

Biološki označevalci akutne oblike bolezni presadka proti gostitelju

Acute graft versus host disease biomarkers

Katarina Klinar¹, Helena Podgornik^{1,2}

¹Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični oddelek za hematologijo

²Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo

Avtor za korespondenco:

Izr. prof. dr. Helena Podgornik, spec. med. biokem., spec. lab. med. gen.

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični oddelek za hematologijo, Zaloška 7, 1000 Ljubljana

e-pošta: helena.podgornik@kclj.si

POVZETEK

Presaditev krvotvornih matičnih celic se uporablja pri zdravljenju hematoloških (malignih) boleznih z najbolj neugodno prognozo, pri čemer glavni razlog umrljivosti bolnikov po presaditvi predstavlja bolezen presadka proti gostitelju (GVHD), še posebej na zdravljenje neodzivna oblika bolezni. Ker trenutno postavitev diagnoze temelji predvsem na kliničnih znakih bolezni in histološki analizi prizadetega tkiva, je veliko študij usmerjenih v iskanje bioloških označevalcev, ki bi jih lahko določali na neinvaziven način in bi omogočali čim bolj zgodnjo postavitev diagnoze in prognoze ter spremljanje zdravljenja. Najbolj proučevani so zaenkrat topni serumski in plazemski označevalci. Ker pa v zadnjem času vedno več dokazov kaže na povezanost med GVHD in endotelijsko poškodbo, predstavlja obojaven označevalec tudi cirkulirajoče endotelijske celice ter zunajcelični vezikli in mikro RNA.

Ključne besede: bolezen presadka proti gostitelju, biološki označevalci

ABSTRACT

Hematopoietic stem cell transplantation is a treatment modality for hematologic (malignant) diseases with the worst prognosis, in which graft versus host disease (GVHD), especially the steroid-resistant form of the disease, is the main cause of mortality. Currently, diagnosis is mainly based on the clinical presentation of the disease and histologic findings. Therefore, many researchers are looking for non-invasive diagnostic, predictive, responsive or prognostic biomarkers for this disease. The most commonly studied biomarkers are serum and plasma biomarkers. As many studies have shown a connection between GVHD and endothelial damage, circulating endothelial cells are a promising marker. In addition, extracellular vesicles and micro-RNA also have great potential.

Key words: graft versus host disease, biomarkers

»

UVOD

Eden izmed možnih načinov zdravljenja hematoloških (malignih) bolezni je alogenska presaditev krvotvornih matičnih celic (aloPKMC), ki predstavlja možnost ozdravitve bolnikov z najbolj neugodno prognozo. Pri omenjenem načinu zdravljenja bolnika ogrožajo predvsem okužbe in bolezen presadka proti gostitelju (GVHD, angl. *Graft versus Host Disease*), ki predstavlja glavni razlog umrljivosti bolnikov po aloPKMC (1,2).

GVHD je sistemska bolezen. Do akutnega GVHD (aGVHD) praviloma pride v prvih 100 dneh po aloPKMC, pojavi se pri približno 40 % bolnikov s sorodnim darovalcem krvotvornih matičnih celic (KMC) in pri 50–60 % bolnikov, ki so prejeli KMC nesorodnega darovalca (3). Kronična oblika GVHD (cGVHD) se praviloma pojavi več kot 100 dni po PKMC ter tudi pomembno vpliva na umrljivost in kakovost življenja bolnikov po presaditvi. Nastane zaradi tkivne poškodbe timusa, kar vodi v motnje v toleranci limfocitov B in T in pripelje v nastanek aloreaktivnih protiteles ter posledično v nastanek kroničnega vnetja in tkivne fibroze (3).

Pri aGVHD v prvi stopnji pride do poškodbe gostiteljevega tkiva, ki jo povzročita kemoterapija in/ali obsevanje v sklopu kondicioniranja. To povzroči izpostavitve z nevarnostjo in z mikrobi povezanih molekularskih vzorcev (DAMP, angl. *Danger-Associated Molecular Pattern* in PAMP, angl. *Pathogen-Associated Molecular Pattern*), kar aktivira prejemnikove (in/ali darovalčeve) antigen predstavitvene celice (APC) in posledično pride do sproščanja vnetnih citokinov (npr. tumor nekrotizirajoči faktor alfa (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), IL-1). Poleg tega kondicioniranje in uporaba profilaktičnega antibiotičnega zdravljenja povzročita tudi izgubo raznovrstnosti črevesne mikrobiote. Bakterijski produkti, ki prehajajo preko poškodovane črevesne sluznice, še dodatno spodbudijo aktivacijo APC. V drugi stopnji APC darovalčevim limfocitom T predstavijo antigene prejemnika, kar povzroči aktivacijo in ekspanzijo celic T pomagalk in zaviralk. Le-ti nato potujejo v tarčne organe in v zadnji stopnji povzročijo poškodbo tkiva, pri čemer pride tudi do okrepljenega sproščanja različnih vnetnih in citotoksičnih dejavnikov, kar še okrepi imunski odziv proti prejemniku in vodi v apoptozo in nekrozo prejemnikovih celic ter tako poveča poškodbo tkiva (3).

Bolezen se lahko izrazi v različnih oblikah – od blage, ki ne potrebuje zdravljenja, do hude, ki ogroža življenje in se pojavi v 10–15 %. Najpogosteje so prizadeti koža, jetra in prebavila, poznamo pa tudi atipično obliko aGVHD, ki prizadene žleze, kostni mozeg in centralni živčni sistem (1,4). Diagnostika aGVHD trenutno temelji predvsem na dokaj nespecifičnih kliničnih znakih bolezni in histološki analizi prizadetega tkiva, zato bi bili označevalci, ki bi jih lahko dooločali iz vzorcev, odvzetih na čim manj invaziven način, zelo dobrodošli. Njihova potencialna vloga pa ni vezana le na postavitve diagnoze, prognoze ali napoved poteka aGVHD, ampak tudi na spremljanje učinkovitosti zdravljenja tega zapleta (5). Hkrati pa njihovo odkrivanje pripomore tudi k razumevanju patofiziologije bolezni in iskanju novih tarč pri načrtovanju zdravljenja (3).

Preživetje bolnikov je sorazmerno klinični resnosti bolezni, vendar šele takrat, ko so simptomi najbolj izraženi, česar pa ne moremo oceniti na začetku, ob pojavu prvih simptomov bolezni. Pri bolnikih, pri katerih pride do odpornosti na zdravljenje s steroidi (SR-GVHD, angl. *Steroid-Refractory GVHD*), ki se uporabljajo kot prva linija zdravljenja, je smrtnost visoka (70–90 %). Ob poznavanju ustreznih označevalcev bi le-ti pomagali pri zgodnji izbiri ustreznega zdravljenja. Pretirano zdravljenje namreč lahko povzroči preveliko imunosupresijo, kar poveča verjetnost nastanka okužb, hkrati pa se zaradi zmanjšanja učinka presadka proti levkemiji (GVL, angl. *Graft versus Leukemia*) poveča možnost ponovitve bolezni. Po drugi strani se pogosto izkaže, da je potrebno močnejše zdravljenje, šele ko prvo zdravljenje ni zadostno (6). Na steroide neodzivna je pogosto črevesna oblika GVHD (GI-GVHD). Ta se kaže z znaki, kot so bolečine v trebuhu, slabost, bruhanje in (krvava) driska. Taki simptomi se lahko pojavijo tudi pri drugih zapletih po aloPKMC, kot so okužbe gastrointestinalnega trakta, kolitis kot posledica zdravljenja ali s transplantacijo povezana trombotična mikroangiopatija (TA-TMA, angl. *Transplantat-Associated Thrombotic Microangiopathy*), za katero je prav tako značilno slabo preživetje (7). TA-TMA označuje endotelijska disfunkcija in aktivacija komplementa, kar vodi v nastanek mikrotrombov in posledično v trombocitopenijo, mikroangiopatično hemolitično anemijo in prizadetosti različnih organov. Največkrat so prizadeta ledvica, gastrointestinalni trakt, centralni živčni sistem in pljuča, lahko pride tudi do odpovedi večorganskih sistemov (8).



Čeprav je aGVHD povezan z epitelijsko poškodbo, pa vedno več dokazov kaže na povezanost med SR-GVHD in poškodbo endotelija (9). K aktivaciji in poškodbi endotelija pri aloPKMC prispevajo različni dejavniki, kot so obsevanje in kemoterapija v sklopu kondicioniranja, različni vnetni dejavniki, ki se sproščajo iz tkiva ob njegovi poškodbi, endotoksini, ki prehajajo skozi poškodovano črevesno sluznico, in profilaktično imunosupresivno zdravljenje za preprečevanje aGVHD. Poškodbo endotelija povzročajo tudi aloreaktivni limfociti T, ki prepoznajo neujemajoče se humane levkocitne antigene (HLA) na površini endotelij-skih celic. Prav podaljšana aktivacija in poškodba endotelija imata pomembno vlogo tudi pri pojavu nekaterih drugih zapletov po PKMC, kot je npr. TA-TMA (10). Teorija, ki TA-TMA opisuje kot trisopenjski proces (angl. *Three-Hit-Hypothesis*), predpostavlja, da je v njen nastanek vpletena endotelij-ska aktivacija, ki povzroči izgubo zaščitnih mehanizmov endotelija, kar skupaj z dodatnimi dejavniki, kot so npr. okužbe, aloreaktivni limfociti T in profilaktično zdravljenje, vodi v poškodbo endotelija, aktiva-

cijo komplemента, nastanek mikrotrombov in posledične tkivne ishemije. Hkrati so ugotovili, da je pomemben dejavnik pri razvoju TA-TMA tudi genetska predispozicija za aktivacijo komplemента in endotelij-sko poškodbo, kar v omenjeni teoriji predstavlja prvi zadetek (7,8).

V prispevku so predstavljeni biološki označevalci aGVHD s poudarkom na tistih, ki bi lahko služili pri zgodnji prepoznavi bolnikov s težko obliko aGVHD. To so namreč bolniki, pri katerih je potrebno čimprej intenziviranje imunosupresije za preprečitev poslabšanja aGVHD in zmanjšanje verjetnosti za nastanek nekaterih drugih zapletov, kot je tudi TA-TMA. Glede na prekrivanje entitet med (SR)-GVHD in TA-TMA smo v pregled vključili označevalce, povezane z obema zapletoma. Povzetek glavnih skupin označevalcev in njihove vloge je prikazan tudi v Tabeli 1.

»

Tabela 1: Označevalci aGVHD: njihov pomen v razvoju in spremljanju bolezni ter način določanja.**Table 1:** Markers of aGVHD: their importance in the development and monitoring of the disease and the method of their determination.

OZNAČEVALEC		PATOLOŠKI PROCES SPROŠČANJA	POMEN OZNAČEVALCA	POVEZAVA Z GVHD	NAČIN DOLOČANJA	VIR
Serumski / plazemski	REG3 α	Poškodba črevesja Poškodba tkiva/ endotelija	Diagnostični, napovedni, prognostični	Koncentracija pri GI-GVHD trikrat višja kot pri enteritisu Koncentracija narašča z resnostjo GI-GVHD	ELISA	(11-13)
	sST2		Napovedni, prognostični	Visoka koncentracija povezana s SR-GVHD Visoka koncentracija pred PKMC povezana z večjim tveganjem za TA-TMA	ELISA	(16)
	Algoritem MAGIC (REG3 α in sST2)		Napovedni, prognostični	Napoveduje dolgoročne izide zdravljenja pred, ob ali po pojavu simptomov in začetku zdravljenja	/	(11,12,17)
Celični	CEC	Poškodba endotelija	Napovedni, diagnostični	Pomoč pri razlikovanju od drugih zapletov, ki niso povezani s poškodbo endotelija	Pretočna citometrija	(26)
EV	Eritrocitni EV	Celična komunikacija, poškodba tkiva, aktivacija celic	Diagnostični in napovedni	Največje povišanje ob hkratni prisotnosti mikroangiopatije	Pretočna citometrija	(34,38,39)
	Endotelijski EV		Diagnostični	Kaže na poškodbo endotelija		(36,37)
miRNA	miR-146a	Celična komunikacija, poškodba tkiva, aktivacija celic	Prognostični	Obratno sorazmerna s težo aGVHD	RT-qPCR, NGS	(48)
	miR-155		Prognostični	Sorazmerna s težo aGVHD		(47)
	miR-181a		Prognostični, diagnostični, spremljanje zdravljenja	Sorazmerna s težo aGVHD Znižanje kaže na odgovor na zdravljenje		(49)

aGVHD – akutna oblika bolezni presadka proti gostitelju; CEC – cirkulirajoče endotelijske celice; ELISA – encimsko imunska metoda na trdi podlagi; EV – zunajcelični vezikli; GI-GVHD – črevesna oblika bolezni presadka proti gostitelju; MAGIC – angl. *Mount Sinai Acute GVHD International Consortium*; miRNA – mikro RNA; NGS – sekvenciranje naslednje generacije; REG3 α – angl. *regeneration islet-derived protein 3 α* ; RT-qPCR – kvantitativna verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo; SR – GVHD-na steroide neodzivna oblika bolezni presadka proti gostitelju; ST2 – angl. *suppressor of tumorigenicity 2*

aGVHD – acute form of graft-versus-host disease; CEC – circulating endothelial cells; ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay; EV – extracellular vesicles; GI – GVHD – intestinal form of graft-versus-host disease; MAGIC – Mount Sinai Acute GVHD International Consortium; miRNA – micro RNA; NGS – next-generation sequencing; REG3 α – regeneration islet-derived protein 3 α ; RT-qPCR – quantitative polymerase chain reaction with reverse transcription; SR-GVHD – steroid-refractory form of graft-versus-host disease; ST2 – suppressor of tumorigenicity 2



SERUMSKI IN PLAZEMSKI OZNAČEVALCI

Nobeden izmed številnih v literaturi opisanih označevalcev ni popolnoma specifičen za aGVHD oziroma TA-TMA. Najbolj proučevani so topni serumski oziroma plazemski označevalci, ki se sproščajo iz poškodovanega tkiva in (imunskih) celic, vključenih v patofiziologijo omenjenih stanj (3). Označevalce aGVHD lahko razdelimo na splošne (npr. različni citokini in receptorji zanje) in organsko specifične (npr. hepatocitni rastni dejavnik za jetrno obliko, elafin za kožno obliko). Označevalec, specifičen za GI-GVHD, ki je povezana z največjo smrtnostjo, je REG3 α (angl. *regeneration islet-derived protein 3 α*), ki se v kri sprosti iz poškodovanih Panethovih celic, ki se nahajajo v črevesnih kriptah. REG3 α je lektin, pomemben pri zaščiti črevesne sluznice, saj pokriva luminalno stran enterocitov in tako predstavlja »pregrado« med enterociti in črevesno mikrobioto. Količina REG3 α v krvi je sorazmerna s količino poškodovanih Panethovih celic. Tako ta preiskava služi kot »tekočinska biopsija« tankega črevesa, ki lahko pokaže poškodbo črevesja še pred pojavom simptomov GI-GVHD (7 dni po PKMC). Količina REG3 α narašča z resnostjo GI-GVHD, poleg tega je koncentracija tega proteina pri tistih, ki imajo GI-GVHD, trikrat višja kot pri bolnikih z enteritisom oz. pri tistih, ki GI-GVHD nimajo (11–13). Višje vrednosti REG3 α tik pred aloPKMC in po začetku zdravljenja so bile dokazane pri bolnikih, ki niso odgovorili na zdravljenje z ruksolitinibom – zaviralcem Janus kinaze 2 (JAK2), za katerega je bila dokazana učinkovitost pri zdravljenju SR-GVHD (14,15).

Iz poškodovanih celic prizadetega tkiva se sprošča tudi alarmin IL-33, kar v tarčnih celicah vodi do večjega proizvodnje vnetnih dejavnikov. IL-33 se veže na membransko vezani receptor ST2 (angl. *suppressor of tumorigenicity 2*), katerega izražanje se poveča na aktiviranih limfocitih T. Topni ST2 (sST2) tudi veže IL-33 in s tem prepreči njegovo vnetno delovanje (11). Ob aGVHD se izločanje sST2 iz poškodovanih (predvsem endotelijskih) celic poveča. Prepoznan je bil tudi kot plazemski označevalec, ki kaže na SR-GVHD. Visoka koncentracija sST2 pred PKMC je povezana tudi z večjim tveganjem za nastanek TA-TMA (16).

Tako sST2 kot tudi REG3 α sicer neodvisno napovedujeta umrljivost bolnikov z aGVHD, vključena pa sta tudi v algoritem MAGIC (*Mount Sinai Acute GVHD International Consortium*), ki ima prognostični pomen in napoveduje dolgoročne izide zdravljenja pred (7. dan po PKMC), ob

ali po pojavu simptomov in začetku zdravljenja aGVHD bolje, kot če le-te napovemo samo na podlagi kliničnih simptomov (11,12,17).

Plazemski koncentraciji sST2 in REG3 α sta skupaj z receptorjem tumor nekrotizirajočega faktorja 1 (TNFR1), ki je nadomestni označevalec TNF- α , ki ga proizvajajo limfociti T in povečuje poškodbo tkiva, vključena v algoritem Ann Arbor. Ta algoritem na podlagi določitve koncentracije omenjenih označevalcev ob pojavu aGVHD napove verjetnost odziva na terapijo s steroidi, razvoja GI-GVHD in umrljivost, ki ni povezana s ponovitvijo bolezni (NRM, angl. *non relapse mortality*) v 6 mesecih neodvisno od ostalih kliničnih dejavnikov tveganja (npr. neujemanje HLA, starost, vrsta kondicioniranja ...) in bi bil potencialno lahko uporabljen kot pomoč pri izbiri ustreznega zdravljenja (6).

Iskanje novih potencialnih označevalcev GVHD so v zadnjem času olajšala različna informacijska orodja in razvoj masne spektrometrije, s katero so dokazali spektralne vzorce značilne za aGVHD, vendar ta tehnika ne omogoča prepoznavne posameznih proteinov. Poleg tega je delovno zahtevna in dolgotrajna, vendar pri njej nismo omejeni z dostopnostjo protiteles. Hkratno določitev različnih označevalcev omogočajo tudi proteinske mikromreže, pri katerih problem predstavljata predvsem visok signal ozadja in nespecifična vezava, kar lahko izboljšamo z uporabo drugih imunokemijskih metod za kvantifikacijo posameznega proteina. Najpogosteje se uporablja sendvič encimsko imunska metoda na trdi podlagi (ELISA, angl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Vendar na rezultat lahko vplivajo uporabljena protitelesa in kalibratorji, kar lahko vodi do razlik med rezultati testov različnih proizvajalcev (3,18,19).

CIRKULIRAJOČE ENDOTELIJSKE CELICE

Obetaven označevalec endotelijske poškodbe predstavljajo cirkulirajoče endotelijske celice (CEC), to so namreč zrele celice, ki se ob žilni poškodbi izplavijo v kri (20). Povišano število omenjenih celic je bilo dokazano pri mnogih stanjih, povezanih z žilno poškodbo, npr. miokardni infarkt in sladkorna bolezen (21,22). V primerjavi z zdravimi osebami je bila povišana koncentracija CEC dokazana tudi pri bolnikih s (hematološkimi) malignimi boleznimi (23). »

Kondicioniranje pred aloPKMC oziroma njegova vrsta (mieloablativno/nemieloablativno) prispeva k endotelijski poškodbi, kar posledično vodi v višje število CEC (24). Pri interpretaciji rezultatov pa moramo upoštevati še možen vpliv drugih dejavnikov, ki povzročijo poškodbo endotelijske celice, kot so npr. okužbe, zdravila (3). Koncentracija CEC ob vgnezditvi (angl. *engraftment*) je nižja pri tistih, pri katerih se kasneje razvije aGVHD, v primerjavi s tistimi, pri katerih do aGVHD ne pride (25). Poleg tega je bil dokazan statistično značilen porast CEC ob pojavu simptomov aGVHD (26). V drugi študiji so pri bolnikih z aGVHD ugotovili nižje število CEC kot pri tistih, ki aGVHD niso razvili, vendar so CEC določali ob vnaprej določenih časovnih točkah in torej ne nujno ob pojavu simptomov aGVHD (24). Zaradi hitrega spreminjanja števila CEC bi njihovo določanje ob pojavu simptomov aGVHD lahko služilo kot pomoč pri razlikovanju aGVHD od drugih zapletov, pri katerih endotelij ni vpleten (26).

Raziskav, ki bi ugotovljale povezavo med CEC in TA-TMA, je malo. V eni izmed študij je bilo sicer dokazano, da imajo bolniki z žilnimi zapleti po aloPKMC višje vrednosti CEC, pri čemer je glavna pomanjkljivost omenjene študije majhno število vključenih bolnikov (27).

Poleg CEC pa se v krvi nahajajo tudi endotelijske prekursorske celice (EPC). To so celice, ki sodelujejo pri nastanku novih žil ter regeneraciji poškodbe obstoječih žil in tako kažejo na regeneracijsko sposobnost žilja (28). Vloga EPC pri aGVHD in TA-TMA za zdaj še ni popolnoma pojasnjena. Dokazano je bilo, da je pri bolnikih z aGVHD koncentracija EPC ob diagnozi bolezni narasla, medtem ko je pri tistih, ki aGVHD niso razvili, ostala nizka. Prav tako pa je pri tistih s SR-GVHD koncentracija EPC ostala visoka, medtem ko je pri bolnikih, ki so se na zdravljenje odzvali, padla na začetno vrednost (29). Hkrati histološki dokazi kažejo, da se ob aGVHD v koži in gastrointestinalnem traktu poveča vaskularizacija. Ena izmed možnih razlag teh rezultatov predvideva, da endotelijska poškodba vodi v višje število EPC, kar privede do povečane vaskularizacije in nazadnje pride do poškodbe endotelijskih celic s strani aloreaktivnih limfocitov, kar povzroči porast CEC (30). Nasprotno pa je bil v drugi študiji porast EPC v periferni krvi 14. dan po aloPKMC v skupini bolnikov z aGVHD omejen (25). Na živalskem modelu pa je bilo dokazano, da injiciranje EPC po aloPKMC ublaži aGVHD (31).

CEC in EPC so v krvi zelo redke. Posledično je potrebna analiza velikega števila celic, za njihovo določanje pa se

lahko uporabljajo različne metode, ki sicer niso standardizirane. Pogosto uporabljena metoda za določanje CEC in EPC je pretočna citometrija, kjer prav tako različne raziskovalne skupine, poleg različnih načinov izolacije celic, za njihovo prepoznavo uporabljajo različne imunofenotipe (32). Nimamo namreč celičnega označevalca, ki bi bil popolnoma specifičen za omenjene celice, zato njihova prepoznava temelji na kombinaciji različnih označevalcev. Pogosto uporabljeni označevalci za prepoznavo CEC so CD31, CD34 in CD146, za prepoznavo EPC pa CD34, CD133 in CD309. Za izključitev nespecifičnih dogodkov je priporočljivo dodati še negativne označevalce, npr. CD45, in označevalce nukleinskih kislin ter označevalce živosti celic. Poleg tega pa je priporočljiva uporaba izotipske kontrole (28,33). Prav uporaba različnih metod in imunofenotipov v različnih študijah je lahko vzrok za različne rezultate dosedanjih študij, ki so proučevale CEC kot možen označevalec aGVHD. Kljub razlikam CEC ostajajo obetaven označevalec za prepoznavo aGVHD, bi pa bilo potrebno pred uporabo metode v vsakdanji klinični praksi standardizirati protokole za prepoznavo in kvantifikacijo teh celic. Prednost uporabe pretočne citometrije pri prepoznavi CEC in EPC predstavlja dejstvo, da lahko omenjene celice določamo hkrati (33).

ZUNAJCELIČNI VEZIKLI

Zunajcelični vezikli (EV, angl. *extracellular vesicle*) so sferične membranske strukture, ki lahko kažejo na celično poškodbo oziroma aktivacijo, pomembni pa so tudi pri medcelični komunikaciji (34). Glede na njihovo velikost EV delimo na eksosome (30–100 nm), mikrovezikle (100–1000 nm) in apoptotska telesca (1000–5000 nm). Sestavljajo jih različne biološke molekule, njihova sestava pa je odvisna od tega, iz katere celice so nastali in od (pato)fizioloških procesov v teh celicah. Ker se nahajajo v mnogih bioloških vzorcih, imajo kot nein vazivni označevalci z diagnostično in prognozično vlogo velik potencial pri različnih boleznih (35), med drugim tudi pri aGVHD, kjer je bilo dokazano povečano število endotelijskih EV (EEV), kar kaže na prisotnost endotelijske poškodbe (36,37). Poleg tega je bilo pri bolnikih z aGVHD dokazano povečano število eritrocitnih EV (Eri-EV), medtem ko pri bolnikih z okužbami do povečanja ni prišlo (38). Višja koncentracija celokupnega števila EV (TEV) in Eri-EV ob vgnezdenju je povezana z večjim tveganjem za razvoj aGVHD. Do

»

kazan je bil tudi vpliv kondicioniranja na število EV, saj je bila koncentracija EV pri mieloablativnem kondicioniranju v primerjavi z nemieloablativnim višja, pri čemer je bila pri nemieloablativnem kondicioniranju povezava med Eri-EV in aGVHD še močnejša (34). Pri bolnikih, pri katerih je bila poleg aGVHD prisotna tudi mikroangiopatija, je bilo povišanje Eri-EV največje. Prav tako je bila pri tistih, ki so preživeli TA-TMA, opažena dolgotrajno povišana koncentracija Eri-EV, vendar je bilo število sodelujočih, pri katerih je prišlo do mikroangiopatije, majhno (38,39).

Poleg določanja Eri-EV, EEV in TEV je bilo proučevano tudi izražanje posameznih antigenov na površini EV. Večje izražanje CD146 je povezano z večjim tveganjem, večje izražanje CD31 in CD140 α pa z manjšim tveganjem za razvoj aGVHD. CD146 je sicer označevalec endotelijskih celic, ki ga najdemo tudi na subpopulaciji limfocitov T (Th17). Čeprav je delež teh limfocitov pri aGVHD povišan, pa je za omenjeno stanje značilna tudi endotelijska poškodba. Ker je intenziteta fluorescence CD146 sorazmerna z intenziteto fluorescence nekaterih drugih endotelijskih označevalcev, avtorji predpostavljajo, da CD146 pozitivni EV izvirajo prav iz endotelijskih celic. CD31 je prav tako membranski antigen, ki se ne nahaja le na endotelijskih celicah, ampak tudi na trombocitih in na nekaterih drugih celicah (npr. limfocitih T ter APC). Med drugim preprečuje povečano aktivacijo limfocitov T, saj zviša aktivacijski prag T celičnega receptorja. CD140 α , znan tudi kot PDGFR α (angl. *platelet-derived growth factor receptor-alpha*), ima pomembno vlogo pri migraciji fibroblastov in celjenju ran oziroma obnovi poškodovanega tkiva (40).

Pomembno vlogo pri razvoju aGVHD imajo tudi limfociti T, ki se nahajajo v tarčnem organu. Antigena za prepoznavo teh tako imenovanih tkivnih spominskih limfocitov T (TRM, angl. *tissue resident memory*) sta CD69 in CD103, ki imata pomembno vlogo pri »zadrževanju« teh celic v tkivu, zato so omenjene celice v krvi zelo redke. Lahko pa v krvi določamo EV; njihova sestava je namreč odvisna od vrste in stanja celic, iz katerih izvirajo (41,42). Ugotovljeno je bilo, da aktivirane endotelijske celice lahko spodbudijo izražanje CD69 na limfocitih (41). Visoka serumska koncentracija CD69 pozitivnih EV pred aloPKMC je povezana z večjim tveganjem za razvoj aGVHD, pri čemer CD69 pozitivni EV soizražajo CD45, kar kaže na levkocitni izvor (42).

Metode za določanje EV za zdaj še niso standardizirane, na rezultate analize pa lahko vplivajo mnogi dejavniki. Še

posebej pomemben je način izolacije EV, ki se priporoča za zmanjšanje vpliva motečih snovi na analizo (34,43). Prav tako so za analizo EV možne različne metode. Metoda, ki omogoča tako prepoznavo različnih EV kot tudi njihovo kvantifikacijo, je pretočna citometrija (44). Določanje EV otežujeta predvsem njihova majhnost in dejstvo, da imajo na svoji površini manjšo količino proteinov, torej je izražanje označevalcev na njihovi površini šibko, zato za njihovo analizo potrebujemo občutljive pretočne citometre, njihova prepoznavna pa bolj kot na podlagi sipanja svetlobe temelji na uporabi fluorescenčnih označevalcev (45).

MIKRO RNA

Poleg membranskih struktur so za opravljanje (pato)fiziološke vloge EV zelo pomembne tudi snovi, ki se nahajajo znotraj EV. Med drugim se v notranjosti EV nahajajo tudi različne kodirajoče in nekodirajoče RNA. Pogosto proučevane so prav mikro RNA (miRNA), ki z vezavo na komplementarno informacijsko RNA (mRNA) preprečijo njeno izražanje. Proučevanje različnih miRNA, ki se nahajajo znotraj EV ali pa prosto v krvi, je predmet različnih študij, povezanih z aGVHD, tako v smislu iskanja označevalcev te bolezni kot tudi ugotavljanja patofizioloških mehanizmov bolezni (46).

Lia s sodelavci je dokazal, da kombinacija izražanja CD146 na EV, plazemska koncentracija sTNFR1 in izražanje miR-100 ter miR-194 v EV najbolje ločuje med bolniki z in brez aGVHD ob pojavu bolezni. miR-100 ima pomembno vlogo pri uravnavanju neovaskularizacije pri aGVHD in postopno narašča od PKMC do pojava aGVHD. Pri tistih, ki so kasneje razvili aGVHD, sta bili pred kliničnim pojavom bolezni v EV povišani tudi količina miR-194 in miR-155; slednja ima pomembno vlogo pri uravnavanju T celičnega odziva (43). Za serumsko vrednost miR-155 je bilo dokazano, da je sorazmerna s težo aGVHD (47).

Pogosto proučevana miRNA v povezavi z aGVHD je miR-146a, ki je pomembna pri uravnavanju izražanja TNF- α , zmanjšano izražanje te miRNA pa je povezano z resnostjo aGVHD (48). S slabšim preživetjem in z resnostjo bolezni je povezano tudi povišanje miR-181a v serumu ob pojavu simptomov aGVHD, medtem ko zmanjševanje miR-181a kaže na odgovor na zdravljenje. Poleg tega je bila dokazana značilna razlika med ravno izražanja miR-181 pri bolnikih »

z aGVHD in tistih z akutno zavrnitvijo presajene ledvice, zdravih osebah in bolnikih s sepso, kar kaže na specifičnost tega označevalca (49).

V različnih študijah je bilo sicer dokazanih še veliko drugih miRNA, ki predstavljajo možno tarčo za zdravljenje ali pa imajo potencialno napovedno, diagnostično ali prognozično vrednost za aGVHD in so večinoma vpletene v regulacijo imunskega odziva (3).

Tako kot EV lahko tudi miRNA določamo v različnih bioloških vzorcih, odvzetih na neinvaziven način. Pogosto uporabljena metoda za njihovo določitev je kvantitativna verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-qPCR). Njeni prednosti sta dobra občutljivost in specifičnost, poleg tega se omenjena metoda tudi sicer uporablja v diagnostiki in spremljanju hematoloških bolezni in je tako na voljo v vseh transplantacijskih centrih (50). Po drugi strani pa analizo miRNA omejuje predvsem dejstvo, da na rezultat lahko vplivajo različni predanalitični in analitični dejavniki, kot so izbor ustreznega matriksa, čas do analize, shranjevanje vzorca, način izolacije miRNA in izbor najustrežnejšega načina za normalizacijo rezultatov. Zato je tudi pri analizi miRNA pred uvedbo v vsakdanjo klinično prakso potrebno overjanje metode za njihovo določanje (51).

ZAKLJUČEK

Glavni razlog umrljivosti bolnikov po aloPKMC predstavlja aGVHD. Smrtnost je največja pri bolnikih, ki se ne odzovejo na zdravljenje, do česar najpogosteje pride pri GI-GVHD. Z enakimi znaki kot GI-GVHD pa se kaže tudi TA-TMA, ki je prav tako povezana s slabim preživetjem. Zaradi pomanjkanja enotnih diagnostičnih kriterijev in prekrivajočih se entitet med (SR)-GVHD in TA-TMA v različnih študijah uporabljajo različne načine prepoznavne omenjenih stanj, kar vodi v neenotno in prekrivajočo se opredelitev obeh zapletov. Pri postavitvi diagnoze nam sicer lahko pomaga histološka analiza prizadetega tkiva, pri čemer je biopsija invaziven postopek, ki je še posebej tvegan pri trombocitopeniji in zato pogosto neizvedljiv (52). Zato bi bili označevalci, ki bi jih lahko določali na neinvaziven način (npr. iz periferne krvi) in bi pomagali pri zgodnji prepoznavi (predvsem tistih bolnikov s težko obliko) aGVHD, zelo dobrodošli (3). Poleg iskanja označevalcev aGVHD pa je pomembno tudi iskanje označevalcev cGVHD. Tudi pri cGVHD so obetavni različni serumski in plazemski označevalci, miRNA, kot pomembni pa so se izkazali tudi nekateri celični označevalci, predvsem določanje različnih subpopulacij limfocitov (3).

Kljub številnim študijam bioloških označevalcev GVHD za zdaj še nobeden ni samostojno umeščen v smernice za klinično obravnavo bolnika. V posameznih transplantacijskih centrih se uporablja le določanje sST2 ter REG3 α . Glavni razlog je, da metode za določanje označevalcev še niso standardizirane, hkrati pa lahko na njihovo koncentracijo vplivajo različni dejavniki (npr. vrsta kondicioniranja in uporaba profilaktičnega zdravljenja). To ob pomanjkanju enotnih diagnostičnih kriterijev in razlik med vključitvenimi kriteriji v različnih študijah omejuje njihovo uporabo v vsakdanji klinični praksi. Zato je poleg odkrivanja novih označevalcev v prihodnosti nujno tudi delo na standardizaciji laboratorijskih metod za njihovo določanje in klinični validaciji odkritih označevalcev oziroma njihovih kombinacij, pri čemer je nujno sodelovanje med zdravniki in laboratorijskimi strokovnjaki (5,53).



LITERATURA

1. Zver S, Škerget M. Bolezni krvi in krvotvornih organov. In: Košnik M, Štajer D, Jug B, Kocjan T, Koželj M, eds. *Interna medicina*. 6. izd. Ljubljana: Buča; 2022. p. 1224–1230.
2. Bolnik po presaditvi krvotvornih matičnih celic v ambulanti družinskega zdravnika - Združenje hematologov Slovenije [Internet]. 2022 [assessed on 15.11.2023]. Available from: <https://zhs.si/bolnik-po-presaditvi-krvotvornih-maticnih-celic-v-ambulantni-druzinskega-zdravnika/>
3. Giaccone L, Faraci DG, Butera S, Lia G, Di Vito C, Gabrielli G, et al. Biomarkers for acute and chronic graft versus host disease: state of the art. *Expert Rev Hematol*. 2021;14(1):79–96.
4. Malard F, Holler E, Sandmaier BM, Huang H, Mohty M. Acute graft-versus-host disease. *Nat Rev Dis Primer*. 2023;9(1):1–18.
5. Bidgoli A, DePriest BP, Saatloo MV, Jiang H, Fu D, Paczesny S. Current definitions and clinical implications of biomarkers in graft-versus-host disease. *Transplant Cell Ther*. 2022;28(10):657–66.
6. Levine JE, Braun TM, Harris AC, Holler E, Taylor A, Miller H, et al. A prognostic score for acute graft-versus-host disease based on biomarkers: a multicenter study. *Lancet Haematol*. 2015;2(1):e21–9.
7. Dvorak CC, Higham C, Shimano KA. Transplant-associated thrombotic microangiopathy in pediatric hematopoietic cell transplant recipients: a practical approach to diagnosis and management. *Front Pediatr*. 2019;7:133.
8. Lazana I. Transplant-associated thrombotic microangiopathy in the context of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: where we stand. *Int J Mol Sci*. 2023;24(2):1159.
9. Lufi T, Dietrich S, Falk C, Conzelmann M, Hess M, Benner A, et al. Steroid-refractory GVHD: T-cell attack within a vulnerable endothelial system. *Blood*. 2011;118(6):1685–92.
10. Neidemire-Colley L, Robert J, Ackaoui A, Dorrance AM, Guimond M, Ranganathan P. Role of endothelial cells in graft-versus-host disease. *Front Immunol*. 2022;13:1033490.
11. Ferrara JLM, Chaudhry MS. GVHD: biology matters. *Blood Adv*. 2018;2(22):3411–7.
12. Srinagesh HK, Ferrara JLM. MAGIC biomarkers of acute graft-versus-host disease: biology and clinical application. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2019;32(4):101111.
13. Ferrara JLM, Harris AC, Greenson JK, Braun TM, Holler E, Teshima T, et al. Regenerating islet-derived 3- α is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood*. 2011;118(25):6702–8.
14. Zeiser R, von Bubnoff N, Butler J, Mohty M, Niederwieser D, Or R, et al. Ruxolitinib for glucocorticoid-refractory acute graft-versus-host disease. *N Engl J Med*. 2020;382(19):1800–10.
15. Socie G, Niederwieser D, Von Bubnoff N, Mohty M, Szer J, Or R, et al. Prognostic value of blood biomarkers in steroid-refractory/dependent acute graft-vs-host disease: A REACH2 analysis. *Blood*. 2023;141(22):2771–2779.
16. Zeisbrich M, Becker N, Benner A, Radujkovic A, Schmitt K, Beimler J, et al. Transplant-associated thrombotic microangiopathy is an endothelial complication associated with refractoriness of acute GVHD. *Bone Marrow Transplant*. 2017;52(10):1399–405.
17. Major-Monfried H, Renteria AS, Pawarode A, Reddy P, Ayuk F, Holler E, et al. MAGIC biomarkers predict long-term outcomes for steroid-resistant acute GVHD. *Blood*. 2018;131(25):2846–55.
18. Paczesny S. Discovery and validation of graft-versus-host disease biomarkers. *Blood*. 2013;121(4):585–94.
19. Chen J, Xiao P, Song D, Song D, Chen Z, Li H. Growth stimulation expressed gene 2 (ST2): Clinical research and application in the cardiovascular related diseases. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:1007450.
20. Kraan J, Strijbos MH, Sieuwerts AM, Foekens JA, Bakker M a. D, Verhoef C, et al. A new approach for rapid and reliable enumeration of circulating endothelial cells in patients. *J Thromb Haemost*. 2012;10(5):931–9.
21. Farinacci M, Krahn T, Dinh W, Volk HD, Düngen HD, Wagner J, et al. Circulating endothelial cells as biomarker for cardiovascular diseases. *Res Pract Thromb Haemost*. 2019;3(1):49–58.
22. Ahmed FW, Rider R, Glanville M, Narayanan K, Razvi S, Weaver JU. Metformin improves circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells in type 1 diabetes: MERIT study. *Cardiovasc Diabetol*. 2016;15(1):116.
23. Zahran AM, Aly SS, Altayeb HA, Ali AM. Circulating endothelial cells and their progenitors in acute myeloid leukemia. *Oncol Lett*. 2016;12(3):1965–70.
24. Beije N, Versluis J, Kraan J, Gratama JW, Sleijfer S, Cornelissen JJ. Circulating endothelial cell enumeration demonstrates prolonged endothelial damage in recipients of myeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2015;100(6):e246–9.
25. Takamatsu A, Nakashima Y, Haji S, Tsuda M, Masuda T, Kimura D, et al. Circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells as potential predictors of acute GVHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol*. 2022;109(2):146–53.
26. Almic C, Skert C, Bruno B, Bianchetti A, Verardi R, Di Palma A, et al. Circulating endothelial cell count: a reliable marker of endothelial damage in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2017;52(12):1637–42.
27. Touzot F, Moshous D, Cros G, Frange P, Chomton M, Frémond ML, et al. Circulating endothelial cells as markers of endothelial dysfunction during hematopoietic stem cell transplantation for pediatric primary immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(5):1203–6.
28. Lanuti P, Rotta G, Almic C, Avvisati G, Budillon A, Doretto P, et al. Endothelial progenitor cells, defined by the simultaneous surface expression of VEGFR2 and CD133, are not detectable in healthy peripheral and cord blood. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol*. 2016;89(3):259–70.
29. Medinger M, Heim D, Gerull S, Halter J, Krenger W, Buser A, et al. Increase of endothelial progenitor cells in acute graft-versus-host disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukaemia. *Leuk Res*. 2016;47:22–5.



30. Lia G, Giaccone L, Leone S, Bruno B. Biomarkers for early complications of endothelial origin after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Do they have a potential clinical role? *Front Immunol.* 2021;12:641427.
31. Wang W, Ye Y, Du Y, Xu Z, Yuan K, Wang Y, et al. EPC infusion ameliorates acute graft-versus-host disease-related endothelial injury after allogeneic bone marrow transplantation. *Front Immunol.* 2022;13:1019657.
32. Almici C, Neva A, Skert C, Bruno B, Verardi R, Di Palma A, et al. Counting circulating endothelial cells in allo-HSCT: an ad hoc designed polychromatic flowcytometry-based panel versus the CellSearch system. *Sci Rep.* 2019;9:87.
33. Fadini GP, Baesso I, Albiero M, Sartore S, Agostini C, Avogaro A. Technical notes on endothelial progenitor cells: ways to escape from the knowledge plateau. *Atherosclerosis.* 2008;197(2):496–503.
34. Carneiro TX, Marrese DG, dos Santos MG, Gonçalves MV, Novis YAS, Rizzatti EG, et al. Circulating extracellular vesicles as a predictive biomarker for acute graft-versus-host disease. *Exp Hematol.* 2023;117:15–23.
35. György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(16):2667–88.
36. Pihusch V, Rank A, Steber R, Pihusch M, Pihusch R, Toth B, et al. Endothelial cell-derived microparticles in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Transplantation.* 2006;81(10):1405–9.
37. Wu Q, Chen H, Fang J, Xie W, Hong M, Xia L. Elevated Fas/FasL system and endothelial cell microparticles are involved in endothelial damage in acute graft-versus-host disease: a clinical analysis. *Leuk Res.* 2012;36(3):275–80.
38. Rank A, Nieuwland R, Toth B, Pihusch V, Delker R, Hiller E, et al. Microparticles for diagnosis of graft-versus-host disease after allogeneic stem transplantation. *Transplantation.* 2011;92(2):244.
39. Gavriilaki E, Sakellari I, Anyfanti P, Batsis I, Vardi A, Bousiou Z, et al. Assessment of endothelial injury and pro-coagulant activity using circulating microvesicles in survivors of allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Int J Mol Sci.* 2020;21(24):9768.
40. Lia G, Brunello L, Bruno S, Carpanetto A, Omedè P, Festuccia M, et al. Extracellular vesicles as potential biomarkers of acute graft-vs-host disease. *Leukemia.* 2018;32(3):765–73.
41. Wienke J, Veldkamp SR, Struijf EM, Yousef Yengej FA, van der Wal MM, van Royen-Kerkhof A, et al. T cell interaction with activated endothelial cells primes for tissue-residency. *Front Immunol.* 2022;13:827786.
42. Storci G, Barbato F, Ricci F, Tazzari PL, De Matteis S, Tomassini E, et al. Pre-transplant CD69+ extracellular vesicles are negatively correlated with active ATLG serum levels and associate with the onset of GVHD in allogeneic HSCT patients. *Front Immunol.* 2022;13:1058739.
43. Lia G, Di Vito C, Bruno S, Tapparo M, Brunello L, Santoro A, et al. Extracellular vesicles as biomarkers of acute graft-vs.-host disease after haploidentical stem cell transplantation and post-transplant cyclophosphamide. *Front Immunol.* 2022;12:816231.
44. Marchisio M, Simeone P, Bologna G, Ercolino E, Pierdomenico L, Pieragostino D, et al. Flow cytometry analysis of circulating extracellular vesicle subtypes from fresh peripheral blood samples. *Int J Mol Sci.* 2020;22(1):48.
45. Stoner SA, Duggan E, Condello D, Guerrero A, Turk JR, Narayanan PK, et al. High sensitivity flow cytometry of membrane vesicles. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol.* 2016;89(2):196–206.
46. Sevcikova A, Fridrichova I, Nikolaieva N, Kalinkova L, Omelka R, Martiniakova M, et al. Clinical significance of microRNAs in hematologic malignancies and hematopoietic stem cell transplantation. *Cancers.* 2023;15(9):2658.
47. Xie LN, Zhou F, Liu XM, Fang Y, Yu Z, Song NX, et al. Serum microRNA155 is increased in patients with acute graft-versus-host disease. *Clin Transplant.* 2014;28(3):314–23.
48. Stickel N, Prinz G, Pfeifer D, Hasselblatt P, Schmitt-Graeff A, Follo M, et al. MiR-146a regulates the TRAF6/TNF-axis in donor T cells during GVHD. *Blood.* 2014;124(16):2586–95.
49. Xie L, Zhou F, Liu X, Fang Y, Yu Z, Song N, et al. Serum microRNA181a: Correlates with the intracellular cytokine levels and a potential biomarker for acute graft-versus-host disease. *Cytokine.* 2016;85:37–44.
50. Pitea M, Canale F, Porto G, Verduci C, Utano G, Policastro G, et al. The role of microRNA in graft-versus-host-disease: a review. *Genes.* 2023;14:1796.
51. Lampignano R, Klotten V, Krahn T, Schlange T. Integrating circulating miRNA analysis in the clinical management of lung cancer: Present or future? *Mol Aspects Med.* 2020;72:100844.
52. Jodele S, Sabulski A. Reeling in complement in transplant-associated thrombotic microangiopathy: You're going to need a bigger boat. *Am J Hematol.* 2023;98(4):S57–73.
53. Iacobescu M, Pop C, Uifălean A, Mogoșan C, Cenariu D, Zdrengea M, et al. Unlocking protein-based biomarker potential for graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplants. *Front Immunol.* 2024;15:1327035.