

Současný koncept patofyziologie a terapie aplastické anémie

Neal S. Young, T. Calado, Philip Scheinberg

Úvod: Patofyziologie aplastické anémie (AA) je mediovaná imunitním systémem: aktivované cytotoxické T lymfocyty typ 1. Abnormální imunitní odpověď a deficity hematopoetických buněk je definována geneticky: například mutace genu pro reparaci telomery, nebo porucha aktivačních cest T buněk. Ve většině případů je efektivní imunosupresivní léčba antithymocytárními globuliny (ATGs) a cyklosporinem, ale s rizikem relapsu a vývoje klonální krevní nemoci. Alogenní transplantace krvetvorných buněk od HLA identického dárce je nejlepší možností léčby pro mladé pacienty s těžkou AA.

Etiologie: Etiologicky se na vzniku AA podílí různé faktory: těhotenství, eozinofilní fascitida, v 10% případů seronegativní hepatitida (dosud nebylo identifikováno infekční agens), benzén, léky. U léků pravděpodobně hraje roli rozdílný detoxikační metabolismus na podkladě genetických rozdílů, jako například u karbamazepinu, kde byla prokázána delece v genech pro glutathione-S-transferázu (GSTM1, GSTT1), což vedlo ke zvýšené koncentraci toxických metabolitů. Neexistuje žádná představa o mechanismu vzniku AA u chloramfenikolu, penicilaminu nebo zlata. Spousta léků pravděpodobně může způsobovat útlum dřeně jednak destrukcí krvetvorných buněk, nebo méně často vyvolává imunitní reakci na nový antigen.

Epidemiologie: Proběhly dvě velké epidemiologické studie v roce 1980 v Evropě a Izraeli a v roce 2006 publikovaná studie z Thajska: incidence AA je na západě 2/milion obyvatel/rok a v Asii 2-3 násobně více.

Autoantigeny Byl proveden screening na protilátky proti nejrůznějším peptidům: u 40% pacientů byly nalezeny protilátky proti kinektinu (široce exprimovaný protein). Jiným antigenem byl diazepam vázající protein-1, enzym který je důležitý v oxidaci mastných kyselin a široce distribuovaný ve tkáních. Relevance těchto autoprotilátek na patofyziologii AA je nejasná.

Patofyziologie: Účinnost imunosupresivní terapie u většiny AA zůstává nejlepším důkazem imunitní patofyziologie nemoci: většina pacientů se zlepší po přechodné T buněčné depleci ATGs. S intenzitou imunosuprese narůstá také podíl léčebných odpovědí. V laboratorních experimentech byly jako efektorové buňky identifikovány imunofenotypizací aktivované cytotoxické T lymfocyty, exprimující Th1 cytokiny, především γ interferon. Je možno přímo detekovat CD8+lymfocyty v cirkulaci, oligoklonální expanze CD8+CD28- buněk je možno definovat. 1/ flowcytometricky podle T buněčného receptoru (TCR) V β rodiny 2/ spektrotypizací detekcí úhlového natočení CDR3 úseku 3/ sekvenací CDR3 regionu k detekci molekulárního klonotypu.. Ve většině případů se zmenšuje nebo mizí tyto klony po úspěšné terapii a znovu se objevují při relapsu nemoci. Velmi zřídka perzistují tyto klony v remisi nemoci, pravděpodobně je to důkazem tolerance. Vliv útoku T lymfocytů na kostní dřeň může být modelován in vitro a in vivo, kdy γ interferon a tumor necrosis factor- α (TNF- α) ve zvyšující se dávce vedou k redukcí počtu lidských hematopoetických progenitorů. Cytokiny indukují apoptózu CD34 cílových buněk, minimálně částečně přes Fas-dependentní cestu. Monoklonální protilátky proti γ interferonu a TNF- α mohou u laboratorních zvířat zrušit onemocnění. Není jasné proč jsou T lymfocyty aktivovány, ale zvýšená exprese HLA-DR2 svědčí pro rozpoznání antigenu a současně je prediktivní pro lepší odpověď na terapii cyklosporinem. Pro zvýšenou imunitní odpověď svědčí také polymorfismy v genech pro cytokiny: nukleotidový polymorfismus v TNF- α promotoru, homozygocie pro variabilní počet repetíci dinukleotidů (variable number of dinucleotide repeats) v genu kodující γ interferon, polymorfismy v genu pro interleukin 6. Konstitutivní exprese T-bet, což je

transkripční regulátor, nutný k zaměření na Th1. Mutace PRF1 genu, gen pro perforin, která je odpovědná za některé případy familiární hemofagocytózy. Mutace SAP, genu kódující malý modulační protein, který inhibuje produkci γ interferonu, která je podkladem X-vázané lymfoproliferace, fatálního onemocnění asociovaného s aberantní imunitní odpovědí na herpesviry a aplastickou anémií. Transkripční analýza genomu T lymfocytů od pacientů s aplastickou anémií zahrnuje komponenty vrozené imunity, včetně Toll-like receptorů a natural killer buněk. Imunitní poškození vede k selhání dřene (prázdňá dřeň dle histologie, malé množství nebo žádné CD 34+ buňky dle imunofenotypizace, minimální množství kolonií v dlouhodobých tkáňových kulturách). Kromě kvantitativního poškození jsou také přítomny kvalitativní změny těchto buněk: například neadekvátní odpověď na hematopoetické růstové faktory. Microarray zbývajících CD 34+ buněk od pacientů s AA odhaluje transkriptom, kde geny vedoucí k apoptóze mají poruchu regulace. Podobně jako u normálních CD34+ buněk, které jsou vystaveny expozici γ interferonem. Mimořádným rysem leukocytů u AA jsou krátké telomery. U pacientů s dyskeratosis congenita, forma vázaná na X chromozom, byla zjištěna mutace DKC1 a mutace TERC, u pacientů, kteří měli syndrom vrozeného selhání kostní dřene a tím byla potvrzen genetický podklad pro deficit telomery. Reparační proces telomery je založen na RNA templátu, který je kódován genem TERC, a na telomeráze, což je reverzní transkriptáza, kódovaná genem TERT, jsou prodlužovány opakující se nukleotidové struktury telomery.

Jiné proteiny jsou spojeny s reparačním komplexem telomery, například dyskerin, který je kódován genem DKC1. Systematický průzkum DNA pacientů se získanou AA odhalil u některých přítomnost mutace TERC a TERT genů. Příbuzní těchto pacientů, kteří měli také detekovanou mutaci genů, měli i přes normální krevní obraz hypocelulární dřeň s redukováným počtem CD34+ buněk., menší schopnost tvorby kolonií, zvýšenou hladinu hematopoetických růstových faktorů, krátké telomery. Klinický projev onemocnění je v pozdějším věku než u dyskeratosis congenita a není spojen s typickými anomáliemi. Chromozomy jsou chráněny několika proteiny, vázajícími se na telomery, polymorfismy v těchto genech (TERF1, TERF2) více či méně souvisí s prevalencí AA ve srovnání se zdravými kontrolami. Několik pacientů byli heterozygoti pro mutaci Schwachman-Bodian-Diamond syndrom (SBDS) genu. Většina těchto dětí s vrozenou AA a mutací SBDS genu měla extrémně krátké telomery. SBDS gen nemá přímou souvislost s reparačním komplexem telomery a neváže se na ně. Vrozené mutace genů kódujících proteiny reparačního či ochranného komplexu telomer jsou genetické rizikové faktory získané AA, pravděpodobně protože vedou k kvantitativní redukci hematopoetických kmenových buněk a také mohou vést ke kvalitativní poruše, která snižuje odolnost proti imunně mediovanému poškození. Zkrácení telomer je detekováno u 1/3 až 1/2 pacientů s AA, mutace jsou detekovány pouze v méně než 10% případech AA. Pravděpodobně jde o poškození jiných genů, které mají vazbu k reparačnímu a ochrannému komplexu telomery. Druhou možností je, že zkrácení telomery je jen sekundárním projevem replikace kmenové buňky.

Klonální evoluce: Klinicky AA existuje společně s jinou hematologickou nemocí, či se může do ní vyvinout. Typicky jde o paroxysmální noční hemoglobinurii (PNH) anebo o myelodysplastický syndrom (MDS). Imunitní proces poškozující tkáň se jeví jako prekanceróza také u jiných onemocnění: chronická hepatitida a hepatocelulární karcinom, ulcerativní kolitida a karcinom tlustého střeva a jiné. Velmi citlivými metodami můžeme detekovat klonální onemocnění v počátku AA (flowcytometrie pro PNH, FISH pro MDS). PNH: Více než 50% pacientů s pancytopenií má přítomnu populaci PNH buněk, jednoduše detekovatelnou flowcytometricky z důvodu absence glykosylfosfatidylinositolové kotvy, která váže četné membránové proteiny, důvodem je somatická mutace PIG-A genu. Většina klonů je malá a nevede ke klinické manifestaci hemolýzy nebo trombózy. Dřeňové PNH buňky si zachovávají proliferační kapacitu ve tkáňových kulturách a nemají zvýšenou expresi Fas.

Microarray ukazuje, že ostatní buňky dřeně s normálním fenotypem mají poruchu genů pro apoptózu jako CD34+ buňky u aplastické anémie, zatímco OIG-A negativní klon (PNH klon) má transkripci podobnou CD34+ buňkám zdravých dárců.

MDS: U menší části pacientů se rozvine aneuploidie: nejčastěji monosomie 7, trisomie 8. MDS s trisomií 8 chromozomu je spjata s velký množstvím imunitních abnormalit, že se podobá AA. Pacienti odpovídají na imunosupresivní terapii, mají expanzi oligoklonálních T lymfocytů. Aneuploidní buňky mají zvýšenou expresi antigenu WT1, jsou rozpoznávány oligoklonálními T lymfocyty, ale nejsou zničeny vlivem poruchy regulace antiapoptotických genů: c-myc, survivin, CDK1. Zdá se, že buňka s trisomií 8 chromozomu je odolná proti cytotoxickému útoku T lymfocytů. Monozomie 7 chromozomu je častou cytogenetickou abnormalitou u AA, ale má horší prognózu, kdy pacienti podlehnou refrakterní cytopenii nebo dojde k rozvoji akutní leukémie. Vývoj monozomie 7 chromozomu má vztah k použití exogenního G-CSF, tak jak se může stát u léčené těžké vrozené neutropenie. Laboratorní studie buněk kostní dřeně pacientů s AA a MDS dokazují, že monozomie 7 se rozvine při abnormální hladině cytokinů: vysoká koncentrace G-CSF vede k selekci buněk, které nesou krátkou isoformu G-CSF receptoru, který vede pouze k proliferaci ale ne k diferenciaci.

Terapie: U těžké AA jsou jedinou možností terapie imunosuprese nebo alogenní transplantace krvetvorných buněk. Imunosupresivní terapie je častěji používána z důvodu nedostatku HLA identického dárce, věku pacienta a z důvodu bezprostředních ekonomických nákladů na transplantaci. U pacientů v celkové remisi zůstává krevní obraz často pod normální hranicí, ale je adekvátní k obraně proti infekci a nevyžaduje transfuze. Většina specialistů používá režimy kombinované s ATG a cyklosporinem (CsA), podle výsledků velkých studií z roku 1990. Největší zkušenosti jsou s koňským ATG, ačkoliv nedávno bylo povoleno použití králičích ATG v USA, které jsou mnohem účinnější v terapii rejekce štěpu po transplantaci solidních orgánů (probíhá studie přímo srovnávající tyto typy ATG jako terapie první volby u AA). ATG je cytolytické, je produkováno zvířaty imunizovanými proti lidským thymocytům, ne lymfocytům. ATG je imunomodulační stejně jako lymfocytotoxické. Dávky ATG jsou empirické. Toxicita ATG je alergická reakce během podání heterogenního proteinu. Po podání vysoké dávky během několika málo dní dojde k formaci imunitních komplexů a minimalizace rizika rozvoje sérové nemoci je zajištěna, pokud pacient neprodukuje vlastní protilátky proti cizímu proteinu během týdne až 10 dní po expozici. Cyklosporin má selektivní efekt na funkci T lymfocytů přímou inhibicí jaderných regulačních proteinů, což vede k redukci proliferace a aktivace T lymfocytů. Těžká AA může odpovědět na terapii CsA samotným, ale je méně efektivní než samotné ATG nebo než kombinace ATG+CsA. CsA má spoustu vedlejších účinků, ale po redukci dávky jsou dobře zvládnutelné, vhodné je udržovat hladinu CsA 200 ng/mL. Udržení hodnot krevního obrazu je možno dosáhnout jen velmi nízkou dávkou CsA i po dobu několika let. Výsledky kombinované imunosupresivní terapie jsou rozdílné v různých studiích, také z důvodu nejednotnosti parametrů remise. Více než 60% pacientů odpoví během 3-6 měsíců po koňském ATG. Dlouhodobá prognóza je predikována časnou odpovědí, kdy dojde ke vzestupu retikulocytů a destiček nad $50 \times 10^9/l$ během 3 měsíců po terapii. Po koňském ATG asi 50% pacientů má léčebnou odpověď a většina z nich má dlouhodobé přežití. Výsledky imunosupresivní terapie mají vztah ke věku pacienta: 5-leté přežití nad 90% mají děti, zatímco dospělí nad 60 let mají 5-leté přežití 50% podle nedávno publikovaných studií. Relaps, který je definovaný konzervativně jako nutnost nové imunosupresivní terapie, je častý a vyskytuje se u 30-40% pacientů. Pokud je relaps definovaný jako nová potřeba transfuzní terapie, tedy během 3 let dojde k relapsu u 12% pacientů dle evropských studií. Nové podání CsA obvykle zlepší krevní obraz, ale někdy je nutné druhé podání koňského nebo králičího ATG. Relaps obvykle neznamená horší prognózu, ale nemusí být vždy vyléčitelný. Mnohem závažnější než relaps je vývoj

klonálního onemocnění: PNH, MDS, leukémie. Klonální onemocnění typu MDS nebo akutní leukémie se v dlouhodobém horizontu vyvine u 15% pacientů.

Intenzifikace imunosupresivní terapie může mít zvýšený počet remisí. Snaha zvýšit efekt ATG+CsA však vedla ke zklamáním: megadávky methylprednisolonu vedly jen ke zvýšení toxicity, G-CSF a GM-CSF jako rutinní součást kombinované imunosuprese má v současnosti negativní výsledek- nevedly ke zvýšení léčebných odpovědí nebo menšímu výskytu infekcí. V současnosti probíhá velká studie, která by měla definitivně odpovědět na úlohu G-CSF v kombinované terapii AA. Dalšími imunosupresivy, které lze použít v terapii AA je mykofenolát mofetil (MMF), který selektivně oslabuje aktivované buňky inhibicí inosine monofosfát dehydrogenázy, což blokuje proliferaci aktivovaných lymfocytů. Kombinace MMF s ATG+CsA nevedla v NIH studii u 104 pacientů ke zlepšení léčebné odpovědi (62%), snížení relapsů (37%), vývoje klonálního onemocnění, pouze snížila nutnou dávku CsA. Čtyřleté přežití pro všechny pacienty bylo 80%, pravděpodobně pro lepší podpůrnou terapii než z důvodu lepšího efektu. Sirolimus, který blokuje sern-theronin kinázu, působí synergicky s csA v tkáňových kulturách a klíčicky u transplantací. Pokud však byl testován v kombinaci s ATG+CsA u AA, výsledky nebyly lepší než výsledky těchto agens samotných. Použití cyklofosfamidů vychází ze zkušeností autologní obnovy krvetvorby u pacienta s AA po přípravném transplantacním režimu s cyklofosfamidem. Cyklofosfamid byl použit opakovaně také v 80tých letech, kdy nebylo všude dostupné ATG. U 38 dříve neléčených pacientů byla léčebná odpověď u 74%, předpokládané přežití 86%. Ale studie NIH byla časně pozastavena pro rozvoj vysokého počtu mykotických infekcí a vyšší úmrtnosti v rameni s cyklofosfamidem a vyššímu počtu relapsů a evoluce klonálních nemocí. V současné době není žádný osvědčený algoritmus pro terapii pacientů, kteří jsou refrakterní na ATG.

Transplantace od alternativního dárce je zvažována u dětí po selhání 1 cyklu ATG, u dospělých v případě selhání 2 cyklů. Léčebná odpověď na druhý cyklus ATG je od 22-64%. Odpověď na druhý cyklus v případě podání králíčích ATG je 30-77%. Po cyklofosfamidu, jako terapii druhé linie, byla popsána léčebná odpověď 50%. Třetí podání imunosupresivní terapie může mít benefit jen u pacientů, kteří měli alespoň přechodnou odpověď na předchozí léčbu. Zlepšení přežití pacientů s refrakterní AA vlivem podpůrné terapie komplikuje rozhodnutí o vysoce rizikové transplantaci. Byl testován alemtuzumab, humanizovaná monoklonální protilátka anti CD 52 (antigen prezentovaný na všech lymfocytech), který má efekt u lymfoproliferativních nemocí, GVHD, autoimunitních nemocí. Čtyři pacienti z 8 refrakterních na koňský ATG, odpověděli na alemtuzumab. Terapie středně závažné pancytopenie záleží na klinických projevech- někteří pacienti progredují do těžké AA, jiní jsou stabilní, bez nutnosti jakékoliv terapie. Je jen velmi málo klinických studií zaměřených na středně těžkou AA. Imunosupresivní terapie může zlepšit pancytopenii, nejefektivnější je kombinace ATG+CsA, ale obvykle jsou používány sekvenčně. Daclizumab, humanizovaná monoklonální protilátka proti interleukin-2 receptoru, zlepšila krevní obraz u 6 z 16 pacientů. Jestliže je zachována minimální hematopoetická funkce, mohou být efektivní androgeny. In vitro androgeny zvyšují aktivitu telomerázy u lymfocytů a CD34+ buněk.

Alogenní transplantace od HLA identického příbuzného dárce po přípravném režimu s cyklofosfamidem není myeloablativní, ale je dostatečně imunosupresivní. Alogenní transplantace od HLA identického dárce vyléčí většinu pacientů, dle IBMTR z roku 2000 je 5-leté přežití 77%. V případě dětí a pacientů s minimálním počtem transfuzí je toto přežití 80-90%. Rejekce štěpu je spíše historický problém, v současnosti není častá z důvodu časně indikace transplantace a také z důvodu méně imunogenních transfuzních přípravků (deleukotizace transfuzních přípravků, trombocyty z cytaferézy). Přípravné režimy bez radioterapie nyní pravidelně umožní přijetí a vyhneme se pozdním komplikacím z radiace. Studie z poslední doby, kde bylo přípravným režimem ATG+cyklofosfamid transplantováno 81 pacientů došlo k přijetí štěpu u 96%, 3 ze 4 pacientů úspěšně absolvovali

retransplantaci. Dlouhodobě přežívá 88% pacientů. Dalším přípravným režimem je kombinace cyklofosfamid a fludarabin s nebo bez ATG má také vysoké procento přihojení štěpu dokonce u těžce transfundovaných, kteří dostaly PBSC měsíce po selhání imunosupresivní terapie. GVHD zůstává vážným problémem pro starší pacienty i přes rutinní profylaxi CsA. Těžká GVHD je u osob pod 20 let 15-20%, pro ostatní osoby 40-45%. V Seattlu se chronická GVHD rozvinula u 41% pacientů, kteří žili déle než 2 roky po transplantaci. Přidání ATG nebo alemtuzumabu může redukovat frekvenci a tíži aGVHD. Alogenní transplantace od shodného nepříbuzného dárce má v 15% rejekci štěpu, riziko GVHD II-IV stupně 48%, předpokládané 5 leté přežití 39%. Mortalita je dvojnásobná než u transplantací od HLA identického příbuzného dárce. Nejsilnějším prediktivním faktorem je věk pacienta, ale vliv má také úroveň shody 1 HLA třídy a doba od diagnózy. Transplantace alternativním dárce vyžadují radiaci k dosažení přihojení štěpu, jednak z důvodu typu dárce ale také obvykle z důvodu vyššího počtu transfuzí. Byla publikována studie 62 pacientů s SAA, refrakterních na imunosupresivní terapii, kteří podstoupily nepříbuzenskou transplantaci od shodného dárce po přípravném režimu cyklofosfamid, ATG, celotělové ozáření: selhání štěpu 2%, aGVHD II-IV 70%, cGVHD 52%, celkové přežití 61%. Evropský protokol nahrazuje záření fludarabinem pro nepříbuzné nebo neshodné příbuzné dárce: 73% pacientů přežívá 2 roky. GVHD je relativně velmi nízké, rejekce štěpu je u 1/3. Dětská nemocnice Milwaukee zavedla přípravný režim cytosine arabinosid, cyklofosfamid, TBI s dlouhodobým přežitím 50% pacientů a nízkou GVHD. Jsou nutné studie k rozhodnutí, který z přípravných režimů je optimální a jak časně indikovat nepříbuzenskou transplantaci. HLA neshodný dárce je lépe tolerován v případě transplantace pupečnickové krve. Většinou jsou příjemci jen malé děti. Dle zprávy NMDP došlo k přihojení u méně než poloviny z 19 příjemců a většinou přetily z důvodu autologní obnovy nebo retransplantace. Přežití po haploidentických transplantacích je velmi špatné.

Závěr: Terapie AA v posledních 25 letech zlepšila dlouhodobé přežití pacientů na více než 75%. Je však nutno upřesnit nejvhodnější přípravný režim, zlepšit výběr alternativního dárce testováním dárců na vysoké rozlišení. U transplantací pupečnickové krve je nutno klást důraz na vyšší počet buněk ve štěpu. U AA jsou testovány nové imunosupresivní léky. Opakované podání imunosuprese nabízí možnost obnovy krvetvorby u 75% pacientů, obvykle iniciálně je podáván koňský ATG a potom králíčí ATG, alemtuzumab a cyklofosfamid. Reziduální krvetvorba může být expandována ex vivo, například použitím Hox box proteinu. Měření aktivity oligoklonálních T lymfocytů, stanovení kvantity a funkce kmenových buněk, výzkum genetických rizikových faktorů, které postihují kmenovou buňku a mají vliv na imunitní odpověď pomůže definovat, jakým způsobem dochází k destrukci krvetvorby u AA.

Zpracoval: MUDr. Yvona Brychtová, Interní hematologická klinika LF MU Brno a FN Brno