



**Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Lekarski**

Anna Dukat-Mazurek

**Możliwości poprawy wyników transplantacji komórek krwiotwórczych
i narządów litych poprzez genetyczną ocenę ryzyka wystąpienia powik-
łań oraz modyfikację doboru immunologicznego par dawca-biorca
przed przeszczepem**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

**Promotor: dr hab. Maria Bieniaszewska
Promotor pomocniczy: dr n. med. Grażyna Moszkowska**

Pracę wykonano w Katedrze i Klinice Hematologii i Transplantologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk 2017

Część badań uzyskało finansowanie z funduszy Ministerstwa Zdrowia, Programu Wieloletniego na lata 2011-2020 „Narodowy Program Rozwoju Medycyny Transplantacyjnej” w zakresie zadania dotyczącego wdrażania nowych programów przeszczepiania w grupach biorców o podwyższonym ryzyku immunologicznym w celu poprawy wyników leczenia transplantacyjnego.

**Pragnę podziękować wszystkim
bez których niniejsza praca nie mogłaby powstać:**

Promotorowi – dr hab. Marii Bieniaszewskiej
za opiekę merytoryczną i wprowadzenie
w kliniczny świat transplantacji komórek krwiotwórczych,
a także za cierpliwość, wyrozumiałość,
oraz czas poświęcony na wszystkie poprawki edytorskie.

Promotorowi pomocniczemu – dr n. med. Grażynie Moszkowskiej
za wszystkie wskazówki merytoryczne,
możliwość czerpania wiedzy z zakresu immunologii transplantacyjnej
i codziennego rozwoju
oraz cierpliwość i życzliwość w trakcie powstawania pracy.

**Pracownikom Zakładu Immunologii Klinicznej i Transplantologii
oraz Laboratorium Immunologii i Transplantologii Klinicznej**
za pomoc w realizacji projektu, a w szczególności:

- **prof. dr hab. Piotrowi Trzonkowskiemu**
za wsparcie w planowaniu i realizacji badań,
opiekę merytoryczną, wskazówki dotyczące interpretacji
i statystycznego opracowania uzyskanych wyników
oraz czas poświęcony na pomoc w rozwiązywaniu
małych i dużych problemów.

- **dr n. med. Hannie Zielińskiej i
mgr Joannie Dębskiej-Zielkowskiej**
za stworzenie przemiłej atmosfery i
umożliwienie poświęcenia czasu na dokończenie projektu.

- **dr Annie Wardowskiej**
za pomoc w planowaniu doświadczeń
z zakresu badań molekularnych.

Mężowi Radkowi i córce Hani
za wyrozumiałość i umożliwienie poświęcenia czasu na realizację projektu.

Monice
za wszystkie poprawki edytorskie.

SPIS TREŚCI:

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	5
WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY	6
STRESZCZENIE	7
Wprowadzenie.....	7
Cele pracy	9
Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy	9
Podsumowanie.....	16
SUMMARY	17
Introduction.....	17
The aims of the doctoral dissertation	18
The overview of publications which are part of doctoral dissertation	19
Summary.....	25
WYKAZ STOSOWANEGO PIŚMIENNICTWA	27
PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY	29

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- aGVHD** – ostra choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (*ang. acute graft versus host disease*)
- ABMR** – odrzucanie przeszczepu zależne od przeciwciał (*ang. antibody mediated rejection*)
- BSI** – bakteryjne zakażenia krwi (*ang. blood stream infection*)
- cGVHD** – przewlekła choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (*ang. chronic graft versus host disease*)
- CDC-XM** – próba krzyżowa metodą cytotoksyczności zależnej od dopełniacza (*ang. complement dependent cytotoxicity cross match*)
- DSA** – przeciwciała specyficzne wobec dawcy (*ang. donor specific antibody*)
- ELISA** – test immunoenzymatyczny (*ang. enzyme-linked immunosorbent assay*)
- FCXM** – próba krzyżowa metodą cytometrii przepływowej (*ang. flow cytometry cross match*)
- GVHD** – choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (*ang. graft versus host disease*)
- GVL** – efekt przeszczep przeciwko białaczce (*ang. graft versus leukemia*)
- HLA** – antygeny zgodności tkankowej (*ang. human leukocyte antigen*)
- HSCT** – przeszczep macierzystych komórek hematopoetycznych (*ang. hematopoietic stem cell transplantation*)
- LS** – test przesiewowy z użyciem fluorymetru przepływowego Luminex (*ang. Luminex screen*)
- L-SAB** – oznaczanie swoistości przeciwciał anti-HLA z użyciem fluorymetru przepływowego Luminex (*ang. Luminex single antigen beads*)
- MFI** – średnia wartość fluorescencji (*ang. mean fluorescent intensity*)
- MM** – niezgodność (*ang. mismatch*)
- PBSCT** – przeszczep krwiotwórczych komórek macierzystych z krwi obwodowej (*ang. peripheral blood stem cell transplantation*)
- PCR RFLP** – łańcuchowa reakcja polimerazy z użyciem enzymów restrykcyjnych (*ang. polymerase chain reaction restriction fragments length polymorphism*)
- PCR SSP** – łańcuchowa reakcja polimerazy z użyciem pojedynczych starterów specyficznych dla sekwencji (*ang. polymerase chain reaction sequence specific primer*)
- PRA-CDC** – stopień uczulenia biorcy z panelem limfocytów potencjalnych dawców metodą cytotoksyczności zależnej od dopełniacza (*ang. panel reactive antibody - complement dependent cytotoxicity*)
- SNP** – polimorfizm pojedynczego nukleotydu (*ang. single nucleotide polymorphism*)
- SPI** – metody fazy stałej (*ang. solid-phase immunoassays*)
- UAMs** – nieakceptowalne niezgodności (*ang. unacceptable HLA antigen mismatches*)
- v-XM** – wirtualna próba krzyżowa (*ang. virtual cross match*)

WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY

1. **Anna Dukat-Mazurek**, Maria Bieniaszewska, Andrzej Hellmann, Grażyna Moszkowska, Piotr Trzonkowski: **Association of cytokine gene polymorphisms with the complications of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation.** Hum. Immunol. 2017; 78: 672-683

Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik Impact Factor: **2,311**
Punktacja ministerstwa: **20.000**

2. Piotr Trzonkowski, **Anna Dukat-Mazurek**, Maria Bieniaszewska, Natalia Marek-Trzonkowska, Anita Dobyszuk, Jolanta Juścińska, Magdalena Dutka, Jolanta Myśliwska, Andrzej Hellmann: **Treatment of graft-versus-host disease with naturally occurring T regulatory cells.** BioDrugs 2013; 27:605-614

Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik Impact Factor: **2.120**
Punktacja ministerstwa: **30.000**

3. Grażyna Moszkowska, Hanna Zielińska, Maciej Zieliński, **Anna Dukat-Mazurek**, Alicja Dębska-Ślizień, Bolesław Rutkowski, Dorota Lewandowska, Roman Danielewicz, Piotr Trzonkowski: **Identification of patients with increased immunological risk among potential kidney recipients in the Polish population.** Hum. Immunol. 2014; 75: 650-655

Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik Impact Factor: **2.138**
Punktacja ministerstwa: **20.000**

4. **Anna Dukat-Mazurek**, Hanna Zielińska, Grażyna Moszkowska, Maria Bieniaszewska, Piotr Trzonkowski: **Rola wirtualnej próby krzyżowej w przeszczepianiu narządów litych.** Forum Transplantol. 2016; 1: 5-10

Łączny IF prezentowanych prac: 6,569

STRESZCZENIE

Wprowadzenie

Przeszczepienie hematopoetycznych komórek macierzystych (*HSCT – haematopoietic stem cell transplantation*) jest w przypadku większości nowotworów hematologicznych jedyną skuteczną metodą oferującą wyleczenie. Niemniej, od ponad dwóch dekad, 5-letnie przeżycie bez nawrotu choroby podstawowej utrzymuje się na poziomie 40-60%.

Jest to spowodowane występowaniem powikłań zależnych od procedury przeszczepienia. Kluczowymi czynnikami pogarszającymi ostateczny wynik transplantacji są choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (*GVHD – graft versus host disease*) występująca w postaci ostrej i przewlekłej oraz poważne, często zagrażające życiu infekcje, głównie zakażenia krwiopochodne (*BSI – blood stream infection*).

Postać ostra GVHD (*aGVHD – acute graft versus host disease*) jest głównym powodem śmiertelności wczesnej zależnej od transplantacji. Zarówno aGVHD jak i komplikacje związane z jej leczeniem są odpowiedzialne za niedobory immunologiczne będące częstym powodem infekcji [1]. Przewlekła postać GVHD (*cGVHD – chronic graft versus host disease*) to zespół zróżnicowanych objawów występujących w okresie późniejszym po przeszczepie. cGVHD jest też w tym okresie głównym powodem śmiertelności biorcy nie związanym z nawrotem choroby podstawowej [2].

Wiele czynników jest uznawanych za istotnie wpływające na rozwój choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi. Większa częstość występowania tego powikłania jest związana z niezgodnościami w układzie HLA (*ang. human leukocyte antigen*) między dawcą a biorcą. Jednak zespół ten występuje również u biorców identycznych w zakresie HLA z dawcą, co wskazuje na rolę innych czynników nie uwzględnionych w rutynowym doborze immunologicznym. Wymienia się tu wiek biorcy (im biorca starszy tym wyższe ryzyko rozwinięcia GVHD), przeszczep pochodzący od dawcy niespokrewnionego, różnica płci (kobieta dawcą dla mężczyzny), stan immunizacji dawcy (wieloródki, osoby poddawane przetoczeniom krwi) [3]. Istnieje również gradacja związana z rodzajem przeszczepu – użycie krwi pępowinowej niesie ze sobą niższe ryzyko wystąpienia GVHD, a komórek macierzystych krwi obwodowej wyższe niż szpik kostny. Niektóre schematy kondycjonowania mogą również mieć wpływ na zwiększenie ryzyka rozwinięcia tego powikłania.

Jak wiadomo najważniejszą rolę w zakresie doboru dawcy dla biorcy ma układ zgodności tkankowej, jednak coraz częściej mówi się o innych, mniejszych układach genetycznych i ich roli w promowaniu GVHD. Są to między innymi polimorfizmy genów kodujących cytokiny, które wydają się być dobrym kandydatem na wskaźnik ryzyka wystąpienia tego powikłania [1,4–7]. Stąd jednym z elementów pracy doktorskiej było określenie wśród wybranych polimorfizmów tych, które pozwalają oszacować ryzyko rozwoju GVHD [8].

Bardzo istotne i zwiększające wskaźniki śmiertelności po HSCT są bakteryjne zakażenia krwiopochodne (*BSI – blood stream infection*), które występują w tej grupie pacjentów w około 13 – 60% przypadków. Wymienia się kilka czynników ryzyka wystąpienia BSI. Jest to wiek biorcy > 18 roku życia, późna faza choroby podstawowej, obecność centralnego katetera naczyniowego, ciężka choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi, stosowanie wysokich dawek leków steroidowych czy zapalenie błony śluzowej (*mucositis*). Jako czynniki ryzyka wymienia się również aloHSCT z obecnością niezgodności w układzie zgodności tkankowej pomiędzy dawcą a biorcą [9–12]. Należy jednak podkreślić, że w grupach pacjentów prezentujących identyczny poziom ryzyka, częstość występowania BSI może się różnić. Postuluje się istnienie innych czynników predysponujących do rozwoju infekcji, w tym BSI. Na podstawie doniesień sugerujących, że polimorfizmy występujące w genach kodujących cytokiny są powiązane z wieloma chorobami zależnymi od procesu zapalnego, można podejrzewać, że mogą mieć także wpływ na ryzyko wystąpienia infekcji po HSCT. W związku z powyższym w badaniu zależno-

ści pomiędzy SNP (SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu; *ang. single nucleotide polymorphism*) występującymi w genach kodujących cytokiny a komplikacjami po HSCT, włączono również obserwacje dotyczące infekcji krwiopochodnych.

Osobny problem w HSCT stanowi leczenie choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi. W przypadku postaci ostrej udało się wypracować schematy, które dają wymierne efekty lecznicze. W zakresie leczenia pacjentów z cGVHD testowano wiele leków (talidomid, alemtuzumab, mykofenolan mofetylu, sirolimus, imatynib) jednak efekty ich działania nie przyniosły istotnej poprawy odległych wyników HSCT. Pewne nadzieje niesie ze sobą fotofereza pozaustrojowa, skojarzenie rituximabu z cyklosporyną i lekami steroidowymi oraz zastosowanie inhibitorów kinazy JAK2, jednak w dalszym ciągu cGVHD stanowi poważny problem klinicystów [13,14]. W świetle tego istotne wydają się być obiecujące wyniki leczenia tej postaci choroby z zastosowaniem komórek T regulatorowych, które zaprezentowane zostały w publikacji [15] wchodzącej w skład niniejszej rozprawy.

Rozwój transplantologii w ciągu ostatnich lat pozwolił również na skuteczne leczenie pacjentów ze schyłkową niewydolnością narządów unaczynionych. W przypadku organów takich jak serce, wątroba czy płuca przeszczep jest jedyną metodą terapii ratującej życie, natomiast transplantacja nerki pozwala na poprawę jakości życia i daje szanse na długoletnie przeżycie.

Wśród przyczyn wpływających na długość przeżycia przeszczepu poza czynnikami nieimmunologicznymi takimi jak zaawansowany wiek dawcy i/lub biorcy, schorzenia dawcy, pochodzenie narządu (dawca żywy bądź zmarły), toksyczne uszkodzenie przeszczepu zależne od leczenia immunosupresyjnego, infekcja CMV, czy długość czasu zimnego niedokrwienia, istotną rolę pełnią czynniki immunologiczne. Te ostatnie obejmują dobór immunologiczny w zakresie antygenów zgodności tkankowej oraz przeciwciał anty-HLA swoistych dla dawcy. Czynniki immunologiczne są odpowiedzialne za procesy odrzucania przeszczepionego narządu prowadzące do jego niewydolności.

Odrzucanie przeszczepionego narządu jest wynikiem rozpoznawania przez układ odpornościowy biorcy antygenów przeszczepu i uruchomienie procesów immunologicznych mających na celu jego zniszczenie. Jest to sytuacja fizjologiczna i uwarunkowana różnicami genetycznymi pomiędzy dawcą, a biorcą głównie w zakresie antygenów zgodności tkankowej.

Kluczowa w doborze immunologicznym par dawca biorca przed przeszczepieniem narządu unaczynionego jest ocena stopnia immunizacji potencjalnych biorców na obce antygeny zgodności tkankowej. Rutynowo stosowanym testem wykrywającym przeciwciała anty-HLA jest PRA-CDC (*ang. panel reactive antibody - complement dependent cytotoxicity*). Jest on jednak niewystarczająco czuły i zaleca się dodatkowo badania metodami fazy stałej (*SPI – solid-phase immunoassays*) – ELISA lub fluorymetrem przepływowym Luminex. Dają one możliwość nie tylko wykrycia mniejszych stężeń aloprzeciwciał, ale umożliwiają identyfikację swoistości przeciwciał anty-HLA, a w konsekwencji ustalenia u potencjalnego biorcy nieakceptowalnych niezgodności HLA (*UAMs – unacceptable HLA antigen mismatches*) [16]. W pracy [17] prezentowanej w niniejszej rozprawie przedstawiono wyniki badań, które obrazują stopień niedoszacowania pacjentów zimmunizowanych w zależności od zastosowanej metody.

Aktualnie stosuje się szereg zabiegów mających na celu ograniczenie częstości występowania poszczególnych typów odrzucania przeszczepionego narządu. Prawidłowe wykonanie biologicznej, przedprzeszczepowej próby krzyżowej eliminuje niebezpieczeństwo wystąpienia odrzucania typu nadostrego. Ostre odrzucanie narządu przeszczepionego jest skutecznie hamowane przy użyciu farmakologicznej immunosupresji. Obecnie największym wyzwaniem dla klinicystów jest poznanie mechanizmów i opanowanie odrzucania przewlekłego, prowadzącego nieuchronnie do przedwczesnej utraty przeszczepu. W związku z nieskutecznością leków farmakologicznych w zakresie tego typu odrzucania sugeruje się zapobieganie jego wystąpienia poprzez odpowiedni dobór immunologiczny przed transplantacją. Poprawę odległych wyników przeszczepiania może przynieść zastosowanie w algorytmie doboru immunologicznego wirtualnej próby krzyżowej, której zalety opisano w publikacji [18] wchodzącej w skład niniejszej rozprawy doktorskiej.

Cele pracy

Celem pracy było badanie nowych możliwości poprawy wyników transplantacji komórek krwiotwórczych oraz narządów unaczynionych.

Zadanie zrealizowano poprzez:

- Ocenę ryzyka wystąpienia powikłań po transplantacji hematopoetycznych komórek macierzystych z uwzględnieniem oceny genetycznej jako parametru umożliwiającego spersonalizowanie leczenia immunosupresyjnego.
- Propozycję leczenia ostrej i przewlekłej choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi przy użyciu preparatu zawierającego namnożone komórki T regulatorowe pacjenta lub dawcy.
- Określenie stopnia immunizacji pacjentów oczekujących na przeszczepienie nerki w Polsce oraz oznaczenie u biorców oczekujących na retransplantację swoistości anty-HLA z użyciem wysokoczułych metod fazy stałej przy zastosowaniu fluorymetru przepływowego.
- Propozycję zastosowania wirtualnej próby krzyżowej w algorytmie doboru immunologicznego przed przeszczepieniem narządu unaczynionego, jako badania pozwalającego na zmniejszenie ryzyka wystąpienia incydentów odrzucania oraz zwiększającej szanse na dłuższe przeżycie przeszczepu.

Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy

Anna Dukat-Mazurek, Maria Bieniaszewska, Andrzej Hellmann, Grażyna Moszkowska, Piotr Trzonkowski: Association of cytokine gene polymorphisms with the complications of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. Hum. Immunol. 2017; 78: 672-683

Poza niezgodnościami w głównym układzie zgodności tkankowej istnieją inne immunologiczne i genetyczne czynniki zwiększające ryzyko wystąpienia choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi. Należą do nich aktywne procesy zapalne i uczestniczące w nich cytokiny, które odgrywają ważną rolę w promowaniu zmian skutkujących rozwojem GVHD. Rola wielu cytokin pro- i przeciwzapalnych została opisana w patogenezie ostrej i przewlekłej postaci GVHD. Wyniki niektórych badań wykazały także, że różne polimorficzne formy genów kodujących cytokiny wpływają na odmienną ich ekspresję, zarówno na poziomie transkryptu, jak i białka. Oznacza to, że polimorfizmy te mogą wpływać na praktycznie wszystkie procesy immunologiczne zachodzące w organizmie, nie wyłączając GVHD oraz podatności na zakażenia. Część badaczy przedstawiło wyniki dokumentujące istotne związki pomiędzy niektórymi polimorfizmami występującymi w genach kodujących cytokiny a częstością nie tylko GVHD, ale również wielu innych schorzeń o podłożu zapalnym (np. chorób z autoagresji). Przeanalizowanie związku między częstością występowania powikłań związanych z procedurą HSCT i ich stopniem ciężkości a SNP występującymi w genach kodujących pro i przeciwzapalne cytokiny było więc wysoce uzasadnione.

W naszej pracy przedstawiliśmy wyniki analizy ryzyka wystąpienia komplikacji typowych dla aHSCT na podstawie genotypów biorców i dawców z uwzględnieniem polimorfizmów genów kodujących cytokiny.

Grupę badaną stanowiło 108 biorców komórek hematopoetycznych oraz ich 81 dawców. Zarówno u dawców jak i u biorców określono występowanie następujących polimorfizmów w genach kodujących cytokiny: TNF- α region promotorowy, pozycja -308 A/G; TGF- β 1 codon 10 T/C, 25 C/G; IL-10 region promotorowy, pozycja -1082 A/G, -819 C/T, -592 A/C; IL-6 region promotorowy, pozycja -174 G/C; IFN- γ intron 1, pozycja +874 T/A. Metody, które wykorzystano do określenia polimorfizmów poszczególnych cytokin to: PCR RFLP (*ang. polymerase chain reaction restriction fragments length polymorphism*) z użyciem enzymów restrykcyjnych, metoda PCR SSP (*ang. polymerase chain reaction single specific primer*) oraz sekwencjonowa-

nie. W celu ustalenia wpływu konkretnych genotypów na aktywność wydzielniczą, wykonano również oznaczenie stężenia cytokin w surowicy (TNF α , TGF- β 1, IL-10, IL-6, IFN- γ). Oznaczenia surowiczych poziomów cytokin zostały wykonane metodą ELISA (*ang. enzyme-linked immunosorbent assay*).

Wyniki oznaczeń odniesiono do danych klinicznych uwzględniających powikłania infekcyjne oraz postać ostrą i przewlekłą choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi. Dane dotyczące biorcy analizowano w kontekście polimorfizmów własnych jak i dawcy. Pozwoliło to na określenie związków pomiędzy występowaniem poszczególnych polimorfizmów w genach kodujących cytokiny, a wystąpieniem i przebiegiem GVHD oraz konkretnych zakażeń.

Uzyskane wyniki sugerują, że w zakresie badanych polimorfizmów, główne znaczenie kliniczne ma genotyp biorcy, natomiast genotyp dawcy jest mniej istotny w odniesieniu do występowania powikłań po HSCT. Polimorfizmy genowe zanotowane dla trzech z przebadanych przez nas cytokin: IL-6, IL-10 i TGF- β są powiązane z występowaniem GVHD oraz posocznicy. Badania wykazały, że polimorfizm w miejscu -174 genu kodującego IL-6 jest powiązany ze stężeniem tej cytokiny w surowicy. Genotyp CC jest odpowiedzialny za niskie stężenia IL-6, natomiast pacjenci charakteryzujący się genotypami zawierającymi guaninę (GG i GC) są jej silnymi wydzielaczami. Ta zależność przekłada się na związek IL-6 z powikłaniami po HSCT. W związku z tym, że IL-6 jest cytokiną prozapalną, pacjenci o genotypie CC związanym z niskimi stężeniami tej cytokiny w surowicy, rzadziej rozwijali ostrą postać GVHD, podczas gdy genotypy zawierające G predysponowały do aGVHD.

Również dla IL-10 wykazano związek określonych polimorfizmów genowych ze stężeniem tej cytokiny w surowicy. Analiza statystyczna wykazała, że genotyp GCC/ATA jest związany z wysokim stężeniem IL-10, podczas gdy GCC/GCC z niskimi poziomami IL-10. Podobnie jak dla IL-6 wykazano zależność między genotypem biorcy a występowaniem komplikacji po HSCT. Biorecy z genotypem GCC/ATA rzadziej cierpieli z powodu GVHD, bez względu na typ choroby. Siedemdziesiąt pięć procent pacjentów o tym genotypie nie rozwinęło ani cGVHD, ani aGVHD. Potencjał ochronny tego genotypu wiązał się szczególnie z wystąpieniem postaci ostrej choroby. W nielicznych przypadkach, gdy u pacjentów o genotypie GCC/ATA zanotowano objawy aGVHD ich nasilenie nie przekraczało stopnia I w ogólnej klasyfikacji choroby. Żaden z biorców ze wspomnianym genotypem nie rozwinął aGVHD w stopniach II - IV. Przeciwny efekt wykazano w przypadkach z genotypem GCC/GCC biorcy. Ponadto zaobserwowano, że badane miejsca polimorficzne genu kodującego IL-10, wykazywały zależność z wystąpieniem przewlekłej formy GVHD. Wszyscy biorecy posiadający genotyp ATA/ATA rozwinęli przewlekłą postać choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi.

Badane polimorfizmy występujące w genie kodującym TGF- β również miały wpływ na stężenia tej cytokiny w surowicy. Wykazano, że genotypy T/T G/G i T/C G/G wiązały się z wysoką syntezą tej cytokiny, podczas gdy genotypy T/C G/C i C/C G/G były odpowiedzialne za średnie jej poziomy. Zależności te ponownie wykazały związek z występowaniem GVHD. Genotyp T/T G/G wiązał się z intensywną produkcją tej cytokiny i predysponował biorcę do rozwinięcia zarówno formy ostrej, jak i przewlekłej GVHD. Ponadto w przypadku wystąpienia postaci ostrej choroby predysponował do jej manifestacji w klinicznie istotnych stopniach: II-IV.

W wyniku dalszych analiz wykazano, że GVHD nie jest jedynym powikłaniem obserwowanym po HSCT, którego częstość występowania wykazała związek z badanymi SNP. Również częstość i ciężkość zakażeń krwi wykazywała statystycznie istotną zależność z konkretnymi genotypami. Istotne znaczenie miały polimorfizmy występujące w genach kodujących trzy cytokiny: IL-10, IL-6 i TNF- β . Genotypy GG oraz CC interleukiny szóstej predysponowały do występowania zakażeń krwi, podczas gdy genotyp GC w tym zakresie wykazywał rolę ochronną. W analizie wieloczynnikowej wykazano współzależność genotypów IL-10 i IL6. Współwystępowanie genotypu IL-10 GCC/GCC związanego z niską produkcją tej cytokiny z genotypem GC IL-6 było związane z niską częstością występowania BSI. Analiza wieloczynnikowa wykazała również, że zakażenia wirusowe (CMV, EBV, BKV) występowały rzadziej u biorców, u których stwierdzono jednoczesne występowanie genotypu GC w IL-6 i ACC/ACC w IL-10. Odwrotny efekt, czyli zwiększenie ryzyka zakażeń wirusowych wywierało natomiast jednocze-

sne wystąpienie u biocy genotypu CC IL-6 i ACC/ACC IL-10. Może to sugerować, że rola IL-6 jest kluczowa w kontrolowaniu infekcji. Zależności statystyczne określające wpływ polimorfizmów prezentowanych w genotypach biocy na ryzyko wystąpienia komplikacji po HSCT przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Wpływ genotypu biocy na ryzyko wystąpienia komplikacji po HSCT

Powikłanie po HSCT	Genotypy zwiększające ryzyko powikłań	Genotypy zmniejszające ryzyko powikłań
aGVHD	IL-6: G/C i G/G TGF-β: T/T G/G	IL-6: C/C IL-10: GCC/ATA
aGVHD stopnie: II-IV	IL-10: GCC/GCC TGF-β: T/T G/G	IL-10: GCC/ATA
cGVHD	IL-10: ATA/ATA TGF-β: T/T G/G	-
GVHD bez względu na postać	IL-6: G/C i G/G TGF-β: T/T G/G	IL-6: C/C IL-10: GCC/ATA
Zakażenia krwi	IL-6: C/C i G/G IL-10: ACC/ATA	IL-6: G/C TGF-β: T/C G/C
Infekcje wirusowe	Jednoczesne wystąpienie IL-6: CC z IL-10:ACC/ACC	Jednoczesne wystąpienie IL-6: GC z IL-10:ACC/ACC

Wyniki badań potwierdziły, że polimorfizmy występujące w genach kodujących cytokiny mają wpływ na ich stężenie w surowicy. Wykazały również szereg związków badanych SNP z częstością i ciężkością występujących po HSCT powikłań. Wśród badanych SNP, miejsce polimorficzne IL-6 -174 G/C biocy wydaje się być dobrym kandydatem na czynnik ryzyka powikłań po HSCT. Podobne wnioski wyciągnęli także inni badacze. Polimorfizmy w genie kodującym IL-10 (-1082 A/G, -819 C/T, -592 A/C) oraz TGF-β (kodon 10 T/C, 25 C/G) są także związane z wynikami klinicznymi po HSCT. Wydaje się również że polimorfizmy genu IL-10 powinny być analizowane jednocześnie z polimorfizmem genu IL-6.

Oszacowanie ryzyka wystąpienia GVHD dałoby możliwość spersonalizowania profilaktyki immunosupresyjnej po przeszczepieniu. Co więcej niektóre z polimorfizmów korelują z występowaniem konkretnych antygenów zgodności tkankowej (dane nieopublikowane). W wybranych przypadkach samo oznaczenie HLA mogłoby wskazywać na ryzyko wystąpienia powikłań.

Piotr Trzonkowski, Anna Dukat-Mazurek, Maria Bieniaszewska, Natalia Marek-Trzonkowska, Anita Dobyszuk, Jolanta Juścińska, Magdalena Dutka, Jolanta Myśliwska, Andrzej Hellmann: Treatment of graft-versus-host disease with naturally occurring T regulatory cells. BioDrugs 2013; 27:605-614

Obecnie wszyscy pacjenci poddani HSCT od dawców w pełni zgodnych w zakresie HLA otrzymują w ramach profilaktyki, a także leczenia GVHD standardową, farmakologiczną immunosupresję. W przypadkach wystąpienia agresywnej formy choroby stosowane są dodatkowe protokoły lecznicze, na przykład fotofereza pozaustrojowa.

W naszej pracy proponujemy zastosowanie komórek T regulatorowych jako terapii komórkowej w walce z chorobą przeszczep przeciwko gospodarzowi. W publikacji opisano sposób działania komórek T regulatorowych, wskazano na te aspekty ich działania które przemawiają za skutecznością w leczeniu i profilaktyce GVHD. Dokonano przeglądu opublikowanych danych potwierdzających skuteczność tych komórek w leczeniu GVHD w modelach zwierzęcych oraz badaniach klinicznych. Omówiono również trudności, z którymi należy się zmierzyć planując włączenie tego typu leczenia do protokołów rutynowych.

Komórki T regulatorowe (Treg) są limfocytami T CD4+ pochodzącymi z grasicy, które uniknęły negatywnej selekcji. We krwi obwodowej stanowią około 1% wszystkich leukocytów i pełnią funkcję ochronną przed autoagresywnym działaniem komórek efektorowych w momencie rozpoznania własnych antygenów. Są odpowiedzialne za tolerancję na własne tkanki organizmu, dzięki czemu zapobiegają reakcjom autoimmunologicznym, alergicznym oraz zmniejszają ryzyko odrzucania wszystkich przeszczepów. Treg wykazują aktywność hamującą po kontakcie ich receptorów TCR z antygenami prezentowanymi przez komórki prezentujące antygen (*APC – antigen presenting cell*). Treg rywalizują o autoantygeny na APC i w przeciwieństwie do komórek efektorowych narzucają anergię. Mechanizm ten jest również ważny w profilaktyce GVHD ponieważ pary dawca-biorca są najczęściej dobrane z pełną zgodnością w zakresie antygenów HLA, co powoduje, że antygeny dawcy powinny być rozpoznawane przez przeszczepione Treg jako własne. Z uwagi na wysoką ekspresję cząsteczek adhezyjnych i integryn na powierzchni Treg, komórki te przemieszczają się do tkanek zapalnych szybciej niż limfocyty T efektorowe. Kiedy rozpoznawane są autoantygeny uwolnione z uszkodzonych komórek, Treg inicjują stan anergiczny, jeszcze zanim pojawią się jakiegokolwiek komórki efektorowe.

Komórki te wydają się również być skuteczne w przeszczepieniach nie w pełni zgodnych w zakresie antygenów zgodności tkankowej (HLA) z powodu niskiej awidności ich receptorów TCR. Ich skuteczność może również w przyszłości zostać wzmocniona poprzez leczenie farmakologiczne uwzględniające substancje znane jako aktywujące komórki T regulatorowe takie jak: rapamycyna, witamina D, kwas retinowy, glikokortykosteroidy, czy tymoglobulina.

Na skuteczne działanie Treg w profilaktyce GVHD wskazują wyniki badań potwierdzające, że biorcy, którzy otrzymali przeszczep PBSC (*ang. peripheral blood stem cell transplantation*) wzbogacony komórkami CD4+, CD25+ mieli mniejsze prawdopodobieństwo wystąpienia ostrej postaci GVHD. Ponadto mniejsze ryzyko wystąpienia aGVHD prezentowali również ci biorcy, którzy otrzymali przeszczep od dawców charakteryzujących się dużą liczbą komórek T regulatorowych we krwi obwodowej.

Badania kliniczne przeprowadzone z użyciem komórek Treg w leczeniu choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi wykazały skuteczność takiej terapii w przypadku formy przewlekłej oraz brak skuteczności w zakresie ostrej postaci GVHD w stopniu IV. U pacjentów z cGVHD obserwowano możliwość odstawienia leków farmakologicznych oraz ulgę w objawach choroby. Wyniki te dają nadzieję na możliwość skutecznego leczenia przewlekłej formy choroby, szczególnie wobec braku zadowalających efektów immunosupresji farmakologicznej w ciężkiej cGVHD. W przypadku aGVHD decyzja o wdrożeniu leczenia komórkowego była podejmowana w momencie gdy środki farmakologiczne okazywały się być nieskuteczne i możliwe, że dwa tygodnie, które są niezbędne dla hodowli komórek, w przypadku szybko postępującego i agresywnego aGVHD w stopniu IV, spowodowały nieskuteczność terapii. Pozwala to również na wysnucie wniosku, że terapia Treg może być bardziej efektywna w profilaktyce. Tezę tą potwierdzają również badania kliniczne innego zespołu, który stosował infuzje komórek T regulatorowych wyizolowanych od dawcy w przeszczepieniach haploidentycznych. Infuzje miały miejsce w dniu -4. W tym przypadku biorcom podawano świeżo wyizolowane komórki bez wcześniejszej hodowli. Żaden z trzynastu biorców, którzy przeżyli okres 12-tu miesięcy po HSCT nie rozwinął GVHD. Wyniki tych badań są bardzo obiecujące głównie z powodu braku konieczności podawania w późniejszym okresie farmakologicznej immunosupresji. Dodatkowo badacze zaobserwowali, że komórki nie miały wpływu na efekt GVL (*ang. graft versus leukemia*) gdyż odnotowano tylko jeden nawrót mimo choroby z obecnością czynników wysokiego ryzyka wznowy.

Jednym z problemów zastosowania tej terapii w praktyce klinicznej jest dostępność komórek. Stan biorcy po przeszczepieniu najczęściej uniemożliwia pobranie odpowiedniej jakości krwi obwodowej w celu hodowli Treg. Najkorzystniejszą jest sytuacja, w której dawcą jest członek rodziny chorego, co niweluje problemy logistyczne z dostępnością krwi dawcy do hodowli komórek T regulatorowych. Sytuacja taka dotyczy jednak niewielkiej populacji biorców. Alternatywnym źródłem Treg mogą być jednostki krwi pępowinowej. Możliwe, że w przyszłości stosowane będą skuteczne techniki krioprezerwacji tych komórek, które pozwolą na szerokie ich stosowanie.

Terapia komórkami T regulatorowymi przewyższa terapie farmakologiczne brakiem działania ogólnoustrojowego, a co za tym idzie ograniczeniem potencjalnych działań niepożądanych. Jest to ściśle związane z naturą tych komórek, które charakteryzują się lokalnym sposobem działania i aktywnością ograniczoną jedynie do miejsca stanu zapalnego. Ponadto taki rodzaj terapii mógłby stanowić dobrą alternatywę dla pacjentów cierpiących na GVHD odporne na konwencjonalne farmakologiczne leczenie immunosupresyjne.

Przedstawione w publikacji dowody skuteczności stosowania komórek T regulatorowych są obiecujące, jednak przed wprowadzeniem tej terapii do rutynowej praktyki konieczne jest przeprowadzenie dodatkowych badań klinicznych i ustalenie najskuteczniejszego protokołu. Wydaje się, że terapia z zastosowaniem tych komórek może być najlepszym rozwiązaniem w profilaktyce i leczeniu choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi a zwłaszcza jej przewlekłej formy.

Grażyna Moszkowska, Hanna Zielińska, Maciej Zieliński, Anna Dukat-Mazurek, Alicja Dębska-Ślizień, Bolesław Rutkowski, Dorota Lewandowska, Roman Danielewicz, Piotr Trzonkowski: Identification of patients with increased immunological risk among potential kidney recipients in the Polish population. Hum. Immunol. 2014; 75: 650-655

Najbardziej dostępną i najczęściej stosowaną metodą określania stopnia immunizacji biorcy przeszczepu narządowego jest opracowana w latach sześćdziesiątych metoda cytotoxyczności zależnej od dopełniacza w teście PRA-CDC. Z upływem czasu wykazano jednak, że test PRA-CDC oprócz zalet ma liczne wady. Główną zaletą jest wykrywanie przeciwciał istotnych klinicznie czyli aktywujących dopełniacz oraz niskie koszty wykonania badania. Niestety test ten nie jest dostatecznie czuły co skutkuje uzyskiwaniem wyników fałszywie ujemnych. Dotyczy to głównie wykrywania aloprzeciwciał skierowanych przeciwko antygenom HLA klasy II, ponieważ limfocyty B prezentujące antygeny HLA klasy II stanowią tylko 13% populacji izolowanych z krwi obwodowej, używanych do testu limfocytów. Ponadto przy użyciu tej metody uzyskujemy jedynie informację czy pacjent jest uczulony i w jakim stopniu (odsetek reakcji dodatnich), bez możliwości określenia klasy oraz swoistości przeciwciał anti-HLA. Dodatkową wadą jest losowość panelu limfocytów użytych do testu, co znacząco wpływa na różnice wyników oznaczeń w porównaniach międzylaboratoryjnych. Nowe technologie, z zastosowaniem testów fazy stałej, umożliwiły znaczną poprawę czułości i jakości wykrywania aloprzeciwciał u chorych oczekujących na przeszczepienie narządu unaczynionego pozwalając na wskazanie grupy biorców podwyższonego ryzyka immunologicznego.

W związku z obserwowaną w stosunku do innych populacji niską liczbą biorców immunizowanych w naszym kraju (ocenianych rutynowo testem PRA-CDC), Ministerstwo Zdrowia sfinansowało w ramach „Narodowego programu rozwoju medycyny transplantacyjnej” analizę stopnia immunizacji biorców czulszymi metodami fazy stałej. Badania objęły pacjentów oczekujących na przeszczepienie nerki wpisanych na Krajową Listę Oczekujących w Ustawowych Rejestrach Transplantacyjnych. W naszej pracy prezentujemy wyniki tych analiz.

Badania przeprowadzono z użyciem fluorymetru przepływowego Luminex w zakresie testu przesiewowego (LS, Luminex Screen, One Lambda, USA) dla całej grupy biorców oczekujących w 2012 roku na transplantację nerki (1460 pacjentów). Dodatkowo w grupie pacjentów, którzy byli najbardziej narażeni na immunizację (235 biorców zgłoszonych do retransplantacji), wykonano testy identyfikacji swoistości przeciwciał (L-SAB, Luminex Single Antigen Beads, One Lambda, USA).

Uzyskane wyniki porównane zostały z danymi PRA-CDC oznaczonymi w surowicach pacjentów w tym samym czasie oraz z maksymalnymi historycznymi wynikami PRA-CDC. Dodatkowo w grupie biorców zgłoszonych do retransplantacji określono stopień zimmunizowania pacjentów na niezgodne antygeny HLA z poprzednich przeszczepów (*MM - mismatch*). Badania potwierdziły podejrzenia, co do niedoszacowania liczby pacjentów zimmunizowanych w Polsce. Metodą fluorymetrii przepływowej w całej 1460 osobowej grupie badanej uzyskano wynik na poziomie 50% pacjentów zimmunizowanych versus 17% oznaczonych metodą PRACDC. Nieco mniejszą różnicę obserwowano porównując wyniki LS z maksymalną, historyczną warto-

ścią PRA-CDC (35% biorców zimmunizowanych). Porównanie to zostało jednocześnie przeprowadzone oddzielnie dla pacjentów skierowanych do pierwszego przeszczepu oraz do retransplantacji. W grupie biorców oczekujących na pierwszy przeszczep uzyskano wynik 41% metodą LS versus 10% PRA-CDC (lub 28% w odniesieniu do maksymalnego PRA-CDC). Pacjenci skierowani do retransplantacji byli zimmunizowani w 52%, 72% lub 96%, odpowiednio w metodzie PRA-CDC, maksymalnego PRA-CDC i przy użyciu LS. Uzyskane różnice były istotne statystycznie.

Test przesiewowy LS umożliwia nie tylko określenie przeciwciała przeciwko której klasie antygenów HLA biorca posiada przeciwciała, ale dodatkowo wykrycie przeciwciał anty-MICA (*MHC class I-related chain -A*), które nie są identyfikowalne przy użyciu testu PRA-CDC. W badanej grupie biorców, przeciwciała te wykryto u 195 pacjentów (13%). Dodatni wynik pozwala wyjaśnić, przyczyny odrzucania zależnego od przeciwciał, z obecnością złożeń C4d w przeszczepionej nerce, u pacjentów nie zimmunizowanych w zakresie HLA.

U 235 pacjentów oczekujących na kolejną transplantację, u których uzyskano dodatni wynik w teście przesiewowym LS, wykonano identyfikację swoistości przeciwciał anty-HLA klasy I i/lub II w zależności od uzyskanego wyniku LS. Przeciwciała przeciwko swoistościom HLA-A i HLA-B występowały najczęściej i były obecne odpowiednio u 80% i 82% badanych. Alopzeciwciała anty-HLA-DR obserwowano u 64% biorców, natomiast anty-HLA-DQ i HLA-DP odpowiednio w 65% i 39% przypadków. Połowa badanych wykazywała obecność anty-HLA-C. W związku z obserwowanymi utratami przeszczepu w transplantacjach w pełni zgodnych w zakresie HLA-A, B, DR wydaje się, że alopzeciwciała anty-HLA-C są również klinicznie istotne i mogą być odpowiedzialne za proces odrzucania.

Wykonanie oznaczeń L-SAB pozwoliło na określenie stopnia immunizacji pacjentów na niezgodności wniesione przez dawców w poprzednich przeszczepach. U 191 (81%) biorców obserwowano mismatch w *locus* A, 210 (89%) prezentowało MM w *locus* B a 174 (74%) w *locus* DR. W pierwszej omawianej grupie u 69 pacjentów nie wykryto przeciwciał DSA (*ang. donor specific antibody*) skierowanych przeciwko antygenom niezgodnym, w grupie drugiej u 96 biorców badanie nie wykazało obecności DSA a w grupie trzeciej aż 99-ciu badanych było negatywnych względem MM w *locus* DR.

Uzyskane wyniki poddają w wątpliwość czy zasadne jest unikanie przy kolejnej transplantacji dawcy, który posiada ten sam MM co dawca poprzedni. Jest to szczególnie istotne w przypadku pacjentów, którzy otrzymali narząd od dawcy z niezgodnością, która często występuje w populacji. Wykluczenie takiego biorcy tylko na podstawie powtórnego MM może oznaczać zminimalizowanie, a nawet utratę szansy na powtórne przeszczepienie [19].

Przedstawione w pracy wyniki sugerują, że zastosowane metody określania immunizacji powinny stanowić integralną część rutynowej strategii klinicznej w celu poprawy wyników przeszczepu nerki. Techniki te są szczególnie przydatne w ocenie pacjentów z grupy podwyższonego ryzyka immunologicznego i umożliwiają skuteczne przeszczepianie i dłuższe przeżycie przeszczepu. Identyfikacja swoistości przeciwciał anty-HLA umożliwia również zastosowanie wirtualnej próby krzyżowej przed przeszczepem.

Anna Dukat-Mazurek, Hanna Zielińska, Grażyna Moszkowska, Maria Bieniaszewska, Piotr Trzonkowski: Rola wirtualnej próby krzyżowej w przeszczepianiu narządów litych. Forum Transplantol. 2016; 1: 5-10

Dobór immunologiczny przed przeszczepieniem narządu unaczynionego opiera się na wyborze biorców, którzy prezentują najmniejszą liczbę niezgodnych antygenów w zakresie HLA wobec zgłoszonego dawcy oraz na przeprowadzeniu biologicznej próby krzyżowej. W Polsce nadal standardem jest typowanie dawcy i biorcy w zakresie HLA-A, B, DRB1 na poziomie niskiej rozdzielczości. Przedprzeszczepowa próba krzyżowa w przypadku dawcy zmarłego prowadzona jest metodą cytotoksyczności zależnej od dopełniacza (CDC-XM - *complement dependent cytotoxicity cross match*). Bardziej czuła metoda cytometryczna stosowana jest w doborze immunologicznym dla dawcy żywego. Taki podział podyktowany jest możliwościami

organizacyjnymi. W przypadku dawców zmarłych jednocześnie wykonywane są próby krzyżowe dla 30 - 40 biorców. Z uwagi na czasochłonność procedury wykonanie takiej liczby badań przy użyciu cytometru przepływowego nie byłoby możliwe bez istotnego wydłużenia czasu zimnego niedokrwienia. FCXM (*ang. flow cytometry cross match*) przy doborze od dawcy zmarłego może być wykonany jedynie retrospektywnie dla zatwierdzonej przez klinicystę wybranej pary dawca - biorca.

Dużym usprawnieniem jest możliwość włączenia do protokołu doboru immunologicznego przed przeszczepieniem tak zwanej wirtualnej próby krzyżowej v-XM (*virtual crossmatch*). Umożliwia ona szybką weryfikację listy potencjalnych biorców narządu unaczynionego i wykluczenie biorców potencjalnie pozytywnych (u których obecne są DSA wcześniej wykryte testami LSA), jeszcze przed wykonaniem biologicznej próby krzyżowej. Takie postępowanie może przyczynić się do szybszego wyboru właściwego dawcy i skrócenia czasu zimnego niedokrwienia. W naszej pracy omówiliśmy zasady stosowania wirtualnej próby krzyżowej oraz wady i niedoskonałości wynikające ze stosowania tej metody w rutynowej praktyce.

Virtual crossmatch wydaje się być dobrym narzędziem minimalizującym ryzyko wystąpienia zależnego od przeciwciał odrzucania ostrego i przewlekłego. Odrzucanie typu nadostrego zostało praktycznie całkowicie wyeliminowane poprzez wykonywanie przedprzeszczepowej biologicznej próby krzyżowej (CDC - XM). Odrzucanie typu ostrego może być efektywnie hamowane poprzez zastosowanie immunosupresji farmakologicznej. Pozwoliła ona na zredukowanie częstości tego typu odrzucania z około 50% w latach 90-tych do około 10 % w 2009 roku i znacznie poprawiła roczne przeżycie przeszczepu. Obecnie jednym z największych wyzwań klinicystów jest odrzucanie zależne od przeciwciał (ABMR – *antibody mediated rejection*), które w wielu przypadkach jest niemożliwe do opanowania mimo prób stosowania plazmaferezy, immunoadsorpcji, dożylnych wlewów immunoglobulin, czy stosowania leków immunosupresyjnych o różnym sposobie działania. Dotyczy to zwłaszcza przewlekłej formy odrzucania zależnego od przeciwciał i przekłada się na gorsze wyniki przeżycia przeszczepionej nerki w obserwacji długoterminowej. Najskuteczniejsza wydaje się być strategia zapobiegania ABMR poprzez adekwatny dobór immunologiczny przed przeszczepieniem, połączony z odpowiednią immunosupresją uwzględniającą ryzyko wystąpienia przeciwciał anty-HLA de novo oraz monitorowanie biorcy po przeszczepie w zakresie DSA.

Użycie v-XM wymaga przedtransplantacyjnego określenia swoistości HLA przeciwko którym biorca wytworzył aloprzeciwciała. Do tego celu wykorzystywane są metody fazy stałej (*SPI – solid phase immunoassay*), z których najczęściej stosowaną i zalecaną jest wysokoczuła metoda z użyciem fluorymetru przepływowego Luminex bazująca na technologii X-Map. Metodę tą zastosowano w badaniach własnych w celu identyfikacji pacjentów zimmunizowanych i określania swoistości przeciwciał anty-HLA. Wirtualna próba krzyżowa umożliwia wskazanie i usunięcie z listy tych potencjalnych biorców, którzy posiadają przeciwciała przeciwko antygenom HLA dawcy (DSA) i wykonanie biologicznego XM tylko z surowicą tych pacjentów, którzy są wolni od DSA.

Włączenie v-XM do protokołu doboru immunologicznego par dawca-biorca przed przeszczepem nie jest jednak pozbawione pewnych obciążeń. Przede wszystkim należy rozważyć czy wszystkie przeciwciała wykrywane w testach L-SAB są istotne klinicznie i czy powinny być uwzględniane w wirtualnej próbie krzyżowej. Nie wszystkie z nich wiążą dopełniacz i powstaje wątpliwość, czy sposób ten nie odbiera biorcom szansy na skuteczne przeszczepienie. W celu eliminacji tego obciążenia sugeruje się aby stosować testy Luminex-C1q lub Luminex C3d, wykrywające aloprzeciwciała wiążące i aktywujące układ dopełniacza. Takie rozróżnienie klinicznie ważnych, litycznych przeciwciał, zwiększałoby szanse na przeszczepienie, zwłaszcza w grupie pacjentów wysoko zimmunizowanych. Badania oceniające wpływ zastosowania testów fazy stałej i v-XM w doborze immunologicznym wykazują poprawę 5-letniego przeżycia o około 10%, a przy detekcji aloprzeciwciał aktywujących komplement nawet 40%.

Kolejnym istotnym aspektem jest ustalenie poziomu odcięcia (*cut off*) wykładnika stężenia przeciwciał, czyli MFI (*ang. mean fluorescence intensity*). Zbyt niska wartość *cut-off* MFI może niesłusznie zabrać szansę choremu na przeszczepienie, ponieważ będzie zdyskwalifikowany do biologicznej próby krzyżowej, a zbyt wysoka może narazić chorego na odrzucanie ostre lub

przewlekłe z powodu obecności niskich stężeń DSA, niewykrywalnych w ostatecznym teście CDC-XM. Ośrodki rutynowo stosujące v-XM wyznaczają różne poziomy odcięcia wahające się od 500-1500 MFI. Niektórzy badacze wskazują, że poziomy te powinny być jeszcze wyższe ze względu na dobrą korelację z biologicznymi próbami krzyżowymi (CDC-XM, FCXM), i wynosić co najmniej 5000 MFI.

Stosując wirtualną próbę krzyżową należy uwzględnić ryzyko uzyskania zarówno fałszywie pozytywnych, jak i fałszywie negatywnych wyników. Te pierwsze wiąże się przede wszystkim z większą gęstością antygenów HLA na mikrokulkach wykorzystywanych w testach L-SAB niż fizjologicznie na komórkach. Dotyczy to głównie *locus C* w klasie I oraz DP, DQ w klasie II. Z tego powodu stosuje się dla tych swoistości wyższe poziomy odcięcia. Wyniki fałszywie ujemne mogą występować w przypadku obecności przeciwciał nie-HLA (np. autoprzeciwciał) wiążących dopełniacz i prowadzących do lizy limfocytów w próbie biologicznej, ale niewykrywalnych testami L-SAB.

W niektórych przypadkach, v-XM mógłby całkowicie zastąpić prospektywną biologiczną próbę krzyżową znacznie skracając czas zimnego niedokrwienia. Taki wybór postępowania byłby możliwy w grupie pacjentów niezimmunizowanych, bez aloprzeciwciał w przeszłości i wolnych od zdarzeń uczulających oraz w grupie biorców z dobrze zdefiniowanymi przeciwciałami, ale nie DSA, również wolnych w międzyczasie od zdarzeń uczulających. Ten rodzaj protokołu byłby szczególnie przydatny w przypadku przeszczepiania narządów, w których krytycznym parametrem jest krótki czas zimnego niedokrwienia.

Za włączeniem wirtualnej próby krzyżowej do rutynowego protokołu doboru immunologicznego par dawca-biorca przemawiają argumenty takie jak usprawnienie doboru, skrócenie czasu zimnego niedokrwienia, a przede wszystkim zmniejszenie ryzyka odrzucenia zależnego od przeciwciał i perspektywicznie redukcję powikłań oraz wydłużenie czasu przeżycia przeszczepu.

Podsumowanie

- Oznaczanie polimorfizmów w genach kodujących cytokiny pro i przeciwzapalne może pozwolić na oszacowanie ryzyka wystąpienia powikłań typowych dla przeszczepu hematopoetycznych komórek macierzystych takich, jak choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi i infekcje.
- Oszacowanie ryzyka wystąpienia GVHD może stać się wyznacznikiem indywidualizacji farmakologicznej immunosupresji a tym samym pozwolić na zastosowanie mniejszych dawek immunosupresji i zmniejszenie niepożądanych skutków tego leczenia u pacjentów z niskim ryzykiem wystąpienia choroby, a u biorców z wysokim ryzykiem zintensyfikować leczenie w celu uniknięcia rozwoju GVHD.
- Zastosowanie komórek T regulatorowych w leczeniu przewlekłej choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi wydaje się dawać wymierne skutki w postaci możliwości częściowej rezygnacji z leczenia farmakologicznego oraz ulgi w objawach choroby. Określenie skuteczności komórek T regulatorowych w profilaktyce i leczeniu ostrej GVHD oraz ustalenie standardowego protokołu wymaga dalszych badań.
- Zastosowanie testów fazy stałej z wykorzystaniem fluorymetru przepływowego umożliwia precyzyjne oszacowanie stopnia zimmunizowania pacjentów oczekujących na przeszczepienie narządu unaczynionego, zakwalifikowanie ich do poszczególnych grup ryzyka immunologicznego oraz określenie akceptowalnych niezgodności.
- Włączenie wirtualnej próby krzyżowej do algorytmu doboru immunologicznego par dawca-biorca przed przeszczepem narządu unaczynionego może dać wymierne skutki w postaci zmniejszonej liczby przypadków odrzucenia zależnego od przeciwciał, a co za tym idzie poprawy wyników długoterminowego przeżycia przeszczepu.

SUMMARY

Introduction

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is the only effective cure for hematological malignances. However, for more than two decades, 5-year overall survival is maintained at 40-60%. This is due to the complications associated with the transplant procedure and early and late relapse of primary disease. Key factors affecting the final outcome of transplantation are acute and chronic graft versus host disease, and serious, often life-threatening infections, mainly blood stream infections (BSI).

Acute graft versus host disease (aGVHD) is the main cause of early mortality dependent on transplantation. Both, aGVHD and the complications associated with its treatment are responsible for immune deficiencies that are a frequent cause of infection [1]. Chronic graft versus host disease (cGVHD) is a syndrome of differentiated symptoms occurring usually later after the transplantation. Chronic GVHD is also the main cause of mortality in the non-relapsed recipient [2].

Many factors are considered to significantly influence the development of graft-versus-host disease. An increased incidence of this complication is associated with mismatches (MM) in the HLA (human leukocyte antigen) between donor and recipient. However, this syndrome is also present in recipients identical in HLA with donors, indicating the role of other factors not included in routine immunological matching. Among them are listed: the age of the recipient (older recipient is associated with a higher risk of developing GVHD), transplant from an unrelated donor, the gender difference (woman as a donor for men), donor immunization status (multipara, donors after blood transfusion) [3]. There is also a gradation associated with graft type - the use of umbilical cord blood carries a lower risk of GVHD and peripheral blood stem cells higher than bone marrow. Some conditioning regimens may also affect the risk of developing this complication.

The most important role in donor selection for the recipient is tissue compatibility, but also smaller genetic systems and their role in promoting GVHD is underlined. The polymorphisms of cytokine-encoding genes appear to be a good candidate for an indicator of the risk of this complication [1,4-7]. Hence, one of the elements of the thesis was to identify among the selected polymorphisms those which allow to estimate the risk of GVHD development [8].

Very important and increasing mortality rates after HSCT are bacterial blood stream infections (BSI), which occur in this group of patients in about 13 - 60% of cases. Several risk factors for BSI are indicated: the age of the recipient > 18 years, the late phase of the primary disease, the presence of a catheter infection, severe graft versus host disease, use of high doses of steroid drugs or mucositis. As risk factors, alloHSCT with the presence of incompatibilities in the tissue compatibility system between the donor and the recipient is also mentioned [9-12]. However, it should be emphasized that in groups of patients presenting an identical level of risk, the incidence of BSI may vary. It is postulated that there are other factors predisposing to the development of infections, including BSI. Based on reports suggesting that polymorphisms in genes encoding cytokine are associated with many inflammatory disorders, it may be suspected that they also affect the risk of infection following HSCT. Therefore, in the study of the relationship between SNP (single nucleotide polymorphism) occurring in genes encoding cytokines and complications after HSCT, incidence of blood infections were also included.

A separate problem in HSCT is the treatment of graft versus host disease. In the case of acute form, regimens that provide measurable therapeutic effects have been developed. Thalidomide, rituximab, alemtuzumab, mycophenolate mofetil, sirolimus, imatinib were tested for the treatment of patients with cGVHD. However, their effects did not significantly improve the long-term outcome of HSCT. Certain hopes arouse extracorporeal photopheresis or the use of

inhibitors of JAK2 kinase, but still cGVHD is a serious clinical problem [13,14]. Hence, promising results of cGVHD treatment with T regulatory lymphocytes, presented in the publication [15] included in this PhD thesis, appear to be important.

The development of transplantation in recent years has also allowed for effective treatment of patients with end-stage insufficiency of solid organs. Among causes affected on the duration of graft survival both nonimmunological factors such as advanced age of donor and / or recipient, donor diseases, organ origin (deceased or alive donor), graft toxic damage dependent on immunosuppressive therapy, CMV infection, or duration of cold ischemia, and immune factors play an important role. The latter, include immunological matching of tissue compatibility and the presence of anti-HLA antibodies. Immune factors are responsible for the processes of graft rejection leading to organ insufficiency.

Rejection of a transplanted organ is a result of the recognizing graft antigens by recipient immune system, which initiates immune processes finally leading to destruction of graft. This physiological situation is due to genetic differences occurring mainly in HLA system between the donor and the recipient.

The most important procedure in immunological matching of donor-recipient pairs before the solid organ transplantation is to assess potential recipients' degree of immunization on foreign tissue compatibility antigens. The routine anti-HLA antibody test is PRA-CDC (panel reactive antibody - complement dependent cytotoxicity). However, it is insufficiently sensitive and it is recommended to additionally use solid phase immunoassays (SPI) - ELISA or by flow fluorometer Luminex. They provide the ability to not only detect lower concentrations of alloantibodies, but also to identify the specificity of anti-HLA antibodies, and consequently to determine the recipient unacceptable HLA antigen mismatches (UAMs) [16]. In the paper [17] presented in the thesis, we present results of studies that show the degree of underestimation of immunized patients, depending on the applied method.

A number of procedures are currently in place to reduce the incidence of particular types of transplant rejection. Proper pre-transplantation biological cross-match eliminates the risk of hyperacute rejection. Acute rejection of the transplanted organ is effectively inhibited by pharmacological immunosuppression. Nowadays, the biggest challenge for clinicians is to learn the mechanisms and mastery of chronic rejection, leading inevitably to premature lost of transplanted organ. Due to the ineffectiveness of the immunosuppressive drugs for this type of rejection, it is suggested to prevent its occurrence by appropriate immunological matching prior to transplantation. Improvement of the distant transplantation results may be possible by using a virtual cross match in the algorithm of immunological matching of the potential recipients. The advantages and disadvantages of v-XM are described in the publication [18] of this dissertation.

The aims of the doctoral dissertation

The aim of the study was to investigate new possibilities for improving hematopoietic stem cell and solid organs transplantation outcomes.

The task was accomplished by:

- Risk assessment of complications following transplantation of hematopoietic stem cells, taking into account the genetic evaluation as a parameter allowing to personalize immunosuppressive therapy.
- A proposal for the treatment of acute and chronic graft-versus-host disease using expanded regulatory T cells of a patient or donor.
- Determining of immunization status of patients awaiting kidney transplantation in Poland and identification of anti-HLA specificity in recipients awaiting retransplantation using high sensitivity solid phase methods by a flow fluorometer - Luminex.

- A proposal of using a virtual cross-match in the immunological matching algorithm prior to solid organ transplantation, as a test allowing reduce the risk of rejection incidents and to increase the chances of longer transplant survival.

The overview of publications which are part of doctoral dissertation

Anna Dukat-Mazurek, Maria Bieniaszewska, Andrzej Hellmann, Grażyna Moszkowska, Piotr Trzonkowski: Association of cytokine gene polymorphisms with the complications of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Hum. Immunol.* 2017; 78: 672-683

In addition to mismatches in the main histocompatibility system, there are other genetic factors that increase the risk of graft versus host disease. These include active inflammatory processes and cytokines involved in it, which play an important role in promoting the changes that result in the development of GVHD. The role of many pro- and anti-inflammatory cytokines has been described in the pathogenesis of acute and chronic GVHD. Some studies have also shown that different polymorphic forms of genes encoding cytokine affect their expression, both at the transcript and at the protein level. This means that these polymorphisms can affect virtually all immune processes occurring in the body, including GVHD and susceptibility to infection. Some researchers have documented a relationships between some of the polymorphisms found in cytokines and the incidence of not only GVHD but also many other inflammatory diseases (e.g. autoimmune diseases). The analysis of the association between the incidence of complications associated with the HSCT procedure and their degree of severity and SNP (single nucleotide polymorphism) occurring in the pro- and anti-inflammatory cytokine genes was therefore highly justified.

In our paper we present the results of the analysis of complication risk typical for alloHSCT on the basis of donor and recipient genotypes taking into account polymorphisms occurring in genes encoding cytokine.

The study group consisted of 108 recipients of hematopoietic cells and their 81 donors. In both donors and recipients group the following polymorphisms in the genes encoding cytokines were identified: TNF- α promoter region, position -308 A/G; TGF- β 1 codon 10 T/C, 25 C/G; IL-10 promoter region, positions -1082 A/G, -819 C/T, -592 A/C; IL-6 promoter region, position -174 G/C; IFN- γ intron 1, position +874 T/A. The methods used to determine the polymorphisms of individual cytokines were polymerase chain reaction restriction fragments length polymorphism (PCR-RFLP), polymerase chain reaction single-specific primer (PCR-SSP) and sequencing. Also, serum cytokine levels (TNF α , TGF- β 1, IL-10, IL-6, IFN- γ) have been determined to define the effect of specific genotypes on secretory activity. Serum cytokine levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

The results of the assay were referred to the clinical data that included infectious complications and acute and chronic forms of graft versus host disease. Data on the recipient were analyzed in the context of both recipient and donor polymorphisms. This allowed to determine the associations between the occurrence of particular polymorphisms in the genes encoding cytokine and the occurrence and progression of GVHD and particular infections.

Results suggest that in the term of studied polymorphisms, recipient genotype has the most clinical significance, while the donor's genotype is less relevant in relation to the occurrence of HSCT complications. Gene polymorphisms recorded for three of the tested cytokines: IL-6, IL-10 and TGF- β are associated with GVHD and sepsis. Studies have shown that polymorphism at site -174 of the gene encoding IL-6 is associated with its serum levels. CC genotype is responsible for low levels of IL-6, whereas guanine-containing genotypes (GG and GC) are connected with high secretion of this cytokine. This translates into an IL-6 correlation with HSCT complications. Since IL-6 is a pro-inflammatory cytokine, patients with CC genotype associated with low serum levels, rarely developed acute GVHD, whereas genotypes including G predisposed to aGVHD.

IL-10 also demonstrated the association of specific gene polymorphisms with serum cytokine concentration. Statistical analysis has shown that the GCC/ATA genotype is associated with high IL-10 concentrations while GCC/GCC with low levels of IL-10. Similarly to IL-6, here also the correlation between recipient genotype and HSCT complications was demonstrated. Patients with GCC/ATA genotype rarely suffered from GVHD, regardless of the type of disease. Seventy-five percent of patients with this genotype developed neither cGVHD nor aGVHD. The protective potential of this genotype was particularly related to the occurrence of acute disease. In rare cases patients with GCC/ATA genotype have been reported with symptoms of aGVHD, but their severity did not exceed grade I in the general classification of the disease. None of the recipients with this genotype developed aGVHD in grades II - IV. The opposite effect was demonstrated in cases with the GCC/GCC genotype. Furthermore, it was observed that the polymorphic sites of the gene encoding IL-10 were linked with chronic GVHD. All recipients of the ATA/ATA genotype have developed a chronic form of graft-versus-host disease.

The polymorphisms studied in the gene encoding TGF- β also influenced the serum concentration of this cytokine. It was shown that T/T G/G and T/C G/G genotypes were associated with high synthesis of this cytokine, while the T/C G/C and C/C G/G genotypes were responsible for its mean levels. These dependencies again demonstrated the association with the occurrence of GVHD. Genotype T/T G/G was associated with intensive production of this cytokine and predisposed the recipient to develop both acute and chronic GVHD. In the case of an acute form of the disease, this genotype was associated with clinically relevant grades: II-IV.

As a result of further analysis, it was shown that GVHD is not the only complication observed after HSCT which proved to be related to the investigated SNPs. Also the frequency and severity of blood infections showed a statistically significant correlation with specific genotypes. Polymorphisms in genes encoding three cytokines: IL-10, IL-6 and TNF- β turned out to be significant. The GG and CC genotypes of IL-6 predisposed to blood infections, while the GC genotype in this area presented a protective role. Multivariate analysis demonstrated the correlation between IL-10 and IL-6 genotypes. The coexistence of IL-10 GCC/GCC genotype with IL-6 GC genotype was associated with a low incidence of infections. Multivariate analysis also showed that viral infections (CMV, EBV, BKV) were less frequent in recipients with concomitant occurrence of GC genotype in IL-6 and ACC/ACC in IL-10. The opposite effect, which is an increase of viral infection risk was observed in recipients with simultaneous occurrence of the CC IL-6 and ACC/ACC IL-10 genotype. This may suggest that the role of IL-6 is crucial in controlling infection. Statistical dependencies of polymorphisms presented in the recipient genotypes and their influence on the risk of complications after HSCT are presented in Table 1.

Table 1. Effect of the recipient genotype on the risk of complications after HSCT

HSCT complication	Genotypes increasing the risk of complications	Genotypes decreasing the risk of complications
aGVHD	IL-6: G/C i G/G TGF- β : T/T G/G	IL-6: C/C IL-10: GCC/ATA
aGVHD grades: II-IV	IL-10: GCC/GCC TGF- β : T/T G/G	IL-10: GCC/ATA
cGVHD	IL-10: ATA/ATA TGF- β : T/T G/G	-
GVHD regardless of type	IL-6: G/C i G/G TGF- β : T/T G/G	IL-6: C/C IL-10: GCC/ATA
BSI	IL-6: C/C i G/G IL-10: ACC/ATA	IL-6: G/C TGF- β : T/C G/C
Viral infections	Simultaneous occurrence IL-6: CC z IL-10:ACC/ACC	Simultaneous occurrence IL-6: GC z IL-10:ACC/ACC

The results of the study confirmed that the polymorphisms found in genes encoding cytokines have an effect on their serum concentration. They also showed a number of correlations between tested SNP and frequency and severity of complications occurring after HSCT. Among the SNPs studied, the polymorphic site of the recipient IL-6 -174 G/C seemed to be a good candidate for the risk factor of complications after HSCT. Other researchers also drew similar conclusions. Polymorphisms in the gene encoding IL-10 (-1082 A/G, -819 C/T, -592 A/C) and TGF- β (codon 10 T/C, 25 C/G) are also associated with clinical results after HSCT. It also seems that polymorphisms of the IL-10 gene should be analyzed simultaneously with the IL-6 gene polymorphism.

Ability to estimate the risk of GVHD would give a possibility to personalize immunosuppressive prophylaxis after transplantation. Moreover, some of the polymorphisms correlate with the occurrence of specific tissue compatibility antigens (unpublished data). In selected cases, the HLA typing itself could indicate a risk of complications.

Piotr Trzonkowski, Anna Dukat-Mazurek, Maria Bieniaszewska, Natalia Marek-Trzonkowska, Anita Dobyszek, Jolanta Juścińska, Magdalena Dutka, Jolanta Myśliwska, Andrzej Hellmann: Treatment of graft-versus-host disease with naturally occurring T regulatory cells. *BioDrugs* 2013; 27:605-614

Currently, all patients undergoing HSCT from fully compatible HLA donors receive standard pharmacological immunosuppression as a part of prophylaxis and GVHD treatment. In cases of an aggressive form of the disease, additional treatment protocols are used, for example, extracorporeal photopheresis.

In our paper, we propose the use of regulatory T cells as a cell therapy against graft-versus-host disease. The publication presented in the dissertation describes the mode of action of regulatory T cells, pointing out those aspects of their operation that support the effectiveness of therapy and their use in treatment and prophylaxis of GVHD. The published data confirms the effectiveness of these cells in the treatment of GVHD in animal models and clinical trials has been reviewed. Difficulties that must be addressed when planning to include this type of treatment in the routine protocols are also discussed.

Regulatory T-cells (Treg) are CD4⁺ T-lymphocytes that have avoided negative selection. In peripheral blood they accounts for about 1% of all leukocytes and fulfill a protective function against autoaggressive activity of effector cells when they recognize their own antigens. They are responsible for tolerance to the body's own tissues, thus preventing autoimmune and allergic reactions and reducing the risk of rejection of all transplants. Treg exhibit inhibitory activity after exposure of their TCR receptors to antigens presented by antigen presenting cells (APCs). Treg competes for autoantigens on APC and, in contrast to effector cells, impose an anergy. This mechanism is also important in GVHD prophylaxis because donor-recipient pairs are most commonly matched with full compatibility of HLA antigens, which means that donor antigens should be recognized by transplanted Treg as their own. Because of the high expression of adhesion molecules and integrins on the Treg surface, these cells migrate to the inflammatory tissues faster than the effector T cells. When autoantigens are released from damaged cells, Treg initiates an anergy, even before any effector cells appear.

These cells also appear to be effective in transplants without full compatibility in HLA due to the low avidity of their TRC receptors. Their efficacy may also be enhanced in the future through pharmacological treatment including substances known to activate regulatory T cells, such as rapamycin, vitamin D, retinoic acid, glucocorticosteroids, or thymoglobulin.

The efficacy of Treg in GVHD prophylaxis is confirmed by reported results that recipients who have received CD4⁺, CD25⁺ enriched peripheral blood stem cell transplantation (PBSC), are less likely to develop acute GVHD. In addition, the lower risk of aGVHD was also presented by those recipients receiving transplants from donors with high numbers of Tregs in peripheral blood.

Clinical studies with using Treg cells in the treatment of graft versus host disease have demonstrated the efficacy of such therapy in chronic forms and lack of efficacy in IV grade of acute GVHD. Patients with cGVHD were able to discontinue pharmacologic treatment and experienced relieve from the disease. These results give hope for the possibility of effective treatment of chronic disease, especially in the absence of satisfactory pharmacological immunosuppression in severe cGVHD. In the case of aGVHD, the decision to implement cellular therapy was made when the pharmacological agents proved to be ineffective and possibly the period of two weeks, which is necessary for cell culture, resulted in ineffectiveness of therapy in case of fast-progressing and aggressive aGVHD stage IV. This also allows to conclude that Treg therapy is more effective as a prevention. This thesis is also supported by clinical trials from another team that used donor's T-cell infusion in haploidentical transplantations. Infusions took place on day -4. In this case, the recipients were given freshly isolated cells without prior culture. None of the thirteen recipients who survived 12 months after HSCT developed GVHD. The results of this study are very promising mainly because there was no need for subsequent pharmacological immunosuppression. In addition, the researchers observed that those cells did not affect the GvL effect (graft versus leukemia) because only one relapse was reported despite the presence of high risk factors for recurrence.

The main problem when it comes to the usage of this therapy in clinical practice is the availability of cells. The condition of the recipient after transplantation most often prevents donation of the proper quality of peripheral blood for Treg culture. The most advantageous situation is that the donor is a member of the patient's family, which eliminates logistical problems with donor's blood availability for regulatory T cell culture. This situation, however, applies to a small population of recipients. An alternative source of Treg may be umbilical cord blood. It is possible that in the future there will be effective cryopreservation techniques for these cells that will allow their extensive usage.

Therapeutic T regulatory cells outperform pharmacological therapies with no systemic effect and thus limit potential side effects. This is closely related to the nature of these cells, which have localized mode of action, limited only to the site of inflammation. In addition, such therapy would be a good alternative for patients suffering from GVHD resistant to conventional pharmacological immunosuppressive therapy.

Evidence of the efficacy of regulatory T-cells are promising, but prior to introducing it to routine therapies establishing most effective protocol and further clinical trials are needed. It seems that this therapy may be the best option in the prevention and treatment of graft versus host disease, especially it's chronic form.

Grażyna Moszkowska, Hanna Zielińska, Maciej Zieliński, Anna Dukat-Mazurek, Alicja Dębska-Ślizień, Bolesław Rutkowski, Dorota Lewandowska, Roman Danielewicz, Piotr Trzonkowski: Identification of patients with increased immunological risk among potential kidney recipients in the Polish population. *Hum. Immunol.* 2014; 75: 650-655

The most available and most frequently used method for determining immunization level of the organ transplant recipients is the method of complement-dependent cytotoxicity in the PRA-CDC test developed in the 1960s. However, with time it has been shown that the PRA-CDC test has numerous disadvantages. The main advantage is the detection of clinically relevant antibodies, which are activating the complement and low cost of the test. Unfortunately, this test is not sensitive enough and gives false negative results. Especially in the detection of alloantibodies directed against HLA class II antigens, because B lymphocytes presenting HLA class II antigens constitute only 13% of the cell population isolated from peripheral blood and used for assay. Furthermore, by using this method, we only can get an information on whether the patient is sensitized and to what extent (the percentage of positive reactions), without the ability to determine the class and specificity of anti-HLA antibodies. Another disadvantage is the randomness of the panel of lymphocytes used for the test. This significantly affects the differences in the results of determinations in inter-laboratory comparisons. New technologies, using solid

phase tests, have allowed a significant improvement in the sensitivity and quality of detection of alloantibodies in patients awaiting solid organ transplantation and allowed to identify the group of recipients with an increased immunological risk.

Due to the low number of recipients immunized in our country (assessed routinely with the PRA-CDC test) in comparison to other populations, the Polish Ministry of Health financed the analysis of the degree of immunization of recipients with more sensitive methods of the solid phase as part of the National Program for the Development of Transplant Medicine. The studies included patients awaiting kidney transplantation from the National Waiting List in the Transplant Registries. In our work, we present the results of these analyzes.

The research was carried out using the Luminex flow fluorometer in the field of screening test (LS, Luminex Screen, One Lambda, USA) for the whole group of recipients awaiting for kidney transplantation in 2012 (1460 patients). In addition, in the group of patients who were the most exposed to immunization (235 recipients reported for retransplantation), antibodies specificity identification tests were performed (L-SAB, Luminex Single Antigen Beads, One Lambda, USA).

The results obtained were compared with the PRA-CDC data performed in patients' sera at the same time and with the maximum historical results of the PRA-CDC. Additionally, in the group of recipients reported for retransplantation, the degree of patients' immunization to incompatible HLA antigens from previous transplants was determined (MM mismatch). The research confirmed the suspicion that the number of sensitized patients in Poland is underestimated. Using the flow fluorometry method in the entire 1460 study group, a score of 50% of immunized patients versus 17% with PRA-CDC was obtained. A slightly smaller difference was observed when comparing the results of LS with the maximum historical value of PRA-CDC (35% of immunized recipients). This comparison was simultaneously carried out separately for patients referred for the first transplant and for retransplantation. In the group of recipients awaiting the first transplant, the result was 41% with the LS method versus 10% PRA-CDC (or 28% with respect to the maximum PRA-CDC). Patients referred for retransplantation were immunized at 52%, 72% or 96%, respectively in the PRA-CDC method, the maximum PRA-CDC and using LS. The differences were statistically significant.

The LS screening test allows to determine not only against which class of HLA antigens the recipient has antibodies, but additionally to detect anti-MICA antibodies (MHC class I-related chain-A), which the PRA-CDC test could not identify. In the studied group of recipients, these antibodies were detected in 195 patients (13%). A positive result makes it possible to explain the reasons for antibody-dependent rejection with the presence of C4d deposits in the transplanted kidney in non-immunized patients.

In 235 patients waiting for the next transplantation, in which a positive result was obtained in the LS screening test, the identification of specificity of anti-HLA class I and / or II antibodies was performed depending on the obtained LS score. Antibodies against antigens of HLA-A and HLA-B were most frequent and were present in 80% and 82% of subjects respectively. Anti-HLA-DR antibodies were observed in 64% of recipients, whereas anti-HLA-DQ and HLA-DP were 65% and 39% respectively. Half of the respondents showed the presence of anti-HLA-C antibodies. In connection with the transplant loss observed in fully compatible graft in the HLA-A, B, DR range, it seems that the anti-HLA-C alloantibodies are also clinically relevant and may be responsible for the rejection process.

The performance of L-SAB tests allowed to determine the degree of immunization of patients for mismatches submitted by donors in previous transplants. In 191 (81%) recipients, mismatch was observed at *locus A*, 210 (89%) presented MM at *locus B* and 174 (74%) at *locus DR*. In the first discussed group, in 69 patients, no DSA (donor specific antibody) antibodies were detected against the incompatible antigens, in the second group in 96 recipients did not show the presence of DSA and in the third group 99 subjects were negative for MM in the DR *locus*.

The obtained results question whether it is reasonable to avoid a donor, which has the same MM as the previous one during the next transplantation. This is particularly important for patients who have received an organ from donor with mismatch, which often occurs in the popula-

tion. Excluding such a recipient only on the basis of a repeated MM can lead to minimizing or even losing the chance of retransplantation [19].

The results presented in the paper suggest that the methods used to determine immunization should be an integral part of a routine clinical strategy to improve the results of a kidney transplantation. These techniques are particularly useful in the assessment of patients from a high immunological risk group and allow effective transplantation and longer graft survival. Identification of specificity of anti-HLA antibodies also allows a virtual cross-match to be used before transplantation.

Anna Dukat-Mazurek, Hanna Zielińska, Grażyna Moszkowska, Maria Bieniaszewska, Piotr Trzonkowski: Rola wirtualnej próby krzyżowej w przeszczepianiu narządów litych. *Forum Transplantol.* 2016; 1: 5-10

Immunological matching before solid organ transplantation is based on the selection of recipients who present the smallest number of incompatible antigens in the HLA against the reported donor and on the performing of a biological cross-match. In Poland, the HLA-A, B, DRB1 typing of donor and recipient at the low resolution level is still a standard. A cross-match before transplantation in the case of deceased donor is carried out by complement dependent cytotoxicity method (CDC-XM). More sensitive flow cytometric method is used for a living donor. Such a distribution is dictated by organizational possibilities. In the case of deceased donors, cross-matches for 30-40 recipients are carried out at the same time. Due to the time-consuming of FCXM (flow cytometry cross match) procedure, it would not be possible to perform the same number of tests using a flow cytometer without significantly prolonging the time of cold ischaemia. FCXM can only be done retrospectively for the selected donor-recipient pair, when matching from a deceased donor.

Ability to include the virtual cross-match (v-XM) in the protocol of donor-recipient matching before transplantation, is a significant improvement. It enables quick verification of the list of potential recipients of the solid organ and exclusion those of recipients who are potentially positive prior to the biological cross-match (for which there are DSAs previously detected by LSA tests). This can contribute to a faster selection of the right donor and to shorten the time of cold ischaemia. In our paper we discussed the principles of using virtual cross-match and the advantages and imperfections resulting from using this method in routine practice.

Virtual crossmatch seems to be a good tool to minimize the risk of antibody-dependent acute and chronic rejection. Hyperacute rejection has been practically eliminated by performing pre-transplant biological cross-match (CDC-XM). Acute rejection can be effectively inhibited by the use of pharmacological immunosuppression. It allowed to reduce the frequency of this type of rejection from around 50% in the 90s to around 10% in 2009 and significantly improved the annual survival of the transplant. Currently, one of the greatest challenges for clinicians is antibody-dependent rejection, which in many cases is impossible to master despite attempts to use plasmapheresis, immunoadsorption, intravenous infusions of immunoglobulins, or the use of immunosuppressive drugs with different modes of action. This applies especially to the chronic form of antibody-dependent rejection and results in worse graft survival results in the long-term observation. Preventing ABMR (antibody mediated rejection) through adequate immunological matching before transplantation, combined with appropriate immunosuppression considering the risk of anti-HLA antibodies produced de novo and monitoring the recipient after transplantation in the terms of DSA seems to be the most effective strategy.

The use of v-XM requires pre-transplantation determination of the HLA specificity against which the recipient has produced alloantibodies. For this purpose, solid phase immunoassays (SPI) are used. The most widely used and recommended is a highly sensitive method using the Luminex based on X-Map technology. This method was used in own studies to identify sensitized patients and to determine the specificity of anti-HLA antibodies. The virtual cross-match test allows to identify and remove from the list of potential recipients those who have antibodies

against donor HLA antigens (DSA) and to perform biological CM only with the serum of those patients who are DSA-free.

Incorporation of v-XM in the donor-recipient matching protocol before transplantation is not without certain drawbacks. First of all, it should be determined whether all antibodies detected in L-SAB tests are clinically relevant and should they be included in the virtual cross-match test. Not all of them bind the complement and it is discussed whether this method deprive recipients of a chance for effective transplantation. In order to eliminate that, it is suggested to use Luminex-C1q or Luminex C3d tests that detect alloantibodies binding and activating the complement system. Such a distinction of clinically important, lytic antibodies would increase the chances of transplantation, especially in the highly-sensitized group of patients. Studies assessing the effect of using solid phase immunoassays and v-XM in immunological matching show an improvement in 5-year survival by about 10%, and in the detection of alloantibodies activating a complement of up to 40%.

Another important aspect is to determine the cut off level of the antibody concentration factor, i.e. the mean fluorescence intensity (MFI). Too low MFI cut-off value may deprive a recipient of transplantation possibility because of disqualification for a biological cross-match, and too high may expose the patient to acute or chronic rejection due to the presence of low DSA concentrations undetectable in the final CDC-XM test. Transplant centers that routinely use the v-XM determine different cut-off levels between 500 and 1500 MFI. Some researchers indicate that these levels should be higher due to good correlation with biological cross-matches (CDC-XM, FCXM) - even above 5000 MFI.

When using the virtual cross-match test, the risk of obtaining both false positive and false negative results due to various reasons should always be considered. False positive results are primarily associated with a higher density of HLA antigens on microspheres used in L-SAB tests than physiologically on cells. This applies mainly to the *C locus* in Class I and DP, DQ in Class II. For this reason, higher cut-off levels are used for those specificities. False negative results may occur in the presence of non-HLA antibodies (e.g. autoantibodies) that bind complement and lead to lysis of lymphocytes in a biological assay, but not detected by L-SAB tests.

In some cases, v-XM could completely replace the prospective biological cross-match test, significantly reducing the time of cold ischaemia. This would be possible in the group of non-immunized patients, without alloantibodies in the past and free of sensitizing events, and in the group of recipients with well-defined alloantibodies, but not DSA, also free from sensitizing events in the meantime. This type of protocol would be particularly useful for organ transplantation where the critical parameter is the short time of cold ischaemia.

The inclusion of the virtual cross-match to the routine protocol of immunological matching of donor-recipient pairs is supported by arguments such as improving of matching, shortening the time of cold ischaemia and, above all, reducing the risk of antibody-dependent rejection which results in reduction of complications and prolonging the survival time of the transplant.

Summary

- Determination of polymorphisms in genes encoding pro and anti-inflammatory cytokines may allow to estimate the risk of complications typical for hematopoietic stem cell transplantation such as graft-versus-host disease and infections.
- Estimating the risk of GVHD may become a determinant of individualization of pharmacological immunosuppression and thus allow the use of lower doses of immunosuppression and reduction of adverse effects of this treatment in patients with low risk of disease, and in patients at high risk to intensify treatment to avoid development of GVHD.
- The use of regulatory T-cells in the treatment of chronic graft-versus-host disease seems to give measurable effects by giving the possibility of partial resignation from pharmacological treatment and relief of symptoms. Determining the effectiveness of regulatory T cells in the

prophylaxis and treatment of acute GVHD and the establishing a standard protocol requires further investigation.

- The use of solid phase tests based on Luminex method enables to precisely estimate the degree of immunization of patients awaiting solid organ transplantation, qualification for individual immunological risk groups and determination of acceptable incompatibilities.
- Inclusion of virtual cross-match to the donor-recipient matching procedure prior to a solid organ transplantation can give measurable results in the form decreasing antibody-dependent rejection rate, and thus improving the long-term survival of the graft.

WYKAZ STOSOWANEGO PIŚMIENICTWA

- 1 Ball LM, Egeler RM, Hansen JA, Chien JW, Warren EH, Zhao LP, et al.: Acute GvHD: pathogenesis and classification. *Bone Marrow Transplant* 2008;41:58–64.
- 2 Devergie A: Graft versus host disease; in Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Gratwohl A, Masszi T (eds): *The 2012 revised edition of the EBMT-ESH Handbook on Haematopoietic Stem Cell Transplantation.*, ed 6. Genoa, ESH, 2012, pp 218–235.
- 3 Wojnar J, Giebel S, Krawczyk-Kulis M, Markiewicz M, Kruzel T, Wylezol I, et al.: Acute graft-versus-host disease. The incidence and risk factors. *Ann Transplant* 2006;11:16–23.
- 4 Pidala J, Sarwal M, Roedder S, Lee SJ: Biologic markers of chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant* 2014;49:324–331.
- 5 Sun Y, Tawara I, Toubai T, Reddy P: Pathophysiology of acute graft-versus-host disease: recent advances. *Transl Res* 2007;150:197–214.
- 6 Bogunia-Kubik K, Łacina P: From genetic single candidate gene studies to complex genomics of GvHD. *Br J Haematol* 2017;178:661–675.
- 7 Bogunia-Kubik K, Wysoczanska B, Lange A: Non-HLA gene polymorphisms and the outcome of allogeneic hemato-poietic stem cell transplantation. *Curr Stem Cell Res Ther* 2006;1:239–253.
- 8 Dukat-Mazurek A, Bieniaszewska M, Hellmann A, Moszkowska G, Trzonkowski P: Association of cytokine gene polymorphisms with the complications of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Hum Immunol* 2017;78:672-683
- 9 Poutsiaka DD, Price LL, Ucuzian A, Chan GW, Miller KB, Snyderman DR: Blood stream infection after hematopoietic stem cell transplantation is associated with increased mortality. *Bone Marrow Transplant* 2007;40:63–70.
- 10 Mikulska M, Del Bono V, Raiola AM, Bruno B, Gualandi F, Occhini D, et al.: Blood Stream Infections in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: Reemergence of Gram-Negative Rods and Increasing Antibiotic Resistance. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15:47–53.
- 11 Gudiol C, Garcia-Vidal C, Arnan M, Sánchez-Ortega I, Patiño B, Duarte R, et al.: Etiology, clinical features and outcomes of pre-engraftment and post-engraftment bloodstream infection in hematopoietic SCT recipients. *Bone Marrow Transplant* 2014;49:824–830.
- 12 Poutsiaka DD, Munson D, Price LL, Chan GW, Snyderman DR: Blood stream infection (BSI) and acute GVHD after hematopoietic SCT (HSCT) are associated. *Bone Marrow Transplant* 2011;46:300–307.
- 13 Fraser CJ, Scott Baker K: The management and outcome of chronic graft-versus-host disease. *Br J Haematol* 2007;138:131–145.

-
- 14 Jamil MO, Mineishi S: State-of-the-art acute and chronic GVHD treatment. *Int J Hematol* 2015;101:452–466.
 - 15 Trzonkowski P, Dukat-Mazurek A, Bieniaszewska M, Marek-Trzonkowska N, Dobyszek A, Juścińska J, et al.: Treatment of graft-versus-host disease with naturally occurring T regulatory cells. *BioDrugs* 2013;27:605–614.
 - 16 The detection & characterisation of clinically relevant antibodies in allotransplantation *British Transplantation Society Guidelines 2015*; Available from: www.bts.org.uk
 - 17 Moszkowska G, Zielińska H, Zieliński M, Dukat-Mazurek A, Debska-Ślizień A, Rutkowski B, et al.: Identification of patients with increased immunological risk among potential kidney recipients in the Polish population. *Hum Immunol* 2014;75:650–655.
 - 18 Dukat-Mazurek A, Zielińska H, Moszkowska G, Bieniaszewska M, Trzonkowski P: Rola wirtualnej próby krzyżowej w przeszczepianiu narządów litych. *Forum Transplantologiczne* 2016;3:5–10.
 - 19 Côté JM, Zhang X, Dahhou M, Sapir-Pichhadze R, Foster B, Cardinal H: The impact of repeated mismatches in kidney transplantations performed after nonrenal solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2017;18:238–244.

PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY