

# خون

فصلنامه تحقیقاتی

دوره ۲ شماره ۵ پاییز ۸۴ (۱۴۴-۱۳۹)

## اثرات کایمیریسم بر بیماری پیوند علیه میزان، عود بیماری و بقا پس از پیوند مغزاستخوان آلوژن در ایران

دکتر حمید الله غفاری<sup>۱</sup>، دکتر کامران علی مقدم<sup>۲</sup>، دکتر فروغ فروغی<sup>۳</sup>، بهرام چهار دولی<sup>۴</sup>،  
دکتر زهره صناعت<sup>۵</sup>، دکتر بابک بهار<sup>۶</sup>، دکتر اسدالله موسوی<sup>۷</sup>، دکتر مسعود ایروانی<sup>۸</sup>، دکتر اردشیر قوام زاده<sup>۹</sup>

### چکیده

سابقه و هدف

حضور همزمان سلول‌های خون‌ساز گیرنده و دهنده در بدن شخص گیرنده پس از پیوند آلوژن مغزاستخوان، کایمیریسم مختلط (mixed chimerism) نامیده می‌شود. تحلیل کایمیریسم روش بسیار ارزشمندی برای ارزیابی رژیم‌های آماده‌سازی مختلف، GVHD، رژیم‌های پیشگیرانه و سلول درمانی برای افزایش موفقیت پیوند است. مطالعه حاضر درکشور به منظور بررسی اثرات کایمیریسم بر بیماری پیوند علیه میزان، عود بیماری و بقا پس از پیوند مغزاستخوان، انجام شد.

### مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده هم‌گروهی و آینده‌نگر بود. در این مطالعه ارتباط کایمیریسم مختلط با بیماری پیوند علیه میزان حاد، عود بیماری، بقا، و بقای بدون عود در ۹۱ بیمار دریافت کننده پیوند از مغزاستخوان (۱۲ نفر) یا از خون محیطی (۷۹ نفر) بررسی شد. ارزیابی کایمیریسم با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توالی‌های تکراری کوتاه (STR-PCR) صورت گرفت. جمعیت مورد مطالعه شامل بیماران مبتلا به تالاسمی، AML، ALL، CML و سایر موارد و شامل زن (۴۱/۸٪) و مرد (۵۳٪) با میانه سنی ۲۱ سال (۳-۵۰) بودند. میانه زمان پیگیری ۱۳ ماه بود. تحلیل داده‌ها در نرم افزار آماری SPSS با آزمون t و کای دو (Chi-square) صورت گرفت.

### یافته‌ها

در روز ۳۰ بعد از پیوند، کایمیریسم مختلط در ۱۵ بیمار (۱۶/۵٪)، کایمیریسم کامل دهنده در ۷۲ بیمار (۷۹٪) و فقدان کایمیریسم در ۴ بیمار (۴/۵٪) مشاهده شد. میزان بروز GVHD حاد به طرز قابل توجهی در بیماران با کایمیریسم مختلط پایین تر از بیماران با کایمیریسم کامل بود ( $p=0.01$ ) ولی تفاوت معنی‌داری در شدت GVHD حاد (درجه ۱، ۲ در مقابل ۳، ۴) بین دو گروه مشاهده نشد. میزان عود ۱۷/۶٪، بقای کلی بیماران ۸۸/۹٪ و بقای بدون عود ۸۰/۲٪ بود که تفاوت معنی‌داری بین بیماران با کایمیریسم مختلط و کایمیریسم کامل مشاهده نشد.

### نتیجه‌گیری

پیش‌بینی نتیجه نهایی کایمیریسم می‌تواند به انتخاب مداخلات درمانی مناسب و پیشگیری از عود یا رد پیوند در بیماران کمک کند.

**کلمات کلیدی:** پیوند مغزاستخوان، آلوژن، کایمیریسم، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

تاریخ دریافت: ۱۱/۱۱/۸۳

تاریخ پایه‌ریش: ۲۲/۶/۸۴

- ۱ PhD ژنتیک- استادیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغزاستخوان بیمارستان دکتر شریعتی
- ۲ فوق تخصص خون- استادیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغزاستخوان بیمارستان دکتر شریعتی
- ۳ مؤلف مسؤول: پژوهش عمومی- مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغزاستخوان بیمارستان دکتر شریعتی- صندوق پستی ۱۴۱۱۴
- ۴ کارشناس ارشد هماتولوژی- مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغزاستخوان بیمارستان دکتر شریعتی
- ۵ فوق تخصص خون- مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغزاستخوان بیمارستان دکتر شریعتی
- ۶ فوق تخصص خون- استاد مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغزاستخوان بیمارستان دکتر شریعتی

۴۵۶

مطالعه ارزیابی اثرات کایمیریسم مختلط بر GVHD حاد، عودبیماری، بقا و بقای بدون عودپس از پیوند آلوژن مغزاستخوان در ایران بود.

### مواد و روش‌ها

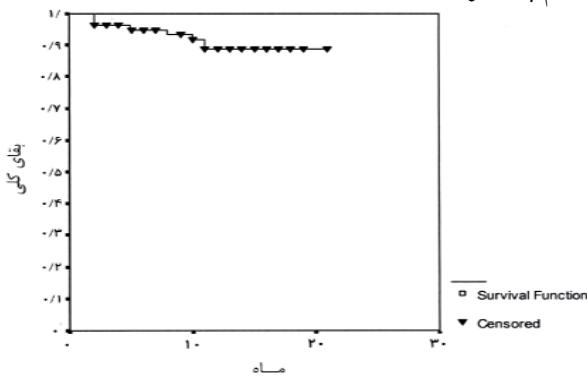
مطالعه انجام شده هم‌گروهی و آینده‌نگر بود. ارتباط کایمیریسم مختلط با GVHD حاد، عود بیماری، بقا و بقای بدون عود در ۹۱ بیمار دریافت کننده پیوند از مغزاستخوان (۱۲ نفر) یا از خون محیطی (۷۹ نفر) در مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغزاستخوان بیمارستان شریعتی تهران بررسی شد. هم‌چنین ارتباط کایمیریسم با سن، جنس، نوع رژیم پیشگیری GVHD، نوع رژیم آماده‌سازی، نوع سلول پیوندی و تعداد سلول تزریقی نیز بررسی شد. مشخصات بیماران در جدول ۱ آورده شده است. میانه زمان پیشگیری بیماران ۱۳ ماه بود.

جدول شماره ۱ : مشخصات بیماران دریافت کننده پیوند از مغزاستخوان یا خون محیطی

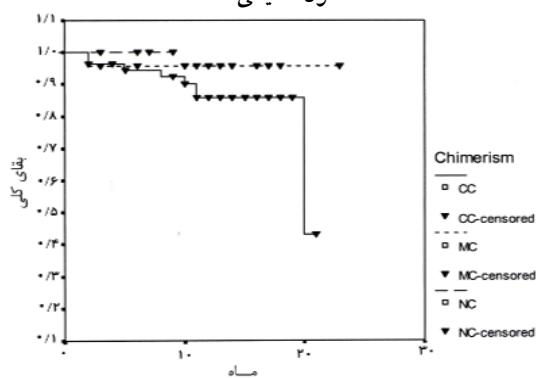
	تعداد	درصد
جنس		
مرد	۵۳	۵۸/۲
زن	۳۸	۴۱/۸
تشخیص اولیه		
ALL	۲۰	۲۱/۹
AML	۲۹	۳۱/۸
CML	۱۸	۱۹/۷
تلاسمی	۱۹	۲۰/۸
آنمی فانکوویی	۲	۲/۱
سایر موارد	۳	۳/۲
رژیم آماده‌سازی		
بوسولفان + سیکلوفسقاماید	۳۴	۳۷/۴
بوسولفان + فلودارابین	۵۱	۵۶
بوسولفان + فلودارابین + آنتی تیموسیت گلوبولین	۶	۶/۶
پیشگیری از GVHD		
سیکلوسپورین A	۵۲	۵۷/۱
سیکلوسپورین A + متوترکسات	۳۹	۴۲/۹

طی سه دهه گذشته، استفاده از پیوند مغزاستخوان به طور وسیعی برای درمان بیماران مبتلا به بیماری‌های بدخیم یا غیربدخیم خونی گسترش یافته است. یکی از اهداف اصلی پیشگیری پس از پیوند، پیش‌بینی عوارض منفی این درمان شامل عود بیماری، رد پیوند و بیماری پیوند علیه میزبان (GVHD)<sup>۱</sup> به منظور تعیین درمان‌های پیشگیرانه است. در این زمینه، ارزیابی کایمیریسم مختلط به عنوان یک روش مهم در پیشگیری نتایج، پس از پیوند پیشنهاد شده است (۱). اصطلاح کایمیریسم به حضور سلول‌های خون‌ساز با منشا غیرمیزبان اطلاق می‌شود. کایمیریسم کامل به معنی جایگزینی کامل خون‌سازی گیرنده توسط سلول‌های خون‌ساز دهنده و کایمیریسم مختلط به معنی حضور هم‌زمان سلول‌های خون‌ساز دهنده و گیرنده می‌باشد (۲). افزایش تعداد سلول‌های گیرنده پس از پیوند قویاً به نفع خطر عود بیماری است و به همین دلیل، تشخیص زودرس، جنبه مهمی از پیش‌آگهی است چون بیمارانی را که دچار عود می‌شوند می‌توان با تزریق لنفوسمیت دهنده (DLI)<sup>۲</sup> وارد رمیسیون دوم نمود. تحلیل کایمیریسم روش بسیار ارزشمندی برای ارزیابی رژیم‌های آماده‌سازی مختلف، GVHD، رژیم‌های پیشگیرانه و سلول درمانی برای افزایش موفقیت پیوند است (۳). مطالعات اولیه در زمینه پیوند سلول‌های خون‌ساز اهمیت کایمیریسم را نشان می‌دهد (۴). محققین در ابتدا از روش‌هایی مثل تعیین فوتیپ گلوبول‌های قرمز، تحلیل ایزوتایپ ایمونوگلوبولین‌ها و ژنتیک سلولی برای بررسی حضور کایمیریسم استفاده می‌کردند (۳، ۵-۷). این روش‌ها غیرحساس و محدود بود و نیاز به عدم هماهنگی جنس دهنده و گیرنده داشت. امروزه مفیدترین و حساس‌ترین روش مورد استفاده در ارزیابی کایمیریسم، روش‌های ژنتیک مولکولی مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مبتنی بر نشان‌گرهای مینی یا میکروستلایت چند شکل است که تعداد بسیار کم سلول‌های دهنده و گیرنده را نیز مشخص می‌کند (۸-۱۳). به دست آوردن این اطلاعات می‌تواند به انتخاب مداخلات مناسب درمانی در بیماران در معرض خطر عود یا رد پیوند کمک کند. هدف این

۵۸/۲٪ بود که به طور معنی‌داری در بیماران با کایمیریسم مختلط کمتر از بیماران با کایمیریسم کامل بود (p=۰/۰۱). ولی هیچ تفاوت معنی‌داری در شدت GVHD حاد (درجه ۱، ۲ در مقابل ۳، ۴) بین دو گروه مشاهده نشد، به این معنی که شدت GVHD حاد به درجه کایمیریسم ارتباطی نداشت. ۱۶ بیمار (۱۷/۶٪) چار عود شدند؛ تفاوت قابل ملاحظه‌ای در میزان عود بین بیماران دو گروه مشاهده نشد. بقای کلی بیماران ۸۸/۹٪ بود و مجدداً تفاوت آماری معنی‌داری در بقای کلی بیماران با کایمیریسم مختلط و بیماران با کایمیریسم کامل مشاهده نشد (به ترتیب ۹۵/۶٪ و ۸۵/۱٪)، (شکل ۱ و ۲). بقای بدون عود بیماران بدون هیچ تفاوتی میان دو گروه ۸۰/۲٪ بود. ارتباطی بین درجه کایمیریسم و سن دهنده و گیرنده، جنس دهنده و گیرنده، هماهنگی جنسی بین دهنده و گیرنده، رژیم آماده‌سازی، نوع سلول پیوندی، تعداد سلول تزریقی و نوع رژیم پیشگیری از GVHD مشاهده نشد.



شکل ۱: بقای کلی بیماران دریافت کننده پیوندaz مغزاستخوان یا خون محیطی



شکل ۲: بقای کلی در بیماران دریافت کننده پیوندaz مغزاستخوان یا خون محیطی با کایمیریسم کامل، کایمیریسم مختلط و فاقد کایمیریسم

1- Polymerase Chain Reaction-Short Tandem Repeats (STR-PCR)

**آماده‌سازی DNA:** آنالیز DNA روی نمونه‌های به دست آمده از لکوسیت‌های خون محیطی بیمار و دهنده صورت گرفت. سلول‌های تک‌هسته‌ای و گرانولوسيت‌های خون محیطی با روش فایکول جدا شد و DNA با روش salting out استخراج شد. غلظت DNA با اسپکتروفوتومتری در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

**تحلیل کایمیریسم:** روش مورد استفاده برای ارزیابی کایمیریسم، روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توالی‌های تکراری کوتاه<sup>۱</sup> با استفاده از ۱۲ شاخص STR با قدرت افراق بسیار بالا بین افراد بود. در این روش سه لوکوس اتوزوم چهار نوکلوتیدی با طول آللی غیرهم‌پوشان تکثیر شد. این لوکوس‌ها شامل ADA، ARA، D4S2366، D16S539، FES/FPS، F13A1، D13S317، D7S820، TH01، TPOX، CSF1PO، VWA تحت شرایط PCR یکسان تکثیر شده سپس روی ژل پلی‌اکریل آماید برده شدند. ارزیابی درجه کایمیریسم بر اساس درصد سلول‌های حاوی لوکوس‌های دهنده و گیرنده صورت گرفت (۱۰-۱۳).

کایمیریسم در مطالعه ما بدین گونه تعریف شد؛ کایمیریسم کامل هنگامی که بیش از ۹۵٪ سلول‌ها در بیمار مربوط به دهنده باشد و فقدان کایمیریسم هنگامی که کمتر از ۵٪ سلول‌های بیمار مربوط به دهنده باشد.

**تحلیل آماری:** تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS انجام شد. بقای کلی و بقای بدون بیماری با روش کاپلان-مایر تعیین شد. ارتباط میان کایمیریسم و فاکتورهایی مثل سن و جنس دهنده و گیرنده، نوع رژیم آماده‌سازی، نوع رژیم پیشگیری از GVHD، نوع پیوند و تعداد سلول تزریقی با استفاده از آزمون‌های آماری t و کاید دو بررسی شد.

## یافته‌ها

در روز ۳۰ پس از پیوند، میانگین کایمیریسم در بیماران ۹۰٪ با مedian ۱۰۰٪ بود. کایمیریسم مختلط در ۱۵ بیمار (۱۶/۵٪) و کایمیریسم کامل در ۷۲ بیمار (۷۹٪) مشاهده شد و ۴ بیمار (۴/۵٪) هیچ گونه کایمیریسمی نشان ندادند. در روز ۶۰ پس از پیوند، میانگین کایمیریسم در بیماران ۷۹٪ با مedian ۹۵٪ بود. میزان بروز GVHD حاد در بیماران

**ب-**

اهمیت تحلیل کایمیریسم بعد از پیوند آلوژن مغزاستخوان، در پیشگویی نتایج پیوند و به کارگیری مداخلات زودرس درمانی کمک کننده است. اندازه گیری کایمیریسم پس از طی مراحل تحقیقات آزمایشگاهی به ابزار بالینی مهمی تبدیل شده است (۱، ۲).

در این مطالعه ما برای تحلیل کایمیریسم از نمونه خون محیطی استفاده کردیم چون با توجه به مطالعات قبلی، سلول های خون محیطی برای این منظور بهتر از سلول های مغزاستخوان هستند و نمونه گیری از آن برای بیمار نیز راحت تر است (۱۴).

در سال ۲۰۰۱، برنامه ملی اهدائندگان مغزاستخوان<sup>۱</sup> و ثبت بین المللی پیوند مغزاستخوان<sup>۲</sup> به منظور بررسی تحلیل کایمیریسم پس از پیوند آلوژن کارگاهی برگزار کردند. هدف این کارگاه ارایه توصیه های کاربردی در مورد روش های آزمایشگاهی، نوع نمونه مورد استفاده و تناوب اندازه گیری بود (۱۴).

در این مطالعه از روش STR-PCR به عنوان دقیق ترین و حساس ترین روش تحلیل کایمیریسم استفاده شد. درصد کایمیریسم مختلط و کامل در بیماران ما مشابه تعدادی از مطالعات دیگر بود ولی گزارش هایی مبنی بر این که در بیماران با کایمیریسم مختلط، خطر عود بیماری افزایش می یابد وجود داشت (۱۵).

در این بررسی تفاوت معنی داری در میزان بقا و عود میان بیماران با کایمیریسم مختلط و بیماران با کایمیریسم کامل مشاهده نشد. وان لوون و همکارانش نیز در مطالعه ای مشابه، ارتباطی میان کایمیریسم مختلط و عود در کودکان نیافتند (۱۶).

از نظر منطقی انتظار داریم که میزان عود در بیماران با کایمیریسم مختلط بیش از بیماران با کایمیریسم کامل باشد چون میزان بروز GVHD حاد در بیماران با کایمیریسم کامل بیشتر است و از آنجایی که GVHD حاد میزان عود را کاهش می دهد، از نظر منطقی باید میزان عود در بیماران با کایمیریسم مختلط که GVHD حاد کمتری را تجربه کرده بودند بیشتر می بود (۱۷). به نظر می رسد علت این باشد که

**نتیجه گیری**

روش STR-PCR روی نمونه سلول های خون محیطی در حال حاضر دقیق ترین و حساس ترین روش تحلیل کایمیریسم است که با استفاده از آن می توان نتیجه پیوند را پیشگویی کرد و به موقع مداخله لازم را انجام داد. علاوه بر این به نظر می رسد افزایش تعداد دفعات اندازه گیری پس از پیوند بتواند عود را در مراحل زودتری تشخیص دهد.

## References :

- 1- Storb R, Yu C, Sandmaier B, et al. Mixed hematopoietic chimerism after hematopoietic stem cell. *Transplant Proc.* 1999; 31: 677-678.
- 2- Bertheas MF, Lafage M, Levy P, et al. Influence of mixed chimerism on the results of allogeneic bone marrow transplantation for leukemia. *Blood.* 1991; 78: 3103-3106.
- 3- Walker H, Singer CR, Patterson J, et al. The significance of host haemopoietic cells detected by cytogenetic analysis of bone marrow from recipients of bone marrow transplants. *Br J Haematol.* 1986; 62: 385-391.
- 4- Mathe G, Amiel JL, Schwartzberg L, et al. Successful allogenic bone marrow transplantation in man: chimerism, induced specific tolerance and possible anti-leukemic effects. *Blood.* 1965; 25: 179-195.
- 5- Lawler SD, Harris H, Millar J, et al. Cytogenetic follow-up studies of recipients of T-cell depleted allogeneic bone marrow. *Br J Haematol.* 1987; 65: 143-150.
- 6- Witherspoon RP, Schanfeld MS, Storb R, et al. Immunoglobulin production of donor origin after marrow transplantation for acute leukemia or aplastic anemia. *Transplantation.* 1978; 26: 407-408.
- 7- Dewald G, Stallard R, Al Saadi A, et al. A multicenter investigation with interphase fluorescence in situ hybridization using X- and Y- chromosome probes. *Am J Med Genet.* 1998; 76: 318-326.
- 8- Frankel W, Chan A, Corringham RE, et al. Detection of chimerism and early engraftment after allogeneic peripheral blood stem cell or bone marrow transplantation by short tandem repeats. *Am J Hematol.* 1996; 52(4): 281-7.
- 9- Elmaagacli AH, Beelen DW, Becks HW, et al. Molecular studies of chimerism and minimal residual disease after allogeneic peripheral blood progenitor cells of bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1996; 18: 397-403.
- 10- Alizadeh M, Bernard M, Danic B, et al. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood.* 2002; 99(12): 4618-4625.
- 11- Bader P, Beck J, Frey A, et al. Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with leukemias allow the prediction of relapse after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant.* 1998; 21: 487-495.
- 12- Thiede C, Florek M, Bornhauser M, et al. Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat marker and fluorescence detection. *Bone Marrow Transplant.* 1999; 23: 1055-1060.
- 13- Thiede C, Bornhauser M, Ehninger G. Evaluation of STR informativity for chimerism testing=comparative analysis of 27 STR systems in 203 matched related donor recipient pairs. *Leukemia.* 2004; 18(2): 248-54.
- 14- Antin JH, Childs R, Filipovich AH, et al. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: Recommendations from a workshop at the 2001 tandem meetings. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2001; 7: 473-485.
- 15- Park SJ, Min WS, Yang IH, et al. Effects of mixed chimerism and immune modulation on GVHD, disease recurrence and survival after HLA-identical marrow transplantation for hematologic malignancies. *Korean J Intern Med.* 2000; 15(3): 224-31.
- 16- Van Leeuwen JE, Van Tol MJ, Joosten AM, et al. Mixed T-lymphoid chimerism after allogeneic bone marrow transplantation for hematologic malignancies of children is not correlated with relapse. *Blood.* 1993; 82(6): 1921-1928.
- 17- Bertheas MF, Lafage M, Levy P, et al. Influence of mixed chimerism on the results of allogeneic bone marrow transplantation for leukemia. *Blood.* 1991; 78: 3103-3106.

## Effects of chimerism on graft-versus-host disease, disease recurrence and survival after HLA-identical marrow transplantation in Iran

**Ghaffari H.<sup>1</sup> (PhD), Alimoghaddam K.<sup>1</sup> (MD), Foroughi F.<sup>1</sup> (MD), Chahardouli B.<sup>1</sup> (MS), Sanaat Z.<sup>1</sup> (MD), Bahar B.<sup>1</sup> (MD), Mousavi A.<sup>1</sup> (MD), Iravani M.<sup>1</sup> (MD), Ghavamzadeh A.<sup>1</sup> (MD)**

<sup>1</sup>Hematology, Oncology and BMT Research Center, Dr. Shariati Hospital

### Abstract

#### Background and Objectives

The co-existence of recipient's and donor's hematopoietic systems after allogeneic marrow transplantation is called mixed chimerism. Chimerism analysis provides a national method of assessing the ability of different conditioning regimens, graft-versus-host disease (GVHD), prophylactic regimens, and cellular therapy to promote engraftment.

#### Materials and Methods

The association of mixed chimerism with acute graft-versus-host disease (GVHD), disease recurrence, survival, and relapse free survival was investigated in 91 patients 12 and 79 of whom underwent either bone or peripheral blood HLA-identical marrow transplantation respectively. Chimerism was assessed using multiplex amplification of short tandem repeats (STR-PCR). Cases included thalassemics (19 subjects), AML (29), ALL (20), CML (18) and others (5). Median age was 21 (age range of 3-50). There were 38 females (41.8%) and 53 males (58.2%). Conditioning was busulfan plus cyclophosphamide in 34 patients, busulfan plus fludarabin in 51 patients and busulfan plus fludarabin plus anti-thymocyte globulin in 6 patients. Median time of follow up was 13 months. Data was analyzed using SPSS statistical software.

#### Results

On day 30 after transplantation, mixed chimerism (MC) was observed in 15 patients (16.5%), complete donor chimerism (CC) in 72 patients (79%), and no chimerism in 4 patients. The incidence of acute GVHD was significantly lower in mixed chimeras than in complete chimeras ( $p=0.01$ ) but there was no significant difference in acute GVHD grade (I, II vs. III, IV) between two groups. The incidence of relapse and overall survival were 17.6% and 88.9% respectively showing no significant difference between MC and CC. Relapse free survival was 80.2% and not significantly different between two groups.

#### Conclusions

Despite some previous reports, we found no significant difference in survival and relapse rate between MC and CC.

**Key words:** Allogenic, Bone Marrow Transplantation, Chimerism, PCR  
*SJIBTO 2005; 2(5):139-144*

Received: 12 Feb 2005

Accepted: 13 Sep 2005

**Correspondence:** Foroughi F., MD, Hematology, Oncology and BMT Research Center  
P.O.Box: 14114, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88029390; Fax : (+9821) 88004140  
E-mail: foroughf@yahoo.com