

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Alicja Sadowska-Klasa

***Ocena wybranych subpopulacji limfocytów T i stężeń interleukin
prozapalnych u pacjentów z rozrostowymi chorobami
hematologicznymi.***

Katedra i Klinika Hematologii i Transplantologii
Gdański Uniwersytet Medyczny

Promotor: dr hab. med. Krzysztof Lewandowski

SPIS TREŚCI

Spis tabel	4
Spis rycin i wykresów	5
Wykaz skrótów	6
1. WSTĘP	9
1.1 Różnicowanie i funkcja biologiczna limfocytów Th17 oraz cytokin z nimi związanych.	10
1.2 Fenotyp limfocytów Th17 i rola antygenów powierzchniowych.	15
1.3 Transplantacja alogenicznych komórek krwiotwórczych – informacje ogólne.	17
1.4 Rekonstytucja immunologiczna po alogenicznej transplantacji.	19
1.5 Ostra postać choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi i rola limfocytów Th17 w patogenezie GvHD.	21
1.6 Powikłania infekcyjne po transplantacji.	24
2. CELE PRACY	28
3. MATERIAŁY I METODY	29
3.1 Charakterystyka grupy badanej.	29
3.2 Oznaczenie populacji limfocytów oraz cytokin prozapalnych.	32
3.3 Klasyfikacja choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi.	32
3.4 Kolonizacja przewodu pokarmowego i powikłania infekcyjne.	34
3.5 Analiza cytometryczna limfocytów krwi.	34
3.6 Oznaczenie stężenia IL-6.	37
3.7 Wartości referencyjne subpopulacji limfocytów.	37
3.8 Analiza statystyczna.	38
4. WYNIKI	39
4.1 Rekonstytucja subpopulacji limfocytów po HCT.	39
4.2 Limfocyty Th17 we krwi obwodowej.	42
4.3 Limfocyty Th17 w materiale przeszczepowym.	45

4.4 Limfocyty T-reg i stosunek Th17/T-reg.	45
4.5 Korelacja limfocytów Th17 z IL-6.	46
4.6 Choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi.	47
4.7 Średnia intensywność fluorescencji limfocytów Th17.	51
4.8 Infekcje po transplantacji.	54
4.9 Analiza przeżycia.	56
5. DYSKUSJA WYNIKÓW	57
5.1 Rekonstytucja immunologiczna po HCT.	57
5.2 Limfocyty Th17 a status choroby zasadniczej przed transplantacją.	60
5.3 Wpływ IL-6 na limfocyty Th17.	62
5.4 Rola limfocytów Th17 w odpowiedzi przeciwniekcyjnej.	63
5.5 Subpopulacje limfocytów a rozwój GvHD.	67
6. WNIOSKI	71
7. STRESZCZENIE	72
8. SUMMARY	76
9. PIŚMIENNICTWO	79

SPIS TABEL

Tabela 1: Ogólna charakterystyka grupy badanej.	31
Tabela 2: Kliniczne manifestacje aGvHD.	32
Tabela 3: Stopnie nasilenia objawów aGvHD	33
Tabela 4: Stopnie zaawansowania aGvHD.	33
Tabela 5: Charakterystyka przeciwciał wykorzystanych do oznaczenia głównych subpopulacji limfocytów - próbówka nr 1.	36
Tabela 6: Charakterystyka przeciwciał wykorzystanych do oznaczenia limfocytów Th17- próbówka nr 2.	36
Tabela 7: Charakterystyka przeciwciał wykorzystanych do oznaczenia limfocytów T regulatorowych – próbówka nr 3.	37
Tabela 8: Wartości referencyjne subpopulacji limfocytów w populacji zdrowej ocenianych metodą cytometrii przepływowej	38
Tabela 9: Wartości bezwzględne wybranych subpopulacji limfocytów w określonych punktach czasowych po transplantacji.	40
Tabela 10: Wartości liczbowe i procentowe limfocytów Th17 oraz limfocytów CD4+ u zdrowych ochotników oraz w grupie badanej przed rozpoczęciem procedury transplantacji.	43
Tabela 11: Porównanie wartości bezwzględnych oraz procentowych limfocytów Th17 pomiędzy pacjentami z remisją oraz brakiem remisji choroby zasadniczej.	44
Tabela 12: Współczynnik korelacji R Spearmana -korelacja limfocytów CD4+ a Th17	44
Tabela 13: Porównanie wartości ilorazu Th17/T-reg w grupie badanej.	46
Tabela 14: Stężenia IL-6 w grupie badanej w określonych punktach czasowych – mediana z zakresem.	46
Tabela 15: Subpopulacje limfocytów u osób z aGvHD i bez aGvHD.	48
Tabela 16: Częstość reaktywacji CMV w zależności od statusu serologicznego dawca-biorca.	56

SPIS RYCIN

Rycina 1: Poglądowy schemat przedstawiający zależności pomiędzy subpopulacjami limfocytów T, cytokiny produkowane przez wybrane subpopulacje i ich wpływ na inne komórki.	12
Rycina 2: Wpływ IL-6 na różnicowanie limfocytów Th17 i T-reg.	14
Rycina 3: Poglądowy schemat regeneracji wybranych populacji komórek po HCT.	21
Rycina 4: Chronologia powikłań infekcyjnych po HCT.	27
Rycina 5: Cytogramy przedstawiające limfocyty Th17 pośród komórek CD4+ u zdrowych ochotników.	42
Rycina 6: Cytogramy przedstawiające limfocyty Th17 pośród limfocytów T CD4+ przed rozpoznaniem aGvHD (po lewej) i w momencie rozwoju choroby (po prawej).	50
Rycina 7: Cytogramy przedstawiające limfocyty Th17 pośród limfocytów T CD4+ w 21 dobie (po lewej) i 30 dobie (po prawej), u pacjenta bez aGvHD.	50

SPIS WYKRESÓW

Wykres 1: MFI w określonych punktach czasowych u wybranych pacjentów rozwijających aGvHD a) pacjent nr 1, b) pacjent nr 2.	52
Wykres 2: MFI w określonych punktach czasowych u wybranych pacjentów, którzy nie rozwijali aGvHD a) pacjent nr 1, b) pacjent nr 2.	53
Wykres 3: Patogeny wielooporne stwierdzone w kolonizacji w grupie badanej	55
Wykres 4: Prawdopodobieństwo przeżycia w grupie badanej .	56

WYKAZ SKRÓTÓW

aGvHD - ang. *acute graft versus host disease*, ostra postać choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi

ALC – ang. *absolute lymphocyte count*, całkowita liczba limfocytów we krwi obwodowej

ALL – ang. *acute lymphoblastic leukemia*, ostra białaczka limfoblastyczna

allo-HCT, HCT – ang. *allogeneic hematopoietic cell transplantation*, transplantacja alogenicznych komórek krwiotwórczych

AML – ang. *acute myeloid leukemia*, ostra białaczka szpikowa

ANC - ang. *absolute neutrophil count*, całkowita liczba granulocytów we krwi obwodowej

APC - ang. *antigen presenting cells*, komórki prezentujące antygen

ATG – ang. *anti-thymocyte globulin*, globulina antytymocytarna

auto-HCT – ang. *autologous hematopoietic cell transplantation*, autologiczna transplantacja komórek krwiotwórczych

BKV – wirus BK

CCR - ang. *chemokine receptor*, receptor chemokinowy

CD – ang. *cluster of differentiation*, system klasyfikacji różnicowania antygenów i ich receptorów

cGvHD - ang. *chronic graft versus host disease*, przewlekła postać choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi

CI – ang. *confidence interval*, przedział ufności

CML – ang. *chronic myeloid leukemia*, przewlekła białaczka szpikowa

CMV – wirus cytomegalii

CsA – cyklosporyna A

CyBu - schemat chemioterapii mieloablacyjnej zawierający cyklofosfamid i busulfan

DCs – ang. *dendritic cells*, komórki dendrytyczne

EBV – wirus Epsteina-Barr

ECOG – skala sprawności wg Eastern Cooperative Oncology Group

ESBL – ang. *extended spectrum beta-lactamases*, bakterie produkujące beta-laktamazę o rozszerzonym spektrum działania

FluBu - schemat chemioterapii kondycjonującej zawierający fludarabinę i busulfan

G-CSF – ang. *granulocyte colony-stimulating factor*, czynnik pobudzający wzrost kolonii granulocytarnych

GM-CSF – ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, czynnik pobudzający wzrost kolonii granulocytarnych i makrofagów

GvHD - ang. *graft versus host disease*, choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi

GvT - ang. *graft versus tumor*, reakcja przeszczep przeciwko chorobie nowotworowej

HCT-CI – ang. *hematopoietic cell transplantation comorbidity index*, wskaźnik oceniający ryzyko związane z transplantacją na podstawie chorób współistniejących

HLA - ang. *Human Leukocyte Antigen*, antygeny zgodności tkankowej

IL – interleukina

IL-6R – receptor dla interleukiny 6

INF- γ – interferon gamma

INT – ang. *intermediate*, pośredni

LPS – lipopolisacharyd

LST – ang. *lymphocyte subpopulation tube*, probówka z zestawem przeciwciał służącym do oznaczania subpopulacji limfocytów

MAC - ang. *myeloablative conditioning*, kondycjonowanie mieloablacyjne

MDRB – ang. *multi-drug resistant bacteria*, bakterie wielooporne

MDS – ang. *myelodysplastic syndrome*, zespół mielodysplastyczny

MFI – ang. *mean fluorescence intensity*, średnia intensywność fluorescencji

MHC - ang. *major histocompatibility complex*, główny układ zgodności tkankowej, zespół białek odpowiedzialnych za prezentację antygenów limfocytów T

mMUD - ang. *mismatched unrelated donor*, dawca niespokrewniony z niezgodnością

MSD - ang. *matched sibling donor*, zgodny dawca rodzinny

MTX – metotreksat

MUD - ang. *matched unrelated donor*, zgodny dawca niespokrewniony

NK – ang. *natural killer cell*, limfocyty NK

NS – nieistotne statystycznie

OR – ang. *odds ratio*, iloraz szans

PBSC - ang. *peripheral blood stem cells*, komórki macierzyste układu krwiotwórczego z krwi obwodowej

RIC - ang. *reduced intensity conditioning*, kondycjonowanie o zredukowanej intensywności

ROR γ t – ang. *retinoic acid-related orphan receptor γ t*, czynnik transkrypcyjny związany z rozwojem limfocytów Th17

T-bet – czynnik transkrypcyjny związany z rozwojem limfocytów Th1

TBI - ang. *total body irradiation*, napromienianie całego ciała

TBI-Cy - schemat kondycjonowania obejmujący radioterapię całego ciała i cyklofosfamid

Tc - ang. *cytotoxic T cell*, limfocyty T cytotoksyczne

TCR - ang. *T-cell receptor*, receptor znajdujący się na limfocytach T

TGF- β – ang. *transforming growth factor β* , transformujący czynnik wzrostu beta

Th - ang. *helper T cell*, limfocyty T pomocnicze

TNF- α - ang. *tumor necrosis factor α* , czynnik martwicy nowotworu, kachektyna

T-reg – limfocyty T-regulatorowe

VEGF – ang. *vascular endothelial growth factor*, czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego

VRE – ang. *vancomycin-resistant enterococci*, wankomycynooporne enterokoki

WBC – ang. *white blood cells*, leukocyty

1. WSTĘP

W ciągu ostatnich trzydziestu lat obserwowany jest stały wzrost zachorowalności na nowotwory układu chłonnego i krwiotwórczego. Pomimo ciągłego doskonalenia metod terapeutycznych odsetek osiągniętych długoletnich przeżyć wciąż nie jest zadowalający i dotyczy mniej niż 50% pacjentów.¹ Stosowanie intensywnej chemioterapii przyczyniło się do poprawy przeżycia chorych z rozpoznaniem ostrej białaczki, szczególnie populacji pacjentów poniżej 55 roku życia.² Szczegółowa ocena profilu cytogenetycznego oraz molekularnego pozwala zakwalifikować chorych do grup obarczonych wysokim ryzykiem niepowodzenia terapii. Pomimo obecności klasycznych czynników ryzyka nadal są poszukiwane nowe biomarkery, które w przyszłości pomogą prognozować odpowiedź na zastosowane leczenie.³⁻⁵ Wznowa choroby zasadniczej oraz powikłania infekcyjne pozostają nadal głównymi czynnikami warunkującymi wysoką śmiertelność w tej populacji chorych. Włączenie transplantacji alogenicznych komórek krwiotwórczych (allogeneic hematopoietic cell transplantation; allo-HCT) do standardowego schematu postępowania leczniczego pozwoliło poprawić rokowanie chorych z grupy wysokiego ryzyka wznowy choroby zasadniczej. Z drugiej strony, wprowadzenie do organizmu chorego-biorcy nowego układu immunologicznego skutkuje wystąpieniem unikalnych powikłań, takich jak choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (graft versus host disease, GvHD), która znacząco wpływa na przeżycie.

Uzyskanie odpowiedzi przeciwnowotworowej zależy nie tylko od stosowanych chemioterapeutyków. Bardzo istotną rolę odgrywa również układ immunologiczny chorego, a zaburzenia w obrębie subpopulacji limfocytów mogą przekładać się na finalne wyniki leczenia. Tempo rekonstrukcji immunologicznej oraz obserwowane zaburzenia populacji komórek po transplantacji mogą pozwolić na przewidywanie powikłań związanych ze stosowaną terapią.

1.1 Różnicowanie i funkcja biologiczna limfocytów Th17 oraz cytokin z nimi związanych.

W ciągu ostatnich lat wyodrębniono różne subpopulacje limfocytów T tzw. pomocniczych, łamiąc obowiązujący dotąd podział na główne linie Th1 i Th2. Limfocyty T mogą być przypisane do określonych linii komórkowych na podstawie produkowanych cytokin, ekspresji czynników transkrypcyjnych oraz biologicznej funkcji, a subtelne zależności pomiędzy subpopulacjami warunkują utrzymanie równowagi immunologicznej organizmu.

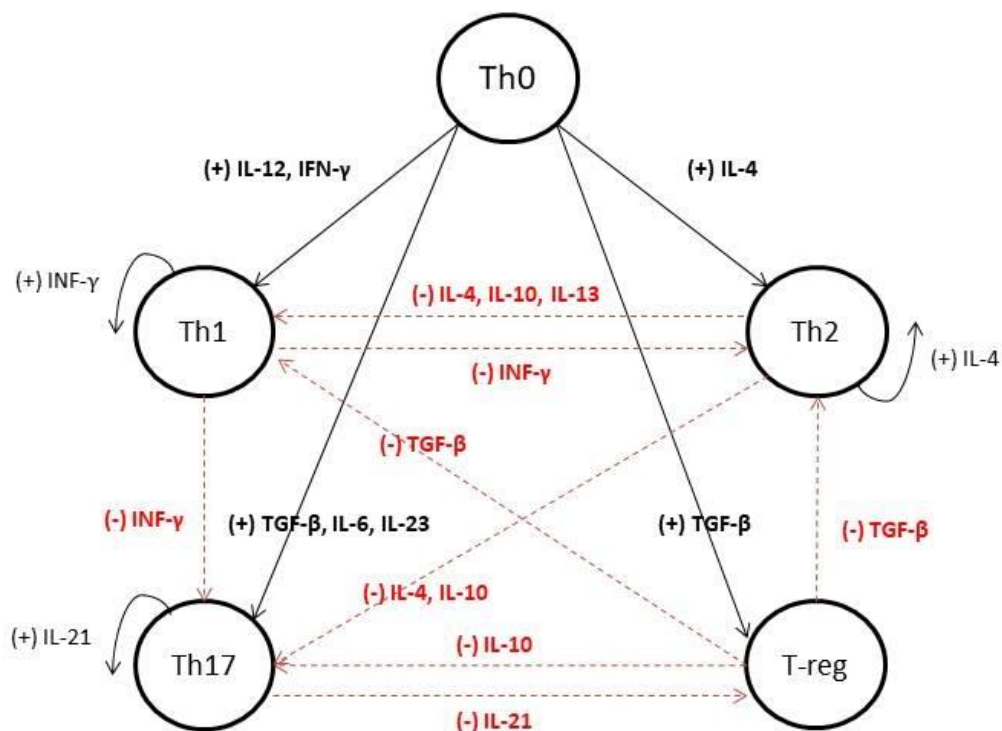
Tradycyjny podział wyróżnia wśród limfocytów T limfocyty cytotoksyczne, pomocnicze i regulatorowe. Limfocyty T pomocnicze (Th) mające na swojej powierzchni antygen CD4, biorą udział w rozpoznawaniu antygeny prezentowanego na cząsteczkach MHC klasy II. Zaangażowane są w aktywację limfocytów B, prekursorów limfocytów cytotoksycznych oraz makrofagów.⁶ Obecnie pośród limfocytów Th wyróżnia się komórki Th0, Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, T_{FH} oraz nTh2.⁷ Limfocyty Th0 (limfocyty naiwne) pod wpływem stymulacji mogą przekształcić się w dowolny typ komórek Th. Limfocyty Th1 produkują głównie IL-2 i IFN-gamma i biorą udział w odpowiedzi komórkowej, natomiast limfocyty Th2 poprzez produkcję IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 są elementem odpowiedzi humoralnej.

Stosunkowo niedawno wyodrębnioną grupą są limfocyty Th17, które biorą udział w odpowiedzi przeciwnowotworowej i przyczyniają się do rozwoju chorób z autoagresji.^{8,9} Limfocyty Th17 i produkowana przez nie IL-17 odgrywają istotną rolę w patofizjologii łuszczycy, reumatoidalnego zapalenia stawów, zapalnych spondyloartropatii, chorób zapalnych jelita czy śluzówek jamy ustnej oraz procesów alergicznych związanych z przewlekłym zapaleniem tj. astmą.¹⁰ W części z tych chorób możliwe jest zastosowanie leczenia biologicznego skierowanego przeciwko IL-17 (secukinumab). Skóra, śluzówki, przewód pokarmowy, płuca czy stawy są atakowanymi narządami również w przebiegu ostrego czy też przewlekłego GvHD, a rola limfocytów Th17 w patofizjologii chorób z autoagresji dała podstawy do poszukiwań ich wpływu na przebieg GvHD.

Po aktywacji wydzielają interleukinę 17(A-F), IL-21, IL-22, GM-CSF. Poprzez mobilizację migracji neutrofilów nasilają stan zapalny w miejscu wniknięcia patogenów

bądź urazu. Kluczowym czynnikiem transkrypcyjnym biorącym udział w różnicowaniu komórek Th17 jest ROR γ t (*retinoic acid-related orphan receptor γ t*). Pod wpływem stymulacji TGF- β , IL-6 i IL-1 β dochodzi do aktywacji ROR γ t i zapoczątkowania różnicowania limfocytów Th0 w kierunku limfocytów Th17. Natomiast w środowisku z wysokimi stężeniami TGF- β przy braku IL-6 dochodzi do różnicowania komórki naiwnej do indukowanych limfocytów T-regulatorowych. Na powierzchni aktywowanych komórek Th17 znajduje się receptor dla IL-23. Interleukina 23 nie jest w stanie samodzielnie inicjować polaryzacji komórek w kierunku limfocytów Th17, natomiast nasila proliferację, wpływa na ekspansję i przeżycie powstałych już komórek. Kolejną cytokiną mającą wpływ na generację limfocytów Th17 jest IL-21. W obecności IL-6 komórki CD4+ są stymulowane do produkcji IL-21, która działa autokrynnie i promuje polaryzację limfocytów w kierunku fenotypu Th17. W obecności cytokin „konkurencyjnych” subpopulacji limfocytów (Th1, Th2) dochodzi do zahamowania powstawania komórek Th17.¹⁰⁻¹² Zależności pomiędzy subpopulacjami limfocytów, wybrane czynniki stymulujące lub hamujące daną populację przedstawia **Rycina 1**.

W przeciwieństwie do limfocytów Th1 i Th2, które są uznawane za stabilne linie komórkowe, wśród limfocytów Th17 obserwowana jest pewna plastyczność. W zależności od warunków mikrośrodowiska komórki te mogą przyjmować cechy limfocytów Th1 bądź T-regulatorowych. W eksperymentalnych warunkach *in vitro* przy braku TGF- β , a w obecności IL-12 i IL-23, komórki Th17 zaczynają produkować IFN- γ , przy zachowanej zdolności do produkcji IL17.¹³ Podobnie, limfocyty T-regulatorowe FoxP3+ pod wpływem stymulacji przez IL-6 mogą wykazywać cechy limfocytów Th17. Opisywano również przekształcenie limfocytów Th17 do T-reg, co może mieć znaczenie w utrzymaniu homeostazy i supresji nadmiernej odpowiedzi zapalnej.^{14,15}



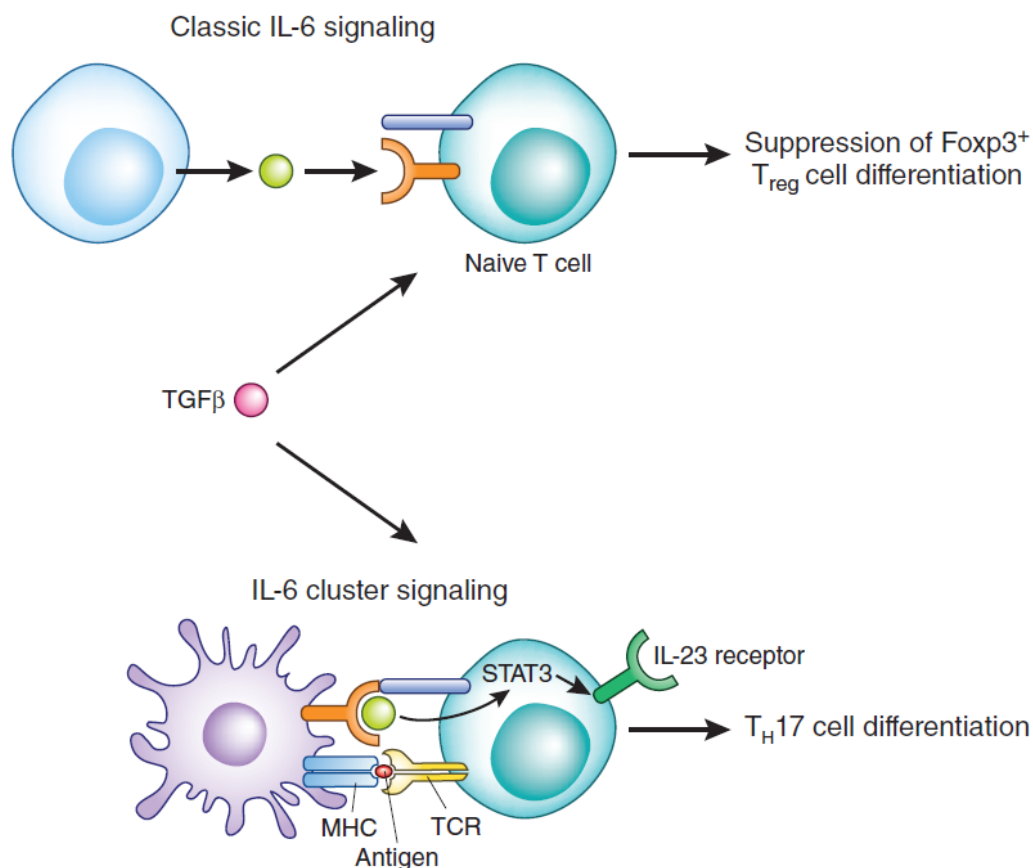
Rycina 1: Poglądowy schemat przedstawiający zależności pomiędzy subpopulacjami limfocytów T, cytokiny produkowane przez wybrane subpopulacje i ich wpływ na inne komórki. (+) strzałki czarne- stymulowanie, (-) strzałki czerwone- hamowanie.

Cytokiny są cząsteczkami wpływającymi na proliferację, migrację i aktywację wielu komórek. Produkowane lokalnie przez pobudzone komórki układu immunologicznego, mogą wywierać swój efekt autokrynnie, doprowadzając do powstania pętli sprzężenia zwrotnego i nasilenia proliferacji danej populacji komórkowej, lub parakrynnie pobudzając komórki znajdujące w otoczeniu. Działanie wielu z nich ograniczone jest do mikrośrodowiska, w którym mogą osiągać wysokie stężenia, w przeciwieństwie do krwi obwodowej, gdzie ich poziomy często są nieoznaczalne. Niektóre cytokiny mogą jednak odgrywać rolę „hormonów” wywierając efekt na komórki znajdujące się w innych narządach.⁶ Interleukina 6 jest jednym z głównych czynników biorących udział w reakcjach przeciwniekcyjnych, mających działanie pirogenne, stymulujących produkcję białek ostrej fazy, jak również wpływających na krwiotworzenie. Aktualnie uważa się, że IL-6 oprócz centralnej roli w generacji stanu zapalnego posiada również szereg działań podobnych do hormonów: wpływa na rozwój chorób naczyniowych, metabolizm lipidów, oporność na insulinę czy

układ neuroendokryny. Cytokina ta jest jedną z głównych cytokin biorących udział w generacji stanu zapalnego towarzyszącemu aGvHD, zespole uwalniania cytokin, a przeciwciała skierowane przeciwko receptorowi dla IL-6 jest stosowane w transplantologii w leczeniu tych jednostek chorobowych.

Wytwarzana jest ona głównie przez aktywowane limfocyty T, makrofagi, komórki śródbłonna i fibroblasty. Stężenie IL-6 stwierdzane w surowicy jest niskie (1-5 pg/ml), jednak w niektórych sytuacjach np. wstrząsie septycznym, może gwałtownie rosnąć do wartości mierzonych nawet w µg/ml.¹⁶ Wytwarzana jest przez monocyty i makrofagi pod wpływem IL-1, TNF-α, interferonów, LPS czy wirusów, razem z IL-1 uczestniczy w procesie aktywacji limfocytów T, jak również pełni kluczową rolę w procesie różnicowania komórek Th17. Interleukina 6 wywołuje swój efekt biologiczny na 3 sposoby: poprzez bezpośrednią aktywację receptora błonowego dla IL-6 (mIL6R), tak zwany „trans-signaling” z wykorzystaniem rozpuszczalnego receptora dla IL-6 (sIL6R) i gp130, jak również poprzez „cluster-signaling” z wytworzeniem wewnętrznego kompleksu IL-6/IL-6R przez komórki dendrytyczne (DCs, dendritic cells) i przekazanie sygnału limfocytom T w synapsie immunologicznej w formie prezentacji antygeny.¹⁷⁻¹⁹ Co więcej, właśnie tej trzeciej drodze aktywacji przypisuje się kluczową rolę w procesie różnicowania się komórek Th17. Wpływ IL-6 na różnicowanie limfocytów T-regulatorowych i Th17 w kontekście różnych szlaków aktywacji IL-6R przedstawiono na **Rycinie 2**.^{19,20}

Główną cytokiną wytwarzaną przez limfocyty Th17 jest interleukina 17. Pod nazwą IL-17 kryje się rodzina cytokin, w której najważniejszą funkcję biologiczną pełnią IL-17A i IL-17F. Za pośrednictwem IL-17A fibroblasty, komórki śródbłonna i nabłonna są stymulowane do produkcji różnych cytokin, m.in. IL-6 i G-CSF. Działając na makrofagi pobudzają je do produkcji TNF-α, IL-6, IL-1β. Interleukina 17A jest główną cytokiną zaangażowaną w rekrutację, aktywację i migrację neutrofilów, a razem z IL-22 zwiększają produkcję peptydów i białek przeciwbakteryjnych. Interleukina 17A bierze udział w odpowiedzi przeciw patogenom zewnątrzkomórkowym, m.in. *Klebsiella pneumoniae* i *Staphylococcus aureus*, jak również jest elementem odpowiedzi przeciwgrzybiczej.^{8,11}



Rycina 2: Wpływ IL-6 na różnicowanie limfocytów Th17 i T-reg.

Aktywacja błonowego receptora dla IL-6 na limfocycie naiwnym doprowadza do supresji Foxp3+ i zahamowania rozwoju w kierunku T-reg. Działając poprzez „cluster signaling” dochodzi do różnicowania w kierunku limfocytów Th17.²⁰ Quintana FJ. Old dog , new tricks : IL-6 cluster signaling promotes pathogenic T H 17 cell differentiation. *Nat Publ Gr.* 2017;18(1):8-10.

W stanach zwiększonej produkcji IL-17A i IL-17F dochodzi do pojawienia się nadmiernej reakcji zapalnej, która prowadzi do zniszczenia tkanek i autoagresji. Obecnie IL-17 wiązana jest z patogenezą takich chorób jak stwardnienie rozsiane, reumatoidalne zapalenie stawów, łuszczyca czy choroby zapalne jelit. Podkreśla się również jej rolę w rozwoju chorób alergicznych związanych z przewlekłym zapaleniem, głównie astmy.²¹

Dodatkowo, IL-17 jest powiązana z angiogenezą, poprzez wpływ na fibroblasty lub komórki nowotworowe stymuluje je do zwiększonej produkcji VEGF i innych czynników proangiogennych. Wykazano jej wpływ przeciwnowotworowy m.in. w raku jajnika, natomiast w innych guzach litych może przyczyniać się do nowotworzenia. Aktualnie nie ma jednoznacznego stanowiska dotyczącego jej roli w procesach

nowotworowych, a wpływ pro- bądź anty-nowotworowy zależy od szeregu czynników.^{9,15}

Limfocyty Th17 nie są jedynymi komórkami produkującymi IL-17. Postuluje się, że IL-17 może być wytwarzana przez limfocyty $\gamma\delta$, Th1/Th17, Th17/T-reg, NK i NKT, jak również przez neutrofile czy komórki tuczne. Wobec produkcji IL-17 zarówno przez komórki odporności wrodzonej, jak i swoistej, biologiczne działanie limfocytów Th17 nie jest równoznaczne z funkcją jedynie tej cytokiny.²²

1.2 Fenotyp limfocytów Th17 i rola antygenów powierzchniowych.

Dzięki wykorzystaniu wieloparametrowej cytometrii przepływowej na podstawie antygenów powierzchniowych i cytoplazmatycznych można wyodrębnić różne subpopulacje limfocytów. Limfocyty Th17, oprócz antygenów CD3 i CD4, typowych dla wszystkich limfocytów T pomocniczych, mają na swojej powierzchni charakterystyczne markery CD161 i CD196 (CCR6) wyróżniające je spośród innych komórek CD4+.²³

CD161 jest ludzką glikoproteiną obecną na większości komórek NK i na niektórych populacjach komórek CD4+ i CD8+. Rola tego antygeny nie jest do końca poznana, postuluje się, że może brać udział w migracji limfocytów poprzez komórki nabłonka. Zarówno w miejscu zapalenia, jak i we krwi obwodowej komórki produkujące IL-17 zawierają się w obrębie populacji komórek CD161+. Dlatego też CD161 uważany jest za kluczowy antygen powierzchniowy pozwalający wyodrębnić komórki Th17 spośród innych limfocytów CD4+.²³⁻²⁵ Fenotyp z pośrednią ekspresją CD161^{int} charakteryzuje komórki pamięci immunologicznej, a ekspresja antygeny zwiększa się po aktywacji limfocytów. Częsteczką CD161 nie jest jedynie markerem aktywacji, pojawia się nie tylko na komórkach efektorowych. Antygen ten stwierdzany jest również na komórkach obecnych w krwi pępowinowej, a limfocyty Th17 wywodzą się z komórek naiwnych CD4+CD161+. W badaniach z wykorzystaniem krwi pępowinowej stwierdzono obecność populacji wykazującej ekspresję CD161 wśród limfocytów T CD4+45RA+ (naiwnych). Jedynie frakcja CD161+ wykazywała wysokie poziomy mRNA dla ROR γ t, IL-23R i CCR6. Dodatkowo stymulacja naiwnych komórek CD4+ w obecności IL-1 β oraz IL-23 doprowadzała do zwiększenia ekspresji T-bet

(typowej dla Th1) i ROR γ t oraz pojawienia się również populacji Th1, natomiast rozwój komórek zdolnych do produkcji IL-17 był obserwowany jedynie w obrębie frakcji CD161⁺.^{25,26}

Najlepszą metodą pozwalającą rozróżnić różne subpopulacje limfocytów jest ocena sekrecji produkowanych cytokin po stymulacji w obecności inhibitora aparatu Golgiego, zapobiegającego uwalnianiu cytokin poza komórkę.²⁷ Po takim przygotowaniu istnieje możliwość oznaczenia obecności wewnątrz-cytoplazmatycznych cytokin i zaszeregowania badanych komórek do różnych subpopulacji. Badanie to może jednak powodować pewne niedoszacowanie szczególnie u chorych w stanie immunosupresji, gdzie obserwuje się głęboką limfopenię, a znakowanie antygenów wewnątrz-cytoplazmatycznych może powodować utratę części badanych komórek. W dostępnym piśmiennictwie przynależność do linii Th17 często jest określana jedynie poprzez obecność cytoplazmatycznej IL-17A, bez wykazywania obecności innych niż CD3 i CD4 antygenów powierzchniowych. Takie założenie nie wydaje się jednak do końca właściwe, biorąc pod uwagę wspomnianą wcześniej plastyczność tej linii oraz zdolność do wytwarzania cytokin przez komórki głównie po ich aktywacji oraz z powodu trudności technicznych w przypadku bardzo małej populacji komórek – jak w przypadku chorych po transplantacji.

Chemokiny są małymi proteinami zaangażowanymi w regulację wielu funkcji układu immunologicznego obejmujących migrację komórek, formowanie się narządów limfatycznych, czy angiogenezę. Ekspresja CCL20 (*Liver and activation regulated chemokine*, LARC; *Macrophage inflammatory protein 3 α* , MIP3 α) stwierdzana jest na błonach śluzowych jelita i płuc, w skórze, jak również w wątrobie czy w grasicy. Produkcja tej chemokiny zwiększana jest przez IL-1 β , TNF- α , IFN- γ czy LPS. Jest ona potencjalnie jedynym ligandem dla receptora CCR6 (CD196), który znajduje się na niedojrzałych komórkach dendrytycznych i limfocytach T, głównie subpopulacji Th17. Po aktywacji limfocytów Th17 dochodzi do zwiększenia ekspresji receptora CCR6, co powoduje nasilenie chemotaksji do miejsca objętego zapaleniem oraz zatrzymania tych komórek w uszkodzonych tkankach. Dodatkowo komórki Th17 mogą produkować autokrynnie CCL20, co prowadzi do nasilenia pętli sprzężenia zwrotnego dodatniego.²⁸⁻

1.3 Transplantacja alogenicznych komórek krwiotwórczych – informacje ogólne.

Transplantacja alogenicznych komórek krwiotwórczych jest jedną z metod terapeutycznych stosowanych w leczeniu schorzeń hematologicznych, głównie nowotworowych. U znacznej grupy pacjentów, allo-HCT prowadzi do wyleczenia z choroby, u części - wydłuża przeżycie. U pacjentów z rozrostowymi chorobami hematologicznymi pożądany efekt terapeutyczny jest osiąganym na dwa sposoby. Po pierwsze, poprzez wykorzystanie chemioterapii bądź radio-chemioterapii kondycjonującej mającej na celu zniszczenie przetrwałych komórek nowotworowych, stworzenie miejsca dla komórek krwiotwórczych dawcy i odpowiednią supresję układu immunologicznego biorcy umożliwiającą ich trwałe wszczepienie. Po drugie, poprzez wykorzystanie efektu przeszczep przeciwko chorobie nowotworowej (graft versus tumor; GvT), w którym dominującą rolę odgrywają limfocyty T i komórki NK dawcy. Dobór dawcy jest jednym z kluczowych elementów wpływających na częstość występowania GvHD, co bezpośrednio przekłada się na wyniki transplantacji.³¹⁻³⁴ Dawcy dobierani są w oparciu o posiadane przez nich antygeny zgodności tkankowej (human leukocyte antigens; HLA). Optymalnym dawcą jest zgodny dawca rodzinny (matched sibling donor; MSD), który oprócz zgodności w głównych układach HLA wykazuje większe podobieństwo w mniejszych układach zgodności tkankowej.³⁵ W przypadku braku dawcy rodzinnego w drugiej kolejności rozpatrywany jest zgodny dawca niespokrewniony (matched unrelated donor; MUD), a następnie inni dawcy alternatywni (np. dawca niespokrewniony z niezgodnością lub rodzinny dawca haploidentyczny).

Istotnym czynnikiem wpływającym na częstość występowania powikłań jest rodzaj postępowania przygotowującego (kondycjonowania). Kondycjonowanie mieloablacyjne (myeloablative conditioning; MAC) powoduje nieodwracane uszkodzenie szpiku, bez możliwości samoistnej regeneracji hematopoezy. Obarczone jest wysoką toksycznością i stosowane jest głównie u chorych młodszych, w dobrym stanie ogólnym, bez współistniejących obciążeń, o wysokim ryzyku nawrotu choroby nowotworowej. Najczęściej wykorzystywane są schematy oparte na busulfanie: Cyklofosfamid z Busulfanem (CyBy), Fludarabina z Busulfanem (FluBu4) lub napromienianiu całego ciała (TBI-Cyklofosfamid, TBI-Cy). Innym postępowaniem jest

kondycjonowanie o zredukowanej intensywności (reduced intensity conditioning; RIC). Poprzez redukcję komponenty mieloablacyjnej i zwiększenie nacisku na immunoablację, która zapobiega odrzuceniu przeszczepu, toksyczność tego protokołu jest znacznie mniejsza. Wykorzystywany jest głównie efekt immunologiczny, w którym limfocyty dawcy niszczą komórki nowotworowe (GvT), a w szpiku przez dłuższy czas mogą utrzymywać się populacje komórek zarówno dawcy i biorcy (tzw. mieszany chimeryzm). Stanowi on alternatywę dla osób w starszym wieku, bądź z dodatkowymi obciążeniami, jednakże postępowanie takie obarczone jest wyższym ryzykiem wznowy choroby.^{36,37}

Jako uzupełnienie kondycjonowania w przypadku przeszczepień od dawców niespokrewnionych lub od starszych dawców rodzinnych stosowana jest globulina antytymocytarna (anti-thymocyte globulin, ATG, thymoglobuline). Jest to poliklonalna immunoglobulina królicza skierowana przeciw ludzkim tymocytom. Rozpoznaje między innymi większość komórek z antygenami CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD18, CD25, HLA-DR i HLA klasy I biorącymi udział w aktywacji limfocytów T.³⁸ Rozpoznane komórki są usuwane z krwioobiegu poprzez lizę zależną od układu dopełniacza, cytotoksyczność zależną do przeciwciał oraz poprzez śmierć komórki w wyniku aktywacji. Thymoglobulina preferencyjnie wiąże się z limfocytami T powodując ich głęboką deplecję. Może jednak rozpoznawać również limfocyty B, komórki dendrytyczne i inne nielimfatyczne linie komórkowe, szczególnie jeśli podawana jest w wysokich dawkach. Lek niszczy zarówno komórki obecne we krwi obwodowej, jak również te rezydujące w narządach limfatycznych.³⁹ W ciągu 2 pierwszych tygodni po podaniu leku obserwuje się zmniejszenie o ponad 85% bezwzględnej liczby limfocytów T. Przed upływem drugiego miesiąca po podaniu ATG odnawia się większość subpopulacji limfocytów, wyjątek stanowią limfocyty T CD4+, których głęboka deplecja może utrzymywać się do 6 miesięcy po podaniu leku.³⁸ Podanie ATG, poprzez nasilenie immunosupresji, zmniejsza częstość występowania GvHD, z drugiej jednak strony zwiększa ryzyko powikłań infekcyjnych.⁴⁰

Kolejnym parametrem wpływającym na częstość powikłań jest wybór materiału przeszczepowego. Aktualnie większość transplantacji przeprowadzanych jest z użyciem komórek macierzystych układu krwiotwórczego uzyskanych z krwi obwodowej

(peripheral blood stem cells; PBSC), tylko w niektórych przypadkach wykorzystywane są komórki pozyskane z krwi szpikowej, bądź pępowinowej. Dzięki użyciu PBSC uzyskuje się szybszą regenerację hematopoezy oraz silniejszy efekt GvT, jednakże podwyższone jest również ryzyko GvHD, co związane jest z większą liczbą limfocytów T w materiale przeszczepowym.

Na ostateczny wynik procedury transplantacyjnej składa się wiele czynników. Część z nich, przedstawionych powyżej, jest modyfikowalnych; poprzez odpowiednie postępowanie przygotowujące można zmniejszyć ryzyko wystąpienia ciężkich powikłań. Jednak w większości przypadków nie ma możliwości oceny endogennych zmiennych zależnych od pacjenta, jego układu immunologicznego, które mogą przesądzić o końcowym powodzeniu terapii. W niniejszej pracy skupiono się głównie na limfocytach Th17, odgrywających rolę w odpowiedzi przeciwniekcyjnej oraz mających swój udział w patogenezie GvHD, oraz na istotnej dla ich rozwoju IL-6, a także limfocytach T-regulatorowych, pozostających w przeciwstawie do prozapalnych komórek Th17.

1.4 Rekonstytucja immunologiczna po alogeniczej transplantacji.

Tempo odbudowy układu immunologicznego po transplantacji jest osobniczo zmienne, a wiele czynników może modulować proces dojrzewania i kształtowania się nowego układu odpornościowego. Wybór kondycjonowania mieloablacyjnego, zastosowanie ATG, podanie materiału przeszczepowego z krwi szpikowej lub pępowinowej, bądź wybór dawców alternatywnych znacząco wpływają na opóźnienie regeneracji subpopulacji limfocytów.^{41,42} Poza defektem ilościowym istotny wpływ na pojawianie się powikłań ma również defekt jakościowy nowo powstałych komórek. Stan ten może utrzymywać się nawet do 2 lat po transplantacji, zwiększając ryzyko wystąpienia ciężkich powikłań infekcyjnych, jak również wznowy choroby.

Rekonstytucja immunologiczna po transplantacji odbywa się stopniowo w zakresie poszczególnych populacji komórek. Po zastosowaniu postępowania kondycjonującego obserwowana jest faza aplastyczna z deficytem wszystkich linii komórkowych. Istotnym czynnikiem wpływającym na szybkość regeneracji jest rodzaj

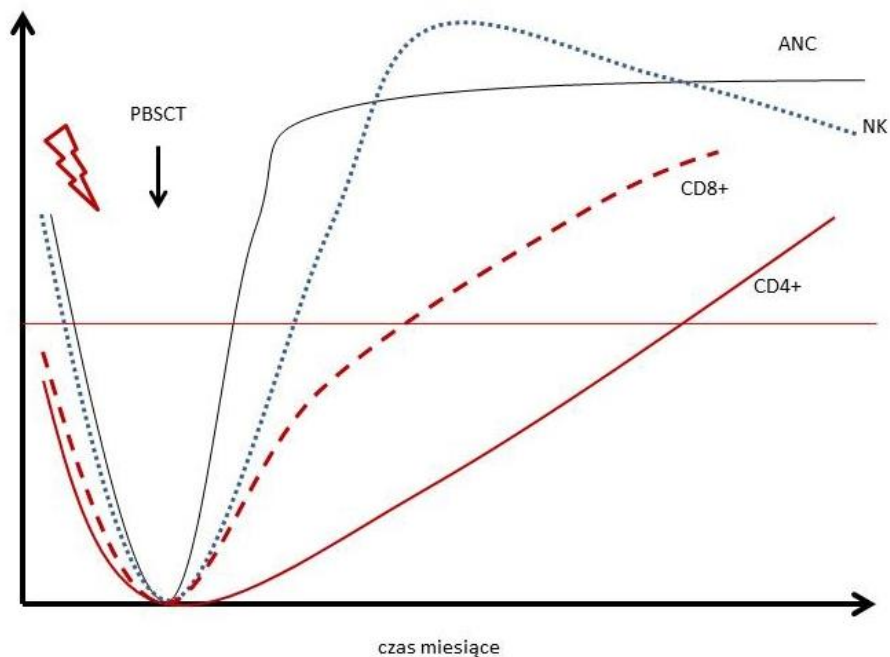
materiału przeszczepowego. Standardowo, pierwsze cechy odnowy szpikowej pojawiają się po około 14 dniach w przypadku PBSC, 21 dniach po przetoczeniu szpiku kostnego, i po około miesiącu przy zastosowaniu krwi pępowinowej.⁴³ Neutrofile są pierwszymi komórkami, które pojawiają się po transplantacji komórek krwiotwórczych. Monocyty i komórki dendrytyczne zazwyczaj osiągają wartości prawidłowe w ciągu miesiąca po allo-HCT, natomiast ich funkcja może być upośledzona nawet do roku.⁴⁴ U części pacjentów dochodzi do szybkiej normalizacji całkowitej liczby limfocytów (absolute lymphocyte count, ALC) we wczesnym okresie po transplantacji. Komórki NK rekonstruuje jako pierwsze z linii limfoidalnej i stanowią główną populację limfocytów przez pierwsze 3 miesiące po transplantacji. Pomimo osiągnięcia prawidłowych wartości w zakresie liczby, deficyt jakościowy utrzymuje się do 12 miesięcy.

Najdłużej regenerującą populacją komórek są limfocyty T, ich defekt ilościowy i jakościowy może utrzymywać się nawet do 2 lat po HCT. Rekonstrukcja limfocytów T zachodzi dwustopniowo. W pierwszym etapie dochodzi do obwodowej ekspansji komórek pamięci immunologicznej, stymulowanych przez cytokiny oraz obecność alo-reaktywnych antygenów. W drugim etapie, po rozpoczęciu limfopoezy z komórek dawcy, w grasicy powstaje nowa generacja naiwnych limfocytów T. Kondycjonowanie mieloablacyjne, poprzez znaczne uszkodzenie grasicy, wpływa istotnie na opóźnienie pojawiania się i dojrzewania limfocytów T. Podobnie, wolniejsze tempo regeneracji limfocytów T obserwowane jest u starszych biorców (inwolucja grasicy) oraz u pacjentów z GvHD.⁴⁵ Generacja limfocytów CD4+ jest w większym stopniu zależna od grasicy, niż produkcja komórek CD8+. Dlatego też obserwowana jest szybsza regeneracja komórek CD8+ w porównaniu do CD4+, co przekłada się na zaburzony stosunek CD4/CD8 utrzymujący się po HCT.⁴⁶ Brak naiwnych limfocytów T z szerokim repertuarem receptorów TCR prowadzi do zwiększonego ryzyka pojawienia się infekcji oportunistycznych czy wznowy choroby, a tempo rekonstrukcji układu immunologicznego może przekładać się bezpośrednio na wyniki transplantacji.

Pomimo normalizacji liczby limfocytów B już rok po allo-HCT, zaburzenia odporności humoralnej mogą utrzymywać się do 2 lat, a u niektórych chorych obniżona zdolność do wytwarzania przeciwciał może występować nawet przez wiele lat. Opóźniona regeneracja limfocytów B pamięci immunologicznej powoduje zmniejszenie

ilości krążących we krwi immunoglobulin oraz nieprawidłową zmianę klas immunoglobulin. Przekłada się to na zmniejszenie zdolności do opsonizacji bakterii otoczkowych, przez co pacjenci są bardziej podatni na infekcje wywołane przez *Haemophilus influenzae* czy *Streptococcus pneumoniae*. Dlatego istotna jest ponowna immunizacja czynna poprzez szczepienia przeprowadzane po allo-HCT.^{43,47}

Poglądowy schemat przedstawiający tempo regeneracji wybranych populacji komórek po transplantacji przedstawia **Rycina 3**.



Rycina 3: Poglądowy schemat regeneracji wybranych populacji komórek po HCT.

ANC - neutrocyty, NK - komórki NK, CD8+ - limfocyty T CD8+, CD4+ - limfocyty T CD4+, PBSCT - transfuzja komórek krwiotwórczych, strzałka – kondycjonowanie, pozioma linia – dolna granica normy

1.5 Ostra postać choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi i rola limfocytów Th17 w patogenezie GvHD.

Ostra postać choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (acute graft versus host disease; aGvHD) pozostaje jedną z głównych przyczyn zgonów we wczesnym okresie po transplantacji. Klasyczna forma aGvHD występuje zazwyczaj do 100 doby po

HCT, charakteryzuje się typową plamisto-grudkową wysypką mogącą obejmować całą powierzchnię ciała, wodnistą biegunką i hiperbilirubinemią.^{48,49} U części chorych objawy aGvHD mogą pojawić się powyżej 100 doby, jako późna manifestacja aGvHD lub tzw. zespół nakładania cech aGvHD i przewlekłego GvHD (chronic GvHD, cGvHD). Późna manifestacja choroby obserwowana jest częściej u pacjentów, u których zastosowano kondycjonowanie niemieloablacyjne lub infuzję limfocytów dawcy.

Częstość występowania choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi jest bezpośrednio związana ze stopniem niezgodności pomiędzy dawcą i biorcą. Po transplantacjach od zgodnych dawców rodzinnych aGvHD występuje średnio u 35-45% biorców, natomiast po przeszczepieniach od nie w pełni zgodnych dawców niespokrewnionych odsetek ten może dotyczyć nawet 60-80% chorych.^{50,51}

Innymi czynnikami wpływającymi na większe ryzyko rozwoju GvHD są m.in. rodzaj materiału przeszczepowego (częściej u biorców PBSC), płeć żeńska dawcy dla biorcy mężczyzny, oraz starszy wiek biorcy, a także powikłania infekcyjne oraz reaktywacja wirusów latentnych pojawiające się we wczesnym okresie allo-HCT.^{52,53}

Patomechanizm rozwoju aGvHD jest kilkietapowy. Na skutek postępowania kondycjonującego i współistniejących infekcji dochodzi do uszkodzenia tkanek oraz uwolnienia prozapalnych cytokin, takich jak TNF- α i IL-1. Szczególną lokalizacją w patofizjologii GvHD jest przewód pokarmowy. Jako następstwo uszkodzenia bariery jelitowej dochodzi do migracji bytującej tam flory bakteryjnej. Prowadzi to do zwiększenia ekspozycji na dodatkowe czynniki prozapalne takie jak lipopolisacharyd (LPS) czy inne molekuly związane z patogenami, które zwiększają aktywację komórek prezentujących antygen biorcy (antigen presenting cells; APCs). Mikrobiom jelitowy odgrywa szczególną rolę w patogenezie GvHD, a utrata różnorodności składu flory jelitowej może wpływać na częstość występowania aGvHD.⁵⁴ W drugiej fazie aktywacja komórek T pochodzących od dawcy jest nasilana przez prezentację antygenów przez APCs biorcy. Interakcja pomiędzy receptorem TCR znajdującym się na limfocytach T oraz cząsteczką MHC obecną na komórkach APCs wymaga obecności kostymulującego sygnału, natomiast w przypadku jego braku dochodzi do anergii i wyciszenia się reakcji zapalnej. Dodatkowo aktywacja komórek efektorowych może być zahamowana dzięki supresyjnemu działaniu limfocytów T-regulatorowych. W trzecim etapie dochodzi do

prolifracji i różnicowania komórek w limfocyty pamięci, limfocyty efektorowe, regulatorowe, tzw. pomocnicze Th1, Th2, Th17, oraz cytotoksyczne (Tc). Równowaga pomiędzy subpopulacjami komórek kontrolowana jest przez lokalną produkcję cytokin, a jej zaburzenie może mieć wpływ na manifestację i ciężkość przebiegu aGvHD. W następnym okresie aktywowane komórki T migrują do obwodowych narządów limfatycznych oraz organów docelowych (skóry, wątroby, jelita). Kluczową rolę w migracji limfocytów odgrywają receptory chemokinowe m.in. CCR5, CCR6 i CCR7. W ostatnim etapie, po osiągnięciu organów docelowych dochodzi do destrukcji tkanki poprzez bezpośrednią aktywność cytotoksyczną oraz rekrutację innych leukocytów do strefy zapalenia. Produkowane w dużych ilościach cytokiny prozapalne tj. TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-17 regulują rekrutację leukocytów oraz miejscowe niszczenie tkanek.⁵⁵⁻⁵⁸

Sugeruje się, że limfocyty Th17 mogą również mieć wpływ na częstość występowania GvHD. Jak wiadomo, rola limfocytów T w rozwoju aGvHD jest kluczowa, jednak udział poszczególnych subpopulacji nie jest już tak oczywisty. Limfocyty Th17 nie są niezbędne do zainicjalizowania aGvHD, w przypadku ich nieobecności dochodzi do rozwoju aGvHD za pośrednictwem limfocytów Th1.⁵⁹ Z drugiej strony plastyczność i niestabilność komórek Th17, a w szczególności ich zdolność do produkowania IFN- γ w zależności od warunków środowiska, może zaburzać rozumienie ich roli w patofizjologii aGvHD. W momencie zablokowania czynników transkrypcyjnych istotnych dla różnicowania zarówno limfocytów Th1 (T-bet), jak i Th17 (ROR- γ t), dochodzi do zmniejszenia częstości występowania aGvHD. W przypadku zablokowania tylko jednego z nich obserwowano występowanie nasilonego aGvHD. Potwierdza to synergizm pomiędzy tymi populacjami komórek i ich wspólną rolę w patogenezie GvHD.⁶⁰ Różne populacje komórek mogą indukować zajęcie różnych narządów przez proces chorobowy, a limfocyty Th17 mogą odgrywać rolę w GvHD obejmującym skórę czy płuca.^{61,62}

Z drugiej strony istnieją doniesienia o ochronnej roli IL-17A w aGvHD. Interleukina 17A nie jest produkowana wyłącznie przez limfocyty Th17, może również być wytwarzana przez komórki Th17/Treg razem z TGF- β i IL-10, podczas gdy komórki Th17/Th1 mogą produkować oprócz IL-17A również IFN- γ . Kombinacja współwytwarzanych cytokin determinuje rolę limfocytów Th17

w patogenezie aGvHD, ale ich ostateczne znaczenie nie jest jeszcze do końca poznane.⁶³

Istotnym czynnikiem warunkującym utrzymanie homeostazy w organizmie są limfocyty T-regulatorowe. Jest to heterogenna grupa komórek zabezpieczająca przed nadmierną autoagresją, warunkująca tolerancję transplantacyjną, jak również wpływająca na osłabienie odpowiedzi przeciwnowotworowej. Limfocyty T-reg oddziałują za pośrednictwem IL-10 i TGFβ nie tylko na inne subpopulacje limfocytów, ale również na APCs. Poza pozytywnym wpływem na zmniejszenie ryzyka autoagresji, mogą hamować efektorowe limfocyty T, a przez to osłabiać odpowiedź na antygeny nowotworowe.⁶⁴ U pacjentów po transplantacji odpowiadają za tolerancję antygenów biorcy i mogą mieć istotny wpływ na częstość występowania GvHD. Obecnie wyodrębnianych jest wiele populacji komórek supresorowych, jednak najlepiej poznane są limfocyty CD4+CD25+FoxP3+. Stanowią przeciwwagę w odniesieniu do prozapalnych limfocytów Th17, a zaburzony stosunek Th17/T-reg może mieć wpływ na częstość występowania aGvHD.^{65,66}

1.6 Powikłania infekcyjne po transplantacji.

Pomimo stosowania standardowych schematów opieki około transplantacyjnej u części chorych dochodzi do rozwoju ciężkich powikłań infekcyjnych. Kluczową rolę może odgrywać nowy układ immunologiczny, tempo rekonstrukcji poszczególnych populacji komórek oraz ich zaburzenia jakościowe obserwowane we wczesnym okresie po transplantacji. Dodatkowym czynnikiem nasilającym dysfunkcję układu odpornościowego, a przez co również zwiększającym podatność na infekcje jest aGvHD. Pomimo ustąpienia neutropenii u części chorych dochodzi do rozwoju gwałtownie przebiegających zakażeń bakteryjnych. Ważną rolę w nasileniu chemotaksji granulocytów do miejsca zakażenia pełnią limfocyty Th17, a zaburzenia w obrębie tej populacji mogą przekładać się na częstość występowania powikłań infekcyjnych po allo-HCT.⁶⁷ Interleukiny 17 i 22 stymulują komórki nabłonkowe do produkcji białek przeciwbakteryjnych i czynników biorących udział w procesach regeneracyjnych zniszczonych tkanek. W przeciwieństwie do ochronnej roli tej populacji w przypadku zakażenia tkanki płucnej przez *K. pneumoniae*, w trakcie zapalenia płuc o etiologii

Pseudomonas aeruginosa limfocyty Th17 nie kontrolują przebiegu infekcji, lecz nasilają proces niszczenia tkanki płucnej.^{8,21} Długotrwały, niekontrolowany stan zapalny powoduje pojawienie się włóknienia w tkankach, trwałego uszkodzenia narządów oraz może doprowadzić do nowotworzenia poprzez działanie proangiogenne.

W zależności od czasu, który upłynął od allo-HCT pojawiają się różnego rodzaju zakażenia. Chronologię powikłań infekcyjnych oraz główne czynniki determinujące pojawienie się danego typu infekcji przedstawiono na **Rycinie 4**.

Infekcje bakteryjne.

Powikłania infekcyjne są jedną z głównych przyczyn zgonów u chorych po allo-HCT. Na skutek stosowanego leczenia dochodzi do uszkodzenia naturalnych barier ochronnych tj. integralności błon śluzowych, co sprzyja translokacji patogenów do krwioobiegu. Dodatkowo w okresie aplazji po terapii brak komórek odpowiadających za mechanizmy odporności wrodzonej może doprowadzić do bardzo gwałtownego przebiegu infekcji. Częstym punktem wyjścia infekcji w okresie agranulocytozy jest przewód pokarmowy. Dekontaminacja przewodu pokarmowego za pomocą fluorochinolonów zmniejszała ryzyko bakteriemii spowodowanej wielowrażliwymi pałeczkami jelitowymi, jednak z powodu narastającej oporności często nie zabezpiecza w pełni przed translokacją bakterii z przewodu pokarmowego.⁶⁸ Dodatkowo stosowanie profilaktycznej antybiotykoterapii może przyczynić się do zwiększenia częstości występowania aGvHD.^{69,70} Z powodu długotrwałego leczenia oraz stosowania empirycznej, szerokospektralnej antybiotykoterapii dochodzi do kolonizacji przewodu pokarmowego patogenami wieloopornymi (multi drug-resistant bacteria, MDRB). MDRB ingerują w skład mikrobiomu jelitowego wypierając naturalnie bytujące w przewodzie pokarmowym komensale. Zaburzenie składu mikrobiomu może wpływać na częstość oraz nasilenie obserwowanych powikłań po stosowanej terapii.⁷¹ Dodatkowo flora jelitowa może w znacznym stopniu przyczynić się do obserwowanych zaburzeń subpopulacji limfocytów, a bytujące komensale mogą mieć wpływ na ukierunkowanie odpowiedzi Th17 zależnej, bądź generowanie limfocytów T-regulatorowych.^{72,73}

Reaktywacja wirusów latentnych.

Na skutek cytotoksycznego działania chemioterapii, bądź też z powodu stosowania immunoterapii z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko limfocytom B lub T, dochodzi do przejściowego deficytu subpopulacji limfocytów. Przedłużająca się limfopenia sprzyja reaktywacji wirusów latentnych, tj. CMV, EBV czy BKV. Reaktywacja wirusa cytomegalii obserwowana jest często u chorych w trakcie leczenia immunosupresyjnego. U pacjentów poddawanych procedurze allo-HCT najwyższe ryzyko obserwowane jest u seropozytywnych biorców, którzy otrzymują komórki krwiotwórcze od seronegatywnego dawcy. Reaktywacja wirusa, jak również stosowana terapia przeciwwirusowa może wpływać hamująco na regenerację hematopoezy. Dodatkowo zajęcie narządów w przebiegu infekcji wirusowej może przyczynić się do pojawienia się lub nasilenia już występującego GvHD.⁷⁴

OKRES APLAZJI	OKRES PO WSZCZEPIENIU	FAZA PÓŻNA
BAKTERIE G(+) i G(-) neutropenia, uszkodzenie anatomicznych barier		BAKTERIE OTOCZKOWE zaburzenia odporności humoralnej, brak przeciwciał opsonizujących, hipogammaglobulinemia
GRZYBICA UKŁADOWA neutropenia, leki immunosupresyjne, zaburzenie aktywności makrofagów		
Pneumocystis jiroveci deplecja limfocytów T CD4+		
ZAKAŻENIA WIRUSOWE: HSV, ENTEROWIRUSY, RSV limfopenia, leki immunosupresyjne		
REAKTYWACJA WIRUSÓW LATENTNYCH deplecja limfocytów T		

Rycina 4: Chronologia powikłań infekcyjnych po HCT.

Pomimo zwiększenia liczby przeprowadzanych transplantacji i rozwoju leczenia wspomagającego, procedura transplantacyjna obarczona jest nadal wysokim odsetkiem powikłań, a GvHD oraz infekcje pozostają głównymi przyczynami zgonu we wczesnym okresie po allo-HCT.^{75,76}

Poza klasycznymi czynnikami zwiększającymi ryzyko występowania powikłań takimi jak wybór dawcy niespokrewnionego, stosowanie komórek krwiotwórczych z krwi obwodowej, czy obecność niezgodności HLA, aktualnie nie dysponujemy nowymi markerami pozwalającym przypisać chorych do grupy ze zwiększonym ryzykiem rozwoju aGvHD i innych powikłań występujących we wczesnym okresie po HCT.⁷⁷ Lepsze zrozumienie zależności występujących między subpopulacjami komórek układu odpornościowego a obserwowanymi powikłaniami zwiększyłoby szanse na identyfikację biomarkerów, które pozwoliłyby wyodrębnić grupę chorych o podwyższonym ryzyku powikłań immunologicznych po transplantacji. Chorzy Ci wymagaliby ściślejszego nadzoru w okresie rekonstrukcji układu odpornościowego, co umożliwiłoby podjęcie szybszych działań terapeutycznych, a to może przełożyć się na zmniejszenie śmiertelności we wczesnym okresie po transplantacji.

2. CELE PRACY

Cele pracy obejmują:

1. Ocenę rekonstytucji wybranych subpopulacji limfocytów T, ze szczególnym uwzględnieniem komórek Th17, we wczesnym okresie po intensywnym leczeniu u pacjentów z rozrostowymi chorobami hematologicznymi, poddanych transplantacji alogenicznych komórek krwiotwórczych.
2. Określenie korelacji pomiędzy stężeniem IL-6 – istotnej dla różnicowania i dojrzewania limfocytów Th17 a liczbą krążących we krwi komórek Th17.
3. Ocenę zależności pomiędzy liczbą krążących we krwi limfocytów Th17 a częstością występowania ostrej choroby przeszczep przeciw gospodarzowi i powikłań infekcyjnych.

Hipoteza badawcza:

Niska liczba krążących we krwi obwodowej limfocytów Th17 może korelować ze zwiększeniem częstości występowania ostrej choroby przeszczep przeciw gospodarzowi i powikłań infekcyjnych u biorców allo-HCT.

3. MATERIAŁY I METODY

Badanie subpopulacji limfocytów T oraz określenie stężenia cytokin prozapalnych przeprowadzono u 32 chorych poddanych transplantacji alogenicznych komórek krwiotwórczych z powodu rozrostowych chorób hematologicznych (grupa badana). Leczenie przeprowadzono w Klinice Hematologii i Transplantologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w latach 2017-2018.

Projekt uzyskał zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym. Każdy pacjent przed zakwalifikowaniem do badania wyraził pisemną zgodę na udział w badaniu.

3.1 Charakterystyka grupy badanej.

W celu ujednoczenia danych wykluczono z dalszej analizy chorego po transplantacji haploidentycznych komórek krwiotwórczych oraz chorego po transplantacji komórek krwi szpikowej. Do ostatecznej analizy włączono 30 chorych po transplantacji alogenicznych komórek krwiotwórczych pobranych z krwi obwodowej.

W grupie badanej kondycjonowanie mieloablacyjne zastosowano u 27 pacjentów, a kondycjonowanie o zredukowanej intensywności u trzech. W ramach postępowania kondycjonującego radioterapię całego ciała (TBI) w dawce łącznej 12 Gy oraz cyklofosfamid w dawce całkowitej 120 mg/kg masy ciała (TBI-Cy) otrzymało 6 pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki limfoblastycznej, 1 pacjent z kryzą limfoblastyczną przewlekłej białaczki szpikowej i 1 pacjent z ostrą białaczką szpikową. Czterech chorych z rozpoznaniem ostrej białaczki szpikowej otrzymało fludarabinę oraz busulfan w dawce 4x3,2 mg/kg należnej masy ciała (FluBu). Pozostałe 15 osób w ramach kondycjonowania otrzymało cyklofosfamid 120 mg/kg oraz busulfan 4x3,2 mg/kg (CyBu), w dwóch przypadkach wzmocniono chemioterapię poprzez dodanie etopozydu, bądź klofarabiny. W ramach postępowania o zredukowanej intensywności podawano fludarabinę z dwiema (1 pacjent), bądź trzema (2 pacjentów) dawkami busulfanu 3,2 mg/kg.

W badanej grupie transplantacje od dawców rodzinnych przeprowadzono u 12 chorych, a od dawców niespokrewnionych u 18 - w tym 4 osoby otrzymały komórki od

nie w pełni zgodnego dawcy niespokrewnionego (1 niezgodność). Materiał przeszczepowy stanowiły we wszystkich przypadkach komórki krwiotwórcze uzyskane z krwi obwodowej po stymulacji granulocytarnym czynnikiem wzrostu w dawce 10 µg/kg masy ciała na dobę. Mediana ilości komórek CD34+ w materiale przeszczepowym w przeliczeniu na kilogram masy ciała biorcy wynosiła $5,78 \times 10^6$ (zakres 3,98-7,49). Ogólną charakterystykę grupy poddanej transplantacji przedstawia **Tabela 1.**

W ramach profilaktyki GvHD wszyscy chorzy otrzymali cyklosporynę (CsA) oraz metotreksat (MTX). Wlew CsA rozpoczynano od dawki nasycającej 5 mg/kg w dniu poprzedzającym przetoczenie materiału przeszczepowego, następnie podawano CsA we wlewie dożylnym pod kontrolą poziomu leku we krwi. Po ustaniu wskazań do podaży leku drogą parenteralną, zmieniano CsA na formę doustną. Za terapeutyczny uznawano poziom CsA pomiędzy 200 a 300 µg/l. Sześciu pacjentów wymagało zmiany leczenia immunosupresyjnego (na takrolimus, bądź mykofenolan mofetilu) z powodu nietolerancji CsA lub wystąpienia powikłań toksycznych po leku. Drugą składową profilaktyki GvHD był MTX podawany w dobach +1 (15 mg/m²), +3, +6 i w przypadku braku przeciwwskazań w dobie +11 (10 mg/m²). Wszyscy chorzy poddani transplantacji od dawcy niespokrewnionego (18 pacjentów) otrzymali jako dodatkowy składnik postępowania przygotowującego króliczą globulinę antytymocytarną (Thymoglobulin, Sanofi; ATG) w sumarycznej dawce 5 mg/kg w dniach od -3 do -1 przed przetoczeniem materiału przeszczepowego. ATG w dawce 2,5 mg/kg otrzymało również 4 pacjentów przeszczepianych od dawców rodzinnych, a wskazaniem do podania ATG był starszy wiek zarówno dawcy i biorcy.

U wszystkich pacjentów z wyjątkiem jednego doszło do regeneracji hematopoezy, definiowanej jako: a) wartość granulocytów powyżej $0,5 \times 10^9/l$ przez dwa kolejne dni, b) uniezależnienie od przetoczeń koncentratów krwinek czerwonych, c) liczba retikulocytów $> 20 \times 10^9/l$ oraz d) liczba płytek krwi $> 50 \times 10^9/l$. Pacjent u którego nie doszło do regeneracji hematopoezy zmarł przed dobą 60 z powodu ciężkich powikłań infekcyjnych.

Tabela 1: Ogólna charakterystyka grupy badanej.

Charakterystyka grupy allo-HCT	
Wiek (mediana, zakres)	48 (20-67)
Kobiety	15 (50%)
Mężczyźni	15 (50%)
Choroba zasadnicza:	
AML	18 (60%)
ALL	6 (20%)
MDS	5 (17%)
kryza limfoblastyczna CML	1 (3%)
Rodzaj dawcy:	
MSD	12 (40%)
MUD	14 (47%)
MMUD	4 (13%)
Kondycjonowanie:	
CyBu	15 (50%)
FluBu4 /FluBu2-3	4 (13%) / 3(10%)
TBI-Cy	8 (27%)
Wskaźnik HCT-CI	
0	10 (33%)
1	7 (23%)
2	6 (20%)
3	6 (20%)
4	0
5	1 (3%)

AML (*Acute Myeloid Leukemia*) - ostra białaczka szpikowa, ALL (*Acute Lymphoblastic Leukemia*) - ostra białaczka limfoblastyczna, MDS (*Myelodysplastic Syndrome*) - zespół mielodysplastyczny, CML (*Chronic Myeloid Leukemia*) - przewlekła białaczka szpikowa; MSD (*matched sibling donor*) - zgodny dawca rodzinny, MUD (*matched unrelated donor*) - zgodny dawca niespokrewniony, MMUD (*mismatched unrelated donor*) - nie w pełni zgodny dawca niespokrewniony; Cy-Bu: cyklofosamid z busufanem; Flu-Bu: fludarabina z busulfanem; TBI-(*total body irradiation*) radioterapia całego ciała; HCT-CI (*Hematopoietic cell transplantation- specific comorbidity index*)

3.2 Oznaczenie populacji limfocytów oraz cytokin prozapalnych.

Do oznaczenia subpopulacji limfocytów we krwi obwodowej wykorzystano metodę wieloparametrowej cytometrii przepływowej. Badanie wykonano przed rozpoczęciem procedury transplantacyjnej, w dobie +14, +21, +30 oraz +60 po przetoczeniu materiału przeszczepowego. Określano wartości bezwzględne, jak również procentowy udział wybranych populacji wśród komórek jądrzastych krwi obwodowej. Analizowano: całkowitą liczbę limfocytów, liczbę limfocytów T CD4+ i CD8+, komórek NK, limfocytów T regulatorowych oraz limfocytów Th17. W tych samych punktach czasowych wykonano oznaczenie stężeń interleukiny 6.

3.3 Klasyfikacja choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi.

Chorobę przeszczep przeciwko gospodarzowi rozpoznawano głównie na podstawie manifestacji klinicznej (**Tabela 2**), w części przypadków uzyskano również potwierdzenie histopatologiczne choroby. Ocenę stopnia zaawansowania aGvHD dokonano zgodnie ze zmodyfikowanymi kryteriami Glucksberga^{48,49} (**Tabela 3 i 4**).

Tabela 2: Kliniczne manifestacje aGvHD.

SKÓRA	Plamisto-grudkowa wysypka na podłożu rumieniowym, często z zajęciem podeszew i dłoni. W ciężkich przypadkach mogą pojawiać się pęcherze oraz złuszczenie naskórka. Może występować świąd oraz ból.
WĄTROBA	Hiperbilirubinemia, cechy cholestazy.
PRZEWÓD POKARMOWY	Jadłowstręt, nudności i wymioty. Biegunka typowo wodnista, ciemnozielona. W ciężkich przypadkach z domieszką świeżej krwi lub z fragmentami błony śluzowej. Często z towarzyszącym bólem jamy brzusznej. Możliwe występowanie niedrożności.

Tabela 3: Stopnie nasilenia objawów aGvHD

STOPIEŃ	SKÓRA	WĄTROBA	JELITO
+	Rumień <25% powierzchni ciała	Bilirubina 2-3mg/dl	Biegunka 500-1000ml na dobę
++	Rumień 25-50% powierzchni ciała	Bilirubina 3-6mg/dl	Biegunka 1000-1500ml na dobę
+++	Uogólniona erytrodermia	Bilirubina 6-15mg/dl	Biegunka >1500ml na dobę
++++	Złuszczenie lub pęcherze	Bilirubina >15mg/dl	Silny ból z/lub bez niedrożności

Tabela 4: Stopnie zaawansowania aGvHD.

STOPIEŃ	Stopień zajęcia narządów
I	Skóra + do ++
II	Skóra + do +++ Przewód pokarmowy + i/lub wątroba + Niewielkie upośledzenie funkcji
III	Skóra ++ do +++ Przewód pokarmowy i/lub wątroba ++ do +++ Znaczne upośledzenie funkcji
IV	Skóra ++ do ++++ Przewód pokarmowy i/lub wątroba ++ do ++++ Bardzo duże upośledzenie funkcji

3.4 Kolonizacja przewodu pokarmowego i powikłania infekcyjne.

U każdego pacjenta w momencie przyjęcia do szpitala pobierano rutynowo wymaz z odbytu bądź próbkę kału celem określenia kolonizacji przewodu pokarmowego patogenami wieloopornymi tj.: VRE (*Vancomycin-resistant enterococci*), extended spectrum beta-lactamases (ESBL) *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* lub innymi. Kolejne wymazy pobierano w odstępach tygodniowych w trakcie hospitalizacji. Dokumentowano występowanie ciężkich powikłań infekcyjnych definiowanych jako: posocznica, zapalenie jelit, ciężka pneumonia, zakażenia centralnego układu nerwowego. Badania mikrobiologiczne wykonywano w Laboratorium Mikrobiologii Klinicznej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku.

Dodatkowo u wszystkich chorych po allo-HCT po uzyskaniu wszczepienia wykonywano oznaczenie CMV-DNA 2 razy w tygodniu.

3.5 Analiza cytometryczna limfocytów krwi.

Ocenę subpopulacji limfocytów krwi obwodowej wykonywano w Laboratorium Hematologii Uniwersyteckiego Centrum Medycyny Laboratoryjnej w Gdańsku przy użyciu cytometru BD FACS CANTO II. Znakowanie antygenów powierzchniowych na limfocytach wykonywano po otrzymaniu zawiesiny leukocytów uzyskanej z krwi pełnej pobranej na EDTA.

Do 1 ml krwi żyłnej dodawano 3 ml roztworu lizującego erytrocyty. Po 10 minutowej inkubacji w ciemni próbkę odwirowywano przez 5 minut z prędkością 2500 obrotów na minutę. Po zlaniu supernatantu do osadu komórek dodawano 2 ml roztworu płuczającego (CellWASH®, BD). Zawiesinę wirowano przez 5 minut. Po usunięciu supernatantu, osad z komórek zawieszano w roztworze CellWASH® o objętości odpowiedniej do uzyskania zawiesiny o gęstości 1000 komórek w mikrolitrze. Gęstość otrzymanej zawiesiny weryfikowano przy użyciu analizatora Micros (ABX ES60, Horiba).

W osobnych 3 probówkach zawiesinę o objętości 250 µl inkubowano z przeciwciałami znakowanymi fluorochromem przez 20 minut w ciemności w temperaturze pokojowej. Objętości dodanych przeciwciał były zgodne z rekomendacjami EuroFlow (probówka 1) oraz według zaleceń producenta (probówka 2 i 3). Po inkubacji, do probówek dodawano po 2 ml roztworu CellWASH®, wirowano przez 5 minut z prędkością 2500 obrotów na minutę, zlewano supernatant, a otrzymany osad zawieszano w 500 µl roztworu FASCFLOW®, każdorazowo wgrzywano 200 000 komórek i poddawano je analizie cytometrycznej.

W próbówce nr 1 użyto zestawu przeciwciał służącego do skringu subpopulacji limfocytów, zgodnie z zaleceniami EuroFlow (tzw. probówka LST, lymphocyte subpopulation tube): anty-CD45, anty-CD3, anty-CD4, anty-CD8, anty-CD56, anty-CD5, anty- $\gamma\delta$ -TCR, anty-CD19, anty-CD20, anty-kappa, anty-lambda, anty-CD38. Wszystkie w/w antygeny wykrywano na powierzchni badanych limfocytów. W próbówce nr 2 identyfikowano limfocyty Th17 z wykorzystaniem przeciwciał anty-CD3, anty-CD4, anty-CD8, anty-CD161 i anty-CD196.²⁷

W próbówce nr 3 dodawano przeciwciała celem identyfikacji limfocytów T regulatorowych, tj.: anty-CD45, anty-CD3, anty-CD4, anty-CD8 i anty-CD25.

W pilotażowych pomiarach identyfikowano T-reg z wykorzystaniem dodatkowo cFOX-P3 a limfocyty Th17 z wykorzystaniem ROR γ t i cIL17. W dalszym etapie badań, zrezygnowano jednak z przeprowadzania procedury wykorzystującej znakowanie antygenów wewnątrz-cytoplazmatycznych z powodu ograniczeń metodologicznych, związanych z niskim odzyskiem badanych komórek uzyskiwanym po zakończonej procedurze znakowania. W badanych próbkach obecna była przeważnie głęboka limfopenia, będąca wynikiem zastosowanego leczenia. Charakterystykę przeciwciał użytych do analizy przedstawiają **tabele 5,6 i 7**.

Aby pośrednio ocenić ilość antygenów CD161 i CD196 na powierzchni limfocytów oraz stopień ich ekspresji, analizowano ich średnią intensywność fluorescencji (mean fluorescence intensity; MFI). Stopień MFI przedstawiano jako wartość liczbową

uzyskaną na podstawie analizy histogramów w programie Kaluza. Uzyskane wyniki w formie plików typu fcs analizowano i opracowywano w programie Kaluza wersja 2.1 (Beckman Coulter).

Tabela 5: Charakterystyka przeciwciał wykorzystanych do oznaczenia głównych subpopulacji limfocytów - próbówka nr 1.

Przeciwciało przeciwno	Fluorochrom	Klon	Dodana objętość
CD45	PO	HI30	5 µl
sCD3	APC	SK7	2,5 µl
CD4	PB	RPA-T4	0,5 µl
CD8	FITC	UCH-T4	5 µl
CD56	PE	C5.9	5 µl
CD5	PerCP-Cy5.5	L17F12	15 µl
TCR γδ	PE Cy7	11F2	1 µl
CD38	APC H7	HB7	3 µl
CD19	PE-Cy7	J3-119	5 µl
CD20	PB	2H7	1 µl
slg κ / slg λ	FITC/PE	Poliklonalne	5 µl

Tabela 6: Charakterystyka przeciwciał wykorzystanych do oznaczenia limfocytów Th17- próbówka nr 2.

Przeciwciało przeciwno	Fluorochrom	Klon	Dodana objętość
Tritest CD3/4/8	PerCP/FITC/PE	SK7/SK3/SK1	20 µl
CD161	APC	DX12	20 µl
CD196	PE-Cy7	11A9	5 µl

Tabela 7: Charakterystyka przeciwciał wykorzystanych do oznaczenia limfocytów T regulatorowych – próbówka nr 3.

Przeciwciało przeciwno	Fluorochrom	Klon	Dodana objętość
CD45	PO	HI30	4 µl
CD3	PerCP-Cy5.5	SK7	20 µl
CD4	PB	RPA-T4	0,5 µl
CD8	FITC	UCH-T4	5 µl
CD25	PE	ZA3	20 µl

3.6 Oznaczenie stężenia IL-6.

Interleukinę 6 oznaczano za pomocą testu chemiluminescencyjnego Immulite XP firmy SIMENS w Centralnym Laboratorium Klinicznym Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku w ramach rutynowo wykonywanych badań. Test wykorzystywany do oznaczenia IL-6 jest testem fazy stałej, chemiluminescencyjnym, dwupunktowym immunometrycznym. Fazę stałą stanowią kulki opłaszczane mysim przeciwciałem monoklonalnym. Fazę ciekłą składa się z fosfatazy alkalicznej sprzężonej z mysim przeciwciałem monoklonalnym zawieszonym w buforze. Próbka badana i odczynnik inkubowane są z kulkami (fazą stałą). W trakcie inkubacji antygen z próbki tworzy kompleks z przeciwciałami fazy stałej i ciekłej. Następnie niezwiązane elementy próbki i odczynnika są usuwane poprzez płukanie połączone z wirowaniem. Ostatnim etapem jest dodanie substratu chemiluminescencyjnego do fazy stałej, a generowany sygnał jest proporcjonalny do ilości związanego enzymu.

3.7 Wartości referencyjne subpopulacji limfocytów.

Wartości referencyjne dla subpopulacji limfocytów zostały określone na podstawie norm przyjętych w Laboratorium Immunologii i Transplantologii Klinicznej UCK w Gdańsku (**Tabela 8**).

Tabela 8: Wartości referencyjne subpopulacji limfocytów w populacji zdrowej ocenianych metodą cytometrii przepływowej.

	Wartości bezwzględne $\times 10^9/l$	% limfocytów
Limfocyty	1,3-1,9	
Limfocyty T	1-1,5	71-79%
Limfocyty CD4+	0,6-0,98	43-54%
Limfocyty CD8+	0,42-0,66	28-37%
Komórki NK	0,13-0,25	8-15%
T-reg naturalne	0,014-0,088	2,4-8,7% (komórek CD4+)

3.8 Analiza statystyczna.

Dane ilościowe zostały przedstawione jako mediana z podanym zakresem wartości minimalnych i maksymalnych. Każdą zmienną o charakterze ilościowym oceniano najpierw pod względem zgodności z rozkładem normalnym (test Shapiro-Wilka, histogramy). Zmienne ilościowe o rozkładzie zgodnym z normalnym analizowano z wykorzystaniem metod parametrycznych: testu t-studenta oraz macierzy korelacji. W przypadku braku rozkładu normalnego stosowano metody nieparametryczne: test U Manna-Whitneya oraz korelacje Spearmana oraz analizę ANOVA w modyfikacji Kruskala-Wallis. Zależności pomiędzy zmiennymi jakościowymi analizowano za pomocą testu chi-kwadrat. Analizę przeżycia wykonano z wykorzystaniem estymatora Kaplana-Meiera. Analizę wieloczynnikową przeprowadzono z wykorzystaniem modelu regresji logistycznej.

Za poziom istotności statystycznej przyjęto $p < 0.05$. Wszystkie obliczenia wykonano w programie Statistica wersja 13.3 (StatSoft).

4. WYNIKI

4.1 Rekonstrukcja subpopulacji limfocytów po HCT.

W pierwszej części pracy oceniano rekonstrukcję subpopulacji limfocytów T i komórek NK w ciągu pierwszych dwóch miesięcy po transplantacji, grupę badaną podzielono na dwie podgrupy z powodu znacznego wpływu zastosowanej ATG na tempo regeneracji wybranych populacji komórek.

U pacjentów otrzymujących globulinę antytymocytarną w porównaniu do chorych nie otrzymujących ATG obserwowano zmniejszenie liczby ALC, limfocytów T oraz CD4+ w dobach +14, +21 po HCT ($p < 0.05$), w 30 dobie nie obserwowano różnic pomiędzy grupami z wyjątkiem obniżonej liczby limfocytów CD4+ w grupie ATG ($p < 0.05$). Natomiast w dobie +60 w grupie ATG obserwowano wyższe wartości bezwzględne ALC, całkowitej liczby limfocytów T i limfocytów CD8+ ($p < 0.05$), z jednoczesnym procentowym obniżeniem liczby limfocytów CD4+, przez co liczba bezwzględna limfocytów CD4 była podobna w obu grupach (mediana 0,18 vs. 0,24 $\times 10^9/l$, $p = NS$). U 7% badanych osiągnięto normalizację liczby limfocytów T w dobie 30, a u 60% w dobie 60 (73% w grupie ATG i 33% bez ATG, $p < 0.05$). Regeneracja limfocytów T CD4+ była opóźniona: żaden z pacjentów badanych nie osiągnął wartości powyżej dolnej granicy normy w dobie 30 i 60, zarówno w grupie ATG jak i bez ATG. Jedynie 17% chorych (10% w grupie ATG, 44% bez ATG, $p < 0.05$) osiągnęło wartości limfocytów CD4+ powyżej 200kom/uł w dobie 30, w dobie 60 odsetek ten wynosił 54% (47% w grupie ATG, 66% bez ATG, $p = NS$).

Grupa otrzymująca ATG prezentowała niższe wartości limfocytów Th17 przez cały okres badany ($p < 0.05$).

Nie obserwowano istotnego statystycznie wpływu ATG na subpopulacje limfocytów T CD8+ oraz komórek NK (**Tabela 9**). Limfocyty CD8+ osiągnęły wartości powyżej dolnej granicy normy w dobie 30 u 17% pacjentów (15% otrzymujących ATG, 22% bez ATG, $p = NS$), natomiast w dobie 60 już u 71% (84% w grupie ATG i 44% bez ATG; $p < 0.05$). Wartości prawidłowe komórek NK osiągnęło w 30 dobie u 79% chorych (70% z ATG, 100% bez ATG, $p = NS$), w 60 dobie obserwowano zmniejszenie się tej populacji i wartości powyżej dolnej granicy normy stwierdzono jedynie u 52% badanych (50% otrzymujących ATG i 55% bez ATG, $p = NS$).

Nie wykazano jednoznacznego wpływu ATG na limfocyty T-regulatorowe. Istotne zmniejszenie tej populacji wykazano jedynie w 14 i 30 dobie po HCT, bez różnicy statystycznie istotnej w dobie 21 i 60. Wartości wybranych subpopulacji limfocytów (mediana z zakresem) w określonych punktach czasowych po transplantacji przedstawiono w **Tabeli 9**.

Tabela 9: Wartości bezwzględne wybranych subpopulacji limfocytów w określonych punktach czasowych po transplantacji.

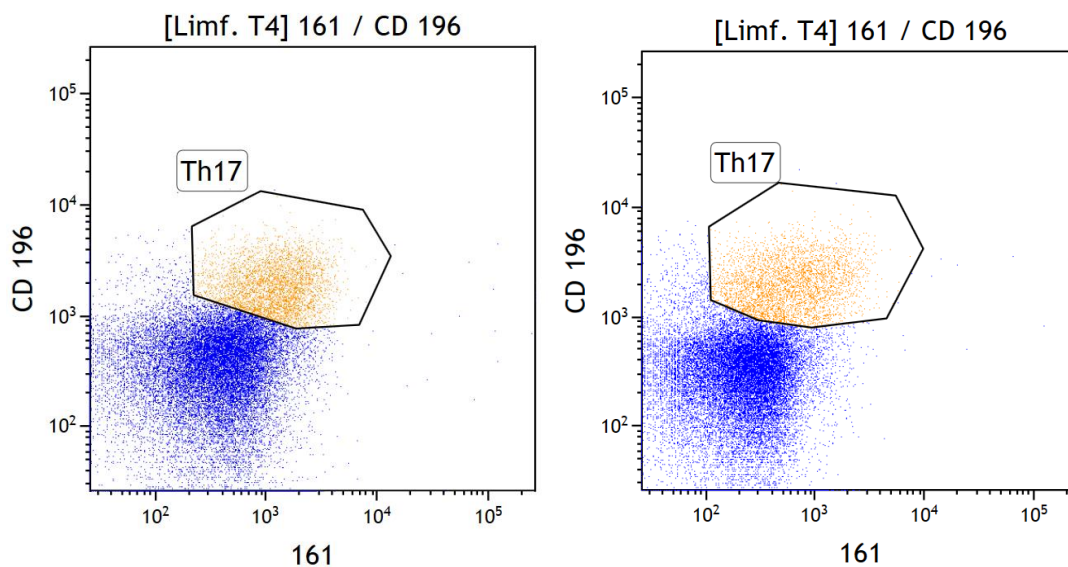
LIMFOCYTY	PRZED HCT ×10 ⁹ /l	+14 DOBA ×10 ⁹ /l	+21 DOBA ×10 ⁹ /l	+30 DOBA ×10 ⁹ /l	+60 DOBA ×10 ⁹ /l
ATG	1,08 (0,19-3,34)	0,07 (0,01-0,3)	0,19 (0,03-0,43)	0,57 (0,04-1,49)	1,63 (0,26-6,27)
Bez ATG	0,99 (0,02-1,39)	0,18 (0,06-0,38)	0,44 (0,09-0,98)	0,6 (0,38-2,57)	0,98 (0,335-1,91)
	p=NS	P<0.05	P<0.05	p=NS	P<0.05
LIMFOCYTY T	PRZED HCT ×10 ⁹ /l	+14 DOBA ×10 ⁹ /l	+21 DOBA ×10 ⁹ /l	+30 DOBA ×10 ⁹ /l	+60 DOBA ×10 ⁹ /l
ATG	0,94 (0,14-3,02)	0,04 (0,0003-0,29)	0,07 (0,01-0,22)	0,2 (0,01-1,35)	1,34 (0,028-5,72)
Bez ATG	0,39 (0,01-1,16)	0,14 (0,04-0,34)	0,21 (0,04-0,59)	0,34 (0,06-1,59)	0,68 (0,25-1,51)
	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P=NS	P<0.05
LIMFOCYTY T CD4+	PRZED HCT ×10 ⁹ /l	+14 DOBA ×10 ⁹ /l	+21 DOBA ×10 ⁹ /l	+30 DOBA ×10 ⁹ /l	+60 DOBA ×10 ⁹ /l
ATG	0,33 (0,07-1,8)	0,01 (0-0,16)	0,03 (0-0,28)	0,06 (0-0,36)	0,18 (0,03-0,53)
Bez ATG	0,16 (0,001-0,68)	0,09 (0,03-0,27)	0,12 (0,02-0,33)	0,17 (0,03-0,46)	0,24 (0,09-0,59)
	P=NS	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P=NS
LIMFOCYTY T CD8+	PRZED HCT ×10 ⁹ /l	+14 DOBA ×10 ⁹ /l	+21 DOBA ×10 ⁹ /l	+30 DOBA ×10 ⁹ /l	+60 DOBA ×10 ⁹ /l
ATG	0,31 (0,05-1,93)	0,01 (0-0,15)	0,02 (0-0,04)	0,095 (0,003-0,71)	1,09 (0,05-5,24)
Bez ATG	0,14 (0,01-0,44)	0,02 (0,01-0,06)	0,04 (0,003-0,09)	0,08 (0,01-0,82)	0,38 (0,04-0,8)
	P<0.05	P=NS	P=NS	P=NS	P<0.05

Komórki NK	PRZED HCT ×10 ⁹ /l	+14 DOBA ×10 ⁹ /l	+21 DOBA ×10 ⁹ /l	+30 DOBA ×10 ⁹ /l	+60 DOBA ×10 ⁹ /l
ATG	0,12 (0-0,19)	0,02 (0-0,3)	0,06 (0,01-0,24)	0,21 (0,01-0,76)	0,12 (0,03-0,45)
Bez ATG	0,09 (0,01-0,33)	0,03 (0,02-0,08)	0,12 (0-0,4)	0,34 (0,18-0,95)	0,13 (0,02-0,53)
	P=NS	P=NS	P=NS	P=NS	P=NS
Limfocyty T-reg	PRZED HCT ×10 ⁹ /l	+14 DOBA ×10 ⁹ /l	+21 DOBA ×10 ⁹ /l	+30 DOBA ×10 ⁹ /l	+60 DOBA ×10 ⁹ /l
ATG	0,034 (0,006-0,12)	0,001 (0-0,035)	0,005 (0-0,046)	0,0035 (0-0,018)	0,009 (0,001-0,07)
Bez ATG	0,015 (0,001-0,06)	0,005 (0,001-0,057)	0,005 (0,001-0,025)	0,009 (0,002-0,026)	0,019 (0,007-0,026)
	P=NS	P<0.05	P=NS	P<0.05	P=NS
Limfocyty Th17	PRZED HCT ×10 ⁹ /l	+14 DOBA ×10 ⁹ /l	+21 DOBA ×10 ⁹ /l	+30 DOBA ×10 ⁹ /l	+60 DOBA ×10 ⁹ /l
ATG	0,058 (0,004-0,33)	0,001 (0-0,021)	0,004 (0,0001-0,026)	0,007 (0-0,08)	0,018 (0,002-0,045)
Bez ATG	0,025 (0,0005-0,11)	0,014 (0,002-0,042)	0,026 (0,005-0,053)	0,026 (0,007-0,09)	0,052 (0,015-0,076)
	P=NS	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05

Nie wykazano wpływu kondycjonowania (TBI vs. chemioterapia), czy wieku biorcy (poniżej i powyżej 50 roku życia) na szybkość regeneracji subpopulacji limfocytów T (p=NS).

4.2 Limfocyty Th17 we krwi obwodowej

Aby ustalić wartości referencyjne limfocytów Th17 wykonano oznaczenia tej populacji komórek u 10 zdrowych ochotników. Badanie przeprowadzono u 4 mężczyzn oraz 6 kobiet. Uzyskano wyniki zbliżone z danymi dostępnymi w aktualnym piśmiennictwie.^{78,79} Przykładowe cytogramy przedstawiające limfocyty Th17 wśród komórek CD4+ u zdrowych ochotników przedstawiono na **Rycinie 5**.



Rycina 5: Cytogramy przedstawiające limfocyty Th17 pośród komórek CD4+ u zdrowych ochotników.

W **Tabeli 10** przedstawiono wartości procentowe oraz liczbowe w postaci mediany z zakresem oraz 95% przedziałem ufności obejmujące limfocyty Th17 oraz limfocyty CD4+ przed rozpoczęciem kondycjonowania. Dodatkowo porównano uzyskane wyniki z populacją limfocytów Th17 zbadaną u zdrowych ochotników.

Tabela 10: Wartości liczbowe i procentowe limfocytów Th17 oraz limfocytów CD4+ u zdrowych ochotników oraz w grupie badanej przed rozpoczęciem procedury transplantacji.

ZDROWI OCHOTNICY		
Th17 x10⁹/l	Th17 % WBC	Th17 % komórek CD4+
0,054 (0,015-0,17)	1,03 (0,38-2,44)	9,29 (4,63-18,9)
95%CI (0,042-0,11)	95%CI (0,68-1,74)	95% CI (6,95-13,81)
GRUPA BADANA PRZED TRANSPLANTACJĄ KOMÓREK KRWIOTWÓRCZYCH		
Th17 x10⁹/l	Th17 % WBC	Th17 % komórek CD4+
0,04 (0,0005-0,33)	1,18 (0,017-9)	17,9(4,2-45,5)
P=NS	P=NS	P<0.05
ZDROWI OCHOTNICY		
Limfocyty CD4+ x10⁹/l	Limfocyty CD4+ % WBC	
0,72 (0,3-1,88)	10,95 (4,99-25,8)	
GRUPA BADANA PRZED TRANSPLANTACJĄ KOMÓREK KRWIOTWÓRCZYCH		
Limfocyty CD4+ x10⁹/l	Limfocyty CD4+ % WBC	
0,25 (0,0016-1,8)	8 (0,1-39)	
p<0.05	P<0.05	

W porównaniu obejmującym grupę chorych przed rozpoczęciem procedury allo-HCT z populacją zdrowych ochotników, nie odnotowano różnic istotnych statystycznie w zakresie wartości bezwzględnych limfocytów Th17 oraz odsetka limfocytów Th17 pośród WBC. Natomiast zaobserwowano statystycznie istotnie niższe wartości bezwzględne limfocytów CD4+ oraz odsetki CD4+ pośród WBC (p<0.05) w grupie chorych przed transplantacją w porównaniu do zdrowych ochotników.

Dodatkowo oceniano wśród chorych, czy status remisji wpływa na liczbę limfocytów Th17. Wykazano, że chorzy z aktywną chorobą przed transplantacją mieli wyższe wartości bezwzględne i procentowe komórek Th17 w stosunku do chorych pozostających w remisji (**Tabela 11**) Mediana odsetka w odniesieniu do WBC wynosiła 0,94% vs 2,6% odpowiednio w grupach: remisja przed HCT i brak remisji ($p < 0.05$)

Tabela 11: Porównanie wartości bezwzględnych oraz procentowych limfocytów Th17 pomiędzy pacjentami z remisją oraz brakiem remisji choroby zasadniczej.

Przed allo-HCT	Th17 x10 ⁹ /l	Th17 % WBC
Remisja	0,033 (0,0005-0,33)	0,94 (0,017-9)
Choroba aktywna	0,085 (0,025-0,17)	2,6 (0,24-4)
	$p < 0.05$	$p < 0.05$

Tempo regeneracji subpopulacji limfocytów Th17 przedstawiono łącznie z innymi subpopulacjami w **Tabeli 9**. W trakcie badania obserwowano silną korelację pomiędzy liczbą limfocytów Th17 a całkowitą liczbą komórek CD4+. Zależność ta ulegała osłabieniu w kolejnych punktach czasowych w grupie otrzymującej ATG – przy większej liczbie komórek CD4+ nie obserwowano proporcjonalnego wzrostu liczby limfocytów Th17. Wyniki te zostały przedstawione w **Tabeli 12**. Wyższy współczynnik korelacji z całą subpopulacją limfocytów CD4+ silniej zaznaczony był w grupie chorych nie otrzymujących ATG.

Tabela 12: Współczynnik korelacji R Spearmana - korelacja limfocytów CD4+ z Th17

Współczynnik R	PRZED	+14 DOBA	+21 DOBA	+30 DOBA	+60 DOBA
ATG	0,77	0,89	0,75	0,76	0,61
Bez ATG	0,68	0,66	0,73	0,87	0,82

4.3 Limfocyty Th17 w materiale przeszczepowym.

Ocenę liczby limfocytów Th17 przeprowadzono w materiale przeszczepowym u 22 pacjentów (73% badanych). Mediana liczby komórek Th17 wynosiła 1,12% komórek jądrzastych (zakres 0,4-3,5%). Mediana przetoczonych z materiałem przeszczepowym limfocytów Th17 wynosiła $7,45 \times 10^6$ (0,98-19,8) w przeliczeniu na kilogram masy ciała biorcy. Stosunek przetoczonej ilości komórek CD34 do Th17 wynosił 0,66 (0,32-5,98). Nie wykazano korelacji pomiędzy liczbą limfocytów Th17 w materiale przeszczepowym, a liczbą komórek Th17 stwierdzaną we krwi obwodowej w kolejnych punktach czasowych ($p=NS$). Nie wykazano korelacji pomiędzy liczbą podanych limfocytów Th17 a częstością występowania GvHD, jednak badania materiału przeszczepowego nie wykonano u wszystkich chorych z przyczyn technicznych.

4.4 Limfocyty T-reg i stosunek Th17/T-reg.

W grupie badanej mediana limfocytów T-regulatorowych przed rozpoczęciem kondycjonowania wynosiła 0,6% komórek jądrzastych (0,2-2,1%). W kolejnych punktach czasowych nie obserwowano powrotu liczby T-reg do wartości wyjściowych (**Tabela 9**). We wszystkich punktach kontrolnych obserwowano dodatni współczynnik korelacji pomiędzy liczbą komórek CD4+ a limfocytami T-reg w grupie pacjentów otrzymujących ATG ($p<0.05$), nie obserwowano takiej korelacji u chorych, którzy nie otrzymali ATG.

Celem oceny dysproporcji pomiędzy antagonistycznymi populacjami komórek badano iloraz Th17/T-reg. Za wynik istotny, zgodnie z danymi literaturowymi przyjęto iloraz poniżej 1. Iloraz <1 był znamienne niższy w pomiarach w grupie z ATG w porównaniu do grupy bez ATG, jednak nie wykazano korelacji stosunku Th17/T-reg z rozwojem aGvHD <60 doby. Wartości ilorazu w obydwu grupach przedstawiono w **Tabeli 13**.

Tabela 13: Porównanie wartości ilorazu Th17/T-reg w grupie badanej.

Th17/T-reg	PRZED	+14 DOBA	+21 DOBA	+30 DOBA	+60 DOBA
ATG	1,6 (0,47-8)	0,69 (0-7,8)	1 (0-3,45)	1,42 (0-6)	1,7 (0,34-8)
Bez ATG	1,56 (0,17-31,6)	3,16 (0,36-11,9)	3,34 (1-41,5)	2,25 (1-5,3)	3,3 (1,16-11,6)
	p=NS	P<0.05	P<0.05	p=NS	P<0.05

4.5 Korelacja regeneracji limfocytów Th17 z IL-6.

W grupie badanej przed rozpoczęciem kondycjonowania jedynie u 4 chorych obserwowano podwyższone wartości stężenia IL-6 (2 pacjentów miało aktywną infekcję). W trakcie leczenia wartości powyżej górnej granicy normy (5,9 pg/ml) obserwowano u 24, 16, 12, 7 pacjentów, odpowiednio w +14, +21, +30 i +60 dobie po HCT. Nie obserwowano korelacji pomiędzy liczbą limfocytów Th17 a stężeniem IL-6 w surowicy (p=NS), podobnej korelacji nie zanotowano również dla innych populacji limfocytów. Nie odnotowano różnic pomiędzy grupą otrzymującą ATG i nieleczoną ATG (p=NS). Stężenia IL-6 w kolejnych punktach czasowych przedstawiono w **Tabeli 14**.

Tabela 14: Stężenia IL-6 w grupie badanej w określonych punktach czasowych – mediana z zakresem.

Grupa HCT	PRZED	+14 DOBA	+21 DOBA	+30 DOBA	+60 DOBA
IL6 pg/ml	2,22 (2-68,7)	29 (2-772)	5,68 (2-287)	3,9 (2-31)	2,17 (2-30,3)

4.6 Choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi.

W trakcie obserwacji, u 13 osób (43%) doszło do rozwoju ostrej choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi. Dziewięć (69%) przypadków rozpoznano przed 60 dobą, u 4 chorych (31%) objawy aGvHD pojawiły się między dobą 60 a 100. Jeden pacjent rozwinął postać jelitową GvHD po odstawieniu immunosupresji w dobie 150 po transplantacji, traktowaną jako manifestację nakładania cech aGvHD i cGvHD. Izolowaną postać skórną stwierdzono u 6 pacjentów. Ostłą GvHD w stopniu I rozpoznano u 6 osób (46%), w stopniu II u 4 (31%), w stopniu III u 2 (14%) i w stopniu IV u 1 (8%).

Nie wykazano korelacji pomiędzy zastosowaniem ATG a częstością występowania aGvHD ($p=NS$). Nie stwierdzono zależności pomiędzy liczbą podanych komórek CD34/kg ($p=NS$), ani liczbą limfocytów Th17 w materiale przeszczepowym a rozwojem aGvHD ($p=NS$). Stwierdzono częstsze rozwijanie się aGvHD u chorych otrzymujących materiał przeszczepowy od dawców niespokrewnionych ($p<0.05$). Ostą GvHD <60 doby występowała częściej u chorych skolonizowanych patogenami wieloopornymi ($p<0.05$).

Oceniając regenerację limfocytów u pacjentów, u których dochodziło do rozwoju aGvHD, chorzy ci mieli niższe wartości ALC, limfocytów T, CD4+, T-reg i Th17 w 14 dobie po HCT ($p<0.05$). W kolejnych punktach czasowych nie odnotowano różnic pomiędzy grupami bez i z aGvHD ($p=NS$) z wyjątkiem niższych wartości bezwzględnych limfocytów Th17 w dobie 21 ($p<0.05$). Dane uwzględniające badane subpopulacje przedstawiono w **Tabeli 15**.

W analizie wieloczynnikowej nie potwierdzono wpływu ALC, Liczby limfocytów T, CD4+, T-reg i Th-17 w 14 dobie, typu dawcy oraz kolonizacji na częstość występowania aGvHD. W modelu regresji logistycznej, z wykorzystaniem metody krokowej wstecznej jedynym czynnikiem korelującym z rozwojem aGvHD przed 60 dobą było występowanie obniżonej liczby limfocytów Th17 poniżej mediany w momencie wszczepienia (doba +21) – $p<0.05$; OR 13; 95% CI 1,35-124.

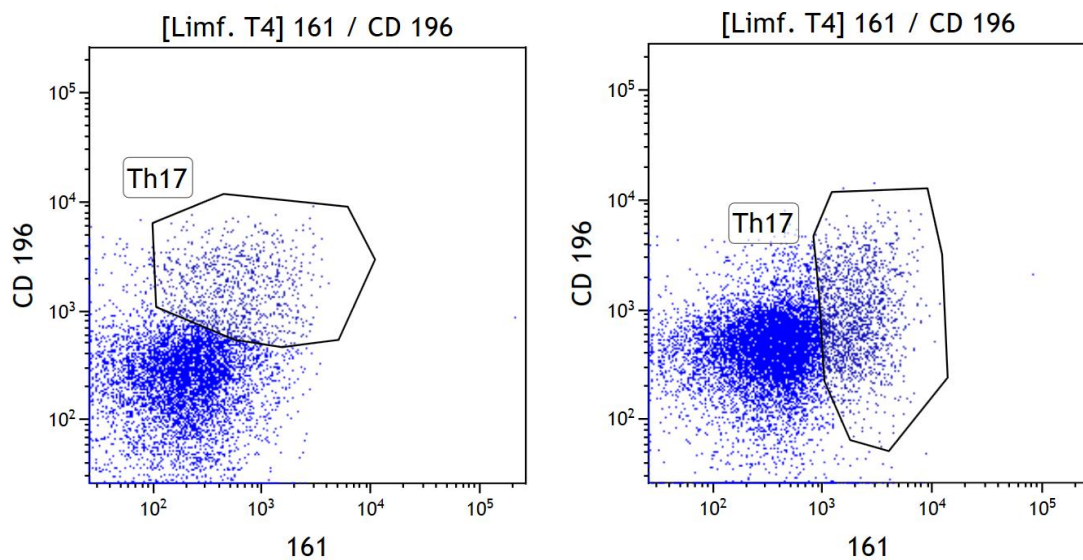
Tabela 15: Subpopulacje limfocytów u osób z aGvHD i bez aGvHD - mediana z zakresem.

LIMFOCYTY	PRZED HCT ×10 ⁹ /l	+14 DOBA ×10 ⁹ /l	+21 DOBA ×10 ⁹ /l	+30 DOBA ×10 ⁹ /l	+60 DOBA ×10 ⁹ /l
aGvHD	1,57 (0,4-3,34)	0,06 (0,01-0,15)	0,17 (0,03-0,98)	0,58 (0,16-1,49)	1,46 (0,26-6,27)
Bez aGvHD	0,99 (0,02-2,67)	0,18 (0,01-0,38)	0,27 (0,03-0,76)	0,0 (0,04-2,57)	1,39 (0,35-3,07)
	p=NS	P<0.05	p=NS	p=NS	p=NS
LIMFOCYTY T	PRZED HCT ×10 ⁹ /l	+14 DOBA ×10 ⁹ /l	+21 DOBA ×10 ⁹ /l	+30 DOBA ×10 ⁹ /l	+60 DOBA ×10 ⁹ /l
aGvHD	1,24 (0,26-3,02)	0,04 (0,0003-0,1)	0,07 (0,01-0,59)	0,25 (0,04-1,35)	1,01 (0,08-5,72)
Bez aGvHD	0,64 (0,01-2,28)	0,11 (0,003-0,34)	0,15 (0,01-0,44)	0,22 (0,01-1,59)	1,09 (0,02-2,41)
	p=NS	P<0.05	p=NS	P=NS	p=NS
LIMFOCYTY T CD4+	PRZED HCT ×10 ⁹ /l	+14 DOBA ×10 ⁹ /l	+21 DOBA ×10 ⁹ /l	+30 DOBA ×10 ⁹ /l	+60 DOBA ×10 ⁹ /l
aGvHD	0,28 (0,11-1,04)	0,01 (0-0,06)	0,03 (0-0,02-0,33)	0,07 (0,002-0,36)	0,15 (0,03-0,47)
Bez aGvHD	0,23 (0,001-1,8)	0,04 (0,0002-0,27)	0,05 (0-0,33)	0,08 (0-0,47)	0,24 (0,03-0,59)
	P=NS	P<0.05	p=NS	p=NS	p=NS
LIMFOCYTY T CD8+	PRZED HCT ×10 ⁹ /l	+14 DOBA ×10 ⁹ /l	+21 DOBA ×10 ⁹ /l	+30 DOBA ×10 ⁹ /l	+60 DOBA ×10 ⁹ /l
aGvHD	0,34 (0,1-1,93)	0,01 (0-0,05)	0,01 (0-0,09)	0,1 (0,01-0,71)	0,78 (0,05-5,24)
Bez aGvHD	0,19 (0,01-0,69)	0,04 (0,01-0,15)	0,04 (0,003-0,42)	0,08 (0,003-0,82)	0,63 (0,04-1,83)
	p=NS	P<0.05	P=NS	P=NS	P=NS
Komórki NK	PRZED HCT ×10 ⁹ /l	+14 DOBA ×10 ⁹ /l	+21 DOBA ×10 ⁹ /l	+30 DOBA ×10 ⁹ /l	+60 DOBA ×10 ⁹ /l
aGvHD	0,12 (0-0,19)	0,02 (0-0,3)	0,07 (0,01-0,4)	0,24 (0,01-0,76)	0,11 (0,02-0,45)
Bez aGvHD	0,11 (0,01-0,33)	0,03 (0-0,11)	0,09 (0-0,38)	0,29 (0,02-0,95)	0,13 (0,02-0,53)
	P=NS	P=NS	P=NS	P=NS	P=NS

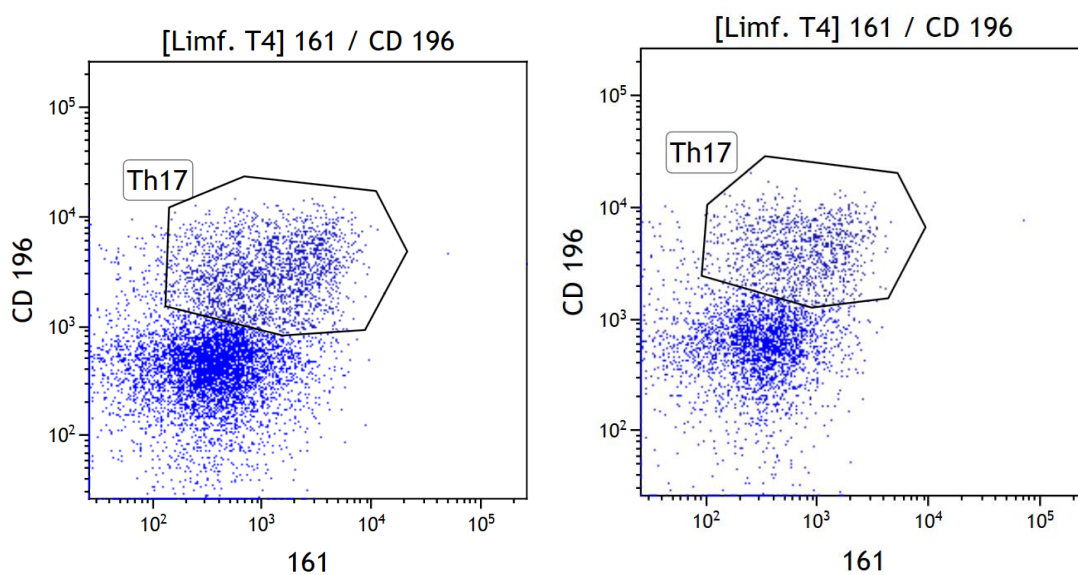
Limfocyty T-reg	PRZED HCT ×10 ⁹ /l	+14 DOBA ×10 ⁹ /l	+21 DOBA ×10 ⁹ /l	+30 DOBA ×10 ⁹ /l	+60 DOBA ×10 ⁹ /l
aGvHD	0,026 (0,01-0,06)	0,0005 (0-0,01)	0,005 (0-0,024)	0,0033 (0,001-0,018)	0,017 (0,003-0,07)
Bez aGvHD	0,013 (0,001-0,12)	0,003 (0-0,05)	0,006 (0,0002-0,046)	0,0065 (0-0,026)	0,01 (0,001-0,056)
	P=NS	P<0.05	P=NS	P P=NS	P=NS
Limfocyty Th17	PRZED HCT ×10 ⁹ /l	+14 DOBA ×10 ⁹ /l	+21 DOBA ×10 ⁹ /l	+30 DOBA ×10 ⁹ /l	+60 DOBA ×10 ⁹ /l
aGvHD	0,06 (0,016-0,33)	0,001 (0-0,008)	0,003 (0,0001-0,026)	0,015 (0-0,08)	0,016 (0,002-0,045)
Bez aGvHD	0,033 (0,0005-0,17)	0,013 (0-0,042)	0,011 (0,0001-0,053)	0,018 (0-0,09)	0,026 (0,005-0,076)
	P=NS	P<0.05	P<0.05	P=NS	P=NS

Podwyższone stężenie IL-6 w dobie 30 stwierdzano u chorych z rozpoznąą aGvHD we wczesnym okresie po transplantacji (przed 60 dobą): mediana 7,34 (zakres 2-31pg/ml) vs. 3,76 (zakres 2-23,4pg/ml) (p=0.01). Dodatkowo wyższe stężenie IL-6 wykazano u chorych z ciężkimi powikłaniami infekcyjnymi (p<0.05).

Przykładowe cytogramy przedstawiające limfocyty Th17 pośród komórek CD4+ u pacjentów z aGvHD i bez rozpoznanej choroby zamieszczono na **Rycinach 6 i 7**.



Rycina 6: Cytogramy przedstawiające limfocyty Th17 spośród limfocytów T CD4+ przed rozpoznaniem aGVHD (po lewej) i w momencie rozwoju choroby (po prawej).

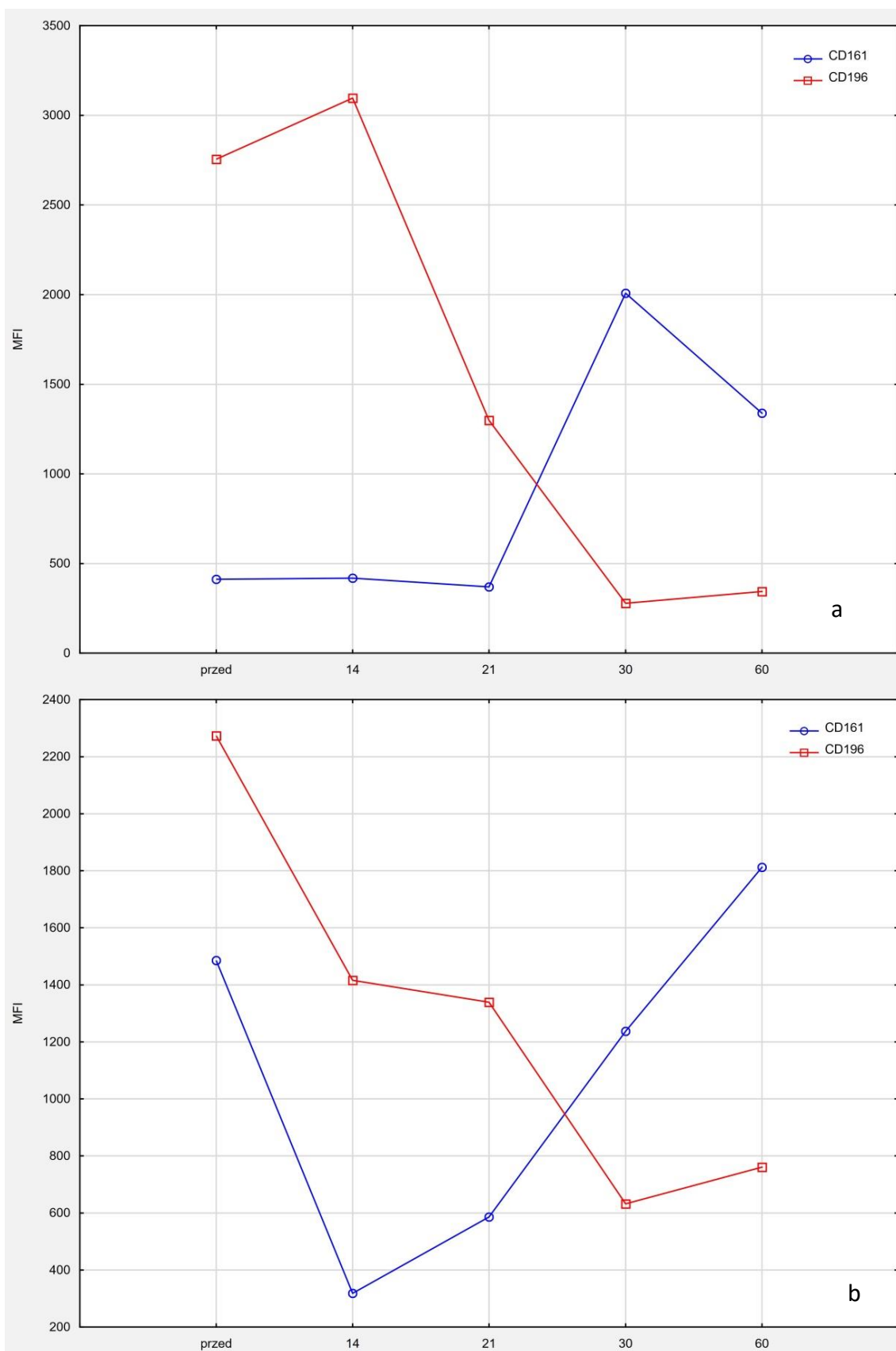


Rycina 7: Cytogramy przedstawiające limfocyty Th17 spośród limfocytów T CD4+ w 21 dobie (po lewej) i 30 dobie (po prawej), u pacjenta bez aGVHD.

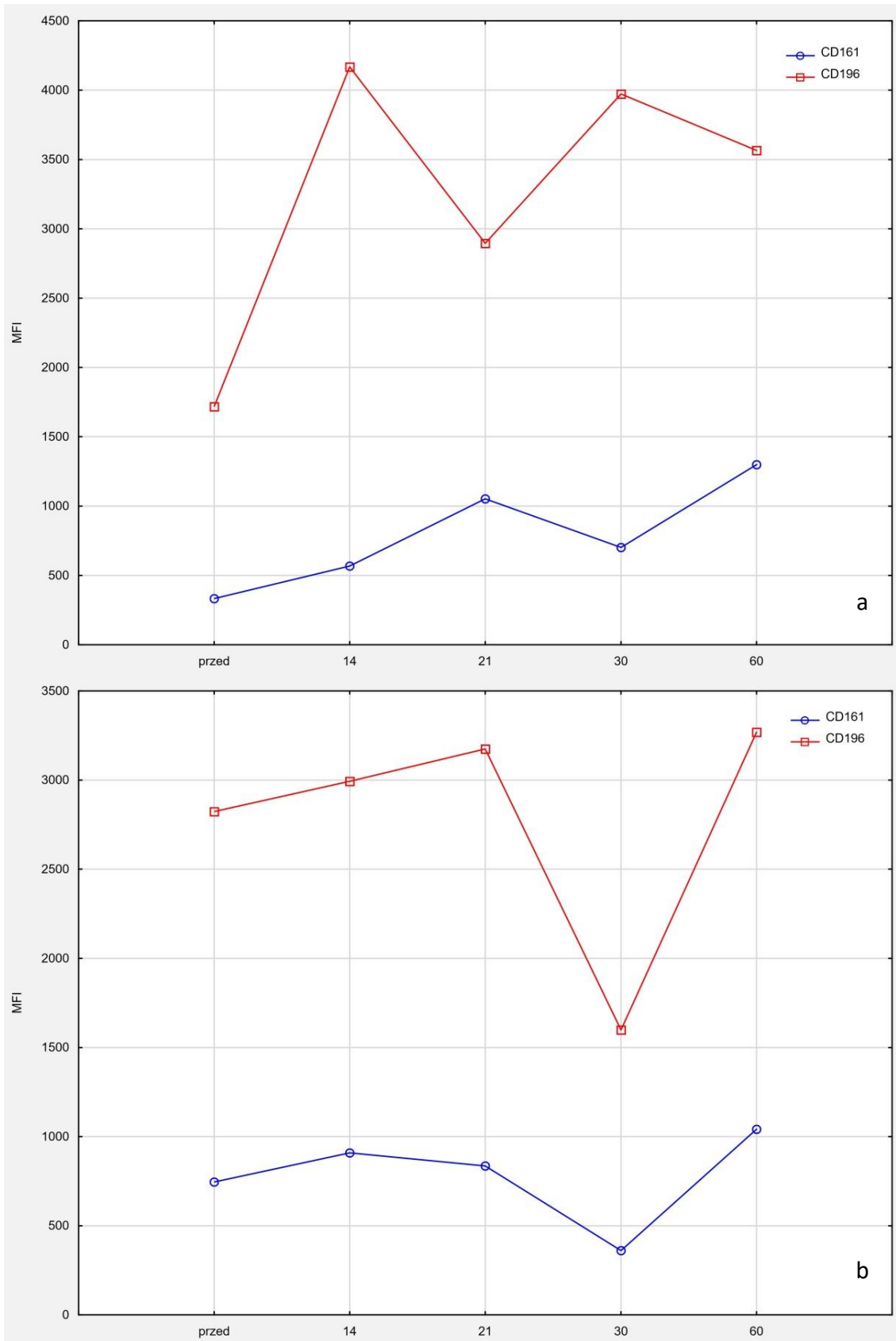
4.7 Średnia intensywność fluorescencji (Mean fluorescence intensity; MFI) limfocytów Th17.

Analizując histogramy w programie Kaluza, u 17 pacjentów (56%) zaobserwowano zmianę wartości MFI w kolejnych punktach czasowych dotyczącą antygenów CD161 i CD196. U 12 z nich doszło do rozwoju aGvHD. U niemal wszystkich tych pacjentów wykazano zmniejszenie MFI antygeny CD196, przy wzroście MFI antygeny CD161. Tylko 1 pacjent z rozpoznaniem aGvHD nie wykazywał zmian siły fluorescencji. Stwierdzono istotną zależność pomiędzy zmianą intensywności fluorescencji a korelacją z występowaniem aGvHD ($p < 0.001$). Nie obserwowano zmian MFI innych badanych antygenów (CD3 i CD4).

Przykładowy schemat zmiany fluorescencji u chorych z aGvHD i bez GvHD przedstawiono na wykresach poniżej (**Wykres 1 i 2**).



Wykres 1: MFI w określonych punktach czasowych u wybranych pacjentów rozwijających aGvHD a) pacjent nr 1, b) pacjent nr 2.



Wykres 2: MFI w określonych punktach czasowych u wybranych pacjentów, którzy nie rozwijali aGvHD a) pacjent nr 1, b) pacjent nr 2.

4.8 Infekcje po transplantacji.

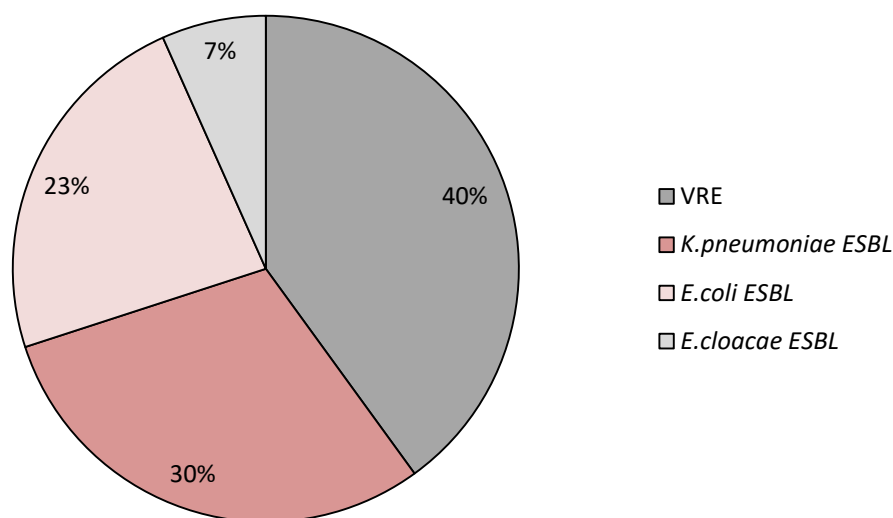
Regeneracja granulopoezy

W grupie badanej wszyscy poza 1 osobą osiągnęli regenerację hematopoezy. Mediana czasu do uzyskania liczby neutrocytów powyżej $0,5 \times 10^9/l$, płytek krwi $>50 \times 10^9/l$ oraz retikulocytów $>20 \times 10^9/l$ wynosiła odpowiednio 18,5 dnia (zakres 12-23), 15 dni (zakres 13-43) i 15 dni (zakres 13-34). Nie wykazano zależności pomiędzy przedłużoną agranulocytozą a częstością występowania ciężkich powikłań infekcyjnych ($p=0.06$) po allo-HCT.

Infekcje bakteryjne

W momencie przyjęcia na oddział transplantacyjny kolonizację bakteriami wieloopornymi (MDRB, multi-drug resistant bacteria) stwierdzono u 16 osób (53%). W trakcie pobytu wyhodowano szczepy MDRB u kolejnych 6. U 7 pacjentów obecna była kolonizacja wieloma patogenami MDR. Wśród patogenów kolonizujących najczęściej stwierdzano obecność wankomycynoopornych enterokoków - *VRE* (40%), *Klebsiella pneumoniae ESBL* (30%) i *Escherichia coli ESBL* (23%) – **Wykres 3**. U 7 osób pojawiły się infekcje o etiologii MDRB, z czego u 5 osób występowała bakteriami MDRB. Czynniki etiologicznymi bakteriami były: *K. pneumoniae ESBL* (40%), *E. coli ESBL* (40%), *Enterobacter cloacae ESBL* (20%). Mediana czasu od HCT do wystąpienia infekcji MDRB wynosiła 5 dni (3-30). Ciężkie infekcje rozpoznano u 11 pacjentów (36%) po allo-HCT.

Nie wykazano różnic w liczbie ani odsetku limfocytów Th17 pomiędzy chorymi skolonizowanymi przy przyjęciu a pacjentami z ujemnymi posiewami w kierunku MDRB. Nie wykazano zależności pomiędzy liczbą limfocytów Th17 a częstością występowania ciężkich powikłań infekcyjnych ($p=NS$). Nie obserwowano różnic w liczebności innych subpopulacji limfocytów u pacjentów z powikłaniami infekcyjnymi.



Wykres 3: Patogeny wielooporne stwierdzone w kolonizacji w grupie badanej.

Reaktywacja CMV.

Reaktywację wirusa cytomegalii stwierdzono u 14 chorych (46%), z czego u 6 pacjentów wirus wykrywalny był już przed 30 dobą po HCT. Wśród pacjentów z reaktywacją CMV niekorzystny układ biorca IgG(+) – dawca IgG(-) obserwowany był w 7 przypadkach. Osoby, u których doszło do reaktywacji CMV, miały istotnie niższe wartości limfocytów Th17 w dobie 21, 30, 60 po HCT ($p < 0.05$). Nie wykazano takiej zależności dla całkowitej liczby komórek CD4+, CD8+ i NK ($p = \text{NS}$). Do reaktywacji CMV częściej dochodziło u pacjentów, u których przeszczep pochodził od dawców niespokrewnionych ($p < 0.001$) oraz tych którzy otrzymywali ATG jako uzupełnienie kondycjonowania ($p = 0.01$). Częstszą reaktywację stwierdzano również w grupie z aGvHD ($p = 0.03$). Status serologiczny oraz częstość reaktywacji wirusa przedstawiono w **Tabeli 16**.

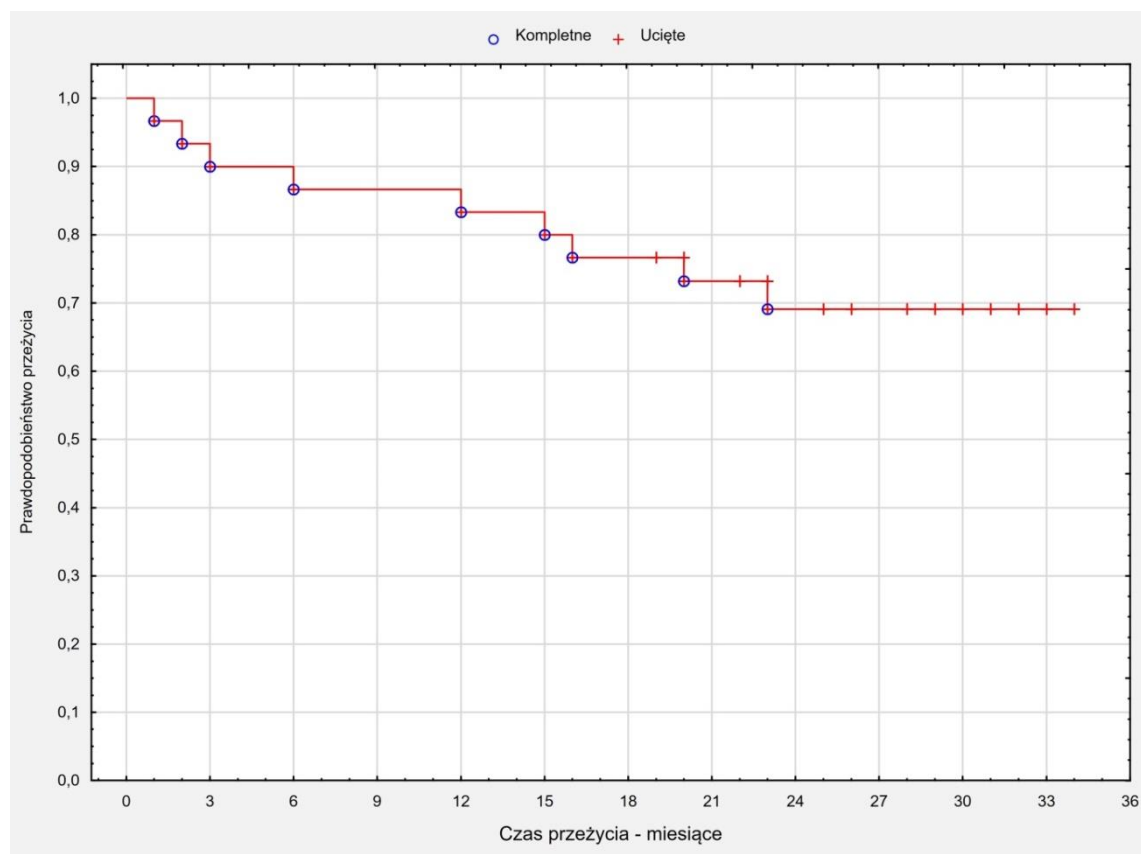
W modelu wieloczynnikowym, żaden z parametrów (ATG, dawca, aGvHD czy limfocyty Th17 w 21 dobie) nie wykazał istotności statystycznej. Przeprowadzając regresję logistyczną metodą krokową wsteczną jedynie wybór dawcy niespokrewnionego zwiększał ryzyko występowania reaktywacji wirusa CMV ($p < 0.05$, OR 38; 95% CI 3,8-399).

Tabela 16: Częstość reaktywacji CMV w zależności od statusu serologicznego dawca-biorca.

Status IgG biorca-dawca	Układ w grupie badanej (liczba pacjentów)	Liczba reaktywacji CMV w danej podgrupie
Biorca (+) Dawca (-)	9	7 (77%)
Biorca (+) Dawca (+)	12	4 (33%)
Biorca (-) Dawca (+)	6	3 (50%)
Biorca (-) Dawca (-)	3	0

4.9 Analiza przeżycia

W trakcie obserwacji o medianie 24 miesięcy (1-34 miesiące) zmarło 9 pacjentów z grupy badanej. Przyczyną zgonu były: wznowa (6 osób), powikłania infekcyjne (1 osoba) oraz GvHD z współistniejącą infekcją (2 osoby).



Wykres 4: Prawdopodobieństwo przeżycia w grupie badanej.

5. DYSKUSJA WYNIKÓW

5.1. Rekonstytucja immunologiczna po HCT.

W dostępnym piśmiennictwie nie ma zbyt wielu doniesień opisujących rekonstytucję układu odpornościowego po transplantacji z uwzględnieniem limfocytów Th17, wpływu stosowanych leków na głębokość zaburzeń w obrębie poszczególnych subpopulacji oraz współzależności komórek Th17 z innymi subpopulacjami limfocytów.

Uzyskane w pracy wyniki w dużej części są zgodne z wynikami dotychczas opublikowanymi literaturze.^{42,47,80} Po podaniu ATG pacjenci mieli niższe wartości bezwzględne wszystkich limfocytów, limfocytów T oraz limfocytów T CD4+ utrzymujące się do 30 doby po HCT, natomiast 2 miesiące po transplantacji nie stwierdzano niższych wartości bezwzględnych tych populacji komórek w grupie otrzymującej ATG. Najgłębsza deplecja populacji limfocytów dotyczyła wczesnego okresu po transplantacji, co wynika z najsilniejszego działania leku w okresie pierwszych tygodni po podaniu oraz braku rekonstytucji limfopoezy z hematopoezy dawcy w tym okresie. W pracy nie odnotowano niższych wartości bezwzględnych limfocytów T CD8+, choć według doniesień z piśmiennictwa regeneracja tej populacji może być opóźniona po podaniu ATG, szczególnie w zakresie naiwnych komórek CD8+.^{81,82} Wynikać to może z faktu, że nie wszystkie populacje limfocytów są jednakowo wrażliwe na ATG. Thymoglobulina niszczy nie tylko krążące komórki efektorowe, ale również te rezydujące w narządach limfatycznych.^{39,83} Ostateczny wpływ na daną subpopulację nie wynika jedynie z samej zdolności do aktywowania procesów prowadzących do zniszczenia komórek, lecz poprzez oddziaływanie na prezentację antygenów może modulować proces dojrzewania limfocytów. Mechanizm działania leku wydaje się być bardziej złożony i nie do końca poznany, a finalny efekt działania Thymoglobuliny na różne subpopulacje może wynikać z zahamowania różnicowania komórek naiwnych oraz modulowania aktywacji szeregu szlaków sygnałowych.^{39,84}

Interesująca wydaje się być obserwacja dotycząca limfocytów Th17. Zarówno we wczesnych dobach po HCT, jak również 2 miesiące po przeprowadzeniu procedury obserwowano znacznie niższe wartości tych komórek w grupie otrzymującej ATG, pomimo braku statystycznie istotnej różnicy w zakresie całkowitej liczby limfocytów T

CD4+ 2 miesiące po HCT. W grupie ATG nie obserwowano proporcjonalnego wzrostu subpopulacji Th17 w stosunku do komórek CD4+, pomimo dodatniego współczynnika korelacji, co może sugerować większą wrażliwość populacji komórek Th17 na stosowaną ATG. W spektrum antygenów rozpoznawanych przez ATG, nie ma antygenów powierzchniowych typowych dla limfocytów Th17 (CD161 i CD196)³⁹, więc eliminacja tych komórek po ekspozycji na ATG odbywa się mniej selektywnie poprzez rozpoznawanie antygeny CD4. Fakt opóźnionej regeneracji Th17 mógłby tłumaczyć wpływ ATG na proces dojrzewania limfocytów T CD4+, przechodzących selekcję pozytywną i negatywną w grasicy. Rozwój naturalnych limfocytów Th17 jest ściśle związany z czynnością tego narządu, a jego uszkodzenie poprzez kondycjonowanie może doprowadzić do zahamowania rozwoju tej populacji komórek.⁸⁵ Dzięki skutecznej eliminacji efektorowych komórek Th17 znajdujących się w krwioobiegu i narządach limfatycznych przez ATG oraz zahamowaniu dojrzewania populacji limfocytów naturalnych w grasicy, deficyt tej subpopulacji jest wyraźnie zaznaczony.

Aktualnie nie ma wielu doniesień dotyczących regeneracji limfocytów Th17 po HCT oraz wpływu ATG na tę subpopulację. Dostępne doniesienia potwierdzają wpływ globuliny antylimfocytarnej na opóźnioną rekonstytucję limfocytów Th17. W przytaczanym badaniu stosowano jednak inny preparat globuliny (Grafalon, Fresenius) działający na limfocyty T i mający węższe spektrum działania niż Thymoglobulina, jak również stosowano inną metodę identyfikowania tej populacji komórek, polegającą na detekcji IL17 w cytoplazmie.⁸⁶ Podobne wyniki uzyskali autorzy badający dzieci, gdzie po podaniu ATG utrzymywała się obniżona liczba limfocytów Th17 po 3 miesiącach od przeprowadzenia transplantacji.⁸⁷

Różna metodologia badań utrudnia przeprowadzanie analizy porównawczej. Choć ocena produkowanych cytokin jest najlepszą metodą służącą do zaszeregowania limfocytów do danej subpopulacji, może stwarzać problemy w interpretacji wyników u chorych w stanie głębokiej immunosupresji, z małą liczbą limfocytów, u których dodatkowo na skutek barwienia cytoplazmatycznego traci się znaczną część badanych komórek. W przypadku pacjentów HIV dodatnich przeprowadzona równoległa analiza oceniająca dwie metody oznaczania limfocytów Th17, wykazała większy odsetek wykrywanych komórek za pomocą oceny markerów powierzchniowych, w porównaniu

do znakowania cytoplazmatycznego.⁸⁸ Różne metody znakowania mogą nie pozwalać na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków dotyczących regeneracji tej populacji po transplantacji oraz wpływu na występowanie powikłań związanych z limfocytami Th17.

W przedstawianej pracy nie zanotowano korelacji pomiędzy liczbą przetoczonych limfocytów Th17 a dynamiką rekonstytucji tej populacji po transplantacji. Istotną informację, w jakim odsetku badane komórki pochodzą od komórek, które przetrwały kondycjonowanie, czy też mają źródło w przetoczonym materiale przeszczepowym przyniosłaby w przyszłości ocena chimeryzmu w subpopulacjach.

Inaczej prezentuje się wpływ ATG na limfocyty T-regulatorowe. Obniżone wartości T-reg stwierdzono jedynie w dobie 14 i 30 (mediana 0,0035 vs. $0,009 \times 10^9/l$). W pozostałych punktach czasowych nie wykazano różnic pomiędzy grupami, a dwa miesiące po HCT średnia wartość limfocytów T-reg w obu grupach wynosiła $0,016 \times 10^9/l$. Otrzymane wyniki mogą wynikać z błędu pomiaru z powodu niewielkiej liczebności grupy badanej, co wymagałoby weryfikacji danych w większej populacji chorych. Dodatkowo ATG może mieć odmienne działanie na tę populację komórek w zależności od zastosowanej dawki leku. Wykazano, że niskie dawki Thymoglobuliny mają ochronne działanie na T-reg i mogą sprzyjać ekspansji tej populacji komórek, jednocześnie powodując deplecję innych subpopulacji CD4+.⁸⁴

Zgodnie z wynikami innych badań,⁸⁰ najwolniej zachodziła regeneracja limfocytów T CD4+, co przekładało się na zaburzony stosunek CD4/CD8 utrzymujący się przez długi czas po HCT, potęgowany dodatkowo przez podaż ATG. Jedynie 54% badanych uzyskało wartości CD4⁺ powyżej 200 kom/ μ l po 2 miesiącach od HCT. Jest to wartość, poniżej której istnieje podwyższone ryzyko rozwoju powikłań infekcyjnych, głównie oportunistycznych, związanych ze stanem głębokiej immunosupresji.

Nie zaobserwowano wpływu typu dawcy (spokrewniony wobec niespokrewniony) na tempo regeneracji subpopulacji limfocytów. W grupie MUD występowały niższe wartości poszczególnych subpopulacji limfocytów, co najpewniej wynika z częstszego zastosowania Thymoglobuliny w tej grupie chorych. W badanym materiale nie wykazano wpływu wieku na szybkość regeneracji limfocytów T, jednakże w analizowanej grupie przeważali pacjenci młodzi, a osoby powyżej 60 roku życia stanowiły jedynie 10% badanych.^{89,41}

W badanej grupie stwierdzono najszybszą regenerację w zakresie populacji komórek NK, które u ponad połowy chorych osiągnęły wartości powyżej dolnej granicy normy już w ciągu 2 miesięcy po allo-HCT. Obserwacja ta zgodna jest z wynikami opisywanymi w piśmiennictwie, według których komórki NK są dominującą populacją limfocytów w pierwszych miesiącach po HCT.⁸⁰ Jest to związane z regeneracją komórek NK z progenitorów szpikowych, które nie wymagają różnicowania zależnego od grasicy i innych narządów limfatycznych. Komórki NK są składową głównie odporności wrodzonej, biorą udział w odpowiedzi skierowanej przeciwko wirusom, jak również są elementem odpowiedzi przeciwnowotworowej. W przedstawianej pracy, zgodnie z danymi literaturowymi, nie wykazano wpływu ATG na rekonstytucję komórek NK. W badanej grupie, w przeciwieństwie do doniesień dostępnych w literaturze, nie zaobserwowano wpływu tempa regeneracji komórek NK na częstość występowania reaktywacji wirusa CMV, czy wznowy choroby.^{90,91-93}

5.2 Limfocyty Th17 a status choroby zasadniczej przed transplantacją.

Limfocyty Th17 odgrywają niejasną rolę w odpowiedzi przeciwnowotworowej w guzach litych, jeszcze mniej wiadomo o ich roli w chorobach układu krwiotwórczego, a dostępne dane często są sprzeczne. Aktualnie nie ma ostatecznie ustalonych wartości referencyjnych dla liczby limfocytów Th17 we krwi obwodowej. W badanej grupie przed rozpoczęciem kondycjonowania mediana liczby limfocytów Th17 wynosiła 1,18% leukocytów oraz stanowiły one 18% limfocytów T CD4+. Co ciekawe u pacjentów z aktywną chorobą nowotworową przed wykonaniem HCT stwierdzano wyższy odsetek komórek Th17 (mediana 2,6%), niż u chorych będących w remisji choroby. Nie odnotowano natomiast różnicy pomiędzy pacjentami w remisji a zdrowymi ochotnikami. Z kolei wyższy odsetek limfocytów Th17 pośród limfocytów CD4+ w grupie allo-HCT w porównaniu do populacji zdrowej, choć istotny statystycznie, wynikał z mniejszej liczby komórek CD4+ u osób chorych.

Obserwacja ta może sugerować, że zwiększona liczba limfocytów Th17 jest dodatkowym markerem aktywności choroby zasadniczej. Teza ta znajduje potwierdzenie w piśmiennictwie. W momencie rozpoznania AML stwierdzano więcej limfocytów Th17 ($2,9 \pm 0,57\%$) w porównaniu do zdrowych ochotników ($1,1 \pm 0,28\%$),

a spadek liczby krążących we krwi obwodowej limfocytów Th17 korelował z przebiegiem choroby i odpowiedzią na stosowane leczenie. Co ciekawe chorzy, którzy odpowiadali na chemioterapię mieli wyjściowo wyższe wartości względne limfocytów Th17, a stwierdzany odsetek komórek powyżej mediany dla danej grupy przekładał się na wydłużone przeżycie 13.9 vs. 8.3 miesiąca.⁹⁴ Podobnie Wu i współautorzy przedstawili zbieżne wyniki stwierdzając wyższy odsetek limfocytów Th17 w porównaniu do zdrowych ochotników ($3,22 \pm 0,22$ vs. $0,88 \pm 0,16\%$) oraz obniżenie się odsetka tej populacji komórek po osiągnięciu remisji.⁹⁵

Profil cytokin produkowanych przez limfocyty Th17 w interakcji z komórkami białaczkowymi może sprzyjać utrzymywaniu się stanu anergii układu odpornościowego. W obecności komórek blastycznych CD33+ limfocyty Th17 wykazywały zdolność do zwiększonej produkcji IL-10 nasilając stan immunosupresji i zmniejszając odpowiedź przeciwnowotworową. Poprzez wytwarzanie IL-17 razem z IL-10 prezentowały właściwości zarówno komórek Th17, jak i T-reg.⁹⁶

W innych badaniach zwiększona liczba komórek produkujących IL-17 przekłada się również negatywnie na rokowanie.⁹⁷ W badaniach *in vitro* IL-17 stymulowała leukemogenezę poprzez konstytutywną fosforylację czynników transkrypcyjnych istotnych dla rozwoju AML. Dodatkowo wzrost populacji Th17 oraz produkcja IL-17 wpływały hamująco na powstawanie limfocytów Th1, a zwiększona liczba limfocytów Th17 stwierdzana w szpiku kostnym przekładała się na krótszy czas przeżycia chorych.⁹⁷ W innej badanej populacji, cytokiny produkowane przez limfocyty Th17 stymulowały komórki białaczkowe do proliferacji oraz sprzyjały powstawaniu lekooporności na podawane cytostatyki poprzez aktywację szlaku sygnałowego PI3K/Akt.⁹⁸ Nie oceniano jednak zdolności komórek do produkcji cytokin typowych dla limfocytów T-regulatorowych, co wydaje się kluczowe przy możliwości zmiany profilu produkowanych cytokin przez limfocyty Th17 w kontakcie z komórkami nowotworowymi.

Stosowana chemioterapia w różnym stopniu wpływa na poszczególne populacje komórek, a równowaga pomiędzy poszczególnymi subpopulacjami może przekładać się na odpowiedź przeciwnowotworową.⁹⁹ Dalsze badania wykażą, czy odsetek limfocytów Th17 wśród komórek jądrzastych mógłby być markerem aktywności choroby

i niezależnie od wartości minimalnej choroby resztkowej stać się dodatkowym czynnikiem stratyfikującym chorych poddawanych procedurze allo-HCT. Wobec znacznej plastyczności opisywanej linii komórkowej, oprócz oceny ilościowej, niewątpliwie cenną informacją byłaby ocena profilu cytokin produkowanych przez limfocyty Th17 w środowisku bogatym w komórki białaczkowe.

5.3 Wpływ IL-6 na limfocyty Th17.

Choć IL-6 jest jedną z kluczowych cytokin zaangażowanych w powstawanie limfocytów Th17, w badanym materiale nie wykazano zależności pomiędzy stężeniem IL-6 we krwi a liczbą krążących limfocytów Th17. Brak korelacji może wynikać z przeważającej produkcji IL-6 w mikrośrodowisku dojrzewających limfocytów, co nie musi przekładać się na jej stężenie we krwi obwodowej. Dodatkowo, rola tej cytokiny w procesie kształtowania się limfocytów Th17 badana była głównie w kontrolowanych warunkach pozaustrojowych, a dojrzewanie komórek *in vivo* zależy tak naprawdę od równowagi pomiędzy różnymi czynnikami stymulującymi i hamującymi komórki naiwne. Podkreśla się również rolę IL-1 β oraz IL-23 jako cytokin istotnych dla różnicowania i dojrzewania tej populacji komórek.¹⁴

Według aktualnych doniesień kluczową rolę w procesie powstawania limfocytów Th17 odgrywają komórki dendrytyczne i przekazywanie sygnału w procesie trans-prezentacji IL-6 (cluster-signaling). Prezentują one kompleks IL-6/IL6R dojrzewającym limfocytom i w połączeniu z gp130 obecną na powierzchni limfocytów stymulują je do rozwoju w kierunku komórek Th17.¹⁹ W przypadku trans-prezentacji istotne znaczenie ma IL-6 produkowana przez komórki dendrytyczne w obrębie synapsy immunologicznej, co może tłumaczyć brak korelacji między stężeniem IL-6 w surowicy a liczbą komórek Th17 we krwi obwodowej. Interleukina mierzona w surowicy może wywoływać swój efekt w odległych narządach, na zasadzie działania hormonów, co nie przekłada się na warunki w danym mikrośrodowisku. Co ciekawe, w przypadku chorych po transplantacji dominuje droga klasyczna, co dodatkowo komplikuje analizę korelacji cytokin mierzalnych w surowicy z liczbą poszczególnych populacji komórek. Komórki dendrytyczne biorcy są kluczowe w prezentacji antygeny we wczesnym okresie po transplantacji, a w klasycznym szlaku przekazywania sygnału, poprzez błonowy IL-6R

prowadzą do aktywacji limfocytów dawcy. Generując komórki Th17 i Th22 przy jednoczesnym zahamowaniu powstawania T-reg, przyczyniają się do zwiększenia częstości aGvHD.¹⁷

Badania dotyczące korelacji IL-6 z limfocytami Th17 pozwoliły na poczynienie dodatkowych interesujących obserwacji. Po pierwsze u pacjentów poddawanych allo-HCT stwierdzano istotnie statystycznie podwyższone stężenie IL-6 w trakcie epizodów infekcyjnych, choć wzrost tej cytokiny był umiarkowany w porównaniu do grupy bez ciężkich powikłań infekcyjnych - 37,9 vs. 16,85 w dobie 14, 8,7 vs. 4,6 w dobie 21 i 8,1 vs. 3,79 w dobie 30 (pg/ml). Oznaczenie IL-6 może potencjalnie stanowić alternatywę w stosunku do oznaczeń CRP, jako markera aktywności procesu zapalnego związanego z infekcją, choć obecnie postępowanie takie nie byłoby ekonomicznie uzasadnione.

Po drugie u pacjentów ze zdiagnozowaną przed 60 dobą aGvHD obserwowano podwyższone stężenie IL-6 w momencie rozpoznania choroby lub bezpośrednio przed jej wystąpieniem. Pomimo istotnej roli tej cytokiny w patofizjologii aGvHD oraz coraz częstszego stosowania leczenia skierowanego przeciwko receptorowi dla IL-6, zmierzone we krwi obwodowej wartości były jedynie nieznacznie podwyższone, z medianą przekraczającą minimalnie górną granicę normy, niezależnie od ciężkości przebiegu choroby. Wydaje się, że IL-6 oznaczana we krwi obwodowej nie jest idealnym markerem intensywności "burzy cytokinowej" towarzyszącej aGvHD, co może być związane z istotniejszą klinicznie lokalną produkcją tej cytokiny w zajętych narządach.

5.4 Rola limfocytów Th17 w odpowiedzi przeciwinfekcyjnej.

Ciężkie powikłania infekcyjne zarówno bakteryjne, jak i grzybicze są jedną z głównych przyczyn wczesnej śmiertelności w okresie aplazji po HCT. Limfocyty Th17 biorą udział głównie w odpowiedzi skierowanej przeciw bakteriom zewnątrzkomórkowym, takim jak *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* czy *Klebsiella pneumoniae*. Opisywana jest również ich rola w reakcjach przeciwgrzybiczych dotyczących głównie *Candida albicans*. Komórki Th17, poprzez

produkowane cytokiny stymulują napływ makrofagów do miejsca zapalenia, czego następstwem jest eliminacja bakterii poprzez fagocytozę. Dodatkowo, zdolność do migracji do błon śluzowych i skóry chroni organizm przed wnikaniem drobnoustrojów patogennych.^{21,100} Wobec znaczącej roli komórek Th17 w obronie przeciwniekcyjnej, podjęto próbę analizy związku pomiędzy liczbą krążących komórek Th17, a częstością występowania ciężkich powikłań infekcyjnych. Zwiększona liczba limfocytów Th17 mogłaby predysponować do bardziej efektywnego zwalczania infekcji.

W przeprowadzonym badaniu nie wykazano jednak korelacji między liczbą komórek z okresu przed kondycjonowaniem, jak i w okresie aplazji i wczesnej regeneracji, a występowaniem ciężkich powikłań infekcyjnych. Stoi to w sprzeczności do doniesień innych autorów, według których obniżona liczba komórek CD3+CD4+CD161+ przed postępowaniem kondycjonującym korelowała z występowaniem infekcji bakteryjnych, zapaleniem śluzówek jamy ustnej, czy też reaktywacją CMV u pacjentów poddawanych alogenicznej, bądź też autologicznej transplantacji komórek krwiotwórczych (auto-HCT, autologous hematopoietic cell transplantation).^{67,101} Uzyskanie sprzecznych danych wymagałoby podjęcia dodatkowej szczegółowej analizy. Komórki Th17 mają zdolność do chemotaksji do miejsc objętych zakażeniem. Ich zmniejszona liczba przed transplantacją, która we wspomnianej pracy korelowała ze zwiększonym ryzykiem powikłań infekcyjnych, mogła wynikać z tłącego się procesu zapalnego przed HCT, co skutkowało obniżeniem ich liczby we krwi obwodowej w związku z migracją do tkanek. Obserwacje te wymagają wnikliwej analizy stanu ogólnego pacjenta, wywiadu infekcyjnego, czasu od zakończenia ostatniej antybiotykoterapii, bądź chemioterapii, która generuje również uszkodzenie tkanek m.in. przewodu pokarmowego i wtórny stan zapalny.

Poszukiwano również związku pomiędzy kolonizacją patogenami wieloopornymi a liczbą badanych limfocytów Th17. W badanej grupie kolonizację przewodu pokarmowego szczepami wieloopornymi stwierdzono u ponad 50% chorych w momencie przyjęcia do szpitala, natomiast w trakcie hospitalizacji odsetek osób skolonizowanych wzrósł aż do 73%. Obecność MDRB, poprzez zaburzenie prawidłowego składu mikrobiomu jelitowego, wpływa na zwiększenie częstości powikłań transplantacyjnych oraz zmniejszenie całkowitych przeżyć chorych po

HCT.^{71,102,103} Przewód pokarmowy jest istotnym miejscem wpływającym na homeostazę całego organizmu, a mikroflora jelitowa ingeruje w produkcję lokalną zarówno pro- i przeciwzapalnych subpopulacji limfocytów. Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe produkowane przez różne rodzaje *Clostridiales* stymulują do lokalnego rozwoju limfocytów T-reg, z drugiej strony komensale takie jak *Segmented filamentous bacteria (SFB)* przyczyniają się do generacji limfocytów Th17.^{72,73,104,105} Oprócz bytujących w przewodzie pokarmowym komensali, również zewnątrzkomórkowe patogeny takie jak *Candida albicans* czy *Citrobacter rodentium* mogą indukować powstawanie komórek Th17. Chociaż wciąż nie ma pewności, które z patogenów pobudzają odpowiedź Th17-zależną w świetle jelita, to wydaje się, że odpowiedzialne za to są bakterie mające zdolność do silnej adhezji do jelitowych komórek nabłonkowych.¹⁰⁴ Nie podlega wątpliwości, że infekcje bakteryjne mogą promować, jak również nasilać niektóre choroby z autoagresji. Prezentowane są różne teorie dotyczące ciągłej aktywacji limfocytów, czy to przez obecność super-antygeny, czy podobieństwo peptydów czynników chorobotwórczych do antygenów gospodarza i nieprawidłową odpowiedź ze strony układu odpornościowego.¹⁰⁶ Apoptoza zakażonych komórek może doprowadzić do prezentacji własnych antygenów na cząsteczkach MHC klasy II, co sprzyja migracji i nadmiernej proliferacji autoreaktywnych komórek Th17. W rezultacie doprowadza to do utrzymywania się stanu zapalnego pierwotnie indukowanego zakażeniem.¹⁰⁷ Podobne zjawiska mogą występować również po transplantacji prowadząc do powstania, bądź nasilenia się GvHD.

Rozpoznanie antygenów bakteryjnych przez komórki APCs w świetle jelita skutkuje produkcją cytokin i rekrutacją komórek układu odpornościowego, co w rezultacie może doprowadzić do samonapędzającego się procesu podtrzymującego stan zapalny, a zaburzenie stosunku Th17/T-reg może przyczynić się do rozwoju lub zaostrzenia aGvHD, nie tylko w formie jelitowej. W pracy nie wykazano korelacji pomiędzy kolonizacją MRDB a liczbą badanych limfocytów Th17. Istotną informację przyniosłoby badanie histopatologiczne wycinków z jelita określające wielkość nacieku komórkami Th17 u pacjentów skolonizowanych MDRB. Stanowi to kwestię wartą rozważenia w dalszych badaniach. Prowadzone badanie pozwoliło natomiast na

wykazanie zależności pomiędzy kolonizacją przewodu pokarmowego a występowaniem aGvHD, choć nie odnotowano takiej korelacji z częstością występowania jelitowej postaci choroby, jednakże grupa chorych z zajęciem przewodu pokarmowego w przebiegu aGvHD była nieliczna. Potwierdza to inne doniesienia podkreślające rolę flory jelitowej i stosowanej antybiotykoterapii na częstość występowania powikłań potransplantacyjnych.^{71,102}

Wreszcie trzecim aspektem prowadzonego badania w kontekście powikłań infekcyjnych była analiza czy istnieje korelacja między limfocytami Th17, a reaktywacją wirusa CMV. Aktualnie badana jest rola limfocytów Th17 w odpowiedzi przeciwko wirusom powodującym zakażenia dróg oddechowych głównie RSV, czy w patogenezie przewlekłego zapalenia wątroby o etiologii HBV/HCV, lecz nie istnieją doniesienia o wpływie tej populacji na częstość reaktywacji wirusów latentnych po allo-HCT.^{108,109} W badanej grupie u 46% chorych doszło do reaktywacji CMV, z czego u połowy chorych stwierdzany był niekorzystny status serologiczny: biorca CMV IgG (+) – dawca CMV IgG (-). Pomimo faktu, że limfocyty T CD8+ i komórki NK są głównymi populacjami odpowiedzialnymi za eliminację wirusów z organizmu, to u pacjentów po HCT szybka regeneracja w zakresie limfocytów T CD4+ wpływa zasadniczo na zmniejszenie częstości reaktywacji wirusa cytomegalii.^{90,92} Wśród badanych pacjentów stwierdzono zależność między niższą liczbą komórek Th17 a reaktywacją CMV we wszystkich punktach czasowych. Co ciekawe, Lee i współautorzy zaobserwowali związek niższej liczby komórek Th17 przed transplantacją z wyższą częstością reaktywacji CMV choć oceniani byli pacjenci ze szpiczakiem plazmocytowym poddani auto-HCT.¹⁰¹ Nie zanotowano natomiast korelacji pomiędzy niższymi wartościami subpopulacji limfocytów T CD4+ a większą częstością reaktywacji wirusa. Podobną zależność obserwowali inni autorzy badając chorych z toczeniem rumieniowatym układowym. W przypadku reaktywacji wirusów latentnych stwierdzano obniżenie liczebności populacji komórek Th17, jak również T-reg.¹¹⁰ Zmniejszenie się populacji tych komórek może nie być przyczyną, lecz skutkiem obserwowanej reaktywacji i migracji komórek do miejsc objętych stanem zapalnym, związanych na przykład z reaktywacją narządową.

Zależność obserwowana w badanej grupie allo-HCT może również wynikać z koincydencji innych czynników wpływających na częstość reaktywacji wirusa tj.

GvHD, stosowania ATG czy niekorzystnego statusu serologicznego dawca-biorca. W przeprowadzonej analizie wieloczynnikowej nie wykazano jednak wpływu powyższych czynników na częstość reaktywacji wirusa CMV. Jedynym parametrem wpływającym na reaktywację był wybór dawcy niespokrewnionego. Wynika to najpewniej z częstszego stosowania ATG i występowania aGvHD w tej populacji chorych, co nie zostało wykazane w analizie wieloczynnikowej z powodu niewielkiej liczebności grupy.

5.5 Subpopulacje limfocytów a rozwój GvHD.

W badanej grupie obserwowano spadek liczby komórek Th17 w 21 dobie po HCT (moment wszczepienia), który korelował z rozwojem aGvHD. Podobnie inni autorzy zanotowali zależność pomiędzy obniżonymi wartościami komórek CD3+CD4+CD161+ we krwi obwodowej, a częstością rozwoju aGvHD. Van der Waart¹¹¹ oraz współautorzy oceniali tempo rekonstytucji limfocytów Th17 przez 1 rok po transplantacji. Wartość referencyjną tych komórek określili badając zdrowych ochotników: limfocyty Th17 stanowiły 17,5%±5,8% komórek CD4+, a ich wartość bezwzględna wynosiła 0,17±0,047x10⁹/l. Komórki CD4+CD161+ pojawiały się stosunkowo wcześnie po przeszczepieniu, nie osiągając jednak zakresów referencyjnych w trakcie obserwacji. W 3 miesiącu po przetoczeniu komórek progenitorowych oceniano korelację pomiędzy krążącymi we krwi limfocytami Th17 a występowaniem GvHD. Podobnie jak w prezentowanej pracy stwierdzono mniejsze wartości liczbowe tej subpopulacji wśród pacjentów rozwijających chorobę – 0,053x10⁹/l vs. 0,087x10⁹/l. Niższe wartości bezwzględne limfocytów Th17 nie korelowały jednak z całkowitą liczbą komórek CD4+, podobnie jak w badanej grupie. Dodatkowo potwierdzono w materiale histopatologicznym obecność komórek z wysoką ekspresją CD196 oraz obecnym antygenem CD161, co potwierdza migrację populacji Th17 do zajętych narządów.^{111,112} Wydaje się, spadek liczby limfocytów Th17 we krwi obwodowej może być wytłumaczony przez ich migrację do miejsc objętych stanem zapalnym. Antygeny powierzchniowe obecne na limfocytach Th17 mogą warunkować tropizm tej populacji komórek do określonych miejsc zapalenia. Jak wspomniano wcześniej receptorem obecnym na powierzchni komórek Th17 jest CCR6 (CD196), a jedynym potencjalnym

ligandem dla tego receptora jest CCL20 obecny na błonach śluzowych jelit, skóry oraz komórkach wątroby, czyli w narządach docelowo zajmowanych w ostrej postaci GvHD. Jest to kolejny dowód na rolę komórek Th17 w patogenezie aGvHD.

W prezentowanej pracy obserwowano zmianę intensywności fluorescencji antygenów CD161 i CD196 u części pacjentów. Zwiększenie intensywności fluorescencji może wskazywać na większą ekspresję danego antygeny na komórkach. U chorych rozwijających aGvHD zwiększało się MFI antygeny powierzchniowego CD161 przy jednoczesnym spadku MFI dla CD196. Zjawisko to najpewniej związane jest z redystrybucją limfocytów Th17 z krwi obwodowej do tkanek. Zaktywowane komórki z wysoką ekspresją CD196 mają większą zdolność migracji do miejsc objętych zapaleniem. Natomiast pozostałe komórki z wyższą ekspresją CD161 badane we krwi obwodowej mogą być populacją komórek pamięci tuż przed aktywacją. Zmiana fluorescencji i zmniejszenie ekspresji antygeny CD196 z równoczesnym spadkiem liczby Th17 we krwi obwodowej w przed rozpoznaniem aGvHD potwierdzałyby tę hipotezę. Sekwencyjne oznaczenia populacji limfocytów Th17 oraz ocena schematu fluorescencji pozwalałaby potencjalnie przewidzieć rozwój aGvHD, choć dynamika i gwałtowne tempo pojawiających się zmian utrudnia wyciąganie jednoznacznych wniosków.

Jak wspomniano wcześniej, przyczyna zmniejszenia się liczby limfocytów Th17 w momencie rozwoju GVHD może wynikać ze zdolność limfocytów Th17 do migracji do miejsc objętych stanem zapalnym. Choć limfocyty Th17 nie są niezbędne do zainicjowania rozwoju aGvHD, mogą jednak wpływać na ciężkość przebiegu choroby.⁵⁹ W badaniach z wykorzystaniem komórek polaryzowanych w warunkach *in vitro* w kierunku limfocytów produkujących IL-17A, wykazano ich szczególną zdolność do zapoczątkowania procesu obejmującego skórę i płuca.⁶¹ Plastyczność oraz niestabilność uzyskiwanych w ten sposób linii komórkowych oraz ich zdolność do polaryzacji w kierunku komórek produkujących oprócz IL-17 również IFN- γ może jednak ograniczać trafność wyciąganych wniosków. W modelu mysim badającym rolę komórek CD4⁺ produkujących IL-17 oraz rolę samej cytokiny w GvHD wykazano, że podanie pochodzących od dawcy komórek CD4⁺IL17⁺ nasilało GvHD na skutek synergistycznego działania z limfocytami Th1. W badaniu histopatologicznym

stwierdzano u biorców znacznie większe zniszczenie tkanek jelita, skóry, płuc i wątroby, niż w grupie otrzymującej komórki bez zdolności do produkcji IL-17. Natomiast badane limfocyty wykazywały również zdolność do produkcji IFN- γ . Z drugiej strony, w tym samym badaniu stwierdzono, że brak IL-17 doprowadzał do zaostrzenia GvHD poprzez zwiększenie odpowiedzi Th1-zależnej, a podanie rekombinowanej IL-17 łagodziło objawy choroby i zmniejszenie się stężenia IFN- γ w surowicy.¹¹³ Należy jednak pamiętać, że IL-17 jest produkowana również przez inne populacje komórek, a limfocyty Th17 wytwarzają także szereg innych cytokin, dlatego też nie można stawiać znaku równości pomiędzy stężeniem IL-17 a ilością limfocytów Th17.

W pracy podjęto się również oceny limfocytów T-regulatorowych, które stanowią swojego rodzaju przeciwwagę do prozapalnych populacji limfocytów pomocniczych. W patogenezie GvHD są populacją supresorową w stosunku do limfocytów Th1 i Th17. Według niektórych autorów stosunek Th17/Treg może mieć wartość prognostyczną dla rozwoju aGvHD. Analizując biopaty z jelita u chorych z aGvHD z zajęciem przewodu pokarmowego wykazano, że iloraz Th17/T-reg <1 koreluje z obecnością aktywnej choroby.⁶⁵ W badaniu tym nie wykonywano jednak badań sekwencyjnie z oceną dynamiki zmian. W przeciwieństwie do badania histopatologicznego, nie wykazano korelacji stosunku Th17/T-reg we krwi obwodowej z rozwojem aGvHD.⁶⁵ Z kolei odmienne obserwacje dotyczyły przewlekłej GvHD, ze zwiększonym stosunkiem Th17/T-reg obecnym w biopatach z zajętej wątroby.⁶⁶ Przewagę subpopulacji limfocytów Th17 z chorobowo zmienionym narządzie tłumaczono faktem migracji tkankowej komórek Th17 i nasilaniem tam stanu zapalnego. Niezgodność między doniesieniami można tłumaczyć zdolnością komórek Th17 do migracji narządowo specyficznej, przez co nie należy stosować wspomnianego ilorazu w odniesieniu do całej populacji chorych z GvHD, a stopień nasilenia stanu zapalnego i wielkość nacieku tkankowego przez limfocyty Th17 może przekładać się na obniżenie ilorazu Th17/T-reg we krwi obwodowej. W trakcie analizy badanej grupy nie obserwowano istotnych zmian w odsetku populacji limfocytów T-regulatorowych, w przeciwieństwie do limfocytów Th17. W badanej grupie uzyskano wyniki niejednoznaczne, ponieważ obniżenie ilorazu w całej populacji korelowało z wystąpieniem GvHD, jednak nie zanotowano takiej zależności w podgrupie ATG. Związane jest to najpewniej z

wyjściowo niższym ilorazem w tej populacji chorych, na skutek generalnie niższych wartości limfocytów Th17 we wszystkich punktach czasowych badania.

Istotny wpływ na częstość występowania powikłań po transplantacji może mieć skład materiału przeszczepowego. W badanej pracy nie wykazano korelacji pomiędzy liczbą przetoczonych komórek CD34+/kg masy ciała biorcy a częstością występowania GvHD. Może to wynikać z faktu, że w badanej grupie maksymalna liczba przetoczonych komórek wynosiła $7,49 \times 10^6$ /kg, a mediana $5,78 \times 10^6$ /kg, co stanowi optimum pozwalające uzyskać regenerację hematopoezy bez zwiększenia ryzyka GVHD.¹¹⁴

Dane dotyczące wpływu składu przeszczepu na częstość powikłań związanych z transplantacją są niejednokrotnie sprzeczne.¹¹⁴⁻¹¹⁷ Niektórzy autorzy podkreślają wpływ liczby limfocytów obecnych w materiale przeszczepowym na częstość występowania aGvHD,¹¹⁵ nie ma jednak danych dotyczących liczby komórek Th17 w przetaczanym preparacie. W grupie badanej nie zanotowano korelacji pomiędzy liczbą przetoczonych limfocytów Th17 a częstością występowania aGvHD, jednakże badania materiału nie przeprowadzono u wszystkich pacjentów. W sferze badań pozostaje poszukiwanie innych markerów obecnych w materiale przeszczepowym, zarówno komórkowych jak i biochemicznych, które mogą mieć wpływ na częstość występowania powikłań potransplantacyjnych.¹¹⁸⁻¹²⁰ Ocena subpopulacji limfocytów w materiale przeszczepowym, jak również ocena ich chimeryzmu w okresie po transplantacji pozwoliłaby na dokładną obserwację zależności pomiędzy przetrwałą hematopoezą biorcy, regenerującą hematopoezą dawcy, a występowaniem powikłań po transplantacji.

6. WNIOSKI

1. We wczesnym okresie po HCT utrzymują się znaczne ilościowe zaburzenia subpopulacji limfocytów. Najszybsza regeneracja dotyczy komórek NK oraz limfocytów T CD8+, natomiast najwolniejsza limfocytów CD4+, co jest zgodne z doniesieniami literaturowymi. Wolniejsze tempo rekonstytucji obserwowane jest u chorych otrzymujących ATG. Limfocyty Th17 stanowią znaczącą subpopulację wśród komórek CD4+. U chorych otrzymujących ATG obserwuje się znacznie opóźnioną regenerację limfocytów Th17, co może sugerować większą wrażliwość tych komórek na stosowaną ATG. Na podstawie otrzymanych wyników nie da się jednoznacznie ustalić wpływu ATG na regenerację populacji limfocytów T-regulatorowych.
2. Pomimo istotnego wpływu IL-6 na proces kształtowania komórek Th17, stężenia IL-6 w surowicy nie korelują z liczbą limfocytów Th17 we krwi obwodowej. Brak korelacji może wynikać z przeważającej produkcji tej cytokiny w mikrośrodowisku dojrzewających limfocytów, co nie musi przekładać się na jej stężenie we krwi obwodowej. Podwyższone stężenie IL-6 obserwowane jest u chorych z ciężkimi powikłaniami infekcyjnymi oraz u pacjentów rozwijających aGvHD przed 60 dobą po HCT. W grupie aGvHD stężenie przekraczało nieznacznie górną granicę normy, co sugeruje, że oznaczenie IL-6 w surowicy nie odzwierciedla burzy cytokinowej towarzyszącej GvHD.
3. Obniżenie liczby komórek Th17 we krwi obwodowej w momencie wszczepienia oraz zmiana ekspresji antygenów powierzchniowych CD161 i CD196 na limfocytach Th17 mogą korelować z występowaniem aGvHD. Spadek liczby komórek Th17 oraz zmiana fluorescencji mogą wynikać z migracji limfocytów Th17 do miejsc objętych zapaleniem. W przeciwieństwie do innych doniesień nie potwierdzono wpływu zmniejszonej liczby krążących we krwi limfocytów Th17 na częstość występowania ciężkich powikłań infekcyjnych po HCT.

7. STRESZCZENIE

Zastosowanie intensywnej radio-chemioterapii oraz u części chorych, transplantacji alogenicznych komórek krwiotwórczych, poprawiło wyniki leczenia pacjentów z rozrostowymi chorobami hematologicznymi. Leczenie cytostatyczne powoduje pojawienie się głębokich zaburzeń w obrębie układu odpornościowego, a stosowanie immunoterapii nasila deplecję wybranych subpopulacji limfocytów. Dodatkowo przeszczepienie komórek krwiotwórczych, poprzez wprowadzenie nowego układu immunologicznego, sprzyja pojawianiu się nie tylko ilościowych, ale również jakościowych zaburzeń wśród populacji limfocytarnych. Poznanie zmian zachodzących w trakcie leczenia w obrębie subpopulacji limfocytów pozwala na lepsze zrozumienie mechanizmów przyczyniających się do powstawania powikłań specyficznych dla okresu potransplantacyjnego, takich jak choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi. Dzięki wieloparametrowej cytometrii przepływowej istnieje możliwość dokładnej oceny wybranych subpopulacji limfocytów T, a obserwacja zaburzeń ilościowych pomiędzy populacjami komórek może pozwolić na wyodrębnienie grupy chorych ze zwiększonym ryzykiem powikłań potransplantacyjnych.

W badanej pracy analizowano prospektywnie tempo rekonstrukcji immunologicznej do 60 doby po allo-HCT (grupa badana). Ocenę wybranych subpopulacji przeprowadzano w określonych punktach czasowych: przed rozpoczęciem kondycjonowania, w dobie +14, +21, +30 oraz +60 po HCT. Szczególnym zainteresowaniem objęto populację limfocytów Th17. Do analizy końcowej włączono 30 chorych, u których szczegółowo przeanalizowano tempo rekonstrukcji immunologicznej oraz oceniano wpływ zaburzeń w obrębie subpopulacji limfocytów na częstość występowania powikłań potransplantacyjnych.

Regeneracja hematopoezy po HCT ma przebieg bardzo indywidualny, a wiele czynników może wpływać na tempo rekonstrukcji subpopulacji limfocytów. W ciągu pierwszych 2 miesięcy po HCT u większości chorych obserwowana jest normalizacja liczby komórek NK oraz limfocytów T CD8+. Opóźniona w czasie regeneracja subpopulacji limfocytów T CD4+ w porównaniu do CD8+ przyczynia się do występowania odwróconego stosunku CD4/CD8 utrzymującego się po HCT. Żaden

z badanych pacjentów nie osiągnął wartości limfocytów T CD4+ powyżej dolnej granicy normy w trakcie okresu obserwacji. Wybór dawcy niespokrewnionego oraz stosowanie globuliny antytymocytarnej przyczyniają się do opóźnionej regeneracji subpopulacji limfocytów. W badanej grupie zastosowanie ATG znacząco wpływało na obniżenie liczby limfocytów T CD4+ i limfocytów Th17, bez wpływu na liczebność populacji limfocytów T CD8+ oraz komórek NK. W badanej pracy wykazano niejednoznaczny wpływ ATG na populację limfocytów T-regulatorowych. Nie wykazano wpływu wieku >50 roku życia ani stosowanego postępowania kondycjonującego na tempo rekonstrukcji immunologicznej.

Limfocyty Th17 stanowiły 18% komórek CD4+ (zakres 4,2-45%) przed rozpoczęciem kondycjonowania, a mediana odsetka tej populacji wśród leukocytów wynosiła 1,18% (zakres 0,017-9%). U chorych z aktywną chorobą stwierdzano wyższe wartości bezwzględne, jak również wyższy procentowy udział limfocytów Th17 wśród leukocytów: 0,94% u chorych z remisją choroby vs. 2,6% u pacjentów z aktywną chorobą przed HCT. Nie stwierdzono różnic pomiędzy zdrowymi ochotnikami a osobami pozostającymi w całkowitej remisji przed HCT. Obserwacja ta może sugerować korelację tej populacji z aktywnością choroby zasadniczej.

Nie obserwowano powrotu liczebności limfocytów Th17 w okresie prowadzenia badania do wartości sprzed rozpoczęcia leczenia, a głęboka deplecja tej populacji obserwowana była w szczególności w grupie utrzymującej ATG. Pomimo regeneracji populacji CD4+ nie obserwowano proporcjonalnego wzrostu liczby komórek Th17, co może sugerować większą wrażliwość tej populacji na ATG. W pracy przeprowadzono analizę składu materiału przeszczepowego u 22 chorych. Mediana liczby limfocytów Th17 wynosiła 1,12% komórek jądrzastych (zakres 0,4-3,5%), nie odnotowano korelacji pomiędzy podaną liczbą komórek Th17 a tempem rekonstrukcji tej populacji limfocytów, jak również z częstością występowania aGvHD.

Kolejnym aspektem pracy była analiza stężenia IL-6, cytokiny istotnej dla różnicowania limfocytów Th17. W badanym materiale nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniem IL-6 w surowicy a ilością krążących we krwi obwodowej limfocytów Th17. Podwyższone wartości tej cytokiny stwierdzono u chorych z rozpoznaniem aGVHD przed 60 dobą, jednak mediana stężenia w tej grupie

(7,34pg/ml) przekraczała jedynie nieznacznie górną granicę normy (5,9pg/ml). Intensywny wzrost IL-6 obserwowano u chorych z ciężkimi powikłaniami infekcyjnymi. Brak korelacji pomiędzy cytokinami mierzonymi w surowicy a limfocytami Th17 najprawdopodobniej wynika z przeważającej lokalnej produkcji cytokin w miejscu zapalenia oraz środowisku różnicujących się limfocytów.

Ostrą postać GvHD rozpoznano u 13 pacjentów (43%), z czego u 9 chorych doszło do rozwoju aGvHD przed 60 dobą po HCT. Jedynym czynnikiem korelującym z rozwojem aGvHD była obniżona liczba limfocytów Th17 w momencie wszczepienia. Mniejsza liczba tych komórek stwierdzana we krwi obwodowej może wynikać z ich migracji do zajętych narządów. W trakcie badania nie stwierdzono istotnych zmian w obrębie populacji limfocytów T-regulatorowych, które stanowiły przed rozpoczęciem leczenia 0,6% leukocytów (0,2-2,1%). Osoby, które rozwijały aGvHD miały niższy stosunek Th17/T-reg w 21 dobie po HCT, co wynikało ze zmniejszenia liczby populacji limfocytów Th17 we krwi obwodowej. Obserwacji tej nie potwierdzono analizując podgrupę otrzymującą ATG.

Limfocyty Th17 wykazywały zmienną intensywność fluorescencji antygenów CD161 oraz CD196, którą odnotowano u 17 pacjentów w trakcie badania. U 12 z nich doszło do rozwoju aGvHD. Chorzy, u których pojawiły się cechy aGvHD wykazywali zmniejszenie intensywności fluorescencji CD196 przy jednoczesnym nasileniu MFI antygeny CD161. Zmiana sposobu fluorescencji korelowała istotnie z częstością występowania aGvHD.

Kolejnym istotnym czynnikiem wpływającym na wyniki leczenia hematologicznego są powikłania infekcyjne. Kolonizację przewodu pokarmowego MDRB stwierdzono u ponad połowy chorych, a obecność patogenów wieloopornych korelowała z częstością występowania aGvHD. Nie zanotowano takiej zależności dla jelitowej postaci choroby, jednak zajęcie przewodu pokarmowego dotyczyło jedynie niewielkiego odsetka chorych. Obecność MDRB wpływa nie tylko na częstość występowania poważnych powikłań infekcyjnych. Zaburzenie składu mikrobiomu jelitowego, poprzez swoje działanie immunomodulujące, może przyczyniać się do powstania bądź nasilenia objawów aGvHD. W przeciwieństwie do innych badań nie

wykazano ochronnego wpływu subpopulacji limfocytów Th17 na częstość występowania ciężkich powikłań infekcyjnych.

W grupie badanej u 46% doszło do reaktywacji wirusa CMV. Do reaktywacji CMV częściej dochodziło u pacjentów, u których przeszczep pochodził od dawców niespokrewnionych oraz tych którzy otrzymywali ATG jako uzupełnienie kondycjonowania. Częstszą reaktywację stwierdzano również w grupie z aGvHD. U chorych tych obserwowano niższe wartości limfocytów Th17 w całym okresie badanym. W modelu wieloczynnikowym, żaden z parametrów nie wykazał istotności statystycznej. Przeprowadzając regresję logistyczną metodą krokową wsteczną jedynie wybór dawcy niespokrewnionego zwiększał ryzyko występowania reaktywacji wirusa CMV.

8. SUMMARY

Intensive radio- and chemotherapy is a curative option for patients with hematological malignancies. Allogeneic hematopoietic cell transplantation (HCT) is a part of the treatment that allows maintaining long-lasting remission and survival. Cytostatic agents cause profound disturbances in the immune system and the addition of immunotherapy to the procedure may increase the depletion of specific cell populations. Hematopoietic cell transplantation, through the introduction of a new immune system, promotes the appearance of both quantitative and qualitative disturbances among the cell populations. The knowledge concerning the impact of alterations in lymphocyte composition would enable a better understanding of mechanisms promoting post-HCT complications such as acute graft-versus-host disease (aGvHD). Multiparameter flow cytometry gives a possibility to investigate precisely distinct T-cell subsets. The observation of disturbances between T-cell populations may allow identifying patients with an increased risk of post-HCT complications.

In the presented study, immune reconstitution was analyzed up to 60 days after allo-HCT (study group). Evaluation of selected subpopulations was performed at specific time points: before treatment, at day + 14, + 21, + 30 and +60 post HCT. The main emphasis was put on the Th17 lymphocyte subset. The influence of the Th17 subset on the incidence of early complications after HCT and correlation with proinflammatory cytokines important for their differentiation and biological function were evaluated. The final analysis enrolled 30 patients after HCT.

Regeneration of hematopoiesis after HCT is very individual and many factors can affect the time of immune reconstitution. During the first two months after HCT normalization of the number of NK cells and CD8+ T lymphocytes is observed in the majority of patients. The postponed regeneration of the CD4+ T lymphocytes in relation to CD8+, contributes to the presence of an inverted CD4/CD8 ratio after HCT. None of the patients reached the CD4+ T-cells level above the lower limit of the normal range at 2 months after HCT. The selection of matched unrelated donor (MUD) and administration of anti-thymocyte globulin (ATG) contribute to delayed lymphocyte

regeneration. The use of ATG decreased CD4+ T-lymphocytes and Th17 population with no influence on CD8+ T-cells and NK cells significantly. There was an ambiguous effect of ATG on regulatory T-cells. Age above 50 and conditioning regimen (myeloablative vs. reduced intensity) had no impact on immune reconstitution.

Prior to conditioning, the Th17 subset constitute around 18% of the CD4+ T-cell population (range 4,2-45%) and median level of Th17 among white blood cells (WBC) was 1,18% (range 0,017-9%). In patients with active disease, higher absolute values, as well as a percentage of Th17 among WBC, were found: 0,94% in complete remission, 2,6% in patients with the active disease before HCT. There was no difference between healthy volunteers and patients in complete remission before HCT. This observation may suggest a correlation between Th17 lymphocytes and the activity of the underlying disease. The composition of the graft was analyzed in 22 patients. Median level of Th17 lymphocytes was 1,12% among nuclear cells (range 0,4-3,5%). There was no correlation between received Th17 amount and the time of reconstitution of this subset, as well as the incidence of aGvHD. However, the examination of the graft composition was not performed in all cases.

Another aspect of the study was to analyze cytokines essential for differentiation (IL-6) of Th17 lymphocytes. There was no correlation between serum IL-6 concentration and level of Th17 subset. Elevated concentrations of IL-6 were found in patients with aGvHD (before 60 days post-HCT), however, the median level was only slightly elevated (7,34pg/ml) above reference range (5,9pg/ml). Excessive rise of IL-6 was observed during severe infectious complications. A lack of the link between cytokines measured in serum and Th17 subset may result from a local production of cytokines in the environment of differentiating lymphocytes or in the site of inflammation.

Acute GvHD was diagnosed in 13 patients (43%), nine of them developed the disease before two months after HCT. The only factor that had an impact on aGvHD incidence was a decreased amount of Th17 lymphocytes at the time of engraftment ($p < 0.05$). The lower number of this subpopulation may result from the migration of Th17 to the organs affected by the disease. No important alterations in the number of regulatory T-cells were found during the study. T-regs constitute 0,6% of WBC (range

0,2-2,1%) before beginning of the treatment. Patients with aGvHD presented a lower Th17/T-reg ratio at the time of engraftment (day 21), which results from the migration of Th17 to the inflamed tissues and reduction of this subset in blood. This observation was not confirmed in the ATG subgroup.

In 17 patients, Th17 lymphocytes presented variable mean fluorescence intensity (MFI) of CD161 and CD196 antigens. Twelve of them developed aGvHD. In cases with GvHD, there was a decrease in fluorescence intensity of CD196 with a simultaneous increase of MFI of CD161. Changes in MFI correlated with the incidence of aGvHD.

Acute GvHD and infectious complications are the main factors that contribute to increasing non-relapse mortality in the early post-transplant period. Colonization of the gastrointestinal tract with multi-drug resistant bacteria (MDRB) was found in more than 50% of patients. The presence of MDRB colonization correlated with the aGvHD occurrence. There was no relation between MDRB and intestinal form of GvHD, however, a small percentage of patients suffered from the GI involvement. The presence of MDRB affects not only the incidence of serious infectious complications. Disturbing the composition of the intestinal microbiome, MDRB may lead to the initiation or aggravation of the symptoms of aGvHD, through its immunomodulatory effect.

In the study group, 46% of patients had CMV reactivation, which was more common in those transplanted from unrelated donors and those who received ATG as a part of conditioning. More frequent reactivation was also seen in the aGvHD group. These patients had lower Th17 lymphocyte values during the time of observation. However, in the multifactorial model, none of the parameters showed statistical significance.

9. PIŚMIENNICTWO

1. Tkanka limfatyczna i krwiotwórcza (C81-C96). Krajowy Rejestr Nowotworów. <http://onkologia.org.pl/tekanka-limfatyczna-krwiotworcza-c81-c96/>.
2. Białaczka szpikowa (C92). Krajowy Rejestr Nowotworów. <http://onkologia.org.pl/bialaczka-szpikowa-c92/>.
3. Estey E. CME Information : Acute myeloid leukemia : 2016 Update on risk-stratification and management. *Am J Hematol.* 2016;91(8). doi:10.1002/ajh.09108
4. Rzepiel A, Kutzegi N, Gézsi A, et al. Circulating microRNAs as minimal residual disease biomarkers in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Transl Med.* 2019;17(1):372. doi:10.1186/s12967-019-2114-x
5. Grobbelaar C, Ford AM. The Role of MicroRNA in Paediatric Acute Lymphoblastic Leukaemia: Challenges for Diagnosis and Therapy. *J Oncol.* 2019;2019:1-14. doi:10.1155/2019/8941471
6. Gołąb Jakub, Jakóbsiak Marek, Lasek Witold ST. *Immunologia.*; 2017.
7. Niedźwiedzka-rystwej P, Tokarz-deptuła B, Deptuła W, et al. Charakterystyka subpopulacji limfocytów T * Characteristics of T lymphocyte subpopulations. *Postepy Hig Med Dosw.* 2013;67:371-379.
8. Szulc-dąbrowska L, Gieryńska M, Depczyńska D, Schollenberger A, Toka FN. Limfocyty Th17 w zakażeniach bakteryjnych * Th17 lymphocytes in bacterial infections. *Postepy Hig Med Dosw.* 2015;69:398-417.
9. Hus I, Maciąg E, Roliński J. Znaczenie limfocytów Th17 w odporności przeciwnowotworowej. *Postepy Hig Med Dosw.* 2010;64:244-250.
10. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev.* 2008;223(1):87-113. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00628.x
11. Crome SQ, Wang AY, Levings MK. Translational mini-review series on Th17 cells: Function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clin Exp Immunol.* 2010;159(2):109-119. doi:10.1111/j.1365-2249.2009.04037.x
12. Sundrud MS, Trivigno C. Identity crisis of Th17 cells: Many forms, many functions, many questions. *Semin Immunol.* 2013;25(4):263-272.

doi:10.1016/j.smim.2013.10.021

13. Lee YK, Turner H, Maynard CL, et al. Late Developmental Plasticity in the T Helper 17 Lineage. *Immunity*. 2009;30(1):92-107. doi:10.1016/j.immuni.2008.11.005
14. Muranski P, Restifo NP. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood*. 2013;121(13):2402-2414. doi:10.1182/blood-2012-09-378653
15. Guéry L, Hugues S. Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. *Biomed Res Int*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/314620
16. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol*. 2015;16(5):448-457. doi:10.1038/ni.3153
17. Wilkinson AN, Chang K, Kuns RD, et al. IL-6 dysregulation originates in dendritic cells and initiates graft-versus-host disease via classical signaling. *Blood*. October 2019;blood.2019000396. doi:10.1182/blood.2019000396
18. Jordan SC, Choi J, Kim I, et al. Interleukin-6, A Cytokine Critical to Mediation of Inflammation, Autoimmunity and Allograft Rejection. *Transplantation*. 2017;101(1):32-44. doi:10.1097/TP.0000000000001452
19. Heink S, Yogev N, Garbers C, et al. Trans-presentation of interleukin-6 by dendritic cells is required for priming pathogenic T H 17 cells. *Nat Immunol*. 2017;18(1):74-85. doi:10.1038/ni.3632.Trans-presentation
20. Quintana FJ. Old dog , new tricks : IL-6 cluster signaling promotes pathogenic T H 17 cell differentiation. *Nat Publ Gr*. 2017;18(1):8-10. doi:10.1038/ni.3637
21. Jin W, Dong C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerg Microbes Infect*. 2013;2. doi:10.1038/emi.2013.58
22. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27(1):485-517. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132710
23. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. Defining the human T helper 17 cell phenotype. *Trends Immunol*. 2012;33(10):505-512. doi:10.1016/j.it.2012.05.004
24. Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V, et al. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161⁺ CD4⁺ T cell precursor. *J Exp Med*. 2008;205(8):1903-1916. doi:10.1084/jem.20080397

25. Fergusson JR, Fleming VM, Klenerman P. CD161-expressing human T cells. *Front Immunol.* 2011;2(AUG):1-7. doi:10.3389/fimmu.2011.00036
26. Cosmi L, De Palma R, Santarasci V, et al. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J Exp Med.* 2008;205(8):1903-1916. doi:10.1084/jem.20080397
27. Mousset CM, Hobo W, Woestenenk R, Preijers F, Dolstra H, van der Waart AB. Comprehensive Phenotyping of T Cells Using Flow Cytometry. *Cytom Part A.* 2019;95(6):647-654. doi:10.1002/cyto.a.23724
28. Schutyser E, Struyf S, Van Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14(5):409-426. doi:10.1016/S1359-6101(03)00049-2
29. Lee AYS, Phan TK, Hulett MD, Körner H. The relationship between CCR6 and its binding partners: Does the CCR6-CCL20 axis have to be extended? *Cytokine.* 2015;72(1):97-101. doi:10.1016/j.cyto.2014.11.029
30. Ghannam S, Dejous C, Pedretti N, et al. CCL20 and -Defensin-2 Induce Arrest of Human Th17 Cells on Inflamed Endothelium In Vitro under Flow Conditions. *J Immunol.* 2011;186(3):1411-1420. doi:10.4049/jimmunol.1000597
31. Morishima Y, Kashiwase K, Matsuo K, et al. Biological significance of HLA locus matching in unrelated donor bone marrow transplantation. *Blood.* 2015;125(7):1189-1197. doi:10.1182/blood-2014-10-604785.The
32. Furst D, Muller C, Vucinic V, et al. High-resolution HLA matching in hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective collaborative analysis. *Blood.* 2013;122(18):3220-3229. doi:10.1182/blood-2013-02-482547
33. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood.* 2007;110(13):4576-4583. doi:10.1182/blood-2007-06-097386
34. Kekre N, Antin JH. Hematopoietic stem cell transplantation donor sources in the 21st century: choosing the ideal donor when a perfect match does not exist. *Blood.* 2014;124(3):334-343. doi:10.1182/blood-2014-02-514760
35. Gam R, Shah P, Crossland RE, Norden J, Dickinson AM, Dressel R. Genetic Association of Hematopoietic Stem Cell Transplantation Outcome beyond

- Histocompatibility Genes. *Front Immunol.* 2017;8(APR). doi:10.3389/fimmu.2017.00380
36. Gratwohl A, Carreras E. Principles of conditioning. In: *The 2012 Revised Edition of the EBMT-ESH Handbook on Haematopoietic Stem Cell Transplantation.*
 37. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, et al. Defining the Intensity of Conditioning Regimens: Working Definitions. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15(12):1628-1633. doi:10.1016/j.bbmt.2009.07.004
 38. Thymoglobuline CHpl.
 39. Mueller TF. Mechanisms of action of thymoglobulin. *Transplantation.* 2007;84(11 S SUPPL.):5-10. doi:10.1097/01.tp.0000295420.49063.b1
 40. Bonifazi F, Andrea MR, Jan J, Jürgen B. Rabbit ATG / ATLG in preventing graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation : consensus-based recommendations by an international expert panel. *Bone Marrow Transplant.* doi:10.1038/s41409-020-0792-x
 41. Mackall C, Fry T, Gress R, Peggs K, Storek J, Toubert A. Background to hematopoietic cell transplantation, including post transplant immune recovery. *Bone Marrow Transplant.* 2009;44(8):457-462. doi:10.1038/bmt.2009.255
 42. Abrahamsen IW, Sømme S, Heldal D, Egeland T, Kvale D, Tjønnfjord GE. Immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation: The impact of stem cell source and graft-versus-host disease. *Haematologica.* 2005;90(1):86-93.
 43. Seggewiss R, Einsele H, Dc W. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation : an update Review article Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation : an update. *Blood.* 2014;115(19):3861-3868. doi:10.1182/blood-2009-12-234096
 44. Toubert A. Chapter 14: Immune reconstitution after allogeneic HSCT. *EBMT-ESH Handb Haemopoietic Stem Cell Transplant.* 2012:235-245.
 45. Stern L, McGuire H, Avdic S, et al. Mass Cytometry for the assessment of immune reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. *Front Immunol.* 2018;9(JUL). doi:10.3389/fimmu.2018.01672
 46. Goldberg JD, Zheng J, Ratan R, Small TN, Lai KC, Boulad F Castro-Malaspina H,

- Giralt SA, Jakubowski AA, Kernan NA, O'Reilly RJ, Papadopoulos EB, Young JW, van den Brink MR, Heller G3 PM. Early recovery of T-cell function predicts improved survival after T-cell depleted allogeneic transplant. *Leuk Lymphoma*. 2017;58(8):1859-1871.
47. Ogonek J, Juric MK, Ghimire S, et al. Immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Front Immunol*. 2016;7(NOV):1-15. doi:10.3389/fimmu.2016.00507
 48. Glucksberg H, Storb R FA et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*. 1974;18:295-304.
 49. Rowlings PA, Przepiorka D, Klein JP, et al. IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease: Retrospective comparison with Glucksberg grade. *Br J Haematol*. 1997;97(4):855-864. doi:10.1046/j.1365-2141.1997.1112925.x
 50. Loiseau P, Busson M, Balere ML, et al. HLA Association with Hematopoietic Stem Cell Transplantation Outcome: The Number of Mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 Is Strongly Associated with Overall Survival. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13(8):965-974. doi:10.1016/j.bbmt.2007.04.010
 51. Gratwohl A, Ruiz de Elvira C, Gratwohl M, Greinix HT, Duarte R. Gender and Graft-versus-Host Disease after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(6):1145-1146. doi:10.1016/j.bbmt.2016.03.020
 52. Sano H, Hilinski JA, Qayed M, et al. Early blood stream infection following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is a risk factor for acute grade III–IV GVHD in children and adolescents. *Pediatr Blood Cancer*. 2018;65(2):1-6. doi:10.1002/pbc.26821
 53. Flowers MED, Inamoto Y, Carpenter PA, et al. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood*. 2011;117(11):3214-3219. doi:10.1182/blood-2010-08-302109
 54. Holler E, Butzhammer P, Schmid K, et al. Metagenomic Analysis of the Stool Microbiome in Patients Receiving Allogeneic Stem Cell Transplantation: Loss of

- Diversity Is Associated with Use of Systemic Antibiotics and More Pronounced in Gastrointestinal Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20(5):640-645. doi:10.1016/j.bbmt.2014.01.030
55. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet (London, England).* 2009;373(9674):1550-1561. doi:10.1016/S0140-6736(09)60237-3
 56. Blazar B., Murphy W. AM. Advances in Graft versus host disease biology and Therapy. *Nat Rev Immunol.* 2013;12(6):443-458. doi:10.1038/nri3212.Advances
 57. Paczesny S, Hanauer D, Sun Y, Reddy P. New perspectives on the biology of acute GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 2010;45(1):1-11. doi:10.1038/bmt.2009.328
 58. Sung AD, Chao NJ. Concise Review: Acute Graft-Versus-Host Disease: Immunobiology, Prevention, and Treatment. *Stem Cells Transl Med.* 2013;2(1):25-32. doi:10.5966/sctm.2012-0115
 59. Iclozan C, Yu Y, Liu C, et al. T helper17 Cells Are Sufficient But Not Necessary to Induce Acute Graft-Versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16(2):170-178. doi:10.1016/j.bbmt.2009.09.023
 60. Yi T, Zhao D, Lin C-L, et al. Absence of donor Th17 leads to augmented Th1 differentiation and exacerbated acute graft-versus-host disease. *Blood.* 2008;112(5):2101-2110. doi:10.1182/blood-2007-12-126987
 61. Carlson MJ, West ML, Coghill JM, Panoskaltis-mortari A, Blazar BR, Serody JS. disease with severe cutaneous and pulmonary pathology In vitro differentiated TH17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathology. *In Vitro.* 2008;113(6):1365-1375. doi:10.1182/blood-2008-06-162420
 62. Ito R, Katano I, Otsuka I, et al. Exacerbation of pathogenic Th17-cell-mediated cutaneous graft-versus-host-disease in human IL-1 β and IL-23 transgenic humanized mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;516(2):480-485. doi:10.1016/j.bbrc.2019.06.094
 63. Wu Y, Yu X-Z. IL-17A \neq Th17 in GvHD. *Cell Mol Immunol.* 2018;15(3):282-283. doi:10.1038/cmi.2016.54

64. Gołąb, Jakóbsiak, Lasek S. Gołąb Jakóbsiak Lasek Stokłosa - Immunologia. Nowe wydanie. wyd 6.pdf. 2016.
65. Ratajczak P, Janin A, Latour RP De, et al. Th17 / Treg ratio in human graft-versus-host disease. *Blood*. 2010;116(7):1-3. doi:10.1182/blood-2009-12-255810.
66. Malard F, Bossard C, Brissot E, et al. Increased Th17/Treg ratio in chronic liver GVHD. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49(4):539-544. doi:10.1038/bmt.2013.215
67. T.W. K, S.-E. L, J.-Y. L, et al. Clinical significance of pre-transplant circulating CD3+CD4+CD161+ cell frequency on the occurrence of neutropenic infections after allogeneic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis*. 2017;19(1):1-8. doi:10.1111/tid.12643
68. Freifeld AG, Bow EJ, Sepkowitz KA, et al. Clinical Practice Guideline for the Use of Antimicrobial Agents in Neutropenic Patients with Cancer: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2011;52(4):e56-e93. doi:10.1093/cid/cir073
69. Routy B, Letendre C, Enot D, et al. The influence of gut-decontamination prophylactic antibiotics on acute graft-versus-host disease and survival following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Oncoimmunology*. 2017;6(1):1-8. doi:10.1080/2162402X.2016.1258506
70. Weber D, Oefner PJ, Dettmer K, et al. Rifaximin preserves intestinal microbiota balance in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2016;51(8):1087-1092. doi:10.1038/bmt.2016.66
71. Taur Y, Jenq RR, Perales MA, et al. The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2014;124(7):1174-1182. doi:10.1182/blood-2014-02-554725
72. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, et al. Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. *Cell*. 2009;139(3):485-498. doi:10.1016/j.cell.2009.09.033
73. Omenetti S, Pizarro TT. The Treg/Th17 axis: A dynamic balance regulated by the gut microbiome. *Front Immunol*. 2015;6(DEC). doi:10.3389/fimmu.2015.00639

74. Duarte RF, Lyon S. Novel approaches to CMV after HCT: report from the 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Vienna, Austria, 22–25 April 2017. *Futur Sci OA*. 2018;4(5):FSO296. doi:10.4155/fsoa-2018-0013
75. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40 000 transplants annually. *Bone Marrow Transplant*. 2016;51(6):786-792. doi:10.1038/bmt.2016.20
76. Pasquini M, Wang Z, Horowitz MM GR. 2013 report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR): current uses and outcomes of hematopoietic cell transplants for blood and bone marrow disorders. *Clin Transpl*. 2013:187-197.
77. Paczesny S, Raiker N, Brooks S, Mumaw C. Graft-versus-host disease biomarkers: Omics and personalized medicine. *Int J Hematol*. 2013;98(3):275-292. doi:10.1007/s12185-013-1406-9
78. Sorrenti V, Marena B, Fortinguerra S, et al. Reference Values for a Panel of Cytokinergic and Regulatory Lymphocyte Subpopulations. *Immune Netw*. 2016;16(6):344-357. doi:10.4110/in.2016.16.6.344
79. Holcar M, Goropevšek A, Ihan A, Avčin T. Age-Related Differences in Percentages of Regulatory and Effector T Lymphocytes and Their Subsets in Healthy Individuals and Characteristic STAT1/STAT5 Signalling Response in Helper T Lymphocytes. *J Immunol Res*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/352934
80. Heining C, Spyridonidis A, Bernhardt E, et al. Lymphocyte reconstitution following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A retrospective study including 148 patients. *Bone Marrow Transplant*. 2007;39(10):613-622. doi:10.1038/sj.bmt.1705648
81. Bosch M, Dhadda M, Hoegh-Petersen M, et al. Immune reconstitution after anti-thymocyte globulin-conditioned hematopoietic cell transplantation. *Cytotherapy*. 2012;14(10):1258-1275. doi:10.3109/14653249.2012.715243
82. Fehse N, Fehse B, Kroger N, et al. Influence of anti-thymocyte globulin as part of the conditioning regimen on immune reconstitution following matched related bone marrow transplantation. *J Hematother Stem Cell Res*. 2003;12(2):237-242.

doi:10.1089/152581603321628377

83. Na I, Wittenbecher F, Dziubianau M, et al. Rabbit antithymocyte globulin (Thymoglobulin[®]) impairs the thymic out- put of both conventional and regulatory CD4 T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adult patients. *Hematologica*. 2013;98(1):23-30. doi:10.3324/haematol.2012.067611
84. Feng X, Kajigaya S, Solomou EE, et al. Rabbit ATG but not horse ATG promotes expansion of functional CD4+CD25highFOXP3+regulatory T cells in vitro. *Blood*. 2008;111(7):3675-3683. doi:10.1182/blood-2008-01-130146
85. Jenkinson WE, Mccarthy NI, Dutton EE, et al. Natural Th17 cells are critically regulated by functional medullary thymic microenvironments. *J Autoimmun*. 2015;63:13-22. doi:10.1016/j.jaut.2015.06.008
86. Bahr F, Wehner R, Platzbecker U, et al. Reconstitution of Interleukin-17-Producing T Helper Cells after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19(3):357-365. doi:10.1016/j.bbmt.2012.11.018
87. Kielsen K, Ryder LP, Lennox-hvenekilde D, et al. Immunobiology Reconstitution of Th17 , Tc17 and Treg cells after paediatric haematopoietic stem cell transplantation : Impact of interleukin-7. *Immunobiology*. 2018;223(2):220-226. doi:10.1016/j.imbio.2017.10.023
88. Dunay A, Ilona T, Eberhard JM, et al. Parallel Assessment of Th17 Cell Frequencies by Surface Marker Co-Expression Versus Ex Vivo IL-17 Production in HIV-1 Infection. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2016;492(November 2015):486-492. doi:10.1002/cyto.b.21352
89. Seggewiss R, Einsele H, Dc W. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation : an update Review article Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation : an update. *Blood*. 2014;115(19):3861-3868. doi:10.1182/blood-2009-12-234096
90. Torelli GF, Lucarelli B, Iori AP, et al. The immune reconstitution after an allogeneic stem cell transplant correlates with the risk of graft-versus-host

- disease and cytomegalovirus infection. *Leuk Res.* 2011;35(8):1124-1126. doi:10.1016/j.leukres.2011.03.009
91. Hattori N, Saito B, Sasaki Y, et al. Status of Natural Killer Cell Recovery in Day 21 Bone Marrow after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Predicts Clinical Outcome. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2018;24(9):1841-1847. doi:10.1016/j.bbmt.2018.05.007
 92. Drylewicz J, Schellens IMM, Gaiser R, et al. Rapid reconstitution of CD4 T cells and NK cells protects against CMV-reactivation after allogeneic stem cell transplantation. *J Transl Med.* 2016;14(1):230. doi:10.1186/s12967-016-0988-4
 93. Mehta RS, Rezvani K. Immune reconstitution post allogeneic transplant and the impact of immune recovery on the risk of infection. *Virulence.* 2016;7(8):901-916. doi:10.1080/21505594.2016.1208866
 94. Abousamra NK, Salah El-Din M, Helal R. Prognostic value of Th17 cells in acute leukemia. *Med Oncol.* 2013;30(4). doi:10.1007/s12032-013-0732-3
 95. Wu C, Wang S, Wang F, et al. Increased frequencies of T helper type 17 cells in the peripheral blood of patients with acute myeloid leukaemia. *Clin Exp Immunol.* 2009;158(2):199-204. doi:10.1111/j.1365-2249.2009.04011.x
 96. Musuraca G, Matteis S De, Napolitano R, et al. IL - 17 / IL - 10 double - producing T cells : new link between infections , immunosuppression and acute myeloid leukemia. *J Transl Med.* 2015;13(229):1-10. doi:10.1186/s12967-015-0590-1
 97. Han Y, Ye A, Bi L, Wu J, Yu K, Zhang S. Th17 cells and interleukin-17 increase with poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer Sci.* 2014;105(8):933-942. doi:10.1111/cas.12459
 98. Bi L, Wu J, Ye A, et al. Increased Th17 cells and IL - 17A exist in patients with B cell acute lymphoblastic leukemia and promote proliferation and resistance to daunorubicin through activation of Akt signaling. *J Transl Med.* 2016:1-11. doi:10.1186/s12967-016-0894-9
 99. Ersvaer E, Liseth K, Skavland J, Gjertsen BT, Bruserud Ø. Intensive chemotherapy for acute myeloid leukemia differentially affects circulating TC1, TH1, TH17 and TREGcells. *BMC Immunol.* 2010;11. doi:10.1186/1471-2172-11-38
 100. Ouyang W, Kolls J, Zheng Y. The biological functions of Th17 cell effector

- cytokines in inflammation. *Immunity*. 2012;28(4):454-467. doi:10.1016/j.immuni.2008.03.004.The
101. Lee S, Lim J, Ryu D, et al. Circulating CD3+CD4+CD161+ Cells Are Associated with Early Complications after Autologous Stem Cell Transplantation in Multiple Myeloma. *Biomed Res Int*. 2018;2018. doi:https://doi.org/10.1155/2018/5097325
 102. Sadowska-Klasa A, Piekarska A, Prejzner W, Bieniaszewska M, Hellmann A. Colonization with multidrug-resistant bacteria increases the risk of complications and a fatal outcome after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Ann Hematol*. 2018;97(3). doi:10.1007/s00277-017-3205-5
 103. Bilinski J, Robak K, Peric Z, et al. Impact of Gut Colonization by Antibiotic-Resistant Bacteria on the Outcomes of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Retrospective, Single-Center Study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(6):1087-1093. doi:10.1016/j.bbmt.2016.02.009
 104. Atarashi K, Tanoue T, Ando M, et al. Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. *Cell*. 2015;163(2):367-380. doi:10.1016/j.cell.2015.08.058
 105. Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, et al. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*. 2013;500(7461):232-236. doi:10.1038/nature12331
 106. J Magarian Blander , Miriam B Torchinsky LC. Revisiting the old link between infection and autoimmune disease with commensals and T helper 17 cells. *Immunol Res*. 2012;(54):50-68. doi:10.1007/s12026-012-8311-9
 107. Campisi L, Barbet G, Ding Y, et al. Apoptosis in response to microbial infection induces autoreactive TH17 cells. *Nat Immunol*. 2016;17(9):1084-1092. doi:https://doi.org/10.1038/ni.3512
 108. Mangoldt TC, Van Herck MA, Nullens S, et al. The role of Th17 and Treg responses in the pathogenesis of RSV infection. *Pediatr Res*. 2015;78(5):483-491. doi:10.1038/pr.2015.143
 109. Wan Z, Zhou Z. Regulatory T cells and T helper 17 cells in viral infection. 2020;(October 2019):1-14. doi:10.1111/sji.12873

110. Su R, Li Z, Wang Y, et al. Imbalance between Th17 and regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus combined EBV/CMV viraemia [published online ahead of print, 2019 Nov 20]. *Clin Exp Rheumatol*. 2019;
111. van der Waart AB, van der Velden WJFM, van Halteren AGS, et al. Decreased Levels of Circulating IL17-Producing CD161+CCR6+ T Cells Are Associated with Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *PLoS One*. 2012;7(12):1-13. doi:10.1371/journal.pone.0050896
112. Bossard C, Malard F, Arbez J, et al. Plasmacytoid dendritic cells and Th17 immune response contribution in gastrointestinal acute graft-versus-host disease. *Leukemia*. 2012;26(7):1471-1474. doi:10.1038/leu.2012.41
113. Cai Y, Ma S, Liu Y, et al. Adoptively transferred donor IL-17-producing CD4+ T cells augment, but IL-17 alleviates, acute graft-versus-host disease. *Cell Mol Immunol*. 2018;15(3):233-245. doi:10.1038/cmi.2016.37
114. Zaucha JM, Gooley T, Bensinger WI, et al. CD34 cell dose in granulocyte colony-stimulating factor – mobilized peripheral blood mononuclear cell grafts affects engraftment kinetics and development of extensive chronic graft-versus-host disease after human leukocyte antigen – identical sibling tran. *Blood*. 2001;98(12):3221-3228. doi:10.1182/blood.v98.12.3221.
115. Czerw T, Labopin M, Schmid C, et al. High CD3+ and CD34+ peripheral blood stem cell grafts content is associated with increased risk of graft-versus-host disease without beneficial effect on disease control after reduced-intensity conditioning allogeneic transplantation from matched unrelated. *Oncotarget*. 2016;7(19):27255-27266. doi:10.18632/oncotarget.8463
116. Svenberg P, Wang T, Uhlin M, et al. The importance of graft cell composition in outcome after allogeneic stem cell transplantation in patients with malignant disease. *Clin Transplant*. 2019;(March):1-9. doi:10.1111/ctr.13537
117. Trzonkowski P, Zaucha JM, My J, et al. Differences in Kinetics of Donor Lymphoid Cells in Response to G-CSF Administration May Affect the Incidence and Severity of Acute GvHD in Respective HLA-Identical Sibling Recipients. *Med*. 2004;21(1):81-93.
118. Stikvoort A, Gaballa A, Solders M, et al. Risk Factors for Severe Acute Graft-

- versus-Host Disease in Donor Graft Composition. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018;24(3):467-477. doi:10.1016/j.bbmt.2017.11.026
119. Sairafi D, Stikvoort A, Gertow J, Mattsson J, Uhlin M. Donor Cell Composition and Reactivity Predict Risk of Acute Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J Immunol Res*. 2016;2016. doi:10.1155/2016/5601204
120. Fisher SA, Lamikanra A, Dorée C, et al. Increased regulatory T cell graft content is associated with improved outcome in haematopoietic stem cell transplantation: a systematic review. *Br J Haematol*. 2017;176(3):448-463. doi:10.1111/bjh.14433