

Gdański Uniwersytet Medyczny

**OCENA WYBRANYCH PARAMETRÓW IMMUNOLOGICZNYCH
ZWIĄZANYCH Z INFEKcją CMV PO PRZESZCZEPIE NERKI
W KONTEKŚCIE MOŻLIWOŚCI ZMNIEJSZENIA LECZENIA
IMMUNOSUPRESYJNEGO**

Maciej Zieliński

ROZPRAWA NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

Gdańsk 2017

Pracę wykonano w Katedrze Immunologii, Zakładzie Immunologii Klinicznej i Transplantologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem:

Prof. dr. hab. med. **Piotra Trzonkowskiego** – Promotora pracy

oraz

Dr n. med. **Grażyny Moszkowskiej** – Promotora pomocniczego

Badania sfinansowano ze środków:

Narodowego Centrum Nauki, granty NN402420738 i NN402562440

Narodowego Centrum Badań i Rozwoju, grant STRATEGMED1/233368/1/NCBR/2014

SPIS TREŚCI

WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY	2
WPROWADZENIE	3
CEL PRACY	4
STRESZCZENIE PREZENTOWANYCH PRAC	5
WNIOSKI Z PREZENTOWANYCH PRAC	8
WYKAZ CYTOWANEGO PIŚMIENNICTWA	9
PODZIĘKOWANIA	10
THE LIST OF PAPERS FOR Ph.D. DISSERTATION	11
INTRODUCTION	12
STUDY OBJECTIVE	13
SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION'S RESEARCH ARTICLES	14
CONCLUSIONS OF PRESENTED PAPERS	16
REFERENCES	17

WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY

1. **Maciej Zieliński**, Hanna Zielińska, Grażyna Moszkowska, Piotr Trzonkowski: **Jaki monitoring po przeszczepieniu nerki powinniśmy stosować?** Forum Transplantol. 2016, vol. 3, nr 1, s. 43-50
– praca pogładowa –

2. **Maciej Zieliński**, Agnieszka Tarasewicz, Hanna Zielińska, Magdalena Jankowska, Grażyna Moszkowska, Alicja Dębska-Ślizień, Bolesław Rutkowski, Piotr Trzonkowski: **CD28 Positive, Cytomegalovirus Specific Cytotoxic T Lymphocytes As A Novel Biomarker Associated With Cytomegalovirus Viremia In Kidney Allorecipients**, J. Clin. Virol. 2016, vol. 83, s. 17-25
– praca doświadczalna –

Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik IF ISI: **3.051**
Punktacja ministerstwa: **25.000**

3. **Maciej Zieliński**, Agnieszka Tarasewicz, Hanna Zielińska, Magdalena Jankowska, Grażyna Moszkowska, Alicja Dębska-Ślizień, Bolesław Rutkowski, Piotr Trzonkowski: **Impact Of Donor And Recipient Human Cytomegalovirus Status On Kidney Transplantation**
ahead of print, International Immunology, DOI: 10.1093/intimm/dxx062
– praca doświadczalna –

Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik IF ISI: **3.748**
Punktacja ministerstwa: **25.000**

Łączny IF prezentowanych prac: 6,799

WPROWADZENIE

Wirus cytomegalii (CMV) jest powszechnym patogenem występującym w populacji osób dorosłych, a odsetek osób zakażonych wzrasta z wiekiem. Do reaktywacji wirusa CMV dochodzi najczęściej u osób z obniżoną odpornością, np. leczonych immunosupresyjnie. Z tego powodu CMV jest jednym z najczęstszych czynników infekcyjnych spotykanych po przeszczepie nerki (KTX). W zależności od statusu serologicznego CMV pary dawca/biorca (obecność przeciwciał IgG w surowicy krwi) u ponad połowy stwierdza się chorobę CMV, a replikacja wirusa obserwowana jest nawet u 90% biorców (1).

Pomimo stosowanego w ostatnich latach przeciwwirusowego leczenia profilaktycznego, zakażenie CMV pozostaje istotnym problemem klinicznym dla biorców przeszczepu nerki. Z powodu zagrażających życiu powikłań, infekcja CMV ma bezpośredni negatywny wpływ na powodzenie przeszczepu. Istotny jest też efekt pośredni wirusa na organizm osoby zakażonej. Odległe efekty dotyczą wyższego ryzyka miażdżycy naczyń (2), zwiększonej podatności na zakażenia (3) oraz zmniejszonej odpowiedzi na szczepienia ochronne (4).

Przewlekła stymulacja przez CMV układu odpornościowego powoduje jego uszkodzenie, określane terminem ścieranie się układu odpornościowego (z ang. *immune attrition*). Prowadzi to do: akumulacji CMV specyficznych limfocytów T, zmiany proporcji limfocytów T naiwnych/pamięci z przewagą komórek terminalnie zróżnicowanych, utraty antygeny CD28 przez limfocyty T, odwrócenia proporcji limfocytów T CD4/CD8 oraz skracania się telomerów (5). Zmiany te mogą istotnie wpływać na stan zdrowia; w badaniach osób starszych, nosicielstwo CMV, wiek powyżej 60 lat oraz indeks CD4/CD8 poniżej jedności wiązał się z zwiększonym ryzykiem śmiertelności w okresie dwóch lat (6).

Współczesne wyzwania związane z badaniem wpływu wirusa CMV na losy biorców przeszczepów nerek skupiają się na poszukiwaniu biomarkerów infekcji CMV oraz ocenie ryzyka infekcji w obecności stosowanego leczenia immunosupresyjnego. Celem badań na świecie jest uwzględnienie odpowiedzi osobniczej na wirusa oraz dobranie na tej podstawie indywidualnej terapii farmakologicznej, stanowiącej najlepsze wyważenie efektu terapeutycznego przy minimalnych działaniach ubocznych leków przeciwwirusowych i immunosupresyjnych (7).

CEL PRACY

Celem pracy było badanie układu odpornościowego biorców przeszczepu nerki zakażonych wirusem CMV w zakresie:

1. Poszukiwania biomarkerów zakażenia CMV mających potencjalne zastosowanie w diagnostyce immunologicznej biorców po przeszczepie nerki.
2. Oceny ryzyka immunologicznego związanego ze statusem serologicznym pary dawca/biorca jako potencjalnego wskaźnika możliwości indywidualizacji leczenia immunosupresyjnego po przeszczepie nerki.

STRESZCZENIE PREZENTOWANYCH PRAC

Wszystkie badania wykonano w grupie 52 biorców alop przeszczepu nerki, 21 kobietach i 31 mężczyznach w wieku 52 ± 14 lat (średnia \pm SD). Pacjenci podzieleni byli na grupy w zależności od statusu serologicznego CMV: (D+/R-) - pierwotna infekcja CMV, (D-/R+) - tylko biorca zakażony CMV, (D+/R+) - reinfekcja CMV oraz (D-/R-) - brak infekcji CMV. Biorcy byli badani co cztery miesiące, przez dwa lata od przeszczepienia nerki. Przy kolejnych wizytach mierzone były parametry immunologiczne: fenotyp limfocytów we krwi obwodowej, stężenie cytokin w surowicy krwi oraz wiremia CMV. Równolegle oceniany był stan kliniczny pacjenta wskazujący na infekcję CMV, albo infekcję innego pochodzenia lub proces odrzucania narządowego. Praca uzyskała zgodę komisji bioetycznej, nr NKEBN/473/2011.

W pracy, *Impact Of Donor And Recipient Human Cytomegalovirus Status On Kidney Transplantation*, ahead of print, *International Immunology*, DOI: 10.1093/intimm/dxx062, zbadano wpływ wirusa CMV na układ odpornościowy biorców KTX w zależności od statusu serologicznego CMV pary dawca/biorca. Skupiono się głównie na biorcach CMV pozytywnych, którzy otrzymują nerkę od dawcy CMV pozytywnego. Jest to grupa szczególna, ponieważ niewiele wiadomo jaki jest efekt reinfekcji CMV na układ immunologiczny biorcy, poddanego immunosupresji farmakologicznej i czy ma to wpływ na jego stan kliniczny. Stosowane w tym zakresie wytyczne wskazują, że biorcy CMV dodatni niezależnie od statusu CMV dawcy traktowani są jako grupa względnego ryzyka w zakresie leczenia przeciwwirusowego (8).

W pracy, najważniejszym spostrzeżeniem był zwiększony poziom limfocytów T CD8+ CMV specyficznych w grupie biorców (D+/R+), w porównaniu do (D-/R+). Pomimo porównywalnych poziomów w momencie przeszczepu, grupa biorców która otrzymywała nerkę od dawcy CMV pozytywnego charakteryzowała się zwiększającymi się poziomami komórek CMV specyficznych w okresie dwuletniego monitorowania. Przeciwnie, pacjenci (D-/R+) utrzymywali stabilny poziom limfocytów T CD8+ CMV specyficznych. Co ciekawe, biorcy CMV pozytywni, których dawca był zakażony wirusem CMV, znacznie częściej rozwijali infekcję CMV w porównaniu z biorcami, których dawca był CMV negatywny, pomimo zwiększonego odsetka limfocytów T CD8+ CMV specyficznych. Częstość pozostałych infekcji była podobna w grupie (R+), za wyjątkiem zakażenia BKV, które pojawiało się jedynie w grupie (D+/R+).

W dwuletniej obserwacji, biorcy (R+) różnili się też w zakresie parametrów immunologicznych kojarzonych z procesem ścierania się układu odpornościowego. Pomimo podobieństwa w momencie przeszczepu, po dwóch latach biorcy (D+/R+) oceniani względem (D-/R+) charakteryzowali się obniżonym indeksem CD4/CD8 poniżej jedności, zmniejszoną ekspresją CD28 na limfocytach T oraz wyższym poziomem stężenia IL-10 i TNF α w surowicy krwi. Podobnie zaś zmieniał się poziom terminalnie zróżnicowanych limfocytów T oraz długość telomerów limfocytów T.

Interesująca jest też obserwacja dotycząca incydentów odrzucania narządowego. Procesu tego nie obserwowano w przypadku biorców przechodzących pierwotną infekcję CMV.

W pracy, *CD28 Positive, Cytomegalovirus Specific Cytotoxic T Lymphocytes As A Novel Biomarker Associated With Cytomegalovirus Viremia In Kidney Allorecipients*, *J. Clin. Virol.* 2016, vol. 83, s. 17-25 badano przydatność wybranych parametrów immunologicznych jako potencjalnych markerów identyfikujących biorców przeszczepu nerki rozwijających wiremii CMV. Wybrano szereg parametrów immunologicznych kojarzonych z odpornością przeciwwirusową. Ważny był też aspekt praktyczny, polegający na możliwości ewentualnego zastosowania danego parametru w warunkach rutynowych oznaczeń w laboratorium o profilu immunologicznym. Pośród ocenianych parametrów były parametry komórkowe mierzone w krwi obwodowej: limfocytoza, limfocyty T CD8+, aktywowane limfocyty T (HLA-DR+), limfocyty T CD8+ o fenotypie komórek pamięci efektorowej (CD45RA-/CD62L-), limfocyty T CD8+ CMV specyficzne oraz stężenie markerów białkowych w surowicy krwi: TNF α , IL-6, IL-2, INF γ .

Badanych 52 pacjentów podzielono na dwie grupy, rozwijających i nie rozwijających wiremii CMV po KTX. Obserwację kontynuowano w odstępach czteromiesięcznych do dwóch lat od KTX. Oprócz badanych parametrów immunologicznych mierzono poziom wiremii CMV i badano stężenie leków immunosupresyjnych w surowicy krwi.

Z wybranych, markerów immunologicznych wiremii CMV, jedynie poziomy limfocytów T CD8+ CMV specyficznych były znamienne wyższe u pacjentów rozwijających wiremii CMV. Różnicę tę obserwowano tylko w pierwszych dwóch punktach monitorowania (KTX, +4 miesiące) i nie identyfikowano w ten sposób wszystkich przypadków wiremii CMV.

Stąd, na podstawie wcześniejszych badań, rozszerzono oznaczenie fenotypu limfocytów T CD8+ CMV specyficznych o ocenę ekspresji antygenu CD28. Modyfikacja ta pozwoliła na wskazanie znamienych różnic pomiędzy biorcami rozwijającymi wiramię CMV, a tymi pacjentami, którzy pozostawali negatywni w całym okresie dwuletniego badania. Analizując parametry analityczne metody z zastosowaniem krzywej ROC zaproponowano poziom 3 komórek/ μ l limfocytów T CD8+/CD28+ CMV specyficznych jako punkt odcięcia, identyfikujący przypadki wirēmii CMV. W badanej grupie pacjentów, ilekroć wartość tego markera była równa lub większa od 3 komórek/ μ l, biorcy nie rozwijali wirēmii CMV. Oznaczenia limfocytów T CD8+/CD28+ CMV specyficznych przy poziomie 3 komórek/ μ l charakteryzowały się zadowalającą wartością czułości (87,5%) i swoistości (85,3%).

Istotna była też obserwacja, że wśród biorców rozwijających infekcje CMV po zakończeniu prewencyjnego leczenia przeciwwirusowego, wartość mierzonych limfocytów T CD8+/CD28+ CMV specyficznych była poniżej 3 komórek/ μ l w krwi obwodowej.

WNIOSKI Z PREZENTOWANYCH PRAC

Wykonane badania ilustrują znaczący wpływ wirusa CMV na układ odpornościowy biorców przeszczepu nerki, charakteryzujący się istotnymi zmianami w populacji komórek limfocytów T. Wykazano progresję cech charakterystycznych dla ścierania się układu odpornościowego (*immune attrition*), tj. akumulację limfocytów T CD8+ CMV specyficznych, zmniejszoną ekspresję antygenu CD28 na limfocytach T i obniżenie się indeksu CD4/CD8. W dużej mierze są to również zmiany charakterystyczne dla procesu starzenia się układu odporności.

W przypadku biorców przeszczepu nerki są to niezmiernie istotne obserwacje dlatego, że zmiany te pogłębiają stan immunosupresji wywołany leczeniem farmakologicznym, koniecznym do utrzymania przeszczepionej nerki. Zbyt silna immunosupresja układu odpornościowego zwiększa wydatnie podatność na zakażenia, w tym infekcje oportunistyczne oraz może usposabiać do rozwoju nowotworu. Dodatkowo, biorca zakażony CMV wymaga również intensywnego leczenia przeciwwirusowego. Wiele spośród stosowanych na tym etapie leków ma szerokie spektrum działań niepożądanych. Stąd próba personalizacji leczenia farmakologicznego, opartego na indywidualnych właściwościach układu odpornościowego biorcy jest współcześnie wyzwaniem immunologii transplantacyjnej.

Wykonane badania wpisują się w ten nurt zagadnień. Wskazano grupę podwyższonego ryzyka immunologicznego, biorców CMV pozytywnych otrzymujących nerkę od dawcy zakażonego CMV. Pacjenci ci są obecnie traktowani zgodnie z międzynarodowymi wytycznymi jako biorcy średniego ryzyka, na równi z pacjentami otrzymującymi nerkę od dawcy CMV negatywnego (8). Przeprowadzone badania wskazują jednak, że reinfekcja CMV znacząco pogarsza parametry układu odpornościowego, zwiększając ryzyko zakażenia CMV.

Udało się też zaproponować nowoczesny test immunologiczny, badania limfocytów T CD8+/CD28+ CMV specyficznych, pozwalający na indywidualizację leczenia przeciwwirusowego konkretnych pacjentów. Test ten identyfikuje pacjentów wysokiego ryzyka, którzy rozwijają wiramię CMV po KTX i pozwala na ocenę bezpieczeństwa zakończenia leczenia przeciwwirusowego.

Podsumowując, wykonane badania mają wkład w zagadnienie personalizowanej farmakoterapii biorców przeszczepu nerki i wnoszą asumpt do przyszłych badań nad starzeniem się układu odpornościowego pod wpływem wirusa CMV.

WYKAZ CYTOWANEGO PIŚMIENNICTWA

- 1 Rowshani, A. T., Bemelman, F. J., van Leeuwen, E. M., van Lier, R. A., and ten Berge, I. J. 2005. Clinical and immunologic aspects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 79:381.
- 2 Betjes, M. G., Weimar, W., and Litjens, N. H. 2013. Circulating CD4(+)CD28null T Cells May Increase the Risk of an Atherosclerotic Vascular Event Shortly after Kidney Transplantation. *J Transplant* 2013:841430.
- 3 Crepin, T., Gaiffe, E., Courivaud, C., Roubiou, C., Laheurte, C., Moulin, B., Frimat, L., Rieu, P., Mousson, C., Durrbach, A., Heng, A. E., Saas, P., Bamoulid, J., and Ducloux, D. 2016. Pre-transplant end-stage renal disease-related immune risk profile in kidney transplant recipients predicts post-transplant infections. *Transpl Infect Dis*.
- 4 Trzonkowski, P., Myśliwska, J., Szmit, E., Wieckiewicz, J., Lukaszuk, K., Brydak, L. B., Machała, M., and Myśliwski, A. 2003. Association between cytomegalovirus infection, enhanced proinflammatory response and low level of anti-hemagglutinins during the anti-influenza vaccination--an impact of immunosenescence. *Vaccine* 21:3826.
- 5 Pawelec, G. and Derhovanesian, E. 2011. Role of CMV in immune senescence. *Virus Res* 157:175.
- 6 Strindhall, J., Skog, M., Emerudh, J., Bengner, M., Löfgren, S., Matussek, A., Nilsson, B. O., and Wikby, A. 2013. The inverted CD4/CD8 ratio and associated parameters in 66-year-old individuals: the Swedish HEXA immune study. *Age (Dordr)* 35:985.
- 7 Manuel, O., Husain, S., Kumar, D., Zayas, C., Mawhorter, S., Levi, M. E., Kalpoe, J., Lisboa, L., Ely, L., Kaul, D. R., Schwartz, B. S., Morris, M. I., Ison, M. G., Yen-Lieberman, B., Sebastian, A., Assi, M., and Humar, A. 2013. Assessment of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high-risk solid-organ transplant recipients: a multicenter cohort study. *Clin Infect Dis* 56:817.
- 8 Kotton, C. N., Kumar, D., Caliendo, A. M., Asberg, A., Chou, S., Danziger-Isakov, L., Humar, A., and Group, T. S. I. C. C. 2013. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation* 96:333.

PODZIĘKOWANIA

Chciałbym serdecznie podziękować:

Pracownikom Katedry i Kliniki Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, GUMed.

- Kierownikowi Katedry, **Pani Profesor Alicji Dębskiej-Ślizień** za możliwość współpracy, poświęcony czas i życzliwość. Szczególnie za wsparcie w badaniach, przy publikacji wyników i prezentacji każdej z powstających na podstawie wykonanych badań pracy;
- **Panu Profesorowi Bolesławowi Rutkowskiemu** za umożliwienie współpracy i okazaną życzliwość;
- **Dr Magdalenie Jankowskiej** za rekrutację pacjentów oraz pomoc przy przygotowaniu publikacji powstających na podstawie prezentowanych wyników;
- **Dr Agnieszce Tarasewicz** za ocenę kliniczną pacjentów oraz pomoc przy przygotowaniu publikacji powstających na podstawie prezentowanych wyników;
- **Mgr Beacie Białobrzskiej** za zaangażowanie i pomoc przy pobieraniu materiału biologicznego pacjentów do badań.

Panu Profesorowi Zbigniewowi Śledzińskiemu, Kierownikowi Katedry Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej i Transplantacyjnej GUMed za umożliwienie pobierania materiału do badań.

Koleżankom i Kolegom z Zakładu Immunologii Klinicznej i Transplantologii GUMed oraz Laboratorium Immunologii i Transplantologii Klinicznej UCK za stworzenie przyjaznej atmosfery oraz pomoc w trakcie wykonywania badań.

THE LIST OF PAPERS FOR Ph.D. DISSERTATION

1. **Maciej Zieliński**, Hanna Zielińska, Grażyna Moszkowska, Piotr Trzonkowski:
Jaki monitoring po przeszczepieniu nerki powinniśmy stosować?
Forum Transplantol. 2016, vol. 3, nr 1, s. 43-50
– review article –

2. **Maciej Zieliński**, Agnieszka Tarasewicz, Hanna Zielińska, Magdalena Jankowska, Grażyna Moszkowska, Alicja Dębska-Ślizień, Bolesław Rutkowski, Piotr Trzonkowski:
CD28 Positive, Cytomegalovirus Specific Cytotoxic T Lymphocytes As A Novel Biomarker Associated With Cytomegalovirus Viremia In Kidney Alloreipients,
J. Clin. Virol. 2016, vol. 83, s. 17-25
– research article –

ISI Master Journal List, IF ISI: **3.051**
MNI₅W: **25.000**

3. **Maciej Zieliński**, Agnieszka Tarasewicz, Hanna Zielińska, Magdalena Jankowska, Grażyna Moszkowska, Alicja Dębska-Ślizień, Bolesław Rutkowski, Piotr Trzonkowski:
Impact Of Donor And Recipient Human Cytomegalovirus Status On Kidney Transplantation
ahead of print, International Immunology, DOI: 10.1093/intimm/dxx062
– research article –

ISI Master Journal List, IF ISI: **3.748**
MNI₅W: **25.000**

Total IF of PhD dissertation: 6,799

INTRODUCTION

Cytomegalovirus (CMV) infection is common in humans and the percentage of infected individuals rises with age. The reactivation of this virus may affect immunocompromised hosts, such as immunosuppressed patients, and therefore CMV infection occurs very often after kidney transplantation (KTX). Depending on donor/recipient serological status, about half of the recipients suffers from CMV disease and viral replication can be detected up to 90% of transplanted individuals (1).

Despite antiviral prophylaxis, CMV infection is a significant threat to kidney transplant recipients. CMV infection, due to life-threatening complications, may affect directly the transplant outcome. In addition, the virus may be indirectly associated with poor transplant outcome because of increased risk of atherosclerosis (2) high susceptibility to infections (3), and poor response to vaccination (4).

CMV impairs the immunity through chronic stimulation described as 'immune attrition'. This includes an abundance of the CMV specific and terminally differentiated T lymphocytes, loss of CD28 antigen expression, inverted CD4/CD8 index and extensive lymphocytes telomere shortening (5). Immune attrition may contribute to overall healthiness, as CMV seropositivity, age > 60 y.o. and the inverted CD4/CD8 index has been reported as associated with increased mortality among elderly (6).

The search for biomarkers of CMV infections, therefore, a constant challenge in kidney transplantation. Good and proper markers of the imminent infection may facilitate personalized immunosuppressive therapy which, on one side, would maintain the graft survival and, on the other side, would reduce side-effects of the immunosuppression as far as possible (7).

STUDY OBJECTIVE

The purpose of the study was to assess immunity of kidney transplant recipients infected with CMV for:

1. the identification of biomarkers of CMV infection with a possible implementation into routine diagnostics of kidney transplant recipients.
2. immune risk assessment of donor/recipient pairs as a potential research tool for immunosuppressive therapy individualization.

SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION'S RESEARCH ARTICLES

The study population consisted of 52 kidney allotransplant recipients, 21 women and 31 men at 52 ± 14 y.o. (mean \pm SD). Patients were divided according to CMV serological status: (D+/R-) - primary CMV infection, (D-/R+) - CMV positive recipient, (D+/R+) - CMV reactivation and (D-/R-) - no CMV infection. Patients were monitored every four months up to 24 months after transplantation. Immune cell phenotypes and cytokine levels were assessed together with CMV viremia and disease development at each time point along with allograft rejection episodes and other infectious complications. The study was approved by the local ethics committee, NKEBN/473/2011.

In the paper, *Impact Of Donor And Recipient Human Cytomegalovirus Status On Kidney Transplantation*, ahead of print, International Immunology, DOI: 10.1093/intimm/dxx062, the influence of CMV on recipient's immunity was investigated in respect to donor status. In this study, recipients exposed to CMV reinfection were investigated because little is known how virus transmitted from an infected donor to an infected recipient (D+/R+) modulates the recipient's already suppressed immunity, and what clinical consequences are. According to international consensus criteria, infected recipients (R+) are collectively recognized as moderate risk patients (8).

The most important observation was that CMV specific lymphocytes expanded vastly in infected recipients who received kidneys from infected donors, in comparison to uninfected donors. In contrast to (D-/R+) recipients, (D+/R+) had higher levels of CMV specific lymphocytes two years after transplantation, despite comparable levels before transplantation. For (D-/R+) patients, levels of CMV specific lymphocytes remained stable in two-years follow-up. Interestingly, increased incidence of CMV infection episodes in D+/R+ patients was noted too, although they had increased proportion of CMV specific CD8+ T cells in peripheral blood. The rate of non-CMV infections was equal across (R+) patients with exception of BK virus infection incidents which was detected only in (D+/R+).

In the follow-up, it was found that immune status was significantly different between (D-/R+) and (D+/R+) patients two years after transplantation, even though it was comparable before the transplantation. The parameters associated with immune attrition, such as inverted CD4/CD8 index, accumulation of CD28-negative T cells, and higher TNF α and IL-10 serum levels were significantly higher in (D+/R+) patients as compared to those (D-/R+). In contrary,

levels of terminally differentiated T cells and lymphocyte's telomere length were changing similarly in both groups.

Noteworthy, the patients undergoing primary CMV infection (D+/R-) were free from kidney rejection episodes.

In the paper, *CD28 Positive, Cytomegalovirus Specific Cytotoxic T Lymphocytes As A Novel Biomarker Associated With Cytomegalovirus Viremia In Kidney Allorecipients*, J. Clin. Virol. 2016, vol. 83, s. 17-25 utility of potential biomarkers of CMV viremia were evaluated for kidney transplant recipients. Several anti-viral immune cell markers and cytokine were chosen as potentially useful in routine immune laboratory settings. The following parameters measured in peripheral blood were tested: lymphocytosis, CD8+ T lymphocytes, activated T lymphocytes (HLA-DR+), effector memory CD8+ T lymphocytes (CD45RA-/CD62L-), CMV specific CD8+ T lymphocytes and serum concentration of TNF α , IL-6, IL-2, and INF γ .

A group of 52 kidney allorecipients was divided into two groups according to the presence of CMV viremia after transplantation. The immune markers, CMV viremia, and immunosuppressive drugs serum concentration were evaluated every 4 months up to two years after KTX.

It has been found that the level of CMV specific CD8+ T lymphocytes was decreased when patients were developing CMV viremia. Unfortunately, this was only at the moment of transplantation and four months later and this biomarker did not cover all viremia positive incidents.

Based on previous experience, the phenotype of CMV specific CD8+ T lymphocytes was extended to assess the surface expression of CD28 antigen. This modification enabled to point the difference between patients that developed or did not develop CMV viremia after KTX up to two years after transplantation. Using statistical approach with ROC curves analysis, the level of 3 cells/ μ l of CMV specific CD8+/CD28+ T cells was found as a critical cut-off for the development of CMV viremia incidents. In the study population, whenever the level of CMV specific CD8+/CD28+ T cells was equal or higher to the cut-off, the patients did not suffer from CMV viremia. The CMV specific CD8+/CD28+ T cells level as a marker of imminent infection had also sufficient sensitivity (87,5%) and specificity (85,3%).

Importantly, the levels below 3 cells/ μ l of CMV specific CD8+/CD28+ T lymphocytes were found in patients who developed CMV viremia at the end of prophylaxis treatment.

CONCLUSIONS OF PRESENTED PAPERS

In this study, the significant impact of CMV on the immunity of kidney transplant recipients was found. The features of immune attrition in these patients, such as the abundance of CMV specific CD8+ T lymphocytes, loss of CD28 surface expression and inverted CD4/CD8 lymphocytes index, could be detected. This process resembled a course of the immune aging process.

For kidney transplant recipients it is of special interest as immune attrition may increase the immunosuppressive effect of drugs applied to maintain transplanted organ. Too heavy immunosuppression may increase the susceptibility to infection including opportunistic infections or may predispose to neoplasia. Furthermore, CMV infected kidney transplant recipients require intensive anti-viral treatment. Unfortunately, many of currently used drugs have severe side effects. So, the attempt to personalized therapy is one of the important challenges of transplantation immunology.

The research that has been done refers to these problems. The risk of CMV reinfection when the positive recipient is transplanted from an infected donor was highlighted. Currently used clinical guidelines classify all CMV positive recipients as an entire group (R+) in the category of moderate risk patients (8). Our research pointed to the problem of the higher risk associated with reinfection phenomenon in the D+/R+ recipients as compared to D-/R+ recipients.

We also propose the laboratory test assessing the level of CMV specific CD8+/CD28+ T cells as a possible biomarker of CMV viremia. This new approach may serve as a tool for personalized therapy as it reliably identifies patients at risk of CMV viremia and can guide safe weaning and withdrawal of anti-viral treatment after kidney transplantation.

In conclusions, presented data increases the knowledge on CMV and immuno-senescence after kidney transplantation and encourage for individually tailored immunosuppressive treatment navigated by the findings from the papers presented in this Ph.D. work.

REFERENCES

- 1 Rowshani, A. T., Bemelman, F. J., van Leeuwen, E. M., van Lier, R. A., and ten Berge, I. J. 2005. Clinical and immunologic aspects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 79:381.
- 2 Betjes, M. G., Weimar, W., and Litjens, N. H. 2013. Circulating CD4(+)CD28null T Cells May Increase the Risk of an Atherosclerotic Vascular Event Shortly after Kidney Transplantation. *J Transplant* 2013:841430.
- 3 Crepin, T., Gaiffe, E., Courivaud, C., Roubiou, C., Laheurte, C., Moulin, B., Frimat, L., Rieu, P., Mousson, C., Durrbach, A., Heng, A. E., Saas, P., Bamoulid, J., and Ducloux, D. 2016. Pre-transplant end-stage renal disease-related immune risk profile in kidney transplant recipients predicts post-transplant infections. *Transpl Infect Dis*.
- 4 Trzonkowski, P., Myśliwska, J., Szmit, E., Wieckiewicz, J., Lukaszuk, K., Brydak, L. B., Machała, M., and Myśliwski, A. 2003. Association between cytomegalovirus infection, enhanced proinflammatory response and low level of anti-hemagglutinins during the anti-influenza vaccination--an impact of immunosenescence. *Vaccine* 21:3826.
- 5 Pawelec, G. and Derhovanessian, E. 2011. Role of CMV in immune senescence. *Virus Res* 157:175.
- 6 Strindhall, J., Skog, M., Emerudh, J., Bengner, M., Löfgren, S., Matussek, A., Nilsson, B. O., and Wikby, A. 2013. The inverted CD4/CD8 ratio and associated parameters in 66-year-old individuals: the Swedish HEXA immune study. *Age (Dordr)* 35:985.
- 7 Manuel, O., Husain, S., Kumar, D., Zayas, C., Mawhorter, S., Levi, M. E., Kalpoe, J., Lisboa, L., Ely, L., Kaul, D. R., Schwartz, B. S., Morris, M. I., Ison, M. G., Yen-Lieberman, B., Sebastian, A., Assi, M., and Humar, A. 2013. Assessment of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high-risk solid-organ transplant recipients: a multicenter cohort study. *Clin Infect Dis* 56:817.
- 8 Kotton, C. N., Kumar, D., Caliendo, A. M., Asberg, A., Chou, S., Danziger-Isakov, L., Humar, A., and Group, T. S. I. C. C. 2013. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation* 96:333.