

Иммунный гемолиз у больного после повторной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток: клинический случай и обзор литературы

И. В. Образцов, А. П. Васильева

ФГБУ ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, Москва

Контакты: Игорь Владимирович Образцов igor_obraztsov@bk.ru

Гемолитическая анемия является серьезным, угрожающим жизни осложнением трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), развивающимся в результате продукции антиэритроцитарных антител как алло-, так и аутоиммунной природы. В отличие от аллоиммунной гемолитической анемии, механизмы развития аутоиммунного гемолиза в посттрансплантационном периоде до сих пор изучены недостаточно. Этим объясняется отсутствие стандартизованных протоколов лечения случаев рефрактерного течения и упорных рецидивов гемолитической анемии. В работе представлен разбор клинического случая рефрактерного аутоиммунного гемолиза у ребенка с ювенильным миеломоноцитарным лейкозом после повторной ТГСК, а также обзор современных подходов к классификации, диагностике и терапии иммунного гемолиза у посттрансплантационных пациентов.

Ключевые слова: гемолиз, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, ювенильный миеломоноцитарный лейкоз, циклофосфамид, ритуксимаб, бортезомиб, экулизумаб

Immune haemolysis in a patient after haematopoietic stem cell retransplantation: case report and a literature review

I. V. Obratsov, A. P. Vasilieva

Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev, Ministry of Health of Russia, Moscow

Haemolytic anaemia is a serious life-threatening complication that follows haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) as a result of allo- or autoimmune derived anti-erythrocyte antibodies production. Unlike alloimmune haemolytic anaemia, mechanisms of autoimmune haemolysis in posttransplant period are poorly understood that explains the lack of standardized protocols for treatment of refractory or recurrent cases. We present here a report of a case of refractory autoimmune haemolysis in a patient with juvenile myelomonocytic leukemia after re-HSCT, as well as a review of current approaches to classification, diagnosis and therapy of immune haemolysis in posttransplant patients.

Key words: haemolysis, haematopoietic stem cell transplantation, juvenile myelomonocytic leukemia, cyclophosphamide, rituximab, bortezomib, eculizumab

Введение

Иммунный гемолиз является одним из серьезных осложнений аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). При этом аллоиммунный гемолиз после трансплантации с групповой несовместимостью между донором и реципиентом гемопоэтических стволовых клеток представляет собой естественное прогнозируемое осложнение, в то время как аутоиммунный гемолиз встречается достаточно редко (3 % аллогенных ТГСК, по данным F.E. Chen [4], 6 % — по данным T.A. O'Brien [12]). В связи с малой распространенностью патогенез аутоиммунной гемолитической анемии (АИГА) не полностью ясен; отсутствуют стандартизованные подходы к терапии. Высокая летальность (до 72 % при 5-летнем периоде наблюдения [12]), сопровождающая случаи АИГА в посттрансплантационном периоде, определяет актуальность данной проблемы.

Патофизиология

В процессе изучения проблемы трансплантации стволовых клеток внимание исследователей было сконцентрировано преимущественно на проблеме клеточного иммунитета [15, 19], поскольку именно алло-реактивные Т-лимфоциты играют ключевую роль в развитии реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ). Гуморальное звено иммунитета (в частности, иммунные взаимодействия с антигенами АВ0-системы), напротив, изучено менее подробно [20].

Несовместимость по группе крови и резус-фактору в большинстве случаев приводит к развитию аллоиммунного гемолиза, как правило возникающего в период смены групповой принадлежности. В свою очередь, механизм развития аутоиммунного гемолиза основан на синтезе аутоантител против донорских эритроцитарных антигенов. Однако патогенез аутоиммунного гемолиза до сих пор не известен окончательно. Так,

L. Xu et al. показали значимую роль Th17-лимфоцитов в развитии АИГА — повышенное содержание Th17-клеток и уровень интерлейкина (ИЛ) 17 определяли активность процесса (образование антиэритроцитарных антител, количество гемоглобина, сывороточный С3-компонент, а также активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ)). В исследованиях на лабораторных животных было показано, что адоптивный перенос Th17-клеток активировал антиэритроцитарный антителы; а *in vivo* нейтрализация ИЛ-17 препятствовала развитию АИГА [22].

Y. Iuchi et al. выявили значимость гена супероксиддисмутазы 1 (СОД 1) в подавлении синтеза антиэритроцитарных антител. В эксперименте на мышах линии NZB (New Zealand Black), склонных к развитию АИГА, после трансгенного переноса СОД 1 определялось снижение смертности и уменьшение продукции антиэритроцитарных антител [10].

В работе С. Toriani-Terenzi et al. подробно охарактеризована продукция цитокинов и пролиферативный ответ при АИГА. Авторы показали увеличение базальной продукции ИЛ-4 и снижение интерферона- γ по сравнению с контрольной группой здоровых лиц. В исследовании при этом было выявлено нарушение баланса между ИЛ-10 и ИЛ-12, что свидетельствует о подавлении Th1-ответа и избыточной активации Th2-ответа; а упомянутые цитокины могут служить терапевтическими «мишенями» [21].

Остается неясным, существуют ли специфические особенности патогенеза АИГА у пациентов после ТГСК, поэтому для экстраполяции имеющихся на сегодняшний день данных необходимо проведение дальнейших сравнительных исследований.

Критерии диагноза и классификация

Основанием для постановки диагноза АИГА у пациента служат следующие клинико-лабораторные симптомы: гепатоспленомегалия, положительный антиглобулиновый тест (проба Кумбса), повышенное содержание билирубина и ЛДГ, значимое снижение содержания гемоглобина и гаптоглобина, усиление трансфузионной зависимости. При этом для подтверждения диагноза иммунной природы гемолиза важно исключить другие возможные причины (лекарственную токсичность, вирусную нагрузку, микроангиопатию) [17]. На ранних сроках после ТГСК наиболее вероятно течение аллоиммунного гемолиза, ассоциированного с изменением группы крови, а гемолитическая анемия на поздних сроках или при совместимой по группе крови пересадке имеет аутоиммунный генез. Существует также мнение о том, что АИГА является одним из проявлений хронической РТПХ [9, 18].

Представляет интерес классификация АИГА, основанная на температурной реактивности антител при агглютинации в непрямом антиглобулиновом тесте. Принято выделять тепловые (IgG, 20 °С), холодные (IgM, 37 °С) и двухфазные гемолизины. Клинически

значимая АИГА обычно сопровождается выявлением тепловых IgG-аутоантител [2]. Опсонизация эритроцитов IgG приводит к стремительному развитию жизнеугрожающего гемолиза, развивающегося за счет взаимодействия с Fc-рецепторами или рецепторами комплемента эффекторных фагоцитов (преимущественно в печени и селезенке) [3].

F. Chen et al. проанализировали 9 случаев АИГА у посттрансплантационных пациентов [4]. Из них 5 случаев сопровождались выявлением тепловых и 4 — холодных гемолизин. При этом в группе пациентов с выделенными тепловыми гемолизинами РТПХ отсутствовала, 3 из 4 больных с холодным гемолизом имели клинически значимую РТПХ. С другой стороны, рецидив основного заболевания констатирован в 3 из 5 случаев теплового гемолиза и в 1 из 4 случаев холодного. Однако небольшое число обследованных пациентов и неоднородность течения заболевания не позволяют делать однозначные выводы.

Лечение

Лечение АИГА направлено в конечном итоге на сохранение эритроцитов и стойкое повышение содержания гемоглобина. В отличие от аллоиммунного гемолиза, обычно легко поддающегося коррекции, АИГА, как правило, требует агрессивного подхода к терапии.

Основным препаратом в лечении посттрансплантационного иммунного гемолиза являются глюкокортикостероиды (ГКС); рекомендуется использовать метилпреднизолон. Имеются рекомендации об использовании препарата в стартовой дозе 1–2 мг/кг/сут, однако при агрессивном течении возможно проведение пульс-терапии в дозе 10–20 мг/кг/сут в течение 3 дней с последующим снижением до поддерживающей дозировки. Общая длительность лечения может варьировать, но при высоком риске реактивации процесса требуется продолжение введения ГКС в дозе 1–1,5 мг/кг/сут после исчезновения клинико-лабораторных признаков гемолиза в течение 3–12 мес [11]. Внутривенные иммуноглобулины (ВВИГ) также нашли широкое применение при АИГА; однако, по данным М. Stowther et al. и G. Flores et al. [6, 8], их эффективность выше при «тепловой» АИГА. На текущий момент применение ритуксимаба — моноклонального антитела к CD20-антигену на поверхности В-лимфоцитов, хорошо зарекомендовавшего себя при лечении многих аутоиммунных процессов, — также отнесено к терапии первой линии при посттрансплантационной АИГА [7, 23].

К сожалению, во многих случаях использование терапии первой линии в составе ГКС, ВВИГ, ритуксимаба не дает стойкого клинического эффекта, а иногда ответ и вовсе отсутствует. Поэтому применяется терапия 2-й линии, включающая цитостатические препараты (азатиоприн, циклофосфамид), иммуносупрессанты

(микофенолата мофетил (ММФ), циклоспорин А), таргетные препараты (бортезомиб, алемтузумаб, экулизумаб), спленэктомия и лучевую терапию [1, 5, 16]. На сегодняшний день накоплен ограниченный опыт, поэтому оценка клинической эффективности какого-либо из подходов остается затруднительной.

Прогноз

Развитие АИГА значительно сокращает вероятную продолжительность жизни посттрансплантационного больного. По данным Т.А. О'Вриен et al. [12], годовая выживаемость пациентов с развившейся АИГА составила 32 %, в то время как тот же показатель у больных без АИГА составил 69 %; однако разница оказалась статистически не значимой ($p = 0,2$). Показатели 5-летней выживаемости составили 28 % и 57 % соответственно ($p = 0,2$) (рис. 1).

Клинический случай

Мальчику в возрасте 5 месяцев (июнь 2011 г.) был установлен диагноз: ювенильный миеломоноцитарный лейкоз, моносомия 7. Ребенок госпитализирован в ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева в марте 2012 г. для выполнения аллогенной ТГСК. Проведено кондиционирование в дни с -7 по -1 в составе: треоосульфат 42 г/м^2 , флударабин 150 мг/м^2 ; алкеран 140 мг/м^2 ; АТГАМ 90 мг/кг ; выполнена трансплантация костного мозга от неродственного донора. Приживление лейкоцитарного ростка констатировано на $+16$ -й день. Профилактика РТПХ – такролимус, ММФ.

Посттрансплантационный период осложнился течением РТПХ (кожная и кишечная формы, III стадия), потребовавшей назначения ГКС. С $+47$ -го дня начала проявляться гипофункция трансплантата, вероятно, иммунного генеза. По данным химеризма костного мозга на $+60$ -й день 54 % $CD3^+$ -клеток линии и 83 % $CD34^+$ -клеток имели донорское происхождение. В связи с тенден-

цией к отторжению трансплантата и высоким риском рецидива было принято решение о проведении повторной ТГСК от того же донора.

Из-за тяжелого соматического статуса пациента проведено кондиционирование со сниженной интенсивностью: флударабин 150 мг/м^2 , цитозар 10 г/м^2 , вепезид 1500 мг/м^2 . Профилактика острой реакции РТПХ: такролимус, ММФ. Повторная ТГСК выполнена на $+96$ -е сутки от первой. Характеристика трансплантата: $CD34^+ - 5,2 \times 10^6/\text{кг}$, $CD3^+ - 0,3 \times 10^8/\text{кг}$. Приживление трансплантата констатировано на $+22$ -й день.

Ранний посттрансплантационный период осложнился течением РТПХ II стадии (кожная и кишечная формы). Пациент получал такролимус под контролем концентрации, метилпреднизолон 1 мг/кг , будесонид 6 мг/сут , ММФ $1,5 \text{ г/сут}$ с эффектом.

Через 7 мес после повторной ТГСК отмечена реактивация кишечной РТПХ, в связи с чем была эскалирована доза ГКС. Клинический эффект достигнут не был, поэтому была произведена замена ММФ на еженедельные введения циклофосфамида 200 мг/м^2 (всего 10 введений) и инфузии мезенхимальных стволовых клеток (всего 10 инфузий) с неполным ответом со стороны РТПХ.

Через 13 мес после повторной ТГСК зафиксировано снижение гемоглобина и гаптоглобина, появление ретикулоцитоза, нарастание ЛДГ и положительная проба Кумбса. Перечисленные признаки укладывались в критерии аутоиммунного гемолиза, охарактеризованные выше (подробно см. в [17]); таким образом, состояние было расценено как течение АИГА. Пациенту выполнено 2 введения ритуксимаба (в режиме 1 раз в неделю), достигнут хороший ответ в виде роста гемоглобина, отрицательной пробы Кумбса (рис. 2).

Однако через месяц после введения ритуксимаба состояние снова ухудшилось клинически и лабораторно: появилась умеренно выраженная гепатоспленомегалия, отмечено падение уровня гемоглобина за сутки со 129 до 92 г/л . Состояние расценено как реактивация АИГА, в связи с чем больному введена пульс-доза метилпреднизолона: 20 мг/кг/сут в течение 2 дней с последующим снижением до 10 мг/кг/сут . Также пациент получал высокодозные ВВИГ в течение 3 дней. Эффект от проводимой терапии не достигнут; начаты введения ритуксимаба. Несмотря на проводимую терапию, состояние пациента продолжало ухудшаться. Отмечалось дальнейшее снижение содержания гемоглобина и эритроцитов в динамике; проба Кумбса оставалась положительной. Уровень ЛДГ достиг 1000 ед/л . Появились признаки диссеминированного сосудистого свертывания (ДВС) крови.

Констатировано крайне агрессивное течение аутоиммунного гемолиза, начат курс терапии бортезомибом $1,5 \text{ мг/м}^2/\text{сут}$ (4 введения с интервалом 2 дня) с целью подавления продукции антиэритроцитарных антител плазматическими клетками. Учитывая течение ДВС-синдрома, начаты введения экулизумаба 150 мг/сут (всего

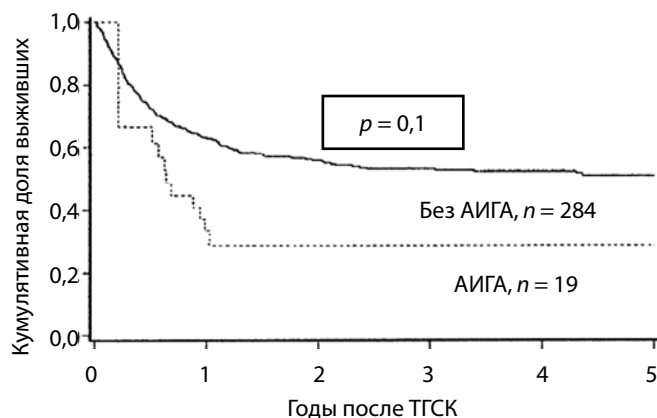


Рис. 1. Вероятность дожития у пациентов после аллогенной ТГСК, осложненной или не осложненной развитием АИГА в посттрансплантационном периоде [12]

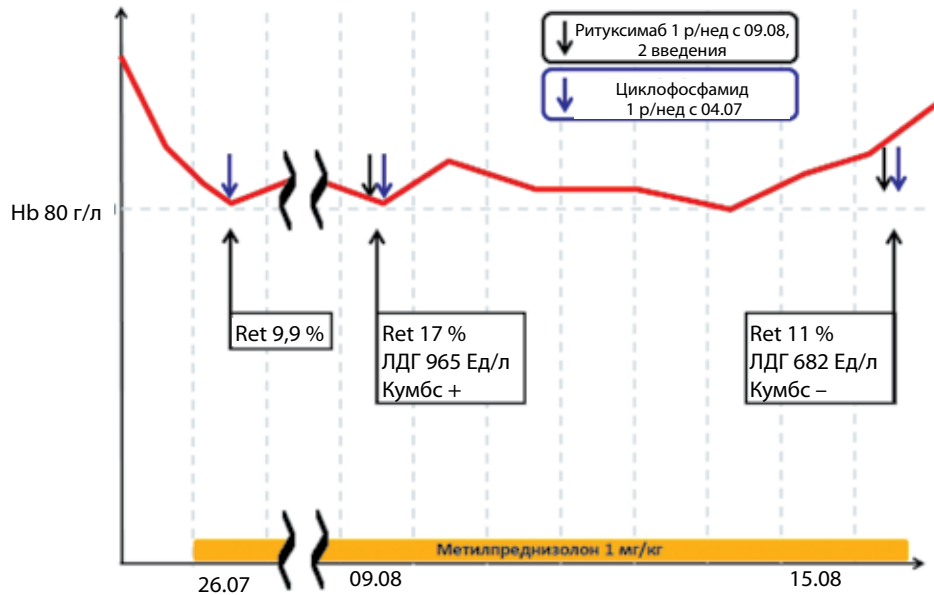


Рис. 2. Содержание гемоглобина, лабораторные показатели гемолитической анемии, терапия во время дебюта АИГА

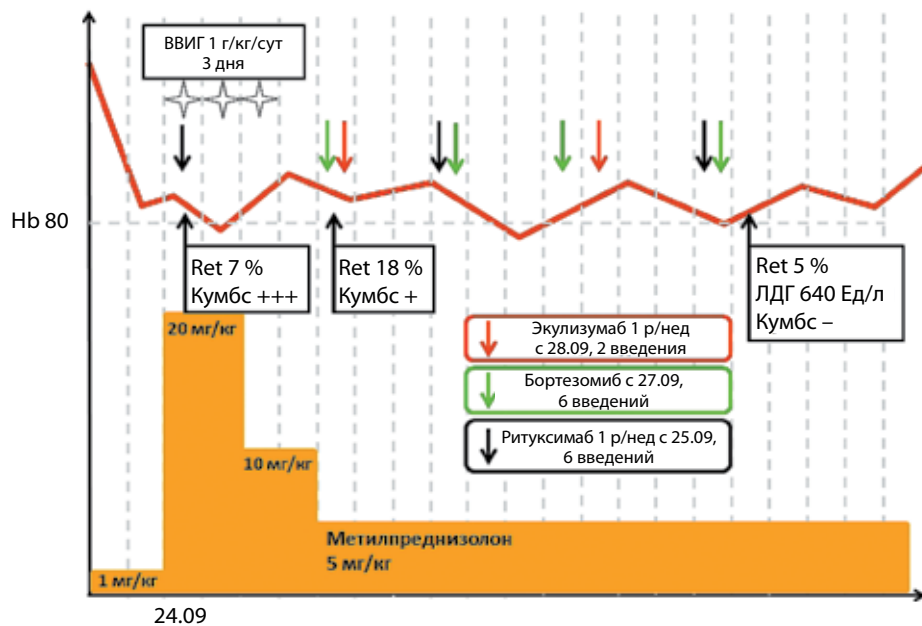


Рис. 3. Содержание гемоглобина, лабораторные показатели гемолитической анемии, терапия во время реактивации АИГА

2 введения) для предотвращения избыточной активации системы комплемента аутоантителами. На фоне описанной терапии отмечена тенденция к нормализации лабораторных показателей гемолитической анемии в виде снижения содержания ЛДГ, отрицательной пробы Кумбса, снижения ретикулоцитоза до 5%, стабилизации показателей красной крови (рис. 3).

Однако при дальнейшем наблюдении отмечалось персистирование повышенного содержания ретикулоцитов, что является признаком сохраняющегося латентного течения АИГА.

Обсуждение

В работе представлен клинический случай развития АИГА у пациента спустя 13 мес после повторной ТГСК. Пусковым фактором могла служить массивная иммуносупрессия, проводимая в связи с рефрактерным течением РТПХ, что согласуется с данными литературы [13] об избыточной активации В-клеток на фоне подавления Т-клеточного звена, в частности дисбаланса между Th1- и Th2-системами [21] и стимуляции Th17-клеток [22]. При этом клинико-лабораторные признаки аутоиммунного гемолитического процесса оказались

компенсированы после применения ритуксимаба и циклофосфида. Однако реактивация АИГА, рефрактерной к конвенциональной терапии высокодозными ГКС, ВВИГ и к CD20-деплеции ритуксимабом, говорит о предшествующем латентном течении аутоиммунного процесса во время «светлого промежутка». Отсутствие эффекта от лечения заставляет предположить, что ключевую роль в продукции антиэритроцитарных антител в описанном случае сыграли долгоживущие плазматические клетки, которые не несут CD20-антиген, персистирующие в тканях, как описывают авторы [14]. Аутоантитела, связываясь с эритроцитами, могли активировать каскад системы комплемента по классическому пути, что, вероятно, привело к развитию ДВС-синдрома. Бортезомиб способствовал инактивации тканевых плазмочитов, продуцирующих антиэритроцитарные антитела; введение экулизумаба позволило прервать разрушение эритроцитов, опосредованное сис-

темой комплемента. В результате удалось достигнуть частичного клинико-лабораторного ответа на терапию и стабилизации состояния больного. Однако повышенное содержание ретикулоцитов свидетельствует о латентном течении процесса с риском реактивации.

Заключение

АИГА — грозное осложнение посттрансплантационного периода, способное проявиться на любых сроках после ТГСК. Терапия первой линии, основанная на введении ГКС, ВВИГ и ритуксимаба, зачастую оказывается неэффективной; поэтому целесообразны разработка и внедрение терапевтических подходов, направленных на ингибирование различных аспектов патогенеза АИГА. Вероятный риск развития АИГА требует пристального внимания гематологов и педиатров, имеющих дело с посттрансплантационными пациентами.

ЛИТЕРАТУРА

- Alba P., Karim M.Y., Hunt B.J. Mycophenolate mofetil as a treatment for autoimmune haemolytic anaemia in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2003;12(8):633–5.
- Bass G.F., Tuscano E.T., Tuscano J.M. Diagnosis and classification of autoimmune hemolytic anemia. *Autoimmun Rev* 2014;13(4–5):560–4.
- Baudino L., Nimmerjahn F., Azeredo da Silveira S. et al. Differential contribution of three activating IgG Fc receptors (FcγRI, FcγRIII, and FcγRIV) to IgG2a- and IgG2b-induced autoimmune hemolytic anemia in mice. *J Immunol* 2008;180(3):1948–53.
- Chen F.E., Owen I., Savage D. et al. Late onset haemolysis and red cell autoimmunisation after allogeneic bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplant* 1997;19(5):491–5.
- Cheung W.W., Hwang G.Y., Tse E., Kwong Y.L. Alemtuzumab induced complete remission of autoimmune hemolytic anemia refractory to corticosteroids, splenectomy and rituximab. *Haematologica* 2006;91(5 Suppl):ECR13.
- Crowther M., Chan Y.T., Garbett I.K. et al. Evidence-based focused review of the treatment of idiopathic warm immune hemolytic anemia in adults. *Blood* 2011;118(15):4036–40.
- Faraci M., Zecca M., Pillon M. et al. Autoimmune hematological diseases after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children: an Italian multicenter experience. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20(2):272–8.
- Flores G., Cunningham-Rundles C., Newland A.C., Bussel J.B. Efficacy of intravenous immunoglobulin in the treatment of autoimmune hemolytic anemia; results in 73 patients. *Am J Hematol* 1993;44(4):237–42.
- Godder K., Pati A.R., Abhyankar S.H. et al. De novo chronic graft-versus-host disease presenting as hemolytic anemia following partially mismatched related donor bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplant* 1997;19(8):813–7.
- Iuchi Y., Kibe N., Tsunoda S. et al. Implication of oxidative stress as a cause of autoimmune hemolytic anemia in NZB mice. *Free Radic Biol Med* 2010;48(7):935–44.
- Michel M. Classification and therapeutic approaches in autoimmune hemolytic anemia: an update. *Expert Rev Hematol* 2011;4(6):607–18.
- O'Brien T.A., Eastlund T., Peters C. et al. Autoimmune haemolytic anaemia complicating haematopoietic cell transplantation in paediatric patients: high incidence and significant mortality in unrelated donor transplants for non-malignant diseases. *Br J Haematol* 2004;127(1):67–75.
- O'Connell N., Goodyer M., Gleeson M. et al. Successful treatment with rituximab and mycophenolate mofetil of refractory autoimmune hemolytic anemia post-hematopoietic stem cell transplant for dyskeratosis congenita due to TINF2 mutation. *Pediatr Transplant* 2014;18(1):E22–4.
- Perez-Andres M., Paiva B., Nieto W.G. et al.; Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of MBL. Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. *Cytometry B Clin Cytom* 2010;78 Suppl 1:S47–60.
- Reddy P., Ferrara J.L. Immunobiology of acute graft-versus-host disease. *Blood Rev* 2003;17:187–94.
- Saha M., Ray S., Kundu S., Chakrabarti P. Pure red cell aplasia following autoimmune hemolytic anemia: an enigma. *J Postgrad Med* 2013;59(1):51–3.
- Sanz J., Arriaga F., Montesinos P. et al. Autoimmune hemolytic anemia following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adult patients. *Bone Marrow Transplant* 2007;39(9):555–61.
- Sevilla J., González-Vicent M., Madero L., Díaz M.A. Acute autoimmune hemolytic anemia following unrelated cord blood transplantation as an early manifestation of chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 2001;28(1):89–92.
- Shlomchik W.D. Antigen presentation in graft-vs-host disease. *Exp Hematol* 2003;31(12):1187–97.
- Stussi G., Halter J., Schanz U., Seebach J.D. ABO-histo blood group incompatibility in hematopoietic stem cell and solid organ transplantation. *Transfus Apher Sci* 2006;35(1):59–69.
- Toriani-Terenzi C., Pozzetto U., Bianchi M., Fagiolo E. Cytokine network in autoimmune haemolytic anaemia: new probable targets for therapy. *Cancer Detect Prev* 2002;26(4):292–8.
- Xu L., Zhang T., Liu Z. et al. Critical role of Th17 cells in development of autoimmune hemolytic anemia. *Exp Hematol* 2012;40(12):994–1004.
- Zecca M., Nobili B., Ramenghi U. et al. Rituximab for the treatment of refractory autoimmune hemolytic anemia in children. *Blood* 2003;101(10):3857–61.