



Gdański Uniwersytet Medyczny

Agnieszka Cegielska

Ocena zależności pomiędzy antygenami zgodności tkankowej oraz limfocytami T regulatorowymi krwi obwodowej a zapadalnością na nowotwory skóry u pacjentów po przeszczepieniu nerki.

ROZPRAWA NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Alicja Dębska-Ślizień

Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych

Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk 2019

SPIS TREŚCI:

WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY	3
WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY	4
STRESZCZENIE	5
WSTĘP	7
CELE PRACY	11
OMÓWIENIE METODYKI I WYNIKÓW BADAŃ ZAWARTYCH W PUBLIKACJACH WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY	12
PODSUMOWANIE	17
STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM	18
WYKAZ CYTOWANEGO PIŚMIENNICTWA	30
PODZIĘKOWANIA	32
PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY	33

WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

AZA- azathioprine- azatiopryna

BCC- basal cell carcinoma- rak podstawnocomórkowy

CNI- calcineurin inhibitors- inhibitory kalcyneuryny

CsA- cyclosporine A- cyklosporyna A

EWE/EVE- everolimus- ewerolimus

GKS- glucocorticosteroids- glikokortykosteroidy

HLA- Human leukocyte antigens- główny kompleks zgodności tkankowej

IS- immunosuppression- immunosupresja

MMF- mycophenolate mofetil- mykofenolan mofetilu

MPS- mycophenolate sodium- mykofenolan sodu

mTORi- mammalian target of rapamycin inhibitors- inhibitory szlaku mTOR

NMSC – non-melanoma skin cancers - niemelanocytowe raki skóry

PFS- progression- free survival- czas przeżycia wolny od progresji, czas przeżycia wolny od choroby

PSI- proliferation signal inhibitors- inhibitory sygnału proliferacji

RAPA- rapamycin, sirolimus- rapamycyna, sirolimus

SCC- squamous cell carcinoma- rak kolczystokomórkowy, rak płaskonabłonkowy

TAC- tacrolimus- takrolimus

Treg- T regulatory cells- limfocyty T regulatorowe

WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY

Association Between HLA Type and skin Cancer in Kidney Transplant Recipients.

Transplantation Proceedings 2016; 48: 1608-1619

IF 0.908

Evaluation of Quantitative Changes in Regulatory T cells in Peripheral Blood of Kidney Transplant Recipients with Skin Cancer after Conversion to mTOR Inhibitors.

Advances in Dermatology and Allergology 2018; XXXV (5): 474-480

IF 1,757

Rola czynników genetycznych i immunologicznych w patogenezie raków skóry u pacjentów po przeszczepieniu narządów unaczynionych.

Forum Nefrologiczne 2018; 11 (4): 256-262

Streszczenie

Allogeniczne przeszczepianie narządów unaczynionych niesie za sobą ryzyko rozwoju powikłań, jakimi są powikłania chirurgiczne i infekcje, we wczesnym okresie po transplantacji, oraz powikłania internistyczne i wzrost zachorowania na nowotwory złośliwe w okresie późniejszym. Stale rosnąca liczba wykonywanych przeszczepień oraz wydłużający się czas życia pacjentów z przeszczepionym narządem sprawiają, że w praktyce klinicznej coraz częściej spotykamy się z powikłaniami odległymi. Wśród nowotworów złośliwych rozpoznawanych *de novo* u osób po transplantacji najliczniejszą grupę stanowią nowotwory skóry. Poniższa praca miała na celu zbadanie roli, jaką odgrywają czynniki genetyczne i immunologiczne w etiopatogenezie nowotworów złośliwych skóry u pacjentów po przeszczepieniu nerki, co w przyszłości pozwoliłoby na wprowadzenie skutecznej profilaktyki.

Cel pracy: 1. Zbadanie zależności między występowaniem określonych antygenów zgodności tkankowej HLA klasy I i II a zwiększoną zapadalnością na nowotwory złośliwe skóry u pacjentów po przeszczepieniu nerki. 2. Ocena aktywności limfocytów T regulatorowych u pacjentów z rozpoznaniem *de novo* po przeszczepieniu nowotworem złośliwym skóry po wprowadzeniu do schematu leczenia immunosupresyjnego mTORi. 3. Ocena ryzyka wznowy lub pojawienia się kolejnego ogniska nowotworu złośliwego skóry po wprowadzeniu do leczenia mTORi.

Materiał i metody: Do badań zostali włączeni pacjenci po przeszczepieniu nerki, pozostający pod opieką Poradni Transplantologicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, u których przeszczepienia dokonano w latach 1983- 2013. W badaniu czynników genetycznych grupę badaną stanowili pacjenci z rozpoznaniem *de novo* po transplantacji niemelanocytowym rakiem skóry, grupę kontrolną zaś pacjenci po przeszczepieniu, którzy takiego nowotworu nie rozwinęli. W obu grupach porównano częstość występowania poszczególnych antygenów zgodności tkankowej HLA klasy I (AB) i II (DR) oraz zbadano czy istnieje zależność pomiędzy obecnością określonych swoistości antygenowych a zwiększoną zapadalnością na raki skóry po transplantacji narządu. Badanie czynników immunologicznych obejmowało grupę pacjentów po przeszczepieniu nerki, u których po rozpoznaniu nowotworu złośliwego skóry zmieniono schemat leczenia immunosupresyjnego, gdzie jeden z dotychczas stosowanych leków został zmieniony na inhibitor sygnału proliferacji. Metodą cytometrii przepływowej oznaczono poziom określonych subpopulacji limfocytów T- przed zmianą leczenia, a następnie 6 miesięcy

po niej. Grupę kontrolną stanowili pacjenci po przeszczepieniu narządu pozostający na dotychczasowym leczeniu immunosupresyjnym. Jednocześnie porównano przebieg choroby nowotworowej w obu grupach pacjentów.

Wyniki i wnioski: 1. W badanej populacji pacjentów po przeszczepieniu nerki stwierdzono częstsze występowanie antygenu HLA DR15 u chorych z rozpoznaniem *de novo* po przeszczepieniu NMSC oraz u pacjentów z rozpoznaniem *de novo* po transplantacji BCC. W tej samej populacji chorych stwierdzono częstsze występowanie HLA B18 u osób z rozpoznaniem *de novo* po przeszczepieniu SCC. 2. Pół roku po wprowadzeniu do leczenia mTORi u pacjentów po przeszczepieniu nerki z rozpoznaniem *de novo* nowotworem złośliwym skóry obserwowano statystycznie istotny wzrost odsetka limfocytów regulatorowych we krwi obwodowej. 3. Po włączeniu do schematu leczenia immunosupresyjnego leków z grupy mTORi u pacjentów z rozpoznaniem *de novo* po transplantacji nerki nowotworem złośliwym skóry odnotowano, w porównaniu z chorymi, u których nie dokonano konwersji na mTORi, rzadsze pojawianie się kolejnego ogniska nowotworu oraz wydłużenie czasu wolnego od choroby.

Wstęp

Przeszczepianie nerki jest obecnie uznaną i coraz powszechniej stosowaną metodą leczenia schyłkowej fazy przewlekłej niewydolności tego narządu.

Pierwszego udanego przeszczepienia nerki u ludzi dokonał w 1954 roku w Bostonie chirurg Joseph Murray we współpracy z Johnem Merillem i Hartwellem Harrisonem [1]. Przeszczepienia tego dokonano u bliźniąt jednojajowych, co zagwarantowało przeżycie przeszczepionego narządu pomimo braku następczej immunosupresji. Kolejne dekady przyniosły dalszy rozwój transplantologii. Dzięki lepszemu poznaniu mechanizmów odrzucania przeszczepionego narządu i, co z tym związane, stworzeniu zasad doboru tkankowego i wprowadzeniu immunosupresji (IS) możliwe stało się allogeniczne przeszczepianie narządów na większą skalę.

Kolejne przełomy w transplantologii wyznaczało wprowadzanie do leczenia leków immunosupresyjnych- najpierw azatiopryny (AZA), początkowo samodzielnie, a następnie w połączeniu z glikokortykosteroidami (GKS), później, w latach 80-tych XX wieku, pierwszego inhibitora kalcyneuryny- cyklosporyny A (CsA). Pozwoliło to nie tylko na wydłużenie przeżycia przeszczepionego narządu, ale również zdecydowanie zmniejszyło śmiertelność chorych po przeszczepieniu. Dalsze intensywne badania pozwoliły na stworzenie nowych leków immunosupresyjnych, takich jak takrolimus (TAC), mykofenolan mofetylu/sodu (MMF/MPS), sirolimus (RAPA), ewerolimus (EWE), obecnie powszechnie stosowanych w przewlekłej terapii u biorców narządów.

Pomimo wprowadzenia do transplantologii nowych, skuteczniejszych, a jednocześnie bezpieczniejszych leków immunosupresyjnych, nadal przewlekła immunosupresja jest jednym z głównych czynników etiopatogenetycznych powikłań odległych po transplantacji, jakimi są infekcje, oraz zwiększona zapadalność na choroby sercowo- naczyniowe i nowotworowe. Spośród tych ostatnich najczęściej rozpoznawane są nowotwory skóry, które stanowią nawet do 50 % wszystkich nowotworów złośliwych rozpoznawanych *de novo* po transplantacji [2]. Zapadalność na nie wzrasta z każdym rokiem po przeszczepieniu, a skumulowane ryzyko zachorowania na raka skóry w tej populacji chorych w krajach o dużym nasłonecznieniu szacuje się na 45% 10 lat po przeszczepieniu i aż 70% 20 lat po przeszczepieniu; z kolei w krajach o umiarkowanym klimacie odpowiednio na 16% i 41% [2-4].

Podobnie jak w populacji ogólnej najczęściej rozpoznawane złośliwe nowotwory skóry to niemelanocytowe raki (NMSC): podstawnokomórkowy (BCC) i płaskonabłonkowy (SCC), przy czym w odróżnieniu od populacji ogólnej dochodzi do odwrócenia stosunku BCC i SCC, który w populacji ogólnej wynosi 1: 0,2, a w populacji osób po przeszczepieniu zmienia się na 1: 2,7 [2,3,5].

Rak płaskonabłonkowy według wielu autorów jest najczęściej rozpoznawanym nowotworem złośliwym skóry u osób z przeszczepionym narządem- częstość jego występowania wzrasta w największym tempie w porównaniu z populacją ogólną; jest rozpoznawany nawet 200- krotnie częściej niż u osób immunokompetentnych [6]. Zapadalność na raka podstawnokomórkowego również wzrasta, przy czym dynamika tego procesu jest słabsza, nowotwór ten jest rozpoznawany w populacji po przeszczepieniu 10 razy częściej niż w populacji ogólnej [7].

Większość autorów opisuje również zwiększoną zapadalność na czerniaka u chorych po przeszczepieniu, zazwyczaj kilku- kilkunastokrotnie większą niż w populacji ogólnej. Jednak, szczególnie w porównaniu z rakami, istnieje znacznie mniej danych na temat częstości jego występowania w tej grupie chorych.

W populacji osób po przeszczepieniu częściej występują również nowotwory złośliwe skóry, które w populacji ogólnej występują sporadycznie, takie jak rak z komórek Merkla czy rak z komórek gruczołów łojowych.

Obraz kliniczny NMSC rozwijających się *de novo* u chorych po przeszczepieniu jest zbliżony do tych rozpoznawanych w populacji ogólnej. Zmiany lokalizują się głównie w okolicach narażonych na działanie promieniowania słonecznego. Rozpoznawane są wszystkie postacie poszczególnych typów raków skóry, przy czym u biorców narządów częściej obserwowane są postacie atypowe. Różny jest przebieg choroby, szczególnie w przypadku SCC, który u osób po przeszczepieniu częściej niż w populacji ogólnej rozwija się wielogniskowo, ma tendencje do pojawiania się w młodszym wieku niż u osób immunokompetentnych, częściej wzrasta naciekająco, a także częściej daje przerzuty [5, 8-9].

Zbieżne z populacją ogólną są również niektóre czynniki ryzyka. Wspólne dla obu populacji są wiek, fototyp, ekspozycja na promieniowanie słoneczne oraz uwarunkowania genetyczne. Raki skóry u osób immunokompetentnych rozwijają się częściej u osób po 60 roku życia, z niskim fototypem skóry wg klasyfikacji Fitzpatricka (osoby o jasnej karnacji, jasnym kolorze włosów i oczu), z dużą ekspozycją na promieniowanie ultrafioletowe w wywiadzie. U chorych po przeszczepieniu nowotwory skóry także częściej rozwijają się w zaawansowanym wieku,

dodatkowo znaczenie ma wiek biorcy w momencie przeszczepienia. U pacjentów, u których przeszczepienia nerki dokonano przed 40 rokiem życia, raki skóry pojawiają się średnio po 7- 8 latach od przeszczepienia. U chorych, u których nerka została przeszczepiona po 60 roku życia czas ten skraca się do 2- 3 lat [5, 10, 11].

Za jeden z najważniejszych czynników ryzyka w obu grupach uważa się promieniowanie ultrafioletowe (promieniowanie UV). Jego działanie kancerogenne wynika z indukowania immunosupresji, zarówno lokalnej w skórze, jak i ogólnoustrojowej, a także z bezpośredniego uszkodzenia DNA komórek skóry. Jest to jeden z najlepiej poznanych czynników etiopatogenezy raków skóry, a zarazem czynnik którego wpływ jesteśmy w stanie zminimalizować poprzez odpowiednie zachowania.

Wśród czynników ryzyka nowotworów skóry specyficznych dla osób po transplantacji wymienia się: przyczynę niewydolności nerek (częściej nowotwory rozwijają się u osób z wielotorbielowatością nerek, z nefropatią analgetyczną, rzadziej z nefropatią cukrzycową), czas dializoterapii przed przeszczepieniem, leczenie immunosupresyjne w okresie przedtransplantacyjnym, przewlekłą immunosupresję po transplantacji oraz zakażenia wirusowe.

Dominującą rolę spośród tych czynników odgrywa IS. Znaczenie ma długość stosowanej immunosupresji, stosowanie leczenia indukcyjnego, leczenie epizodów odrzucania przeszczepu, a także rodzaj stosowanych leków immunosupresyjnych.

Schematy leczenia immunosupresyjnego po transplantacji opierają się na kilku grupach leków. Stosuje się antymetabolity (AZA), inhibitory kalcyneuryny (CsA, TAC), selektywne antymetabolity (MMF/MPS), inhibitory sygnału proliferacji (RAPA i EWE), glikokortykosteroidy. Niekiedy bywa konieczne zastosowanie przeciwciał mono- i poliklonalnych.

Największy wpływ na rozwój nowotworów złośliwych skóry przypisuje się AZA [12,13]. Zwiększona zapadalność na nowotwory pozytywnie koreluje również z całkowitą dawką CsA przyjmowaną przez pacjentów oraz z jej poziomem we krwi [14].

W innych badaniach obserwowano większą zapadalność na nowotwory wśród chorych otrzymujących trójlekowy schemat leczenia immunosupresyjnego (CsA- AZA- GKS) niż u chorych leczonych schematem dwulekowym (AZA- GKS) [2, 10]. Z kolei rzadsze występowanie nowotworów potwierdzono w kilku badaniach u pacjentów leczonych inhibitorami szlaku mTOR (inhibitory mTOR, mTORi) – RAPA i EWE [10, 15,16].

Jako kolejne czynniki ryzyka zwiększonej zapadalności na raki skóry wymienia się te związane z antygenami zgodności tkankowej (HLA). Niezgodność w układzie HLA między dawcą i biorcą jest pośrednim czynnikiem ryzyka, jako że im większa tym wymaga stosowania silniejszej immunosupresji. Istnieją również badania, które wiążą zwiększoną zapadalność na raki skóry z obecnością określonych antygenów głównego układu zgodności tkankowej. W zależności od badanej populacji obserwowano częstsze występowanie pewnych swoistości antygenowych u osób z rozpoznaniem raka skóry, zarówno w populacji ogólnej, jak i osób po transplantacji.

Cele pracy:

1. Zbadanie zależności między występowaniem określonych antygenów zgodności tkankowej HLA klasy I i II a zwiększoną zapadalnością na nowotwory złośliwe skóry u pacjentów po przeszczepieniu nerki.
2. Ocena aktywności limfocytów T regulatorowych u pacjentów z rozpoznaniem *de novo* po przeszczepieniu nowotworem złośliwym skóry po wprowadzeniu do schematu leczenia immunosupresyjnego mTORi.
3. Ocena ryzyka wznowy lub pojawienia się kolejnego ogniska nowotworu złośliwego skóry po wprowadzeniu do leczenia mTORi.

Cele pracy zostały zrealizowane w cyklu 3 spójnych tematycznie prac- 2 oryginalnych i jednej poglądowej co zostało poniżej w skrócie opisane.

Badania wykonane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej podzielono na dwie części: pierwszą, obejmującą badanie czynników genetycznych i drugą, obejmującą badanie czynników immunologicznych.

Do badania w obu przypadkach zostali włączeni pacjenci po przeszczepieniu nerki, pozostający pod opieką Poradni Transplantologicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, u których przeszczepienia dokonano w latach 1983- 2013.

1. Praca oryginalna **Association Between HLA Type and skin Cancer in Kidney Transplant Recipients**, Transplantation Proceedings 2016; 48: 1608-1619 IF 0.908

W ramach tej pracy starano się uzyskać odpowiedź na pierwszy przedstawiony powyżej cel czyli zbadanie zależności między występowaniem określonych antygenów zgodności tkankowej HLA klasy I (A i B) i II (DR) a zwiększoną zapadalnością na nowotwory złośliwe skóry u pacjentów po przeszczepieniu nerki.

Grupę badaną stanowiło 39 chorych z rozpoznaniem *de novo* po przeszczepieniu NMSC, grupę kontrolną 50 pacjentów po przeszczepieniu nerki, którzy takiego nowotworu nie rozwinęli. Obie grupy były dobrane zgodnie pod względem płci, wieku, fototypu skóry, deklarowanej w przeszłości ekspozycji na promieniowanie słoneczne (do badania nie włączono osób, które w wywiadzie podawały epizod zamieszkania lub pracy w krajach o dużym nasłonecznieniu), wieku w momencie transplantacji oraz czasu po transplantacji. W obu grupach podobny był odsetek osób, które wymagały leczenia epizodu ostrego odrzucania przeszczepu (16% w grupie badanej i 18 % w grupie kontrolnej). W obu grupach najczęściej stosowanym schematem leczenia immunosupresyjnego był GKS, MMF, CNI. W grupie badanej 7 chorych prezentowało pojedyncze ognisko SCC, 17 chorych- BCC, 15 chorych prezentowało wieloogniskowe raki skóry, zazwyczaj obu typów. W obu grupach przeanalizowano częstość występowania poszczególnych antygenów zgodności tkankowej HLA klasy I i II. Uzyskane wyniki porównano ze sobą, a także z częstością występowania poszczególnych antygenów w populacji ogólnej, którą reprezentowało 100 zdrowych osób.

Obliczenia statystyczne wykonano przy użyciu programu Statistica, wersja 10.0. (StatSoft, Inc. 2011). Analizy częstości alleli oraz innych cech jakościowych dokonano przy użyciu testu χ^2 metodą Pearsona. Zmienne niezależne spełniające założenia dla testów parametrycznych analizowane były za pomocą testu t-Studenta. Zmienne niezależne, niespełniające założeń testów parametrycznych, analizowano za pomocą testów nieparametrycznych (odpowiedników ANOVA): testu U Manna-Whitneya (porównania dwóch prób) bądź Kruskala-Wallisa (porównania wielu prób). Ilorazy szans (OR, ang. odds ratio) z 95% zakresami ufności określano metodą regresji logistycznej. We wszystkich testach, jako znamiennego poziomu istotności statystycznej uznano $p < 0,05$.

W przeprowadzonym badaniu stwierdzono istotne statystycznie częstsze występowanie antygeny HLA- DR 15 u pacjentów z rozpoznaniem NMSC w porównaniu z grupą

kontrolną (6,41% v 0,0% p=0.014). Antygen ten występował również częściej u tych chorych niż w populacji ogólnej (6,41 % v 3,54%), jednak różnica ta nie osiągnęła istotności statystycznej (p= 0,29). Istotnie statystycznie częstsze niż w grupie kontrolnej występowanie HLA DR 15 wykazano również u osób z rozpoznaniem BCC (9% v 0%, p= 0,04). Inną odnotowaną zależnością było częstsze występowanie antygeny HLA B18 u osób z rozpoznaniem SCC w porównaniu z zarówno grupą kontrolną (26% v 10,8% P=0.03), jak i populacją ogólną (26% v 8% p= 0,002).

Nie odnotowano natomiast żadnej korelacji pomiędzy występowaniem określonych antygenów zgodności tkankowej a obecnością mnogich ognisk raków skóry.

Związek pomiędzy występowaniem określonych antygenów zgodności tkankowej a zwiększoną zapadalnością na nowotwory skóry u osób po transplantacji był już przedmiotem badań w różnych populacjach. Opisano dotychczas pozytywną korelację między obecnością antygeny HLA A11 a zwiększonym ryzykiem rozwoju NMSC u pacjentów w Australii, negatywną zaś w populacji europejskiej. Stwierdzono również częstsze występowanie HLA B27 u biorców z rozpoznaniem *de novo* po przeszczepieniu NMSC, zarówno w populacji australijskiej, jak i w Europie. W badaniu przeprowadzonym w Polsce, w ośrodku krakowskim, nie wykazano wpływu rodzaju ani liczby zgodnych antygenów HLA na rozwój raków skóry. W prezentowanym badaniu z ośrodka gdańskiego odnotowano częstsze występowanie HLA DR15 u osób z rozpoznaniem po transplantacji NMSC oraz częstsze występowanie antygeny HLA B18 u chorych, którzy po przeszczepieniu rozwinęli SCC. Są to korelacje nieopisane wcześniej w literaturze.

Na podstawie wyników tej pracy sformułowano następujący wniosek:

1. W populacji pacjentów po przeszczepieniu nerki, pozostających pod opieką Poradni Transplantologicznej w Gdańsku, stwierdzono częstsze występowanie antygeny HLA DR15 u chorych z rozpoznaniem *de novo* po przeszczepieniu NMSC oraz u pacjentów z rozpoznaniem *de novo* po transplantacji BCC. W tej samej populacji chorych stwierdzono częstsze występowanie HLA B18 u osób z rozpoznaniem *de novo* po przeszczepieniu SCC.

2. Praca oryginalna **Evaluation of Quantitative Changes in Regulatory T cells in Peripheral Blood of Kidney Transplant Recipients with Skin Cancer after Conversion to mTOR Inhibitors**, *Advances in Dermatology and Allergology* 2018; XXXV (5): 474-480 IF 1,757

Praca ta miała na celu odpowiedź na dwa kolejne cele czyli ocenę aktywności limfocytów T regulatorowych u pacjentów z rozpoznaniem *de novo* po przeszczepieniu nowotworem złośliwym skóry po wprowadzeniu do schematu leczenia immunosupresyjnego mTORi oraz ocenę ryzyka wznowy lub pojawienia się kolejnego ogniska nowotworu złośliwego skóry po wprowadzeniu do leczenia tych leków.

Do badania włączonych zostało 14 pacjentów, z rozpoznaniem *de novo* po transplantacji nowotworem złośliwym skóry, u których z tego powodu wdrożono mTORi. Spośród pacjentów włączonych do badania siedmiu prezentowało pojedyncze ognisko raka BCC, dwóch pojedyncze ognisko raka SCC, jeden pojedyncze ognisko czerniaka, czterech wieloogniskowe raki skóry, gdzie współwystępowały BCC i SCC. W 6 przypadkach AZA zamieniono na EWE, w 4 CNI na EWE, w 3 przypadkach MMF na EWE, w jednym przypadku AZA na RAPA.

U wszystkich badanych metodą cytometrii przepływowej oznaczono we krwi obwodowej odsetek limfocytów T o fenotypach: CD3⁺, CD3⁺ CD4⁺, CD3⁺ CD8⁺, CD4⁺ CD25⁻, CD4⁺ CD25⁺, CD4^{low} CD25^{high} oraz ich wzajemny stosunek. Komórki regulatorowe identyfikowano jako limfocyty o niskiej ekspresji CD4 i wysokiej CD25, zgodnie z metodą zaproponowaną przez Bryl, i wsp [17]. Oznaczeń dokonano przed zmianą leczenia i 6 miesięcy po niej. Otrzymane wyniki opracowano nieparametrycznym testem obserwacji par Wilcoxon, za poziom istotności statystycznej uznano $p < 0,05$.

Wykonana analiza nie wykazała zmian w odsetku, zarówno limfocytów T (CD3⁺), jak i limfocytów T pomocniczych (CD3⁺ CD4⁺). Znacząco wzrósł natomiast odsetek limfocytów T cytotoksycznych (CD3⁺ CD8⁺), u niektórych pacjentów niemal zrównując się z poziomem limfocytów pomocniczych. Jednak zmiana stosunku komórek CD4⁺/CD8⁺ nie była statystycznie istotna ($p=0,07$). Analiza subpopulacji limfocytów CD4⁺ wykazała, że 6 miesięcy po zmianie leczenia nie zmienił się odsetek komórek CD4⁺ CD25⁻ i CD4⁺ i CD25⁺, wzrósł natomiast odsetek komórek CD4^{low} CD25^{high} (3,08% v 3,41%, $p=0,09$). Doszło również do istotnego statystycznie spadku proporcji pomiędzy limfocytami aktywowanymi i regulatorowymi na korzyść tych drugich (CD4⁺ i CD25⁺ / CD4^{low} CD25^{high} 6,52 v 4,29, $p=0,03$).

Oceniano ponadto wpływ zmiany leczenia na pojawienie się kolejnych ognisk raków skóry. W tym celu porównano przebieg choroby pacjentów z grupy badanej z grupą kontrolną, którą stanowiło 18 pacjentów po transplantacji z rozpoznaniem *de novo* nowotworem złośliwym skóry, pozostających na dotychczasowym schemacie leczenia, bez mTORi. Częstość występowania wznowy lub pojawienia się nowego ogniska nowotworu skóry w obu grupach porównano testem chi kwadrat, zaś długość przeżycia wolnego od choroby (*progression free survival*, PFS) porównano testem long-rank. Poziom istotności statystycznej w obu testach ustalono na $p < 0,05$.

W grupie kontrolnej u jedenastu chorych rozpoznano pojedyncze ognisko BCC, u czterech chorych- pojedyncze ognisko SCC, u trzech chorych wielogniskowe raki skóry. Schematy leczenia, które otrzymywali badani pacjenci to: dwunastu pacjentów: CNI, GKS i MMF, trzech: CNI i MMF, trzech: GKS, CNI i AZA. W klinicznej obserwacji, która trwała od 2 do 6 lat po konwersji, rozwój kolejnego ogniska nowotworu skóry odnotowano u jednego pacjenta w grupie badanej i u 8 pacjentów z grupy kontrolnej, co wykazało statystycznie mniejszy odsetek kolejnych raków skóry u pacjentów po wprowadzeniu mTORi ($p = 0,022$). Dodatkowo u pacjentów w grupie badanej statystycznie istotnie dłuższy był czas PFS ($p = 0,016$).

Allogeniczne przeszczepianie narządów nieodzownie łączy się ze stosowaniem następczej immunosupresji. Ten stan obniżonej odporności u pacjentów uzyskuje się poprzez stosowanie leków, które w różnych mechanizmach hamują odpowiedź immunologiczną na przeszczepiony narząd. Wiadome jest, że również w obrębie ludzkiego układu odpornościowego istnieją naturalne komórki generujące stan immunosupresji, które w prawidłowych warunkach zabezpieczają przed rozwojem chorób autoimmunologicznych i alergii. Odkrycie ich właściwości wzbudziło duże zainteresowanie, gdyż dawało nadzieję na stworzenie nowego środka terapeutycznego w chorobach z autoagresji i po przeszczepach allogenicznych. Ograniczeniem jest fakt, że ich nadmierna aktywacja sprzyja infekcjom i chorobom nowotworowym.

Za wywoływanie stanu naturalnej immunosupresji odpowiedzialna jest subpopulacja limfocytów T, limfocyty regulatorowe, która początkowo była definiowana jako populacja komórek z ekspresją receptorów CD4 i CD25. Obecnie wiemy, że tylko część komórek o tym fenotypie wykazuje hamujące działanie wobec komórek efektorowych. Są to te, które wykazują ekspresję czynnika transkrypcyjnego FOXP3⁺ lub, jak wykazała Bryl i wsp., odpowiadające im komórki o fenotypie CD4^{low} CD25^{high} [17]. Poszczególne leki IS w różny

sposób modyfikują działanie układu immunologicznego. Inhibitory kalcyneuryny działają nieselektywnie i wywołują supresję, zarówno ramienia cytotoksycznego, jak i regulatorowego odpowiedzi immunologicznej. Inhibitory sygnału proliferacji (PSI) działają bardziej wybiórczo. Przy wprowadzeniu ich do schematu IS obserwowano w badaniach wzrost populacji komórek regulatorowych we krwi obwodowej pacjentów [18-21]. Potwierdzone to zostało też w powyższym badaniu, gdzie odnotowano po 6 miesiącach od wprowadzenia PSI, wzrost odsetka limfocytów CD4^{low} CD25^{high}. Jednocześnie nadal, nawet przy pobudzeniu aktywności komórek regulatorowych, leki te wykazywały działanie antynowotworowe.

Na podstawie tak przeprowadzonych badań wyciągnięto następujące wnioski:

2. Pół roku po wprowadzeniu do leczenia mTORi u pacjentów po przeszczepieniu nerki z rozpoznaniem *de novo* nowotworem złośliwym skóry obserwowano statystycznie istotną zmianę proporcji w obrębie subpopulacji limfocytów T krwi obwodowej pomiędzy limfocytami aktywowanymi a regulatorowymi, na korzyść tych drugich.

3. Po włączeniu do schematu leczenia immunosupresyjnego leków z grupy mTORi u pacjentów z rozpoznaniem *de novo* po transplantacji nerki nowotworem złośliwym skóry odnotowano, w porównaniu z chorymi, u których nie dokonano konwersji na mTORi, rzadsze pojawianie się kolejnego ogniska nowotworu oraz wydłużenie PFS.

3. Praca poglądowa Rola czynników genetycznych i immunologicznych w patogenezie raków skóry u pacjentów po przeszczepieniu narządów unaczynionych,

Forum Nefrologiczne 2018; 11 (4): 256-262

Celem pracy było przedstawienie czynników ryzyka rozwoju raków skóry u pacjentów po przeszczepieniach narządowych, ze szczególnym uwzględnieniem czynników genetycznych i immunologicznych. W artykule zebrano opisane dotychczas w literaturze dane na temat częstości występowania określonych antygenów zgodności tkankowej u pacjentów z rozpoznaniem *de novo* po transplantacji NMSC. Omówiono również wpływ poszczególnych leków immunosupresyjnych na kancerogenezę skórną, z zaznaczeniem ich wpływu na subpopulację limfocytów regulatorowych.

Podsumowanie

Stale rosnąca liczba wykonywanych przeszczepień narządowych oraz wydłużający się czas przeżycia chorych z przeszczepionym narządem sprawiają, że w praktyce klinicznej coraz częściej mamy do czynienia z odległymi powikłaniami potransplantacyjnymi. Stąd powstała potrzeba jak najszerszego poznania patomechanizmu tych schorzeń, aby możliwe stało się wdrożenie skutecznej profilaktyki. Potwierdzenie istnienia zależności pomiędzy występowaniem określonych antygenów zgodności tkankowej HLA a zwiększoną zapadalnością na raki skóry pozwoliłoby na wyłonienie „genetycznych markerów”, identyfikujących pacjentów o znacznym ryzyku rozwoju tego powikłania. Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań w tym zakresie nie dają jednak jednoznacznej odpowiedzi czy istnieją określone antygeny predysponujące do rozwoju NMSC w tej populacji chorych.

Allogeniczne przeszczepianie narządów niesie za sobą konieczność stosowania immunosupresji. Jest to czynnik sprzyjający powstawaniu nowotworów, którego nie będziemy w stanie w najbliższym czasie wyeliminować. Wydaje się jednak, że badania pogłębiające naszą wiedzę o mechanizmach immunologicznych w jakich ten stan obniżonej odporności indukujemy, mogłyby pozwolić w przyszłości na stworzenie nowych, być może bardziej spersonalizowanych schematów leczenia IS, które gwarantowałyby utrzymanie funkcjonującego przeszczepu przy generowaniu jak najmniejszej ilości powikłań.

Abstract

Allogenic solid organ transplantation is associated with the risk of complications such as surgical ones and infections in the early post-transplant period, as well as those of internal medicine and increased incidence of malignant neoplasms in the longer perspective. A constantly growing number of transplantations and extended life expectancy in patients following organ transplantation result in a higher rate of long-term complications in clinical practice. Skin neoplasms are the largest group of malignant neoplasms diagnosed *de novo* in post-transplant patients. The aim of this study was to investigate the role of genetic and immunological factors in etiopathogenesis of malignant neoplasms of the skin in patients after renal transplantation, to enable effective prophylaxis in the future.

Aim of the study: 1. Analysis of the relationships between the presence of certain class I and class II HLA and increased incidence of malignant neoplasms of the skin in patients after renal transplantation. 2. Assessment of regulatory T cells activity in patients with *de novo* diagnosed malignant skin neoplasm after the introduction of immunosuppressive mTORi treatment. 3. Assessment of the risk of tumor recurrence or occurrence of a new malignant neoplastic lesion in the skin following the introduction of mTORi treatment.

Materials and methods: Patients following renal transplantation, treated in the Transplant Outpatient Clinic of the Medical University of Gdańsk, who received transplants in the years 1983 – 2013 were included to the study. In the analysis of genetic factors the study group included patients with non-melanoma skin cancer diagnosed *de novo* after the transplantation, and the control group comprised post-transplant patients without such neoplasm. In both groups the frequency of class I (AB) and II (DR) HLA was compared, and the potential relationship between the presence of certain antigen specificity and increased incidence of skin cancers in post-transplant patients was examined. Immunological factors were analysed in the patients after renal transplantation who, after the diagnosis of malignant skin neoplasm, received a modified immunosuppressive therapy in which one of the previous medications was switched to a proliferation signal inhibitor. Using flow cytometry, the levels of T-cell subpopulations were determined before and 6 months after the treatment modification. The control group comprised post-transplant patients whose

immunosuppressive therapy was not changed. Also the course of the neoplastic disease was compared between both groups of patients.

Results and conclusions: 1. In the study group a higher occurrence of HLA DR15 was found in the patients with *de novo* diagnosed both NMSC and BCC. In the same population, HLA B18 was observed more frequently in patients with SCC *de novo* diagnosed after renal transplantation. 2. Six months after the introduction of mTORi in patients after kidney transplantation with *de novo* recognized malignant skin neoplasms, a statistically significant increase of regulatory T-cell ratio in peripheral blood was observed. 3. Following the introduction of immunosuppressive treatment with mTORi in the patients with malignant skin neoplasms diagnosed *de novo* after the renal transplantation, a lower incidence of secondary skin cancer was observed, as well as increased progression free survival, compared to the patients whose therapy was not modified to include mTORi.

Introduction

Renal transplantation is presently a recognized and increasingly common method of treatment in end-stage kidney failure.

The first successful human kidney transplantation was conducted in 1954 in Boston by Joseph Murray in co-operation with John Merrill and Hartwell Harrison [1]. The transplant was performed in identical twins, which ensured survival of the transplanted organ, despite the absence of further immunosuppressive treatment. Next decades witnessed development of transplantology. Due to a better understanding of the mechanisms of rejection of transplanted organs, subsequent development of the rules for histological matching and the introduction of immunosuppression (IS), allogeneic transplantation of organs is possible on a larger scale.

Further breakthroughs in transplantology were associated with the introduction of new immunosuppressive agents: starting with azathioprine (AZA), initially on its own, then in combination with glucocorticosteroids (GKS), followed by the first calcineurin inhibitor, cyclosporine A (CsA) in the 1980s. It not only ensured extended survival of the transplanted organ, but also significantly reduced mortality in post-transplant patients. Further intensive research resulted in the development of new immunosuppressive medications, including tacrolimus (TAC), mycophenolate mofetil/sodium (MMF/MPS), sirolimus (RAPA) and everolimus (EVE), presently commonly used in the long-term therapy of organ recipients.

Despite the introduction of new, more effective and safer immunosuppressants, chronic immunosuppression is still among the principal etiopathogenetic factors contributing to long-term complications such as infections and increased incidence of cardiovascular and oncological diseases. Among the latter, the most frequent ones are skin neoplasms, which contribute up to 50% of all malignant neoplasms diagnosed *de novo* in post-transplant patients [2]. Their incidence increases with every year following the transplantation, and the cumulative risk of skin cancer in this population of patients in the countries with high sun exposure is estimated at 45% 10 years following the transplant, and at 70% 20 years after the transplant. In the moderate climate countries the rates are 16% and 41%, respectively [2-4].

Similarly as in the general population, the most frequently diagnosed malignant skin neoplasms are non-melanoma skin cancers (NMSC): basal cell carcinoma (BCC) and squamous cell carcinoma (SCC). However, the BCC to SCC ratio is reversed: in the general population it is 1: 0.2, and in post-transplant patients it is 1: 2.7 [2, 3, 5].

Squamous cell carcinoma, according to many authors, is the most frequently found malignant skin neoplasm in patients with transplanted organs. Its incidence increases at the greatest rate, compared to the general population; it is diagnosed up to 200 times more often than in immunocompetent individuals [6]. The incidence of basal cell carcinoma also increases, but the dynamics of that process is lower; the neoplasm is diagnosed in post-transplant patients 10 times more often than in the general population [7].

The majority of authors also report increased incidence of melanoma in post-transplant patients. It is usually a few or several times higher than in the general population. However, especially in comparison with cancers, the data regarding its incidence in this group of patients is limited.

Malignant skin neoplasms rarely observed in the general population, such as Merkel cell carcinoma or sebaceous carcinoma, are also more often found in patients following organ transplantation.

The clinical picture of NMSC developing *de novo* in post-transplant patients is similar to that observed in the general population. These lesions are located mainly in the areas exposed to solar radiation. All forms of skin cancer types are observed, although atypical forms are more frequently found in organ recipients. The course of the disease varies, especially in the case of SCC which in post-transplant patients is more often multifocal compared to the general population; it also tends to occur in younger age compared to immunocompetent individuals, it is more often invasive and characterized by a higher metastatic potential [5, 8-9].

Certain risk factors are similar to those in the general population, e.g. age, phototype, exposure to sunlight and genetic predisposition. Skin cancers in immunocompetent patients develop more frequently in individuals over 60 years of age, type I and II of Fitzpatrick phototype scale (people with fair skin, hair and eyes), and with a history of high exposure to ultraviolet radiation. In post-transplant patients skin neoplasms also are more frequently found in advanced age; the recipients age at the moment of transplantation is also a factor. In patients who received a renal transplant before 40 years of age skin cancers occur on average after 7 - 8 years following the procedure. In patients who received the kidney when they were over 60 years old this time is reduced to 2 - 3 years [5, 10, 11].

Ultraviolet radiation (UV radiation) is considered one of the most important risk factors in both groups. Its carcinogenic effect is due to induced immunosuppression, both local, in the skin, and systemic, as well as due to the direct damage of DNA in skin cells. UV radiation is among

the best recognized factors in the etiopathogenesis of skin cancers, and also a factor which impact we can decrease through proper behaviour.

Risk factors for skin neoplasms specific for post-transplant patients include: the cause of renal insufficiency (neoplasms develop more frequently in patients with multicystic kidneys, analgesic nephropathy, less often in those with diabetic nephropathy), length of dialysis therapy prior to the transplantation, pre-transplantation immunosuppressive therapy, long-term immunosuppression after the transplantation, and viral infections.

Among these factors, IS plays a dominant role. The length of immunosuppression, use of induction therapy, treatment of the transplant rejection episodes, as well as the type of immunosuppressants are important.

The immunosuppressive therapy regimens following a transplantation are based on a few groups of medications. They include antimetabolites (AZA), calcineurin inhibitors (CsA, TAC), selective antimetabolites (MMF/MPS), proliferation signal inhibitors (RAPA and EVE), and glucocorticosteroids. In certain cases the use of mono- and polyclonal antibodies is required. AZA is considered to have the greatest effect on the development of malignant skin neoplasms [12, 13]. Increased incidence of neoplasms is also positively correlated with the total dose of CsA received by patients, and with its blood levels [14].

Other studies revealed an increased incidence of neoplasms in patients receiving triple immunosuppression (CsA - AZA - GKS) compared to those treated with two medications (AZA - GKS) [2, 10]. A few studies confirmed a lower incidence of neoplasms in patients treated with mTOR inhibitors (mTOR, mTORi): RAPA and EVE [10, 15, 16].

Further risk factors for increased incidence of skin cancers include those associated with histocompatibility antigens (HLA). Incompatibility between the HLA systems of the donor and the recipient is an intermediate risk factor, as the greater the discrepancy, the stronger immunosuppression is required. Some studies also report a relationship between increased incidence of skin cancers and the presence of certain antigens of the main histopathological compatibility system. Depending on the population studied, certain antigen specificities were observed more frequently in patients diagnosed with skin cancer, both in the general population and in patients after transplantation.

Aims of the study:

1. Analysis of the relationships between the presence of certain class I and class II HLA and increased incidence of malignant neoplasms of the skin in patients after renal transplantation.
2. Assessment of regulatory T cells activity in patients with de novo diagnosed malignant skin neoplasm after the introduction of immunosuppressive mTORi treatment.
3. Assessment of the risk of tumor recurrence or occurrence of a new malignant neoplastic lesion on the skin following the introduction of mTORi treatment.

These aims were achieved through a cycle of 3 publications within the same subject area: two original articles, and one review article, all described below.

The studies conducted as part of this doctoral dissertation are divided into two parts: the first one includes the analysis of genetic factors, and the second involves examination of immunological factors.

Both parts involved patients following renal transplants, treated in the Transplant Outpatient Clinic of the Medical University of Gdańsk, who received transplants in the years 1983 – 2013.

1. Original article **Association Between HLA Type and skin Cancer in Kidney Transplant Recipients**, Transplantation Proceedings 2016; 48: 1608-1619 IF 0.908

This article addressed the first of the aims presented above, i.e. the analysis of the relationship between the presence of certain class I (A and B) and II (DR) HLA antigens and increased incidence of malignant neoplasms of the skin in patients after renal transplantation.

The study group included 39 patients after the transplantation with *de novo* diagnosed NMSC, and the control group comprised 50 patients with kidney transplants who did not develop such neoplasm. Both groups were matched for sex, age, skin phototype, declared history of exposure to UV radiation (patients who reported a history of living or working in countries with high sun exposure were not included in the study), age at the moment of transplantation and the time passed since the transplantation. In both groups the rate of patients who at some point required treatment of acute transplant rejection was similar (16% in the study group and 18% in the control group). In both groups the most frequently used immunosuppressive therapy was GKS, MMF and CNI. In the study group 7 patients presented with a single SCC, in 17 patients a single BCC, and 15 patients had multifocal skin cancers, typically of both types. In both groups of patients the occurrence of particular class I and II HLA was analysed. The results were compared, and juxtaposed with the occurrence of particular antigens in the general population, represented by 100 subjects.

The statistical analysis was conducted using the Statistica 10.0 software (StatSoft, Inc. 2011). The χ^2 test and Pearson's method were used to analyse the frequency of alleles and other qualitative characteristics. The independent variables fulfilling the criteria for parametric tests were analysed using the Student's t-test. The individual variables that did not meet the criteria for parametric tests were analysed with the use of non-parametric tests (equivalent to ANOVA): Mann-Whitney U-test (comparison of two samples) or Kruskal-Wallis test (comparison of multiple samples). The odds ratios (OR) with 95% confidence interval were determined using logistic regression. In all the tests the statistical significance threshold was $p < 0.05$.

The study revealed a statistically significantly more frequent presence of HLA-DR 15 in patients diagnosed with NMSC, compared to the control group (6.41% v 0.0% $p = 0,014$). This antigen was also more often found in this group of patients than in the general population (6.41% vs 3.54%); however, the difference was not statistically significant ($p = 0.29$). A statistically

significantly higher presence of HLA DR-15 was demonstrated also in patients diagnosed with BCC (9% vs 0%, $p = 0.04$). A more frequent presence of HLA B18 was also observed in patients diagnosed with SCC compared to the control group (26% vs 10.8% $p = 0.03$), as well as to the general population (26% vs 8% $p = 0.002$).

No correlation was found between the occurrence of certain histocompatibility antigens and the presence of multiple skin cancer.

The relationship between the occurrence of certain histocompatibility antigens and increased incidence of skin neoplasms in post-transplant patients was analysed in studies involving various populations. A positive correlation was reported between the presence of HLA A11 and an increased risk of NMSC in Australian patients, whereas in the European population the correlation was negative. In addition, HLA B27 was more frequently found in recipients with a diagnosis of *de novo* NMSC, both in the Australian and European populations. A Polish study conducted in Krakow revealed no effect of the type or number of compatible HLA antigens on the development of skin cancers. The presented study from the Clinic in Gdańsk reported a more frequent presence of HLA DR15 in patients diagnosed with NMSC after the transplantation, and a more frequent occurrence of HLA B18 in patients who developed SCC after the transplantation. These correlations have not been described in the literature before.

Based on the results of the above study, the following conclusion was formulated:

1. In the population of patients following renal transplant a higher occurrence of HLA DR15 was found in patients with *de novo* diagnosed both NMSC and BCC. In the same population, HLA B18 was observed more frequently in post-transplant patients with *de novo* diagnosed SCC.

2. Original article: **Evaluation of Quantitative Changes in Regulatory T cells in Peripheral Blood of Kidney Transplant Recipients with Skin Cancer after Conversion to mTOR Inhibitors**, *Advances in Dermatology and Allergology* 2018; XXXV (5): 474-480 IF 1,757

The purpose of this study was to address the two other aims, i.e. the assessment of the activity of regulatory T cells in post-transplant patients with *de novo* diagnosed malignant skin neoplasm following the introduction of mTORi to the immunosuppressive therapy, as well as

the evaluation of the risk of tumour recurrence or occurrence of another malignant skin neoplasm following the introduction of these medications.

The study involved 14 post-transplant patients diagnosed with *de novo* malignant skin neoplasm who received mTORi due to the diagnosis. Among the patients included in the study, seven presented with a single BCC, two presented with a single SCC, one patient presented with a single focus of melanoma, and four patients had multifocal skin cancers, with concurrent BCC and SCC. In six cases AZA was switched to EVE, in four cases calcineurin inhibitors were switched to EVE, in three cases MMF was switched to EVE, and in one case AZA was switched to RAPA.

In all the patients flow cytometry was used to determine the rates of T cells of the following phenotypes: CD3⁺, CD3⁺ CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD4⁺CD25⁻, CD4⁺CD25⁺, CD4^{low}CD25^{high} in peripheral blood, as well as the ratios between them. Treg cells were identified as lymphocytes with a low CD4 expression and a high CD25 expression, following the method proposed by Bryl et al. [17]. The analysis was performed before the treatment conversion and 6 months after the modification. The results were processed using a non-parametric Wilcoxon signed-rank test, with statistical significance at $p < 0.05$.

The analysis did not reveal changes in the rate of T cells (CD3⁺), or T helper cells (CD3⁺CD4⁺). The rate of cytotoxic T cells (CD3⁺CD8⁺) increased significantly in some patients, almost reaching the levels of T helper cells. However, the change in the CD4⁺/CD8⁺ ratio was not statistically significant ($p = 0.07$). The analysis of CD4⁺ subpopulation demonstrated that 6 months after the treatment conversion the rates of CD4⁺ CD25⁻, CD4⁺ and CD25⁺ cells did not change, while the rate of CD4^{low}CD25^{high} increased (3.08% vs 3.41%, $p = 0.09$). In addition, a statistically significant decrease of the proportion between activated lymphocytes and Treg cells was observed, in favor of the latter (CD4⁺ and CD25⁺ / CD4^{low} CD25^{high} 6.52 v 4.29, $p = 0.03$).

Moreover, the effects of treatment conversion on the occurrence of a subsequent skin cancer were assessed. The course of the disease was compared between the patient in the study group and in the control group, comprising 18 post-transplant patients diagnosed with *de novo* skin neoplasm whose treatment was not modified to include mTORi. The frequency of tumor recurrence or occurrence of a new focus of skin neoplasm in both groups was compared using chi square test, and progression free survival (PFS) was compared with the use of log-rank test. The statistical significance level in both tests was established at $p < 0.05$.

In the control group, 11 patients were diagnosed with a single BCC, 4 patients presented with a single SCC, and three patients developed multifocal skin cancers. The patients received the following treatments: twelve patients – CNI, GKS and MMF, three patients – CNI and MMF, three patients – GKS, CNI and AZA. In clinical follow-up covering 2 to 6 years after the treatment conversion, recurrence of skin cancer was found in one patient in the study group, and in eight patients in the control group, which suggested a statistically lower rate of new skin cancers in patients who received mTORi ($p = 0.022$). In addition, patients in the study groups demonstrated a statistically significantly longer PFS ($p = 0.016$).

Allogeneic organ transplantation always requires subsequent immunosuppressive therapy. This state of compromised immunity is achieved with medications that use various mechanisms to inhibit the immune response to the transplanted organ. It has been established that human immune system contains natural cells that generate immunosuppression and in normal conditions prevent the development of autoimmune diseases or allergies. Discovering their properties raised much interest, as it offered hope for creating a new therapeutic agent for autoimmune diseases and after allogeneic organ transplantation. However, their use is limited by the fact that excessive activation of these cells may lead to infections and neoplastic diseases.

Natural immunosuppression is induced by regulatory T cells, a subpopulation of lymphocytes that was initially defined as a population of cells with CD4 and CD25 expression. Presently, we know that only some of the lymphocytes of this phenotype inhibit effector cells. They include Treg cells expressing FOXP3⁺ transcription factor or, as demonstrated by Bryl et al., the corresponding cells with the CD4^{low}CD25^{high} phenotype [17]. Various IS medications modify the immune function in different manners. Calcineurin inhibitors are non-selective, and suppress both the cytotoxic and regulatory immune cells. Proliferation signal inhibitors (PSI) demonstrate a more selective effect. Following their introduction to the IS treatment, an increase of Treg cells in the peripheral blood of patients was observed [18-21]. It was also confirmed in the above study, which reported an increase in CD4^{low} CD25^{high} rates after six months of using PSI. Regardless of stimulating the activation of Treg cells, these medications still demonstrated antineoplastic effect.

This study supported the following conclusions:

2. Six months after the introduction of mTORi in patients after a renal transplant with *de novo* recognized malignant skin neoplasms, a statistically significant change was observed in the ratio between activated T cells and Treg cells in peripheral blood, in favor of the latter.

3. Following the introduction of immunosuppressive treatment with mTORi in the patients with malignant skin neoplasms diagnosed *de novo* after the renal transplantation, a lower incidence of secondary skin cancer was observed, as well as increased PSF, compared to the patients whose therapy was not modified to include mTORi.

3. Review article: Rola czynników genetycznych i immunologicznych w patogenezie raków skóry u pacjentów po przeszczepieniu narządów unaczynionych [Role of genetic and immunological factors in pathogenesis of skin cancers in patients following transplantation of vascularised organs], published in Forum Nefrologiczne 2018;11 (4): 256 ± -262

The aim of the study was to present risk factors for skin cancers in post-transplant patients, focusing on the genetic and immunological factors. The article presented the available literature data regarding the frequency of selected histocompatibility antigens in patients with *de novo* diagnosed NMSC after the transplantation. The effects of individual immunosuppressive medications on skin cancerogenesis was also discussed, with emphasis on their effect on Treg cells.

Conclusion

A constantly growing number of transplantations and extended life expectancy in patients following organ transplantations result in a higher rate of long-term post-transplant complications in clinical practice. Therefore, the pathomechanism of these disorders must be well understood to enable effective prophylaxis. Confirmation of the relationship between the presence of certain histocompatibility (HLA) antigens and increased incidence of skin cancers would help to establish the “genetic markers” identifying patients at high risk of this complication. However, the results of previous studies do not determine unequivocally whether certain antigens predispose patients in this population to the development of NMSC. Immunosuppression always follows allogeneic organ transplantation and is a risk factor of the development of neoplasms that we will not be able to exclude soon. It appears, however, that the better knowledge of immunological mechanisms in which we induce immunosuppression might help in the future to create new, potentially more individualized IS therapies to guarantee functional grafts with possibly few complications.

Piśmiennictwo

1. Morris P. J.: Transplantation – A Medical Miracle of the 20th century. *N Engl J Med.* 2004; 351: 2678-2680.
2. Euvrard S., Kanitakis J., Claudy A.: Neoplastic skin diseases in organ transplant recipients. *Am J.Cancer* 2002; 1(2): 109-120.
3. Bouwes- Bavinck JN, Hardie DR, Green A, i wsp. The risk of skin cancer in transplant patients in Queensland, Australia. *Australia. Transplantation.* 1996; 61: 715-712.
4. Hartevelt MM, Bouwes- Bavinck JN, Kootte AM, i wsp. Incidence of skin cancer after transplantation in the Netherlands. *Transplantation.* 1990; 49(3): 506-509.
5. Lindelof B., Sigurgeirsson B., Gabel H, i wsp. Incidence of skin cancer in 5356 patients following organ transplantation. *Br J Dermatol.* 2000; 143: 513-519.
6. Imko- Walczuk B. Ocena zagrożenia chorobami nowotworowymi i możliwości ich zapobiegania u chorych po przeszczepach nerki. Praca doktorska. Gdański Uniwersytet Medyczny 2009.
7. Jemec GB., Holm AE. Nonmelanoma skin cancer in organ transplant patients. *Transplantation.* 2003; 75: 253- 257.
8. Fortina AB., Piaserico S., Alaibac M, i wsp. Squamous cell carcinoma[W:] *Cancer after Renal Transplantation.* red. Ulrich C., Euvard S., Stockfeth E, i wsp. New York: Springer. 2009. 241-261.
9. Imko- Walczuk B., Ankudowicz A., Jaśkiewicz J., i wsp. Nowotowory skóry u chorych po przeszczepieniu narządów. *Przegl Dermatol.* 2011; 98: 91-103.
10. Euvrard S., Ulrich C., Lefrancois N.: Immunosuppressants and skin cancer in transplant patients: focus on rapamycin. *Dermatol Surg* 2004; 30: 628-633.
11. Wojnarowska F., Cooper S.M.: The accuracy of clinical diagnosis of suspected premalignant and malignant skin lesions in renal transplant recipients. *Clinical and Experimental Dermatology* 2002; 27: 436-438.
12. Kasiske BI, Snyder JJ, Gilbertson DT, i wsp. Cancer after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant.* 2004; 4: 905-913.

13. Kauffman HM, Cherikh WS, McBride MA., i wsp. Post- transplant de novo malignancies in renal transplant recipients: the past and present. *Transplant Int* 2006;19: 607-620.
14. Dantal J., Houmant M., Cantarovich D., i wsp. Effect of long- term immunosuppression in kidney- graft recipients on cancer incidence: randomized comparison of two cyclosporin regimens. *Lancet*, 1998; 351: 623- 628.
15. Fortina AB, Piaserica S, Caforio AL, i wsp. Immunosuppressive level and other risk factors for basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma in heart transplant recipients. *Arch Dermatol* 2004; 140: 1079-2460.
16. Ramsay HM, Freyer AA, Hawley CM, i wsp. Factors associated with nonmelanoma skin cancer following renal transplantation in Queensland, Australia. *J Am Acad Dermatol* 2003; 49: 397- 406.
17. Bryl E, Daca A, Jóźwik A, Witkowski JM. Human CD4^{low} CD25^{high} regulatory T cells indiscriminately kill autologous activated T cells. *Immunology*. 2009;128: e287-95.
18. San Segundo D, Fernandez- Fresnedo G, Ruiz JC, i wsp. Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells in renal transplant recipients. *Transplantation* 2006; 82: 550-557.
19. San Segundo D, Fernandez- Fresnedo G, Gago M, i wsp. Number of peripheral blood regulatory T cells and lymphocyte activation at 3 months after conversion to mTOR inhibitor therapy. *Transplant proc* 2010; 42: 2871-2873.
20. Carroll RP, Hester J, Wood KJ, Harden PN. Conversion to sirolimus in kidney transplant recipients with squamous cell cancer and changes in immune phenotype. *Nephrol Dial Transplant* 2013; 28: 462-465.
21. Hendrikx TK, Velthuis JHL, Klepper M, i wsp. Monotherapy rapamycin allows an increase of CD4⁺ CD25^{high} FOXP3⁺ T cells in renal transplant recipients. *Transpl Int* 2009; 22: 884-991.

Podziękowania

Pragnę serdecznie podziękować

Mojej Promotorce Pani Profesor dr hab. n. med. Alicji Dębskiej-Ślizień za merytoryczną opiekę nad moją pracą naukową, za pomoc, inspirację i motywację do pracy.

Rodzinie i bliskim za wsparcie i pomoc przy powstawaniu pracy.

Pracę tę dedykuję Mojej Mamie.