 και κατόπιν προστέθηκε στις καλλιέργειες η ανοσοτοξίνη anti-Tac(Fv)-PE38 σε συγκέντρωση 0.1 μg/ml για 24 ώρες. Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 3 φορές με διάλυμα RPMI και χρησιμοποιήθηκαν σαν κύτταρα-ανταποκριτές σε δοκιμασίες HTLPf εναντίον ακτινοβολημένων PBMNC αρρώστου ή PBMNC τρίτου μέρους.

Σύγκριση των συχνοτήτων HTLPf δότη → αρρώστου πριν και μετά την έκθεση στην ανοσοτοξίνη έδειξε ότι η μέθοδος πέτυχε σημαντική μείωση της συχνότητας των αλλοαντιδρώντων βοηθητικών T-κυττάρων του δότη (ΕΙΚΟΝΑ ΙΧ-3). Στα 7 ζεύγη που μελετήθηκαν οι συχνότητες μειώθηκαν κατά μέσο όρο 4.5 φορές ($p=0.017$ with student's t test for paired samples assuming unequal variances). Αντιθέτως οι συχνότητες HTLPf

δότη → τρίτου μέρους δεν παρουσίασαν σημαντική μεταβολή ($p=0.96$) (EIKONA IX-4).
Άρα η εφαρμογή της μεθόδου πέτυχε σημαντικού βαθμού μείωση της αντιδραστικότητας
δότη εναντίον αρρώστου χωρίς την πρόκληση γενικευμένης ανοσοκαταστολής.

Διαχωρισμός αντιδραστικότητας δότη-κατά-ξενιστή και δότη-κατά-λευχαιμίας

Σε πειράματα με κύτταρα από 8 αρρώστους που έπασχαν από χρόνια φάση CML και από τους HLA-ιστοσυμβατούς αδελφικούς τους δότες, εξετάστηκε εάν η εκλεκτική ανοσοεξουδετέρωση με τη χρήση ανοσοτοξινών θα μπορούσε να πετύχει ταυτόχρονα, μείωση της πιθανότητας εμφάνισης GVHD και διατήρηση της αντιδραστικότητας του δότη ενάντια στη λευχαιμία. Για την μέτρηση της αρχικής αντιδραστικότητας δότη-κατά-ξενιστή και δότη-κατά λευχαιμίας χρησιμοποιήθηκαν PBMNC δότη σαν ανταποκριτές και PBMNC αρρώστου ή λευχαιμικά κύτταρα αρρώστου σαν διεγέρτες και μετρήθηκαν οι αρχικές συχνότητες HTLPf για τις παραπάνω αντιδράσεις. Για την εξουδετέρωση της αντιδραστικότητας του δότη, στήθηκαν πρωτογενείς MLC με PBMNC δότη σαν ανταποκριτές και ακτινοβολημένα (5000 rads) OKT3/IL2 αυξημένα λεμφοκύτταρα αρρώστου σαν διεγέρτες σε αναλογία 1:1. Μετά από καλλιέργεια 2 μερών, τα αλλοαντιδρώντα κύτταρα εξουδετερώθηκαν με την προσθήκη της ανοσοτοξίνης anti-Tac(Fv)-PE38 σε συγκέντρωση 0.1 μg/ml για 24 ώρες. Μετά την εξουδετέρωση τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν σαν ανταποκριτές για τη μέτρηση συχνοτήτων HTLPf είτε εναντίον ακτινοβολημένων PBMNC αρρώστου (HTLPf δότη-κατά-ξενιστή) είτε εναντίον ακτινοβολημένων λευχαιμικών κυττάρων αρρώστου (HTLPf δότη-κατά-λευχαιμίας).

Η διαδικασία παραγωγής των OKT3/IL2 αυξημένων λεμφοκυττάρων και διαχωρισμού των λευχαιμικών κυττάρων από τα PBMNC του αρρώστου περιγράφεται στο κεφάλαιο VI (Υλικό και Μέθοδος). Στο ΠΙΝΑΚΑ IX-2 φαίνεται ο ανοσοφαινότυπος των κυττάρων των 8 αρρώστων που χρησιμοποιήθηκαν στα διάφορα πειράματα.

Ο ΠΙΝΑΚΑΣ IX-3 δείχνει αναλυτικά τις συχνότητες HTLPf δότη-κατά-ξενιστή και δότη-κατά-λευχαιμίας για τους 8 αρρώστους (P1-P8) που μελετήθηκαν, πριν και μετά την εκλεκτική ανοσοεξουδετέρωση (E.A.) της αντιδραστικότητας του δότη.

Όπως φαίνεται στην ΕΙΚΟΝΑ IX-5, η εκλεκτική ανοσοεξουδετέρωση πέτυχε σημαντική μείωση των συχνοτήτων HTLPf δότη-κατά-ξενιστή ($p=0.007$ with student's t test for paired samples assuming unequal variances) και διατήρηση των συχνοτήτων HTLPf δότη-κατά-λευχαιμίας ($p=0.19$).

Στις περισσότερες περιπτώσεις μαζί με την σημαντική μείωση της συχνότητας HTLPf δότη-κατά-ξενιστή υπήρξε και μια μικρή μείωση της συχνότητας HTLPf δότη-κατά-λευχαιμίας. Συνολικά όμως η μέση τιμή της μείωσης της συχνότητας HTLPf δότη-κατά-ξενιστή ήταν κατά πολύ μεγαλύτερη της μέσης τιμής μείωσης της συχνότητας HTLPf δότη-κατά-λευχαιμίας ($p=0.03$) (ΠΙΝΑΚΑΣ IX-4).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι με την μέθοδο της εκλεκτικής ανοσοεξουδετέρωσης μπορεί να επιτευχθεί ο διαχωρισμός της αντιδραστικότητας του δότη και να μειωθεί η αντιδραστικότητα δότη-κατά-ξενιστή ενώ ταυτόχρονα να διατηρηθεί σε μεγάλο βαθμό η αντιδραστικότητα δότη-κατά-λευχαιμίας.

X. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΛΩΝΩΝ T-ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΔΟΤΗ ΜΕ ΞΕΧΩΡΙΣΤΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΕΣ ΕΝΑΝΤΙΑ ΣΕ ΛΕΥΧΑΙΜΙΚΑ ΚΑΙ ΜΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΑΡΡΩΣΤΟΥ

Για τη παραγωγή κλώνων T-κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν σαν κύτταρα-ανταποκριτές PBMNC από ένα υγιή δότη και σαν διεγέρτες λευχαιμικά κύτταρα από τον αδελφό του που έπασχε από χρόνια φάση CML και που διέφερε από το δότη ως προς ένα HLA αντιγόνο. Η διαδικασία παραγωγής των κλώνων περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο VI (Υλικό και Μέθοδος). Συνολικά παρήχθησαν 122 κλώνοι και η αποδοτικότητα (cloning efficiency) ήταν 12% στην περιορισμένη αραίωση των 0.3 κυττάρων/φρεάτιο (δηλαδή παραγωγή 12 κλώνων από κάθε 100 φρεάτια). Από αυτούς διαλέχθηκαν τυχαία και μελετήθηκαν αναλυτικά 18 κλώνοι για την αντιδραστικότητα τους ενάντια σε PHA-βλάστες και CML-κύτταρα του αρρώστου, σε δοκιμασίες πολλαπλασιασμού με μέτρηση πρόσληψης ραδιενεργού θυμιδίνης. Επίσης οι ίδιοι κλώνοι μελετήθηκαν με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας (flow cytometry) χρησιμοποιώντας ανοσοφθορίζοντα αντισώματα ειδικά για τα Vβ τμήματα του υποδοχέα των T-κυττάρων (TCR-Vβ). Τα αντισώματα αυτά ήταν συνδεδεμένα με FITC και αναγνώριζαν τις ειδικότητες Vβ3.1, 5.1, 5.2, 5.3, 6/7, 8, 12, 13.1, 13.3 και Vα2, 12.1 του TCR (T cell Diagnostics, Inc., Woburn, MA). Για τη χρώση των κυττάρων με τα αντισώματα, πρώτα έγινε επώαση με IgG ποντικού για 5 λεπτά με σκοπό να αποφευχθεί η τυχόν μη ειδική πρόσδεση αντισώματος με τα κύτταρα και κατόπιν προστέθηκαν 5-7 μl από το ειδικό αντίσωμα Vβ σε κάθε σωλήνα και συνεχίστηκε η επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 4⁰C.

Όπως φαίνεται στο ΠΙΝΑΚΑ X-1, 10 κλώνοι έδειξαν αντιδραστικότητα μόνο εναντίον των λευχαιμικών (CML) κυττάρων του αρρώστου, 3 κλώνοι μόνο εναντίον μη λευχαιμικών κυττάρων (PHA-βλάστες), 4 κλώνοι αντέδρασαν και με τους δύο διεγέρτες ενώ ένας κλώνος δεν αντέδρασε με κανένα από αυτούς. Η ΕΙΚΟΝΑ X-1 δείχνει την αντιδραστικότητα 3 χαρακτηριστικών κλώνων. Ο κλώνος v13 αντιδρούσε με CML-

κύτταρα, ο κλώνος v14 με PHA-βλάστες και ο κλώνος v25 και με τα δύο. Η παραγωγή περισσότερων κλώνων με αντιδραστικότητα εναντίον λευχαιμικών κυττάρων οφείλεται στη χρησιμοποίηση λευχαιμικών κυττάρων σαν διεγέρτες κατά την παραγωγή των κλώνων. Αντίθετα η παραγωγή μερικών κλώνων με αντιδραστικότητα μόνο για PHA-βλάστες πιθανώς να οφείλεται σε μικρή πρόσμειξη των λευχαιμικών κυττάρων με λεμφοκύτταρα.

Όλοι οι κλώνοι ήταν CD3⁺ και TCRαβ⁺, 13 ήταν CD4⁺, 2 ήταν CD8⁺ και 3 ήταν CD4⁺ και CD8⁺. Μερικοί από τους υποτιθέμενους κλώνους είχαν παραπάνω από μία Vβ ειδικότητα (όπως οι κλώνοι v2, v4, v37, v52, v57) που σημαίνει ότι συνυπήρχαν παραπάνω από ένας κλώνοι. Ένας κλώνος (v29) δεν αναγνωρίστηκε από κανένα αντίσωμα. Οι κλώνοι που αντιδρούσαν μόνο με τα λευχαιμικά κύτταρα είχαν ειδικότητες TCR Vβ5, Vβ6/7, και Vβ13, αυτοί που αντιδρούσαν μόνο με τους PHA-βλάστες είχαν TCR Vβ8 και Vβ12, ενώ αυτοί που αντιδρούσαν και με τα δύο είχαν TCR Vβ3, Vβ5 και Vβ8 (ΠΙΝΑΚΑΣ X-1).

Τα αποτελέσματα από τα παραπάνω πειράματα υποδηλώνουν ότι ανάμεσα στα λεμφοκύτταρα του δότη υπάρχουν κλώνοι T-κυττάρων που αντιδρούν εκλεκτικά με λευχαιμικά κύτταρα του αρρώστου (GVL κλώνοι), άλλοι κλώνοι που αντιδρούν εκλεκτικά με μη λευχαιμικά κύτταρα (GVHD κλώνοι) και τέλος άλλοι κλώνοι που αντιδρούν και με τα δύο (GVHD-GVL κλώνοι). Ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις η διπλή αντιδραστικότητα των κλώνων θα μπορούσε να εξηγηθεί με τη συνύπαρξη περισσότερων του ενός κλώνων στην καλλιέργεια, σε άλλες περιπτώσεις θα μπορούσε να οφείλεται σε ελάσσονα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας (mHA) που εκφράζονται ταυτόχρονα και σε λευχαιμικά και σε μη λευχαιμικά κύτταρα. Αντίθετα η ύπαρξη κλώνων με ξεχωριστές αντιδραστικότητες υποδηλώνει ότι ορισμένα mHA μπορεί να εκφράζονται κατά κύριο λόγο ή αποκλειστικά σε λευχαιμικά ή μη λευχαιμικά κύτταρα του αρρώστου. Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν περιγραφεί και από άλλους στην βιβλιογραφία [29,30] και αποτελούν τη θεωρητική βάση για το διαχωρισμό των αντιδράσεων GVHD και GVL.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σε αυτή την ερευνητική μελέτη αναπτύχθηκε μια καινούργια μέθοδος μείωσης της αλλοαντιδραστικότητας ανάμεσα στο δότη και στον άρρωστο που ονομάζεται εκλεκτική ανοσοεξουδετέρωση. Η μέθοδος περιλαμβάνει αρχικά τη διέγερση των λεμφοκυττάρων του δότη ενάντια σε μη λευχαιμικά κύτταρα του αρρώστου και κατόπιν την εξουδετέρωση των αλλοαντιδρώντων κυττάρων με ανοσοτοξίνες που στοχεύουν την αλυσίδα α του υποδοχέα της IL-2 (IL-2Ra). Έτσι η αφαίρεση είναι εκλεκτική και αφορά μόνο τα λεμφοκύτταρα του δότη που αναγνωρίζουν φυσιολογικά κύτταρα του αρρώστου. Τα λεμφοκύτταρα του δότη που δεν αντιδρούν ενάντια στον άρρωστο, δεν αναμένεται να προκαλέσουν GVHD και δεν βλάπτονται από την ανοσοτοξίνη αφού δεν εκφράζουν την IL-2Ra στην επιφάνεια τους. Αυτά τα λεμφοκύτταρα όμως θα μπορούσαν πιθανόν να αντιδράσουν ενάντια στη λευχαιμία και να προσφέρουν στο μεταμοσχευμένο άρρωστο ανοσολογική λειτουργία δότη συνεισφέροντας στη καταπολέμηση των λοιμώξεων.

Η λευχαιμία που μελετήθηκε ήταν η CML γιατί αφενός προσφέρει τη δυνατότητα συλλογής μεγάλου αριθμού λευχαιμικών κυττάρων από το περιφερικό αίμα του αρρώστου και αφετέρου γιατί η αντίδραση GVL είναι πιο έντονη στην CML απ' ό τι στις άλλες λευχαιμίες [31]. Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου ελέγχθηκε σε HLA-ιστοσυμβατούς αδελφικούς δότες καθώς επίσης και σε συγγενικούς δότες που έχουν κοινό με τον άρρωστο μόνο τον ένα απλότυπο (haploidentical). Για τη πιο ακριβή μέτρηση της αλλοαντιδραστικότητας μεταξύ HLA-ιστοσυμβατών αδελφών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος HTLPf που επιτρέπει τον υπολογισμό της συχνότητας των αλλοαντιδρώντων προγονικών βοηθητικών T-κυττάρων και μπορεί να προβλέψει τη πιθανότητα ανάπτυξης οξείας και χρόνιας GVHD [20-22]. Η ίδια μέθοδος χρησιμοποιήθηκε και για τη μέτρηση της αντιδραστικότητας GVL δεδομένου ότι έχει αποδειχθεί με *in vitro* [32] και *in vivo* [33] μελέτες ο σημαντικός ρόλος των CD4+ T-κυττάρων στην καταπολέμηση της λευχαιμίας.

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την ανάλυση των αποτελεσμάτων των διαφόρων πειραμάτων είναι τα ακόλουθα:

1. Οι ανοσοτοξίνες anti-Tac(Fv)-PE38 και anti-CD25-ricin είναι πολύ αποτελεσματικές στην εξουδετέρωση αλλοαντιδρώντων λεμφοκυττάρων.
2. Η ανοσοτοξίνη anti-Tac(Fv)-PE38 δεν είναι τοξική στα μη ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα.
3. Η ανοσοτοξίνη anti-Tac(Fv)-PE38 δεν είναι τοξική στα προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών.
4. Η μέθοδος της εκλεκτικής ανοσοεξουδετέρωσης επιτρέπει τη διατήρηση της ανοσίας του δότη ενάντια στον ιό Epstein-Barr.
5. Η χρησιμοποίηση της ανοσοτοξίνης anti-Tac(Fv)-PE38 επιτυγχάνει σημαντική μείωση της αλλοαντιδραστικότητας ως προς ένα διαφορετικό απλότυπο με ταυτόχρονη διατήρηση της αντίδρασης τρίτου μέρους.
6. Σε αρρώστους με CML, η χρησιμοποίηση της ανοσοτοξίνης anti-CD25-ricin μπορεί να διαχωρίσει τις αντιδραστικότητες του ιστοσυμβατού δότη εναντίον λεμφογενών και μυελογενών κυττάρων του αρρώστου.
7. Σε αρρώστους με CML, η χρησιμοποίηση της ανοσοτοξίνης anti-Tac(Fv)-PE38 μειώνει σημαντικά την συχνότητα των αλλοαντιδρώντων βοηθητικών T-κυττάρων του ιστοσυμβατού δότη χωρίς να προκαλεί γενικευμένη ανοσοκαταστολή.
8. Σε αρρώστους με CML που διαθέτουν HLA-ιστοσυμβατούς αδελφικούς δότες, η εφαρμογή της μεθόδου της εκλεκτικής ανοσοεξουδετέρωσης με την ανοσοτοξίνη anti-Tac(Fv)-PE38, προκαλεί μείωση της αντιδραστικότητας GVHD και διατήρηση της αντιδραστικότητας GVL του δότη, όπως αυτές ελέγχονται με τη μέτρηση συχνοτήτων HTLPf.
9. Αποδείχτηκε ότι είναι δυνατή η απομόνωση διαφορετικών κλώνων T-κύτταρων από κάποιο ιστοσυμβατό δότη, με διαφορετικές αντιδραστικότητες για λευχαιμικά και μη λευχαιμικά κύτταρα του αρρώστου. Αυτοί οι κλώνοι θα μπορούσαν να διαχωριστούν με τη μέθοδο της εκλεκτικής ανοσοεξουδετέρωσης.
10. Αντιθέτως, κλώνοι T-κυττάρων του δότη που δείχνουν την ίδια αντιδραστικότητα για λευχαιμικά και μη λευχαιμικά κύτταρα του αρρώστου, δεν θα μπορούσαν να διαχωριστούν με αυτή τη μέθοδο.

Με βάση τα παραπάνω συμπεράσματα η μέθοδος θα μπορούσε να εφαρμοστεί με επιτυχία σε περιπτώσεις όπου ο κίνδυνος εμφάνισης σοβαρής GVHD είναι μεγάλος όπως σε περιπτώσεις HLA-ιστοσυμβατού αδελφικού δότη με υψηλή αρχική συχνότητα HTLPf δότη→αρρώστου, σε περιπτώσεις συγγενικού αλλά όχι απόλυτα ιστοσυμβατού δότη και τέλος σε περιπτώσεις που ο δότης είναι μή συγγενικό άτομο. Η εξουδετέρωση της αντιδραστικότητας του δότη θα μπορούσε να γίνει είτε στη φάση της μεταμόσχευσης είτε αργότερα όταν χορηγούνται μεταγγίσεις λεμφοκυττάρων του δότη για τη πρόληψη ή τη θεραπεία λευχαιμικής υποτροπής. Η ανοσοτοξίνη δεν αναμένεται ότι θα έχει τοξική δράση στον άρρωστο δεδομένου ότι η όλη διαδικασία γίνεται ex vivo και η ανοσοτοξίνη απομακρύνεται με ξέπλυμα των κυττάρων μετά την ανοσοεξουδετέρωση. Επιπλέον η ανοσοτοξίνη δεν είναι τοξική στα κύτταρα που δεν εκφράζουν την IL-2Rα αλυσίδα. Σοβαρό πλεονέκτημα αποτελεί η έλλειψη τοξικής δράσης της ανοσοτοξίνης στα κύτταρα του μυελού. Έτσι δεν αναμένεται να επηρεάσει αρνητικά την εμφύτευση του μοσχεύματος. Στην εφαρμογή της μεθόδου σε συγγενικούς δότες που έχουν κοινό με τον άρρωστο τον ένα μόνο απλότυπο (haploidentical), η μέθοδος επίσης πλεονεκτεί γιατί επιτρέπει τη μεταβίβαση ανοσίας του δότη για τον ιό του Epstein-Barr και έτσι μειώνονται οι πιθανότητες εμφάνισης EBV-λεμφωμάτων μετά τη μεταμόσχευση. Η αποτελεσματική πρόληψη της GVHD χωρίς τη πρόκληση γενικευμένης ανοσοκαταστολής, θα μπορούσε να βελτιώσει σημαντικά τα αποτελέσματα των μεταμοσχεύσεων από μερικά ιστοσυμβατούς συγγενικούς δότες. Αυτό θα έκανε τη μεταμόσχευση εφικτή σε περισσότερους αρρώστους που πάσχουν από ανίατα νοσήματα και στερούνται HLA-ιστοσυμβατού δότη [34].

Οι ανοσολογικές αντιδράσεις που συμβαίνουν στις αλλογενείς μεταμοσχεύσεις μυελού των οστών θα μπορούσαν να ελεγχθούν καλύτερα εάν ήταν γνωστά τα αντιγόνα που τις προκαλούν. Αυτό σημαίνει ότι για τη συχνή περίπτωση μεταμόσχευσης από HLA-ιστοσυμβατό αδελφικό δότη θα έπρεπε να γνωρίζουμε την υπάρχουσα ποικιλία σε ελάσσονα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας (mHA) και να ήταν δυνατή η ανίχνευση τους στο δότη και στον άρρωστο για την ακριβή πρόβλεψη της αναμενόμενης αλλοαντιδραστικότητας. Τέτοια δυνατότητα προς το παρόν δεν υπάρχει. Ακόμα και σε

αυτή τη περίπτωση όμως, για το διαχωρισμό των ανοσολογικών αντιδράσεων GVHD και GVL θα έπρεπε να ήταν γνωστό ποια mHA ευθύνονται για την κάθε αντίδραση. Τότε θα μπορούσαν να παραχθούν κλώνοι T-κυττάρων του δότη με ειδική αντιλευχαιμική δράση. Εφόσον η παραγωγή τέτοιων κλώνων προς το παρόν δεν είναι εφικτή, θα μπορούσε ίσως να επιτευχθεί διαχωρισμός των αντιδράσεων με την εκλεκτική αφαίρεση των λεμφοκυττάρων του δότη που θα μπορούσαν να προκαλέσουν αντίδραση GVHD. Σε μια τέτοια προσέγγιση είναι αναμενόμενο ότι θα ελαττωθεί, όχι μόνο η GVHD αντιδραστικότητα του δότη, αλλά σε κάποιο βαθμό και η GVL αντιδραστικότητα. Αυτό οφείλεται στην ύπαρξη κοινών αντιγόνων ανάμεσα στα λευχαιμικά και μη λευχαιμικά κύτταρα του αρρώστου. Τέτοια μείωση της αντιδραστικότητας GVL παρατηρήθηκε και στα πειράματα που έγιναν με την εφαρμογή της μεθόδου. Η μείωση όμως της αντιδραστικότητας GVHD υπερτερούσε κατά πολύ της αντίστοιχης μείωσης της αντιδραστικότητας GVL. Αυτό αποτελεί και την επιτυχία της μεθόδου στο διαχωρισμό των δύο ανοσολογικών αντιδράσεων.

Εκτός όμως από τη διατήρηση αντιδραστικότητας ενάντια στη λευχαιμία, πλεονέκτημα της μεθόδου αποτελεί και η μεταβίβαση σημαντικής ανοσίας του δότη με το μυελικό μόσχευμα. Αυτό οφείλεται στην ειδική δράση της ανοσοτοξίνης να είναι τοξική μόνο για τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα. Γιαυτό το λόγο, η ευαισθησία στις λοιμώξεις, που συχνά παρατηρείται με τη μη εκλεκτική αφαίρεση των T-κυττάρων του μοσχεύματος, δεν αναμένεται να αποτελέσει πρόβλημα με την εφαρμογή αυτής της μεθόδου. Όπως αποδείχτηκε σε πολλά πειράματα, σχεδόν ανέπαφη παραμένει η αντιδραστικότητα εναντίον κυττάρων τρίτου μέρους και αντιγόνων του ιού Epstein-Barr. Η διατήρηση ανοσίας κατά των ιών θα μπορούσε να αποβεί χρήσιμη και στη περίπτωση του μεγαλοκυτταροϊού (CMV) που είναι γνωστό ότι αποτελεί μεγάλο πρόβλημα μετά από μεταμοσχεύσεις.

Ο αρχικός στόχος όμως αυτής της μεθόδου είναι η μείωση της πιθανότητας εμφάνισης σοβαρής μορφής GVHD. Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων μέτρησης συχνότητας HTLPf, αυτός ο στόχος θα πρέπει να έχει επιτευχθεί. Οι περισσότερες συχνότητες HTLPf δότη-κατά-ξενιστή μετά την εκλεκτική ανοσοεξουδετέρωση ήταν

κατά πολύ χαμηλότερες της συχνότητας 1/100,000 που θεωρείται σαν ουδός των συχνοτήτων υψηλού κινδύνου [20,21]. Επίσης στις δευτερογενείς MLC που μετρήθηκε ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων μετά από 3, 5 ή 7 μέρες καλλιέργειας, δεν παρατηρήθηκε καμμία ανάκαμψη της αντιδραστικότητας ενάντια στον αρχικό διεγέρτη. Αυτό σημαίνει ότι τα αλλοαντιδρώντα κύτταρα είχαν πάθει μη αντιστρεπτή βλάβη από την έκθεση στην ανοσοτοξίνη. Αντιθέτως όταν χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα συνδεδεμένο με την ανενεργό μορφή της τοξίνης [anti-Tac(Fv)-PE38KDEL^{ASP553}], δεν υπήρξε εξουδετέρωση της αντιδραστικότητας, προφανώς γιατί τα αλλοαντιδρώντα λεμφοκύτταρα δεν καταστράφηκαν.

Όλα όμως τα παραπάνω συμπεράσματα στηρίζονται στα αποτελέσματα των *in vitro* πειραμάτων και στην υπάρχουσα γνώση για τους μηχανισμούς των ανοσολογικών αντιδράσεων. Ο πραγματικός έλεγχος για την επιτυχία της μεθόδου θα πρέπει να είναι η εφαρμογή της σε αρρώστους υψηλού κινδύνου για εμφάνιση GVHD που υποβάλλονται σε αλλογενή μεταμόσχευση μυελού των οστών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΕΙΔΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ

1. Theze J., Alzari P., Bertoglio J: Interleukin 2 and its receptors: recent advances and new immunological functions. *Immunology Today* 1996, 17:481
2. Minami Y., Kono T., Miyazaki T., et al: The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Ann Rev Immunol* 1993, 11:245

3. Uchiyama T., Broder S., Waldmann T., et al: A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells. *J Immunol* 1981, 126:1393
4. Taniguchi T., Minami Y: The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. *Cell* 1993, 73:5
5. Martin P., Hansen J., Thomas D: Preincubation of donor bone marrow cells with a combination of murine monoclonal anti-T-cell antibodies without complement does not prevent GVHD after allogeneic BMT. *J Clin Immunol* 1984, 4:18
6. Tellides G., Dallman M., Morris P: Mechanism of action of IL-2R monoclonal antibody therapy: target cell depletion or inhibition of function? *Transplantation Proceedings* 1989, 21:997
7. Engert A., Martin G., Amlot P., et al: Immunotoxins constructed with anti-CD25 monoclonal antibodies and deglycosylated ricin A-chain have potent anti-tumor effects against human Hodgkin cells in vitro and solid Hodgkin tumors in mice. *Int J Cancer* 1991, 49:450
8. Hwang J., FitzGerald D., Adhya S., et al: Functional domains of pseudomonas exotoxin identified by deletion analysis of the gene expressed in E. Coli. *Cell* 1987, 48:129
9. Waldmann T., Goldman C., Robb R., et al: Expression of interleukin-2 receptors on activated human B cells. *J Exp Med* 1984, 160:1450
10. Chaudhary V., Queen C., Junghans R., et al: A recombinant immunotoxin consisting of two antibody variable domains fused to pseudomonas exotoxin. *Nature* 1989, 339:394
11. Kreitman R., Bailon P., Chaudhary V., et al: Recombinant immunotoxins containing anti-Tac(Fv) and derivatives of pseudomonas exotoxin produce complete regression in mice of an interleukin-2 receptor expressing human carcinoma. *Blood* 1994, 83:426
12. Kreitman R., Pastan I: Importance of the glutamate residue of KDEL in increasing the cytotoxicity of pseudomonas exotoxin derivatives and for increased binding to the KDEL receptor. *Biochem J* 1995, 307:29

13. Kreitman R., Schneider W., Queen C., et al: Mik- β_1 (Fv)-PE40, a recombinant immunotoxin cytotoxic toward cells bearing the β -chain of the IL-2 receptor. *J Immunology* 1992, 149:2810
14. Kreitman R., Puri R., Pastan I: A circularly permuted recombinant interleukin 4 toxin with increased activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91:6889
15. Brinkmann U., Pai L., FitzGerald D., et al: B3(Fv)-PE38KDEL, a single chain immunotoxin that causes complete regression of a human carcinoma in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88:8616
16. Chaudhary V., Jinno Y., FitzGerald D., et al: Pseudomonas exotoxin contains a specific sequence at the carboxyl terminus that is required for cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87:3080
17. Tsukamoto N., Karasawa M., Maehara T., et al: The majority of T lymphocytes are polyclonal during the chronic phase of chronic myelogenous leukemia. *Ann Hematol* 1996, 72:61
18. Jonas D., Lubbert M., Kawasaki E., et al: Clonal analysis of bcr-abl rearrangement in T lymphocytes from patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1992, 79:1017
19. Sharrock C., Kaminski E., Man S: Limiting dilution analysis of human T cells: a useful clinical tool. *Immunol. Today* 1990, 11:281
20. Theobald M., Nierle T., Bunjes D., et al: Host-specific interleukin-2-secreting donor T-cell precursors as predictors of acute graft-versus-host disease in bone marrow transplantation between HLA-identical siblings. *NEJM* 1992, 327:1613
21. Schwarzer A., Jiang YZ., Brookes P., et al: Frequency of anti-recipient alloreactive helper T-cell precursors in donor blood and graft-versus-host disease after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Lancet* 1993, 341:203
22. Bunjes D., Theobald M., Nierle T., et al: Presence of host-specific interleukin 2-secreting T helper cell precursors correlates closely with active primary and secondary chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 1995, 15:727
23. Zutter M., Martin P., Sale G., et al: Epstein-Barr virus lymphoproliferation after bone marrow transplantation. *Blood* 1988, 72:520

24. Shapiro R., McClain K., Frizzera G., et al: Epstein-Barr virus associated B cell lymphoproliferative disorders following bone marrow transplantation. *Blood* 1988, 71:1234
25. Papadopoulos E., Ladanyi M., Emanuel D., et al: Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *NEJM* 1994, 330:1185
26. Lieberman J., Buchsbaum R: Using T cells to treat B-cell cancers. *NEJM* 1994, 330:1231 (editorial)
27. de Bueger M., Bakker A., van Rood J., et al: Tissue distribution of human minor histocompatibility antigens. *J Immunol* 1992, 149:1788
28. DeGast G., Mickelson E., Beatty P., et al: Mixed leukocyte culture reactivity and graft-versus-host disease in HLA-identical marrow transplantation for leukemia. *Bone Marrow Transplantation* 1992, 9:87
29. Hoffmann T., Theobald M., Bunjes M., et al: Frequency of bone marrow T cells responding to HLA-identical non-leukemic and leukemic stimulator cells. *Bone Marrow Transplant* 1993, 12:1
30. Oettel K., Wesly O., Albertini M., et al: Allogeneic T-cell clones able to selectively destroy Philadelphia chromosome-bearing (Ph+) human leukemia lines can also recognize Ph- cells from the same patient. *Blood* 1994, 83:3390
31. Kolb H., Schattenberg A., Goldman J., et al: Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 1995, 86:2041
32. Jiang YZ., Barrett AJ: Cellular and cytokine-mediated effects of CD4-positive lymphocyte lines generated in vitro against chronic myelogenous leukemia. *Exp Hematol* 1995, 23:1167
33. Giralt S., Hester J., Huh Y., et al: CD8-depleted donor lymphocyte infusion as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1995, 86:4337
34. Henslee-Downey J: Choosing an alternative bone marrow donor among available family members. *Am J Ped Hem Onc* 1993, 15:150

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην εργασία αυτή αναπτύχθηκε μια καινούργια μέθοδος προφύλαξης από την εμφάνιση σοβαρής αντίδρασης μοσχεύματος-κατά-ξενιστή (GVHD) σε αλλογενείς μεταμοσχεύσεις μυελού των οστών (MMO). Η μέθοδος βασίζεται αρχικά στη διέγερση των λεμφοκυττάρων του δότη ενάντια στα κύτταρα του αρρώστου και κατόπιν στην εξουδετέρωση των αλλοαντιδρώντων T-κυττάρων του δότη με τη χρήση ανοσοτοξινών

που στοχεύουν την αλυσίδα α του υποδοχέα της IL-2 (IL-2R α). Με αυτό το τρόπο επιτυγχάνεται η εκλεκτική εξουδετέρωση των λεμφοκυττάρων του δότη που αντιδρούν εναντίον του αρρώστου και θα μπορούσαν να προκαλέσουν GVHD. Τα υπόλοιπα λεμφοκύτταρα του δότη παραμένουν ανέπαφα και θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν στην ανοσολογική αντίδραση μοσχεύματος-κατά-λευχαιμίας (GVL) και να προσφέρουν ανοσία κατά των λοιμώξεων.

Με τα αποτελέσματα των πειραμάτων αποδείχτηκε ότι οι ανοσοτοξίνες anti-Tac(Fv)-PE38 και anti-CD25-ricin είναι πολύ αποτελεσματικές στην εξουδετέρωση αλλοαντιδρώντων λεμφοκυττάρων. Προσδιορίστηκαν οι πειραματικές παράμετροι για την επίτευξη των καλύτερων αποτελεσμάτων. Αποδείχτηκε ότι η ανοσοτοξίνη δεν παρουσιάζει τοξικότητα ενάντια στα μη ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και στα προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών. Η εφαρμογή της μεθόδου πέτυχε σημαντική μείωση της αντιδραστικότητας ενάντια σε ένα διαφορετικό απλότυπο χωρίς να προκαλέσει γενικευμένη ανοσοκαταστολή. Σε HLA-ιστοσυμβατά αδέρφια αποδείχτηκε ότι είναι εφικτός ο διαχωρισμός της αντιδραστικότητας του δότη ενάντια σε λευχαιμικά και μη λευχαιμικά κύτταρα αρρώστων με χρόνια μυελογενή λευχαιμία (CML). Τέλος με τη μέτρηση συχνότητας αλλοαντιδρώντων βοηθητικών T-κυττάρων (HTLPIf) αποδείχτηκε ότι με την εφαρμογή της μεθόδου μειώνεται σημαντικά η αντιδραστικότητα GVHD των λεμφοκυττάρων του δότη ενώ διατηρείται σε μεγάλο βαθμό η αντιδραστικότητα GVL. Συμπερασματικά αυτή η μέθοδος της εκλεκτικής αφαίρεσης της αντιδραστικότητας GVHD του δότη, θα μπορούσε να βελτιώσει την ανοσολογική αποκατάσταση του αρρώστου μετά από αλλογενή ΜΜΟ.

SUMMARY

In this study we have developed a new method to prevent severe graft-versus-host disease (GVHD) in allogeneic bone marrow transplantation (BMT). The method is based on initial priming of donor lymphocytes against host cells followed by elimination of the alloreactive donor T-cells using immunotoxins that target the IL-2 receptor α chain. Such an approach would selectively deplete donor lymphocytes reacting against the patient and

causing GVHD, and spare the remaining donor T-cells which could perhaps mediate graft-versus-leukemia (GVL) reactivity or confer immunity against infections.

According to our results, the immunotoxins anti-Tac(Fv)-PE38 and anti-CD25-ricin are very effective in depleting alloreactive lymphocytes. We have determined the experimental parameters for achieving optimal depletion. We have shown that the immunotoxin is not toxic to either resting lymphocytes or bone marrow progenitor cells. Using this method we were able to deplete the alloreactivity against a foreign haplotype without causing global immunosuppression. In HLA identical siblings, we provided evidence that it is feasible to separate the donor reactivities against leukemic and non-leukemic cells in patients with CML. Finally, by measuring helper T-lymphocyte precursor frequencies (HTLPf) of donor T-cells we have shown that this method results in the reduction of GVHD and the preservation of GVL reactivity. In conclusion, this method of selective depletion of donor GVHD reactivity, has the potential to improve the immunological reconstitution of patients undergoing allogeneic BMT.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

APC	κύτταρο παρουσίασης αντιγόνων
CML	χρόνια μυελογενής λευχαιμία
CPM	μετρήσεις ανά λεπτό
CTL	κυτταροτοξικό T-κύτταρο
E.A.	εκλεκτική ανοσοεξουδετέρωση
EBV	ιός Epstein-Barr
GVHD	αντίδραση μοσχεύματος-κατά-ξενιστή

GVL	αντίδραση μοσχεύματος-κατά-λευχαιμίας
HLA	ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα
haploidentical	κύτταρα με ταυτόσημο τον ένα απλότυπο
HTLPf	συχνότητα βοηθητικών προγονικών T-κυττάρων
³ HT	τριτιομένη ραδιενεργός θυμιδίνη
IBMTR	διεθνές αρχείο μεταμοσχεύσεων μυελού των οστών
IL-2	ιντερλευκίνη-2
INF	ιντερφερόνη
LCL	λεμφοβλαστική κυτταρική γραμμή
LDA	ανάλυση περιορισμένης αραίωσης
MHC	μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας
mHA	ελάσσονα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας
MLC	μεικτή λεμφοκυτταρική καλλιέργεια
MMO	μεταμόσχευση μυελού των οστών
NK	κύτταρα φυσικοί φονείς (NK κύτταρα)
PBMNC	μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος
PE	εξωτοξίνη της ψευδομονάδας
PHA	φυτοαιμαγλουτίνη
s.d.	σταθερή απόκλιση
S:R	αναλογία διεγέρτες προς ανταποκριτές
TCR	υποδοχέας των T-κυττάρων