

© 2023 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 30.03.2023
Принята к печати 20.04.2023

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-2-44-53

Прогностическое значение потери гетерозиготности HLA после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток при развитии рецидива острого лейкоза у детей

Л.А. Цветкова, А.В. Евдокимов, И.М. Бархатов, О.В. Паина, О.С. Еписфановская, Е.В. Бабенко, Н.Е. Иванова, Ж.З. Рахманова, П.В. Кожокар, А.С. Фролова, А.А. Осипова, С.В. Рябенко, Д.В. Козлов, Т.Л. Гиндина, Е.В. Семенова, А.Д. Кулагин, Л.С. Зубаровская

Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Контактная информация:

Цветкова Любовь Александровна,
врач-гематолог отделения трансплантации
костного мозга для детей №1
НИИ детской онкологии, гематологии и
трансплантологии им. Р.М. Горбачевой
ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова
Минздрава России
Адрес: 197022, Санкт-Петербург,
ул. Льва Толстого, 6/8
E-mail: tsvetluibov@mail.ru

Потеря пациент-специфичного HLA-гаплотипа на поверхности бластной популяции является одним из способов «ускользания» опухоли из-под иммунного надзора донорских клеток. Данный феномен наблюдается примерно в 30% случаев рецидивов онкогематологических заболеваний после частично несовместимой аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). В данном исследовании впервые проанализирована большая когорта педиатрических пациентов ($n = 80$) с рецидивами острого миелоидного (ОМЛ) и острого лимфобластного (ОЛЛ) лейкозов после аллогенной ТГСК с помощью метода STR (анализ высокополиморфных микросателлитных маркеров) по 6 маркерам HLA-гаплотипа. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России. Потеря гетерозиготности в рецидиве наблюдалась у 18/80 (22%) пациентов с различными вариантами острых лейкозов: у 8/44 (18%) пациентов с В-клеточным ОЛЛ, у 4/10 (40%) – с Т-клеточным ОЛЛ, у 6/25 (24%) – с ОМЛ. Все случаи рецидивов с потерей HLA-гаплотипа были обнаружены у пациентов после гаплоидентичной ТГСК и развивались позднее, чем рецидивы без потери HLA-гаплотипа (медиана 8,8 мес против 6,2 мес, $p = 0,043$). Среди пациентов, получивших гаплоидентичную ТГСК ($n = 61$), был проведен анализ факторов, влияющих на риск потери HLA-гаплотипа в рецидиве заболевания. Факторами, ассоциированными с повышенным риском генетической потери HLA-гаплотипа, стали: в группе пациентов с ОМЛ ($n = 17$) – количество линий предшествующей терапии, в группе пациентов с ОЛЛ ($n = 44$) – наличие острой и хронической реакции «трансплантат против хозяина», $p = 0,008$ и $p = 0,015$ соответственно. Рецидив после повторной аллогенной ТГСК у 4/5 (80%) пациентов был ассоциирован с потерей HLA-гаплотипа, $p = 0,008$. Прогноз пациентов с потерей HLA-гаплотипа был крайне неблагоприятным. Общая выживаемость от момента рецидива при медиане наблюдения 6 мес составила 22% в группе с потерей HLA-гаплотипа и 37% в группе без потери HLA-гаплотипа. Медиана общей выживаемости – 4,5 мес (95% доверительный интервал 3–NA) и 10,3 мес (95% доверительный интервал 5,7–16,1) соответственно, $p = 0,063$. Наилучшую выживаемость среди пациентов с потерей гаплотипа имели дети, прошедшие повторную аллогенную ТГСК со сменой донора. Таким образом, потеря HLA-гаплотипа в педиатрической когорте пациентов с острыми лейкозами имеет большое значение для определения прогноза и дальнейшей терапевтической стратегии при рецидиве заболевания, что требует введения данного тестирования в стандартное обследование пациентов после частично несовместимой аллогенной ТГСК.

Ключевые слова: гаплоидентичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, дети, острый лейкоз, рецидив, потеря HLA

Цветкова Л.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (2): 44–53. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-2-44-53

The prognostic value of HLA loss of heterozygosity after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with relapsed acute leukemia

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPhO»

Received 30.03.2023

Accepted 20.04.2023

L.A. Tsvetkova, A.V. Evdokimov, I.M. Barkhatov, O.V. Paina, O.S. Epifanovskaya, E.V. Babenko, N.E. Ivanova, Zh.Z. Rakhmanova, P.V. Kozhokar, A.S. Frolova, A.A. Osipova, S.V. Ryabenko, D.V. Kozlov, T.L. Gindina, E.V. Semenova, A.D. Kulagin, L.S. Zubarovskaya

The R.M. Gorbacheva Research Institute for Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation of the I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saint Petersburg

The loss of a patient-specific HLA haplotype on the surface of the blast cell population is one of the ways a tumor can evade the immune surveillance of donor cells. This phenomenon is observed in approximately 30% of relapses in patients with hematologic malignancies who underwent partially mismatched allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). In this study, for the first time, a large cohort of pediatric patients ($n = 80$) with relapsed acute myeloid (AML) or acute lymphoblastic (ALL) leukemia after allogeneic HSCT was analyzed with the help of the STR method (highly-polymorphic microsatellite marker analysis) using 6 HLA haplotype markers. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation. Loss of heterozygosity (LOH) was observed in 18/80 (22%) relapsed patients with various types of acute leukemia: out of these, 8/44 (18%) patients had B-cell ALL, 4/10 (40%) patients – T-cell ALL and 6/25 (24%) patients – AML. All relapses with LOH were observed in patients who had undergone haploidentical HSCT, and were found to occur later than relapses without loss of the HLA haplotype (median time to relapse: 8.8 months vs 6.2 months, $p = 0.043$). In the patients treated with haploidentical HSCT ($n = 61$), we assessed factors increasing the risk of LOH at relapse. The number of previous therapy lines in the patients with AML ($n = 17$) and acute or chronic graft-versus-host disease in the patients with ALL ($n = 44$) were associated with an increased risk of genetic loss of the HLA haplotype ($p = 0.008$ and $p = 0.015$ respectively). A relapse following the second allogeneic HSCT was associated with LOH in 4/5 (80%) patients, $p = 0.008$. The prognosis of the patients with LOH was extremely poor. At a median follow-up of 6 months, the overall survival from relapse was 22% in the LOH group and 37% in the non-LOH group. The median overall survival was 4.5 months (95% confidence interval 3–NA) and 10.3 months (95% confidence interval 5.7–16.1) respectively, $p = 0.063$. Among the patients with LOH, the best survival rates were observed in those who had undergone a repeat allogeneic HSCT from a different donor. Thus, the analysis of LOH is an important tool for determining the prognosis and further treatment in pediatric patients with acute leukemias. We strongly recommend that this diagnostic test should be included into standard testing of patients after partially-mismatched allogeneic HSCT.

Key words: haploidentical hematopoietic stem cell transplantation, children, acute leukemia, relapse, HLA loss

Tsvetkova L.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (2): 44–53.
DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-2-44-53

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) является важнейшей терапевтической опцией для детей с острыми лейкозами, результат которой во многом зависит от иммуноадаптивного эффекта клеток донора и связанной с ним реакции «трансплантат против лейкоза». Рецидивы, возникающие после алло-ТГСК, обусловлены механизмами «ускользания» опухоли от иммунного контроля, один из которых представлен утратой гетерозиготности генов HLA I и II классов клетками лейкоэмической популяции [1]. HLA-гаплотип – совокупность генов HLA, расположенных в регионе короткого плеча 6-й хромосомы (6p21). Потеря участка 6-й хромосомы в области, кодирующей HLA, приводит к полной или частичной утрате отцовского или материнского гаплотипа, в результате чего нарушается презентация опухолевых антигенов. Наиболее подробно данный механизм изучен при солидных опухолях [2].

При острых лейкозах данный феномен впервые был описан L. Vago и соавт. (2009) у взрослых пациентов с миелоидными неоплазиями после алло-ТГСК от гаплоидентичного донора (гапло-ТГСК) [3]. В дальнейшем участие данного механизма было показано при алло-ТГСК от неродственного частично совместимого донора [4] и полностью совместимого донора [5, 6].

Генетическая потеря пациент-специфичного HLA-гаплотипа клетками бластной популяции характерна как для миелоидных, так и для лимфо-

идных неоплазий и обнаруживается примерно в 30% случаев рецидивов после алло-ТГСК от не полностью совместимого донора [7–9].

Опубликованные исследования, касающиеся изучения роли изменения HLA-гаплотипа в развитии рецидива при ОМЛ и ОЛЛ включают в основном пациентов взрослого возраста или смешанные группы. У детей феномен потери гетерозиготности HLA-гаплотипа широко не изучен. Отдельно описаны 2 случая потери HLA-гаплотипа у детей с В-клеточным ОЛЛ (В-ОЛЛ) после гапло-ТГСК с применением TCR $\alpha\beta$ /CD19-деплеции [10]: потеря HLA II класса у 12-летнего пациента с В-ОЛЛ после повторной гапло-ТГСК и потеря HLA II класса у ребенка с младенческим В-ОЛЛ после гапло-ТГСК [7].

Важность изучения потери HLA-гаплотипа обусловлена необходимостью выбора оптимальной стратегии ведения рецидива после алло-ТГСК. В случае утраты HLA-гаплотипа иммуноадаптивная терапия с включением инфузии донорских лимфоцитов (ИДЛ), а также повторная алло-ТГСК от того же донора, вероятно, не будут эффективны.

Для определения потери HLA-гаплотипа используются методы, оценивающие донорский химеризм реципиента в целом, и методы HLA-типирования. Из них раньше всего появились методы визуальной детекции: SSP (Sequence-Specific Primer) и SSO (Sequence-Specific Oligonucleotide). Первый основан на амплификации конкретных аллелей HLA с помощью сиквенс-специфичных праймеров и

Correspondence:

Lyubov A. Tsvetkova, a hematologist at the Pediatric Bone Marrow Transplantation Department №1 at the R.M. Gorbacheva Research Institute for Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation of the I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: Leo Tolstoy St. 6/8, St. Petersburg 197022, Russia
E-mail: tsvetluibov@mail.ru

оценкой результатов полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью гель-электрофореза низкого разрешения. Второй включает амплификацию интересующих локусов HLA в мультиплексной ПЦР с последующей гибридизацией флуоресцентномеченых олигонуклеотидов специфичной последовательности к амплифицированным фрагментам HLA. Однако в последнее время данные методики теряют популярность по причине низкой чувствительности и заменяются цифровыми методами – HLA-типирование генов I и II классов методом секвенирования по Сэнгеру, секвенирование нового поколения (next generation sequencing, NGS) [11].

Для выявления потери HLA-гаплотипа также используется комбинация метода SNP-array (SNP – single nucleotide polymorphism) и анализа CNV (copy number variation). С помощью одновременного исследования большого числа однонуклеотидных замен по всему геному данный способ позволяет выявлять потерю генов HLA и протяженность делетированного региона. Однако из-за трудоемкости выполнения и дороговизны данный метод не получил широкого распространения в клинических лабораториях [11].

На сегодняшний день широкое распространение получил метод определения потери HLA-гаплотипа с помощью исследования коротких tandemных повторов STR (short tandem repeat) на хромосоме 6p и донорского химеризма в целом. Метод основан на амплификации участков генома, несущих повторяющуюся последовательность из 1–6 нуклеотидов. Аллели STR различаются длиной повторяющегося фрагмента. Микросателлиты обнаружены по всему геному, включая хромосому 6p. Данный метод считается «золотым стандартом» для определения уровня донорского химеризма. Анализ потери HLA-гаплотипа осуществляется с помощью капиллярного гель-электрофореза [12]. Данная методика используется для определения потери HLA-гаплотипа при солидных опухолях [13].

Определение потери гаплотипа HLA и уровня донорского химеризма также возможно при помощи метода количественной ПЦР. Существуют коммерческие наборы, включающие маркеры на хромосоме 6p в локусах HLA-A, HLA-C и DPB1 (KMRtype и KMRtrack, GenDx, Нидерланды). В их основе лежит реакция аллель-дискриминационной ПЦР в режиме реального времени. За счет использования флуоресцентномеченных зондов, которые комплементарны специфичным вариантам SNP или InDel (insertion/deletion), достигаются высокие показатели чувствительности и специфичности, что позволяет выявлять микрохимеризм и ранний рецидив [14].

Следующим шагом в развитии методов определения потери HLA-локусов стало применение NGS. Основным преимуществом данного метода считается универсальность. NGS позволяет выявлять широкий

спектр генетических нарушений, в том числе уровень донорского химеризма и HLA-статус [8].

Для выполнения текущего исследования был разработан диагностический тест, который исследует 6 различных STR-маркеров, расположенных на различных участках короткого плеча 6-й хромосомы (D6S265, D6S473, D6S277, D6S105, D6S273, D6S291).

В работе впервые продемонстрирован анализ потери гетерозиготности HLA-гаплотипа методом STR у детей с рецидивами ОМЛ и ОЛЛ после алло-ТГСК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ретроспективный анализ включены 80 пациентов (42 мальчика и 38 девочек) с морфологически подтвержденным костномозговым рецидивом заболевания после проведенной алло-ТГСК в клинике НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой. Пациенты имели следующие диагнозы: В-ОЛЛ ($n = 44$), Т-клеточный ОЛЛ (Т-ОЛЛ) ($n = 10$), острый лейкоз со смешанным фенотипом – Т/миело ($n = 1$), ОМЛ ($n = 25$). Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБОУ ВО СПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России.

Медиана возраста на момент проведения алло-ТГСК составила 8 лет (диапазон 3 месяца – 20 лет). Пять (6%) пациентов были включены в исследование после повторной алло-ТГСК. Миелоаблативный режим кондиционирования (МАК) на основе бусульфана проведен 47 (59%) пациентам: бусульфан 10–16 мг/кг + флударабин 150 мг/м² – 34 больным, бусульфан 16 мг/кг + циклофосфамид 100 мг/кг – 2 детям, бусульфан 12 мг/кг + циклофосфамид 100 мг/кг + цитарабин 8000 мг/м² + ломустин 120 мг/м² – 11 пациентам. МАК со сниженной токсичностью на основе треоосульфана проведен 10 (12,5%) пациентам: треоосульфан 42 г/м² + флударабин 150 мг/м² + тиотепа 10 мг/кг – 5 детям, треоосульфан 42 г/м² + циклофосфамид 80 мг/кг – 2 больным, треоосульфан 36 г/м² + флударабин 150 мг/м² – 3 пациентам. Режим кондиционирования со сниженной интенсивностью доз проведен 24 (30%) пациентам: флударабин 150 мг/м² + мелфалан 140 мг/м² – 21 больному, бусульфан 8 мг/кг + флударабин 150 мг/м² – 2 пациентам. Профилактику острой реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) на основе циклофосфамида на дни +3, +4 в дозе 50 мг/кг использовали у 71 (89%) пациента, на основе моноклональных антител с применением технологии TCR $\alpha\beta$ /CD19⁺-деплеции – у 3 (4%), серопротекцию – у 2 (2,5%). Гаплоидентичный родственный донор был у 61 (76%) больного, родственный совместимый донор – у 6 (7,5%), неродственный совместимый донор – у 11 (14%), неродственный частично совместимый донор 9/10 –

у 2 (2%) (mismatch в локусе В у 1 пациента, в локусе DRB1 у 1 больного). Медиана уровня донорского химеризма на момент включения пациентов в исследование составила 20–30% (0–90%). Развитие изолированного костномозгового рецидива заболевания отмечено у 67 (84%) пациентов, комбинированного рецидива с вовлечением костного мозга + экстрамедуллярное поражение (нейролейкоз – 4, мягкие ткани – 5, тестикулы – 1, сочетанное поражение – 3) – у 13 (16%) больных. Медиана количества бластов в костном мозге на момент рецидива – 37% (6–93%).

Для включенных в исследование пациентов в ДНК-банке лаборатории трансплантологии и молекулярной гематологии НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой были отобраны образцы ДНК, выделенные из ядро-содержащих клеток костного мозга в рецидиве заболевания. У 6 пациентов в качестве материала была использована ДНК, выделенная из сортированной бластной популяции. Также были отобраны образцы ДНК, выделенные из периферической крови реципиентов перед алло-ТГСК, и образцы ДНК доноров. Для определения потери HLA-локусов использовали сравнение высокополиморфных микросателлитных маркеров (STR), локализованных на 6-й хромосоме, в пробах пациента до трансплантации и в рецидиве.

Методика включала в себя следующие этапы:

1. Выделение геномной ДНК из клеточного материала пациента с помощью набора «К-сорб» (НПК «Синтол», Россия).

2. Амплификация анализируемых участков STR геномной ДНК с использованием 6 STR-маркеров: D6S265, D6S473, D6S277, D6S105, D6S273, D6S291 (рисунок 1).

3. Определение длины исследуемых фрагментов методом капиллярного электрофореза на приборе ABI PRISM 3130 (Thermo Fisher Scientific, США).

4. Анализ потери HLA-локусов при помощи сравнения электрофореграмм амплифицированных STR-фрагментов. Положительный ответ теста «Потеря HLA-локусов» определялся как отсутствие аллеля хотя бы одного из маркеров STR. В случае амплификации всех специфических фрагментов тест «Потеря HLA-локусов» считался отрицательным.

Основными задачами исследования стали: анализ факторов риска, ассоциированных с потерей HLA-гаплотипа в рецидиве заболевания, сравнительный анализ общей (ОВ) и безрецидивной (БРВ) выживаемости пациентов с потерей гетерозиготности генов HLA и без нее. Время ОВ рассчитывали от момента рецидива до смерти, повторной алло-ТГСК или последнего контакта. Оценку БРВ проводили от момента рецидива до прогрессии, следующего рецидива или последнего контакта.

Статистическая обработка данных осуществлялась в программах SPSS Statistics v.26 и R v.4.2. Однофакторный анализ проводился с помощью точного критерия Фишера, критерия χ^2 и U-критерия Манна–Уитни. Сравнительный анализ ОВ и БРВ – с помощью метода Каплана–Майера и long-rank-теста.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Потеря гетерозиготности по генам HLA была обнаружена у 18/80 (22%) пациентов: 8/44 (18%) – с В-ОЛЛ, 4/10 (40%) – с Т-ОЛЛ, 6/25 (24%) – с ОМЛ. У 13/18 (72%) пациентов обнаружена потеря гетерозиготности по генам HLA I класса, у 5/18 (28%) – по генам HLA I и II классов. После первой алло-ТГСК потеря гетерозиготности генов HLA была обнаружена у 14/75 (18%) пациентов.

После повторной алло-ТГСК частота потери HLA-гаплотипа была выше и наблюдалась у 4/5 (80%) больных, $p = 0,008$. Пациентам с детектированной потерей гетерозиготности после повторной алло-ТГСК также был проведен ретроспективный анализ потери HLA-гаплотипа после первой алло-ТГСК. Примечательно, что на момент выполнения повторной алло-ТГСК у данных пациентов не отмечали генетической потери гетерозиготности генов HLA.

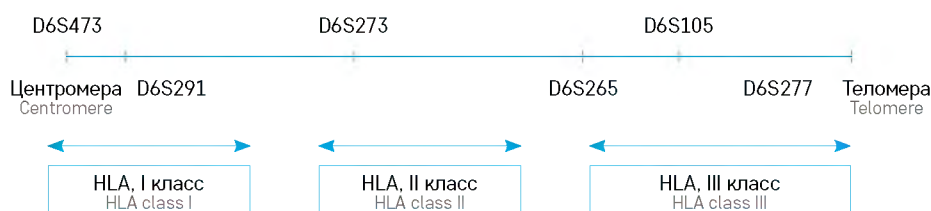
Все случаи потери гетерозиготности генов HLA были обнаружены после гапло-ТГСК. В связи с этим дальнейший сравнительный анализ факторов риска и выживаемости был проведен для пациентов после гапло-ТГСК ($n = 61$). Рецидивы с потерей HLA-гаплотипа возникали позже по времени по сравнению

Рисунок 1

Амплификация анализируемых участков STR геномной ДНК с использованием 6 STR-маркеров: D6S265, D6S473, D6S277, D6S105, D6S273, D6S291

Figure 1

Amplification of the analyzed STR regions of genomic DNA using 6 STR markers: D6S265, D6S473, D6S277, D6S105, D6S273, D6S291



с «классическим» типом рецидива (без потери гетерозиготности генов HLA). Медиана времени развития рецидива с потерей HLA-гаплотипа составила 8,8 (2–63) мес после гапло-ТГСК, без потери HLA-гаплотипа – 6,2 (1–30) мес, $p = 0,043$ (рисунок 2). Тем не менее было зафиксировано 3 случая развития раннего рецидива с потерей HLA-гаплотипа (в течение 6 мес после алло-ТГСК).

Анализ факторов риска рецидива с потерей гетерозиготности генов HLA у детей после гаплоидентичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

Следующей задачей было оценить взаимосвязь клинических факторов с риском развития рецидива с потерей генов HLA. Для этого мы разделили пациентов на 2 группы: рецидив с потерей гетерозиготности по генам HLA и без нее (классический тип рецидива). Отдельно был проведен анализ в группе пациентов с ОЛЛ и ОМЛ. Оценке подлежали следующие клинические характеристики: пол пациента, пол донора, ABO-несовместимость, статус заболевания на момент выполнения алло-ТГСК, число линий предшествующей терапии, режим кондиционирования, клеточность трансплантата по CD34⁺/кг, CD3⁺/кг, степень несовместимости по числу локусов HLA-генов, возникновение РТПХ до или в момент развития рецидива, персистенция минимальной остаточной болезни (МОБ) после алло-ТГСК.

Для группы пациентов с диагнозом ОЛЛ была выявлена взаимосвязь клинически значимых форм РТПХ (острая + хроническая) и отдельно хронической РТПХ с риском развития потери гетерозиготности генов HLA, $p = 0,015$ и $p = 0,05$ соответственно.

Для пациентов с ОМЛ фактором, ассоциированным с потерей гетерозиготности генов HLA в

рецидиве, стало большее число линий предшествующей терапии, включая предшествующую алло-ТГСК. Медиана линий терапии составила 6 при рецидиве с потерей HLA-гаплотипа против 3 при классическом рецидиве ($p = 0,008$) (таблица).

Прогностическое значение потери гетерозиготности генов HLA у детей в рецидиве после гаплоидентичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

Проведен сравнительный анализ ОВ и последующей БРВ 61 пациента с первым рецидивом после гапло-ТГСК, из них 18 (29%) имели зафиксированную потерю гетерозиготности генов HLA, 43 (71%) не имели потери гетерозиготности генов HLA. При медиане наблюдения 6 (0,1–68) мес БРВ с момента первого рецидива до прогрессии/следующего рецидива заболевания значимо не различалась между группами и составила 16% в группе с потерей HLA-гаплотипа и 23% в группе без потери HLA-гаплотипа. Медиана БРВ составила 1,7 мес (95% доверительный интервал (ДИ) 1–NA) в группе с потерей HLA-гаплотипа и 2,5 мес в группе без потери HLA-гаплотипа (95% ДИ 1,6–9,3), $p = 0,25$ (рисунок 3).

В качестве терапии первого рецидива с потерей HLA-гаплотипа после гапло-ТГСК химиотерапия была проведена 6/18 (33%) пациентам, химиотерапия в сочетании с моноклональными антителами (блинатумомаб – 3, инотузумаб озогамидин – 1, гемтузумаб озогамидин – 2, даратумомаб – 2) – 8/18 (44%). ИДП выполнена 6/18 (33%) пациентам, повторная алло-ТГСК – 5/18 (27%).

В качестве терапии рецидива у пациентов без потери HLA-гаплотипа химиотерапия была проведена 7/43 (16%) пациентам, в сочетании с моноклональными антителами/таргетными препаратами/гипометилирующими агентами – 11/43 (26%), терапия моноклональными антителами/гипометилирующими препаратами без химиотерапии – 11/43 (26%). ИДП выполнена 21/43 (49%) пациенту, повторная алло-ТГСК – 5/43 (12%).

ОВ при медиане наблюдения 6 мес составила 22% в группе с потерей HLA-гаплотипа и 37% в группе без потери HLA-гаплотипа. Медиана ОВ – 4,5 мес (95% ДИ 3–NA) и 10,3 мес (95% ДИ 5,7–16,1) соответственно, $p = 0,063$ (рисунок 4).

Наилучшие показатели ОВ имели пациенты, прошедшие повторную алло-ТГСК как в группе с потерей HLA-гаплотипа, так и в группе без нее.

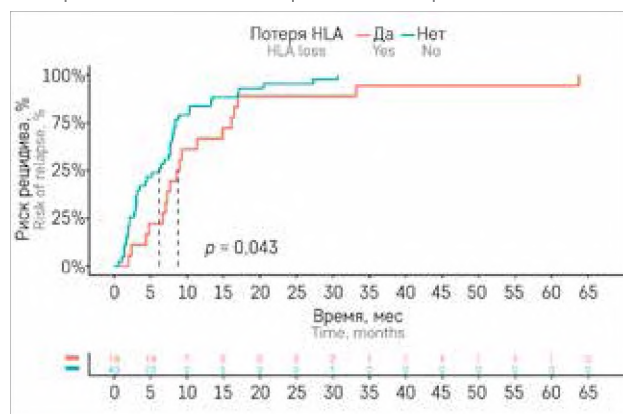
Повторная алло-ТГСК была выполнена 5/18 (27%) пациентам с потерей гетерозиготности генов HLA: 4 больным со сменой гаплоидентичного донора и 1 пациенту без смены донора. У пациента, прошедшего повторную гапло-ТГСК без смены донора, не удалось достичь стойкой ремиссии забо-

Рисунок 2

Кумулятивный риск развития рецидива с потерей гетерозиготности генов HLA и без нее у пациентов после гапло-ТГСК

Figure 2

Cumulative risk of relapse with/without loss of heterozygosity of HLA genes in the patients after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation (haplo-HSCT)



Таблица

Анализ факторов риска, ассоциированных с потерей гетерозиготности HLA-гаплотипа в рецидиве после гапло-ТГСК

Table

The analysis of risk factors associated with loss of heterozygosity (LOH) of the HLA haplotype in the relapsed patients after haplo-HSCT

Характеристика Characteristics	ОЛЛ (n = 44) ALL (n = 44)		p	ОМЛ (n = 17) AML (n = 17)		p
	Потеря гетерозиготности HLA (n = 12; 27%) Loss of HLA heterozygosity (n = 12; 27%)	Классический тип рецидива (n = 32; 73%) Classic relapse (n = 32; 73%)		Потеря гетерозиготности HLA (n = 6; 35%) Loss of HLA heterozygosity (n = 6; 35%)	Классический тип рецидива (n = 11; 65%) Classic relapse (n = 11; 65%)	
Пол пациента, n (%): Patient gender, n (%): женский female мужской male	5 (42) 7 (58)	16 (50) 16 (50)	0,7	3 (50) 3 (50)	7 (54) 6 (46)	0,8
Возраст пациента на момент гапло-ТГСК, медиана (диапазон), годы The median age at the time of haplo-HSCT (range), years	5 (0,5–16)	7,7 (0,5–16)	0,5	13 (5–20)	4 (0–16)	0,1
Диагноз, n (%): Diagnosis, n (%): В-ОЛЛ B-ALL Т-ОЛЛ T-ALL	8 (67) 4 (33)	26 (81) 6 (19)	0,4			
Количество линий терапии до гапло-ТГСК, медиана (диапазон) The median number of therapy lines before haplo-HSCT (range)	5 (2–9)	5 (2–12)	0,9	6 (5–8)	3 (2–12)	0,008
Статус заболевания перед гапло-ТГСК, n (%): Disease status before haplo-HSCT, n (%): 1–2-я ремиссия, МОБ ⁺ 1st/2nd remission, MRD ⁺ вне ремиссии/МОБ ⁺ not in remission, MRD ⁺	6 (50) 6 (50)	13 (41) 19 (59)	0,7	0 6 (100)	3 (27) 8 (73)	0,2
Режим кондиционирования, n (%): Conditioning regimen, n (%): МАК myeloablative немиелоаблативный non-myeloablative	9 (75) 3 (25)	19 (59) 13 (41)	0,4	2 (33) 4 (67)	9 (82) 2 (18)	0,05
Посттрансплантационный циклофосфамид в профилактике РТПХ, n (%) GVHD prophylaxis with post-transplant cyclophosphamide, n (%)	11 (92)	30 (94)	1	6 (100)	10 (90)	1
Пол донора, n (%): Donor gender, n (%): женский female мужской male	1 (8) 11 (92)	6 (19) 26 (81)	0,6	1 (17) 5 (83)	3 (27) 8 (73)	1
Пара донор/реципиент, n (%): Donor/recipient gender pairing, n (%): мужчина/мужчина male/male мужчина/женщина male/female женщина/женщина female/female женщина/мужчина female/male	5 (42) 5 (42) 0 2 (16)	15 (47) 10 (31) 6 (19) 1 (3)	0,7	3 (50) 2 (33) 1 (17) 0 (0)	2 (18) 6 (55) 0 (0) 3 (27)	0,2
ABO-несовместимость ABO blood group mismatch	5 (42)	18 (55)	0,5	4 (67)	4 (36)	0,2
HLA mismatch локусы, n (%): HLA locus mismatch, n (%): 5/10 < 5/10	5 (45) 6 (54)	17 (56) 13 (43)	0,5	3 (75) 1 (25)	7 (63) 4 (36)	0,6
CD34 ⁺ /кг, медиана (диапазон), n (%) Median CD34 ⁺ /kg (range), n (%)	5,8 (2,8–11)	5 (2,1–15,8)	0,5	7,6 (3,4–10,8)	7,3 (2,9–10,5)	0,6
CD3 ⁺ /кг медиана (диапазон), n (%) Median CD3 ⁺ /kg (range), n (%)	6 (5,2–21)	6,3 (0,18–14,8)	0,4	8 (4,5–43)	6,7 (4,5–9,1)	0,2
ИДЛ до рецидива, n (%) DLI before a relapse, n (%)	4 (33)	10 (31)	1	4 (67)	2 (18)	0,1
РТПХ до рецидива, n (%): GVHD before a relapse, n (%): острая РТПХ II–IV степени grade II–IV acute GVHD хроническая РТПХ средней степени moderate chronic GVHD	6 (50) 5 (42) 3 (25)	4 (13) 6 (19) 1 (3)	0,015 0,2 0,05	2 (33) 1 (17) 1 (17)	3 (27) 2 (18) 1 (9)	1
Персистенция МОБ после алло-ТГСК, n (%) MRD persistence after allo-HSCT, n (%)	2 (16)	6 (19)	1	4 (67)	3 (27)	0,1

Notes. ALL – acute lymphoblastic leukemia; AML – acute myeloid leukemia;

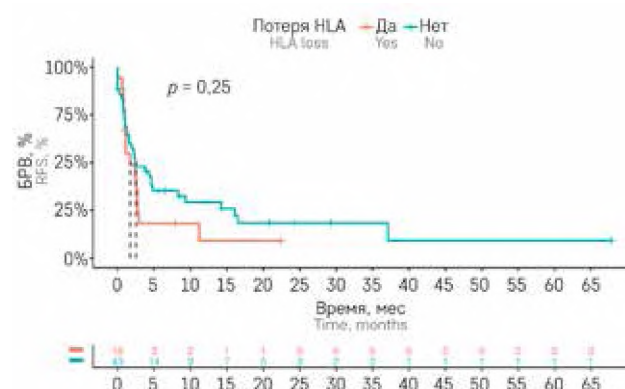
B-ALL – B-cell ALL; T-ALL – T-cell ALL; GVHD – graft-versus-host disease; DLI – donor lymphocyte infusion; MRD – minimal residual disease; allo-HSCT – allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

левания, что привело к летальному исходу. Два пациента после повторной гапло-ТГСК от альтернативного донора умерли от трансплантат-ассоциированных осложнений, 2 остаются живы с сохранением ремиссии заболевания в течение 1,5 года и 7 лет после повторной гапло-ТГСК.

Среди пациентов без потери HLA-гаплотипа повторная алло-ТГСК со сменой донора была выполнена 5/43 (12%) пациентам, все они остаются живы и находятся в ремиссии заболевания на момент последнего контакта. Оставшимся 38 пациентам повторная алло-ТГСК не выполнялась в связи с прогрессирующим течением заболевания и/или тяжелым соматическим статусом. Из них 11/38 (29%) остаются живы на момент последнего контакта с медианой ОВ 6 (1–67) мес.

Рисунок 3
БРВ с момента рецидива после гапло-ТГСК у пациентов с потерей HLA-гаплотипа и без нее

Figure 3
Relapse-free survival (RFS) from relapse after haplo-HSCT in the patients with/without LOH



В группе с потерей HLA-гаплотипа без проведения повторной алло-ТГСК на момент последнего контакта живы 2/13 (15%) пациента в течение 1 и 8 мес после рецидива.

Результаты терапии в группе с различными типами рецидива отражены на рисунках 5, 6.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рецидив заболевания остается основной причиной смертности у детей с острыми лейкозами после алло-ТГСК. Существующие возможности ведения посттрансплантационного рецидива в зависимости от варианта острого лейкоза включают полихимиотерапию, терапию моноклональными антителами, гипометилирующие агенты, комбиниро-

Рисунок 4
ОВ с момента рецидива после гапло-ТГСК у пациентов с потерей HLA-гаплотипа и без нее

Figure 4
Overall survival (OS) from relapse after haplo-HSCT in the patients with/without LOH

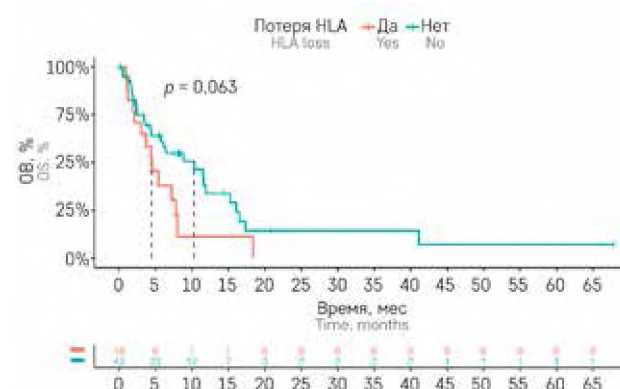


Рисунок 5
Результаты терапии рецидива пациентов с потерей HLA-гаплотипа

Figure 5
The results of relapse treatment in the patients with HLA loss

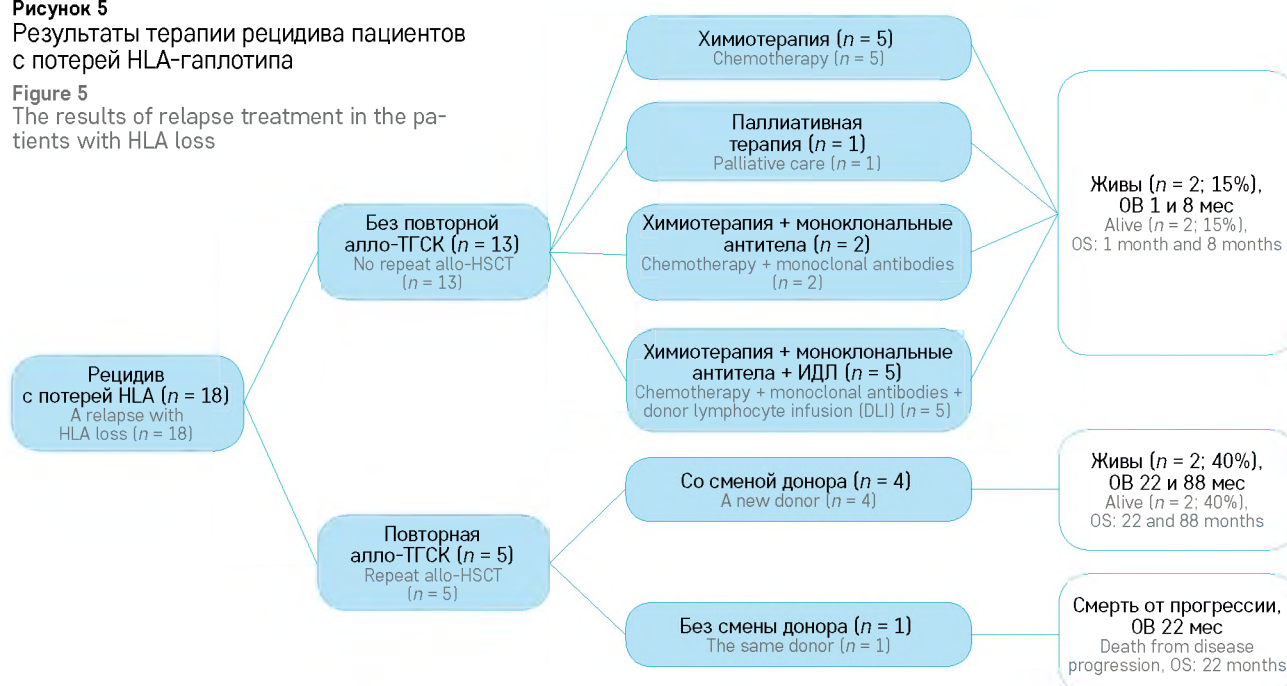
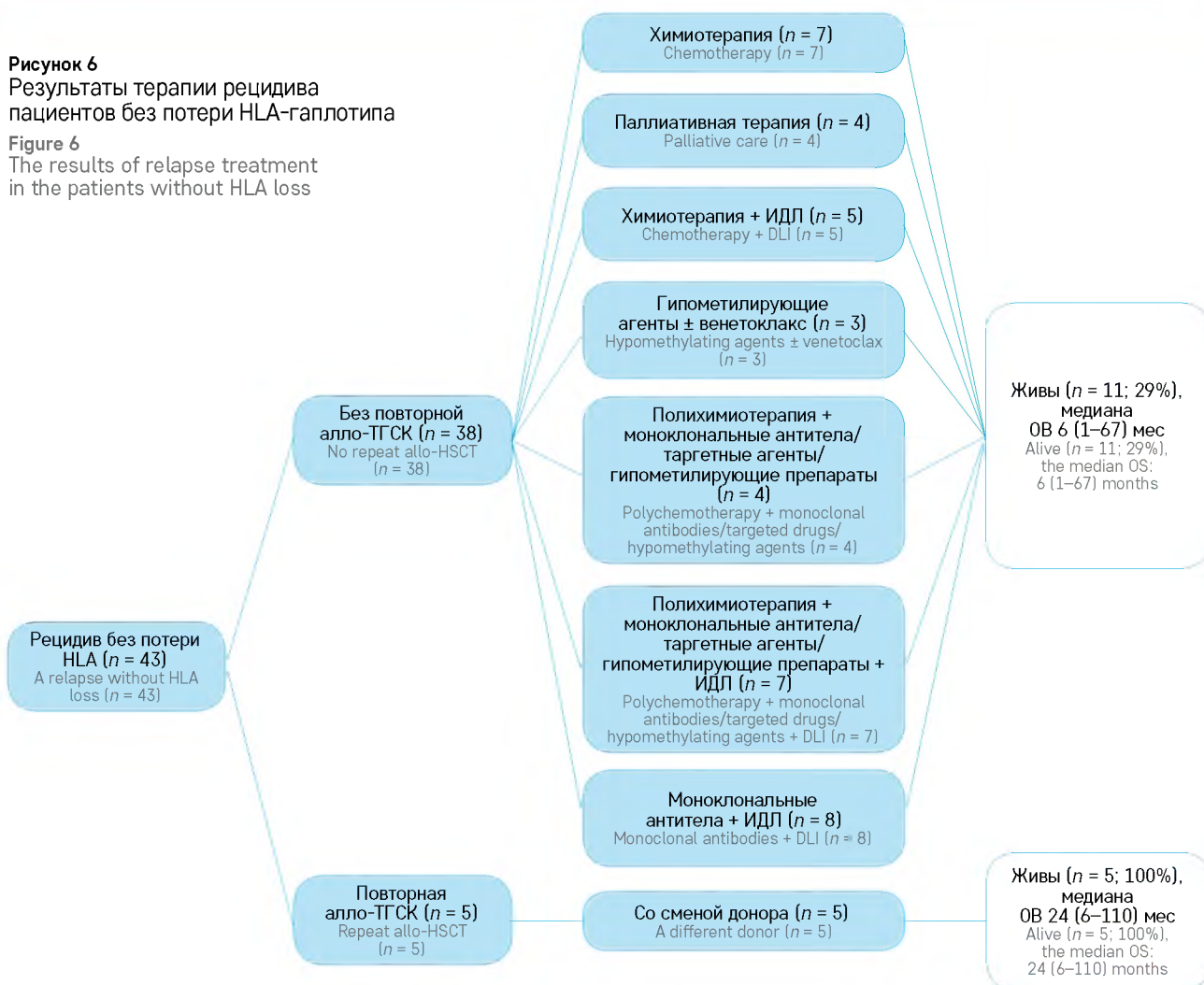


Рисунок 6
Результаты терапии рецидива
пациентов без потери HLA-гаплотипа

Figure 6
The results of relapse treatment
in the patients without HLA loss



ванные методы иммуноадаптивной терапии (биспецифический активатор Т-клеток, ИДЛ) и в отдельных случаях проведение повторной алло-ТГСК. Выбор того или иного метода терапии в основном определяется клиническими характеристиками рецидива, соматическим статусом пациента, наличием РТПХ. Индивидуальный подход к ведению рецидивов после алло-ТГСК может быть основан на понимании причин иммунологической резистентности опухолевых клеток [15].

Презентация генов HLA I и II классов на бластной популяции является необходимым условием для эффективного распознавания опухолевых антигенов донорскими Т-клетками. Потеря гетерозиготности генов HLA на коротком плече 6-й хромосомы считается важным механизмом резистентности, особенно в контексте гапло-ТГСК.

В данном исследовании частота рецидивов с потерей HLA-гаплотипа составила 22%, что соответствует ранее опубликованным работам, включающим пациентов взрослого возраста [9].

Мы наблюдали потерю HLA-гаплотипа у детей с ОМЛ (24%), ОЛЛ (22%), включая Т-ОЛЛ (40%). Все случаи потери HLA были обнаружены после гапло-ТГСК.

Рецидивы с потерей HLA-гаплотипа возникали позднее, чем рецидивы без потери HLA (медиана 8,8 мес), что также было описано в других исследованиях [4, 9]. Причина данного феномена может лежать в появлении мутаций *de novo*, приводящих к клональной эволюции опухоли.

В работе А. Wang и соавт. такие факторы как число HLA-несовместимых локусов (5/10 против < 5/10) были значимо ассоциированы с потерей HLA-гаплотипа в общей когорте из 160 больных и у пациентов с миелоидными неоплазиями, в то время как АВ0-несовместимость была ассоциирована с потерей HLA-гаплотипа при лимфоидных неоплазиях [8].

В многофакторном анализе L. Crucitti гиперлейкоцитоз в дебюте заболевания, неблагоприятная цитогенетика, предшествующая алло-ТГСК, активное заболевание на момент алло-ТГСК, доза Т-клеток в трансплантате, появление хронической РТПХ были связаны с повышенным риском потери HLA-гаплотипа у пациентов с миелоидными неоплазиями от частично HLA-несовместимых доноров [4]. В нашей работе повторная алло-ТГСК была ассоциирована с повышенным риском потери HLA-гаплотипа в общей когорте больных, $p = 0,008$.

Количество линий терапии влияло на риск потери HLA-гаплотипа при ОМЛ ($p = 0,008$), в то время как РТПХ (острая + хроническая) и отдельно хроническая РТПХ перед рецидивом влияли на риск потери HLA-гаплотипа при ОЛЛ ($p = 0,015$ и $p = 0,05$ соответственно). Возможное объяснение влияния хронической РТПХ может заключаться в создании более сильного иммунологического напряжения на лейкоэмические клетки, что приводит к клональной эволюции опухоли.

Прогноз пациентов с потерей HLA-гаплотипа крайне неблагоприятный. Однако ранее не было показано различий в ОВ у пациентов с потерей HLA-гаплотипа и без нее. Шестимесячная ОВ после рецидива составила 28,5% при потере HLA-гаплотипа и 27,4% при «классическом» рецидиве, медиана выживаемости 94 (1–1084) дня и 78 (0–484) дней после рецидива соответственно [4].

В нашем исследовании БРВ после терапии рецидива не различалась у пациентов с потерей HLA-гаплотипа и без нее. Тем не менее ОВ была несколько лучше у пациентов без потери HLA-гаплотипа, $p = 0,06$, что связано, по-нашему мнению, с несколькими причинами. Прежде всего, часть пациентов без потери HLA-гаплотипа способны достичь ответа на комбинированную химио/иммунотерапию рецидива, в то время как большинство больных с потерей HLA-гаплотипа оказываются рефрактерны к проводимой противорецидивной терапии.

В группе без потери HLA-гаплотипа ($n = 43$) 11 (29%) пациентов достигли стойкой ремиссии (медиана 6 мес) после проведения комбинированной химио/иммуноадоптивной терапии и остаются живы без повторной алло-ТГСК на момент последнего контакта. Повторная алло-ТГСК проведена 5 (12%) пациентам, все больные из группы без потери HLA-гаплотипа живы с сохранением ремиссии заболевания.

Среди всех пациентов с потерей HLA-гаплотипа ($n = 18$) на момент последнего контакта живы 4 (22%), 2 из них прошли повторную алло-ТГСК со сменой донора и имеют ОВ 22 и 88 мес после рецидива. Еще 2 пациента живы на момент последнего контакта после химиотерапии в течение 1 и 8 мес. В группе больных с потерей HLA-гаплотипа 5 выполнена повторная гапло-ТГСК, 2 из них вследствие высокой предлеченности умерли от токсических осложнений, 1 умер от рецидива.

Одной из опций терапии рецидива ОЛЛ с потерей HLA-гаплотипа может быть применение биспецифического активатора Т-клеток блинатумаба. Три пациента с В-ОЛЛ с потерей HLA-гаплотипа получили иммунотерапию с применением CD3/CD19-биспецифического активатора Т-клеток блинатумаба, у 2 из них удалось достичь клинико-гематологической ремиссии, которая составила

5 и 18 мес. Н. Wu и соавт. описали 4 пациентов с рецидивами В-ОЛЛ с потерей HLA-гаплотипа после гапло-ТГСК, 3 из них достигли МОБ-негативной ремиссии заболевания в течение первого курса терапии. Благодаря образованию цитолитического синапса блинатумаб способен восстанавливать антилейкемический эффект цитотоксических лимфоцитов даже в условиях потери HLA-гаплотипа [16].

Анализ STR, используемый в данном исследовании, является простым и доступным в рутинной практике. Однако чувствительность данного метода низкая, что ограничивает обнаружение малого количества бластов (1–5%). Сортировка бластной популяции с помощью проточной цитометрии позволяет повысить чувствительность метода, однако ее эффективность также зависит от числа опухолевых клеток. Пациенты, не соответствующие критериям чувствительности метода, не были включены в данный анализ. Другие методы исследования генов HLA-локусов, такие как количественная ПЦР-панель HLA-KMR и в особенности NGS позволяют определить потерю гетерозиготности конкретного локуса HLA и охватить большее число случаев генетической утраты HLA [8, 11].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Частота потери HLA-гаплотипа при рецидивах острых лейкозов у детей сопоставима с таковой у взрослых после гапло-ТГСК, по данным литературы. Высокая предлеченность до алло-ТГСК у пациентов с ОМЛ ($p = 0,008$), наличие острой и хронической РТПХ ($p = 0,015$) перед рецидивом ОЛЛ были ассоциированы с риском потери HLA-гаплотипа. Несмотря на более поздние сроки возникновения (8,8 мес против 6,2 мес, $p = 0,043$), рецидив с потерей HLA-гаплотипа оказался прогностически более неблагоприятным по сравнению с рецидивом без потери HLA-гаплотипа (медиана ОВ после развития рецидива 4,5 мес против 10,3 мес, $p = 0,063$).

В нашем исследовании лишь повторная гапло-ТГСК со сменой донора продемонстрировала излечивающий потенциал после рецидива с потерей HLA-гаплотипа у 2 пациентов.

Для поиска эффективных терапевтических стратегий тестирование на предмет потери гетерозиготности генов HLA рекомендуется ввести в клиническую практику у детей с острыми лейкозами, прошедшими гапло-ТГСК.

Совершенствование молекулярно-генетических методов может повысить частоту раннего выявления случаев потери HLA-гаплотипа для своевременного определения индивидуальной тактики ведения пациентов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда №22-15-00491 (<https://rscf.ru/project/22-15-00491/>).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Tsvetkova L.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4952-0704>

Evdokimov A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3809-421X>

Epifanovskaya O.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8168-6811>

Barkhatov I.M. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8000-3652>

Paina O.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7263-4326>

Rakhmanova Zh.Z. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3386-0942>

Kozhokar P.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5721-0207>

Frolova A.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1143-4851>

Osipova A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7629-4293>

Ryabenko S.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0526-3064>

Kozlov D.V. ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-8205-0094>

Babenko E.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3367-4936>

Ivanova N.E. ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-5455-860X>

Gindina T.L. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1302-3311>

Semenova E.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5077-9225>

Kulagin A.D. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9589-4136>

Zubarovskaya L.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2594-7703>

Литература

1. Vago L., Gojo I. Immune escape and immunotherapy of acute myeloid leukemia. *J Clin Invest* 2020; 130 (4): 1552–64.
2. Hazini A., Fisher K., Seymour L. Deregulation of HLA-I in cancer and its central importance for immunotherapy. *Jr immunother Cancer* 2021; 9: e002899.
3. Vago L., Perna S.K., Zanussi M., Mazzi B., Barlassina C., Stanghellini M.T., et al. Loss of mismatched HLA in leukemia after stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2009; 361: 478–88.
4. Crucitti L., Crocchiolo R., Toffalori C., Mazzi B., Greco R., Signori A., et al. Incidence, risk factors and clinical outcome of leukemia relapses with loss of the mismatched HLA after partially incompatible hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia* 2015; 29: 1143–52.
5. Vago L., Toffalori C., Ahci M., Lange V., Lang K., Todaro S., et al. Incidence of HLA Loss in a Global Multicentric Cohort of Post-Transplantation Relapses: Results from the HlaLoss Collaborative Study. *Blood* 2018; 132: 818.
6. Jan M., Leventhal M.J., Morgan E.A., Wengrod J.C., Nag A., Drinan S.D., et al. Recurrent genetic HLA loss in AML relapsed after matched unrelated allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood Adv* 2019; 3 (14): 2199–204.
7. Hirabayashi K., Kurata T., Horiuchi K., Saito S., Shigemura T., Tanaka M., et al. Loss of mismatched HLA on the leukemic blasts of patients with relapsed lymphoid malignancies following bone marrow transplantation from related donors with HLA class II mismatches in the graft versus host direction. *Pediatr Blood Cancer* 2016; 63 (4): 709–11.
8. Wang A., Li W., Zhao F., Zheng Z., Yang T., Wang S., et al. Clinical Characteristics and Outcome Analysis for HLA Loss Patients Following Partially Mismatched Related Donor Transplantation Using HLA Chimerism for Loss of Heterozygosity Analysis by Next-Generation Sequencing. *Cell Transplant* 2022; 31: 09636897221102902.
9. Muñiz P., Kwon M., Carbonell D., Chicano M., Bailén R., Oarbeascoa G., et al. Clinical Utility of the Detection of the Loss of the Mismatched HLA in Relapsed Hematological Patients After Haploidentical Stem Cell Transplantation With High-Dose Cyclophosphamide. *Front Immunol* 2021; 12: 642087.
10. Shyr D.C., Zhang B.M., Saini G., Madani N.D., Schultz L.M., Patel S., et al. HLA-haplotype loss after TCR $\alpha\beta$ /CD19-depleted haploidentical HSCT. *Bone Marrow Transplant* 2020; 56 (3): 733–7.
11. Arnold P.Y. Review: HLA loss and detection in the setting of relapse from HLA-mismatched hematopoietic cell transplant. *Hum Immunol* 2022; 83 (10): 712–20.
12. Chia W.C., Khoo T.S., Abdul Wahid S.F.S., Razak N.F.A., Alauddin H., Raja Sabudin R.Z.A., et al. Multiplex STR panel for assessment of chimerism following hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). *Ann Hematol* 2019; 98 (5): 1279–91.
13. Feenstra M., Velthkamp M., Van Kuik J., Wiertsema S., Slootweg P., Van Den Tweel J., et al. HLA class I expression and chromosomal deletions at 6p and 15q in head and neck squamous cell carcinomas. *Tissue Antigens* 1999; 54 (3): 235–45.
14. Ahci M., Toffalori C., Bouwmans E., Crivello P., Brambati C., Pultrone C., et al. A new tool for rapid and reliable diagnosis of HLA loss relapses after HSCT. *Blood* 2017; 130 (10): 1270–3.
15. Gaballa S., Abutalib S.A., Ciurea S.O. Prevention and Treatment of Relapse After HLA-Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation. *Haploidentical Transplantation* 2017. Pp. 291–306.
16. Wu H., Cai Z., Shi J., Luo Y., Huang H., Zhao Y. Blinatumomab for HLA loss relapse after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Cancer Res* 2021; 11 (6): 3111–22.