

Agnieszka Piekarska

**Wpływ rekonstytucji immunologicznej
na kształtowanie się odporności
przeciwzakaźnej u chorych po
przeszczepieniach allogenicznych
komórek macierzystych hematopoezy**

rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Praca wykonana w Katedrze i Klinice Hematologii
i Transplantologii Akademii Medycznej w Gdańsku

Promotor: **Prof. dr hab. med. Andrzej Hellmann**



Akademia Medyczna w Gdańsku

2008

Praca finansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego
(grant promotorski 2 P05B 080 26)

WYKAZ SKRÓTÓW

Ag – antygen

aGvHD – ang. acute Graft-versus-Host Disease – ostra choroba przeszczep przeciw gospodarzowi

ALL – ang. acute lymphoblastic leukemia – ostra białaczka limfoblastyczna

AML – ang. acute myeloid leukemia – ostra białaczka szpikowa

ANC – ang. absolute neutrophil count – bezwzględna liczba neutrocytów

antyHBs – przeciwciała przeciwko antygenowi HBs wirusa HBV

APC – ang. antigen presenting cell – komórka prezentująca antygen

ASBMT – ang. American Society of Blood and Marrow Transplantation – Amerykańskie Towarzystwo Przeszczepiania Krwi i Szpiku

BDO – grupa pacjentów bardzo dobrze odpowiadających na szczepienie rHBsAg

BM – ang. bone marrow – szpik kostny

BuCy120 – busulfan/cyklofosfamid – schemat chemioterapii stosowanej przed przeszczepieniem komórek hematopoetycznych

CC – ang. complete chimerism – całkowity chimeryzm hematopoetyczny

CCR – ang. chemokine receptor - receptor chemokinowy

CD – ang. cluster of differentiation - cząsteczki występujące na powierzchni komórek świadczące o ich zróżnicowaniu i funkcjach (numerowane cyframi arabskimi)

CEL – ang. chronic eosinophilic leukemia – przewlekła białaczka eozynofilowa

cGvHD – ang. chronic Graft-versus-Host Disease – przewlekła choroba przeszczep przeciw gospodarzowi

CML – ang. chronic myeloid leukemia – przewlekła białaczka szpikowa

CsA – cyklosporyna A

Cy – cyklofosfamid

DLI – ang. donor lymphocytes infusion – przetoczenie limfocytów dawcy

DO – grupa pacjentów dobrze odpowiadających na szczepienie rHBsAg

EBMT – ang. European Group for Blood and Marrow Transplantation - Europejska Grupa ds. Przeszczepiania Krwi i Szpiku

G-CSF – ang. granulocyte colony-stimulating factor – czynnik pobudzający wzrost kolonii granulocytarnych; granulocytarny czynnik wzrostu

GvHD – ang. Graft-versus-Host Disease – choroba przeszczep przeciw gospodarzowi

GvL – ang. Graft-versus-Leukemia – efekt immunologiczny przeszczepu allogenicznego przeciw komórkom białaczkowym

GvT – ang. Graft-versus-Tumor – efekt immunologiczny przeszczepu allogenicznego przeciw komórkom nowotworowym

HCT – ang. (allogeneic) hematopoietic cell transplantation - (allogeniczne) przeszczepienie komórek hematopoetycznych

Hib – szczepionka / szczepienie przeciwko Haemophilus influenzae typu B

IFN γ - interferon - γ

Ig – immunoglobulina

IL – interleukina (rodzaje cytokin; numerowane cyframi arabskimi)

IPV – ang. intramuscular polio vaccine – domięśniowa szczepionka przeciwko wirusowi polio

MC – ang. mixed chimerism – mieszny chimeryzm hematopoetyczny

MDS – ang. myelodysplastic syndrome – zespół mielodysplastyczny

MHC – ang. major histocompatibility complex – główny układ zgodności tkankowej

MTX – metotreksat

MUD - ang. matched unrelated donor – dawca niespokrewniony zgodny z biorcą

NK – ang. natural killers – subpopulacja limfocytów wykazująca naturalną cytotoksyczność

PNH – ang. paroxysmal nocturnal hemoglobinuria – nocna napadowa hemoglobinuria

PBSC – ang. peripheral blood stem cells – komórki hematopoetyczne z krwi obwodowej

PBMC – ang. peripheral blood mononuclear cells – jednojądrzaste komórki krwi obwodowej

PMA - ang. phorbol 12-myristate 13-acetate – octan mirystynianu forbolu; estry forbolu używane do aktywacji 'in vitro' komórek jednojądrzastych

Pneumo - szczepionka przeciwko *Streptococcus pneumoniae*

RD – ang. related donor - dawca spokrewniony (rodzinny)

rHBsAg - rekombinowany antygen HBs (szczepionka przeciwko WZW B)

SO – grupa pacjentów słabo odpowiadających na szczepienie rHBsAg

TBI – ang. total body irradiation - naświetlanie całego ciała jako przygotowanie do przeszczepienia komórek hematopoetycznych

Tc – ang. cytotoxic T – limfocyty T cytotoksyczne

TCR – ang. T-cell receptor – receptor na powierzchni limfocyta T

Tcm – ang. T-cell central memory – limfocyty T spełniające funkcje tzw. pamięci centralnej

Td – ang. tetanus/diphtheria - szczepionka przeciwko tężcowi i błonicy

Tem – ang. T-cell effector memory – limfocyty T spełniające funkcje tzw. pamięci efektorowej

Th – ang. helper T – limfocyty T pomocnicze

TREC – ang. T-cell receptor rearrangement excision DNA circles – fragmenty DNA kodujące receptor limfocyta T

WZW B – wirusowe zapalenie wątroby typu B wywołane przez wirus HBV; szczepienie przeciw wirusowemu zapaleniu wątroby typu B

SPIS TREŚCI

1	WSTĘP	10
1.1	Procedura allogenicznego przeszczepienia komórek układu krwiotwórczego - wiadomości ogólne	10
1.2	Rekonstrukcja immunologiczna a zaburzenia odporności.....	11
1.2.1	Wiadomości ogólne	11
1.2.2	Odporność humoralna	12
1.2.3	Odporność komórkowa	14
1.2.4	Zaburzenia odporności związane z cGvHD	15
1.3	Pamięć immunologiczna a zjawisko adoptywnego transferu odporności	17
1.4	Znaczenie regulacyjne cytokin	20
1.5	Profilaktyka przeciwwirusowa.....	22
2	CEL PRACY	24
3	MATERIAŁ I METODY	25
3.1	Badani chorzy	25
3.1.1	Ocena rekonstrukcji immunologicznej.....	27
3.1.2	Choroba przeszczep przeciw gospodarzowi.....	28
3.1.3	Kryteria włączenia do programu szczepień ochronnych po HCT	31
3.1.4	Kalendarz szczepień ochronnych.....	31
3.1.5	Kryteria odpowiedzi na immunizację rHBsAg	33
3.2	Metody badań	35
3.2.1	Ocena subpopulacji leukocytów krwi obwodowej	35
3.2.2	Ocena wewnątrzkomórkowej ekspresji cytokin profilu Th1 i Th2.....	37
3.3	Analiza statystyczna	40
4	WYNIKI	41
4.1	Ocena rekonstrukcji immunologicznej po HCT	41
4.1.1	Wybrane parametry morfologii krwi obwodowej.....	41
4.1.2	Wybrane parametry białkowe.....	44
4.2	Porównanie parametrów rekonstrukcji immunologicznej po HCT w grupie wczesnej i późnej.....	49
4.2.1	Informacje ogólne o grupie wczesnej i późnej	49
4.2.2	Subpopulacje limfocytów	52
4.2.3	Cytokiny Th1 i Th2	59
4.3	Charakterystyka odpowiedzi na immunizację czynną	63
4.3.1	Tempo zanikania przeciwciał antyHBs po HCT	63
4.3.2	Podział na grupy SO, DO, BDO; ilość dawek rHBsAg w poszczególnych grupach	67
4.3.3	Zależność między parametrami rekonstrukcji immunologicznej oraz czynnikami zależnymi od biorcy i dawcy a odpowiedzią na immunizację rHBsAg.....	71
5	OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA	80
5.1	Rekonstrukcja immunologiczna po HCT.....	80
5.1.1	Odporność humoralna i komórkowa.....	81
5.1.2	Profil cytokin Th1/Th2.....	85
5.2	Szczepienia ochronne po HCT	88
5.2.1	Czynniki decydujące o odpowiedzi na szczepienie.....	88
5.2.2	Propozycja nowego kalendarza szczepień ochronnych po HCT	94
6	WNIOSKI	98
7	STRESZCZENIE	100

8	SUMMARY	102
9	PIŚMIENICTWO	104

SPIS TABEL

Tabela 1 Charakterystyka dawców i biorców	27
Tabela 2 Stopniowanie ostrej choroby przeszczep przeciw gospodarzowi	28
Tabela 3 Zaawansowanie aGvHD	28
Tabela 4 Oryginalna i zmodyfikowana klasyfikacja Seattle cGvHD	29
Tabela 5 Kategorie ostrej i przewlekłej choroby przeszczep przeciw gospodarzowi (ASBMT 2005)	31
Tabela 6 Kalendarz szczepień ochronnych - stosowany formularz	32
Tabela 7 Charakterystyka szczepionek	33
Tabela 8 Charakterystyka przeciwciał użytych w badaniu ekspresji antygenów powierzchniowych	37
Tabela 9 Charakterystyka przeciwciał użytych do detekcji wewnątrzcytoplazmatycznej cytokin	39
Tabela 10 Charakterystyka grupy wczesnej i późnej pod względem liczebności, rozkładu płci i czasu oraz podstawowych laboratoryjnych parametrów immunologicznych	50
Tabela 11 Porównanie wyników immunofenotypizacji subpopulacji limfocytów B w grupie wczesnej i późnej	55
Tabela 12 Porównanie wyników immunofenotypizacji subpopulacji limfocytów T w grupie wczesnej i późnej	57
Tabela 13 Porównanie ekspresji wewnątrzcytoplazmatycznej cytokin Th1 w grupie wczesnej i późnej	61
Tabela 14 Porównanie ekspresji wewnątrzcytoplazmatycznej cytokin Th2 w grupie wczesnej i późnej	63
Tabela 15 Kalendarz szczepień ochronnych dla pacjentów po HCT (projekt nowego formularza)	97

SPIS RYCIN

Rycina 1 Bezwzględna wartość neutrocytów (ANC) w 100 dobie, 180 dobie, 1 rok, 2 lata, 3 lata po HCT	42
Rycina 2 Liczba limfocytów w 100 dobie, 180 dobie, 1 rok, 2 lata, 3 lata po HCT	43
Rycina 3 Odsetek α -globulin w 100 dobie, 180 dobie, 1 rok, 2 lata, 3 lata po HCT.....	45
Rycina 4 Stężenie immunoglobuliny IgG w 100 dobie, 180 dobie, 1 rok, 2 lata, 3 lata po HCT	46
Rycina 5 Wykres obrazujący zmienność stężenia immunoglobuliny IgM w 100 dobie, 180 dobie, 1 rok, 2 lata, 3 lata po HCT	47
Rycina 6 Stężenie immunoglobuliny IgA w 100 dobie, 180 dobie, 1 rok, 2 lata, 3 lata po HCT.	48
Rycina 7 Stopnie zaawansowania cGvHD (według klasyfikacji ASBMT) w badanej grupie	51
Rycina 8 Porównanie częstości występowania podtypów cGvHD w grupie wczesnej i późnej .	52
Rycina 9 Cytogramy przedstawiające subpopulacje limfocytów CD19 z zależności od obecności receptora immunoglobulinowego: IgM (A), IgD (B), IgG (C).....	53
Rycina 10 Przykładowe cytogramy przedstawiające w bramce komórek CD19+ ekspresję antygeny CD27 wśród limfocytów B posiadających na powierzchni receptory immunoglobulinowe IgM (A), IgD (B), IgG (C)	54
Rycina 11 Przykładowe cytogramy przedstawiające subpopulacje limfocytów T w zależności od ekspresji antygenów CD4 i CD8	56
Rycina 12 Przykładowe cytogramy obrazujące subpopulacje limfocytów T w zależności od ekspresji izoformy RA i RO antygeny CD45	58
Rycina 13 Przykładowe cytogramy przedstawiające ekspresję wewnątrzcytoplazmatyczną cytokin Th1	60
Rycina 14 Przykładowe cytogramy obrazujące ekspresję cytokin Th2	62
Rycina 15 Wykrywalność przeciwciał antiHBs (miano>1mUI/ml) w okresie 1 roku po HCT	66
Rycina 16 Występowanie przeciwciał antiHBs w mianie 10-100mUI/ml w okresie 1 roku po HCT	66
Rycina 17 Stopniowy spadek ilości pacjentów z mianem antiHBs>100mUI/ml w okresie 1 roku po HCT	67
Rycina 18 Podział na grupy SO,BO,BDO w zależności od odpowiedzi na immunizację rHBsAg	68
Rycina 19 Ilość dawek szczepionki potrzebna do uzyskania miana antiHBs 10-100 mUI/ml w poszczególnych grupach (SO, DO i BDO)	69
Rycina 20 Rozkład dawek szczepionki podanych do uzyskania miana>100 mUI/ml w poszczególnych grupach (SO, DO, BDO).....	70

Rycina 21 Różnice w odpowiedzi na immunizację w zależności od ilości komórek CD4+CD45RA+	71
Rycina 22 Zmiana ilości bezwzględnej komórek naiwnych CD4+ w trakcie programu szczepień	72
Rycina 23 Zmiana ilości bezwzględnej komórek pamięci immunologicznej CD4+ w trakcie programu szczepień	73
Rycina 24 Kształtowanie się odsetka limfocytów T CD8-IL4+ w trakcie programu szczepień ochronnych	74
Rycina 25 Kształtowanie się odsetka limfocytów T CD8-IL2+ w trakcie programu szczepień ochronnych	75
Rycina 26 Kształtowanie się stosunku Th1/Th2 w trakcie programu szczepień ochronnych w trzech grupach odpowiedzi na rHBsAg.	76
Rycina 27 Występowanie poszczególnych postaci cGvHD w grupach SO, DO, BDO	77
Rycina 28 Wpływ szczepienia dawcy rHBsAg przed HCT na wynik immunizacji biorcy po transplantacji	78
Rysunek 29 Różnice w odpowiedzi na szczepienie rHBsAg u pacjentów, u których wystąpiło zjawisko adoptywnego transferu i u pozostałych pacjentów	79

1 WSTĘP

1.1 Procedura allogenicznej transplantacji komórek układu krwiotwórczego - wiadomości ogólne

Allogeniczne przeszczepienie komórek hematopoetycznych (Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation – alloHCT; HCT) jest skomplikowaną metodą leczniczą polegającą, w ogólnym zarysie, na zastąpieniu układu krwiotwórczego biorcy przez komórki pochodzące od dawcy. Procedura ta znalazła zastosowanie w terapii chorób rozrostowych układu krwiotwórczego, nabytych zespołów niewydolności szpiku oraz wrodzonych defektów immunologicznych i metabolicznych. Wraz z rozwojem wiedzy o zjawiskach immunologicznych i powikłaniach infekcyjnych związanych z transplantacją oraz postępem w ich zapobieganiu i leczeniu, rezultaty HCT znacznie się poprawiły, dając wielu pacjentom szansę na wyleczenie (1-4). Tradycyjne protokoły kondycjonowania (postępowania przygotowującego do przeszczepienia) opierają się na chemioterapii lub radio-chemioterapii w wysokich dawkach w celu zniszczenia komórek nowotworowych, stworzenia tzw. niszy w szpiku dla komórek krwiotwórczych dawcy i przeciwdziałania odrzuceniu przeszczepu. W przypadku chorób nienowotworowych przebiegających z niewydolnością szpiku, efekt terapeutyczny transplantacji wynika z prostego zastąpienia defektywnej hematopoezy ‘zdrową’. Natomiast w przypadku chorób rozrostowych, procedura ta z jednej strony pozwala na podanie mielotoksycznej dawki chemioterapii i radioterapii, a dodatkowo wywiera efekt przeciwnowotworowy o podłożu immunologicznym (Graft-versus-Leukemia – GvL; Graft-versus-Tumor – GvT) z udziałem pochodzących od dawcy limfocytów T i NK (ang. natural killers), który jest korzystnym aspektem reakcji przeszczep przeciw gospodarzowi (Graft-versus-Host Disease – GvHD) (3;5-8). Zamiana hematopoezy biorcy komórkami pochodzącymi od dawcy nosi nazwę całkowitego (pełnego) chimeryzmu hematopoetycznego (complete chimerism – CC).

W ostatnich latach znalazły zastosowanie zabiegi HCT z niemieloablacyjnym kondycjonowaniem, z większym natomiast udziałem postępowania immunoablacyjnego, które zapobiega odrzuceniu przeszczepu. W tej procedurze mamy częściej do czynienia z mieszanym chimeryzmem (mixed chimerism – MC),

czyli utrzymywaniem się jednocześnie hematopoezy dawcy i biorcy. Uzyskanie statusu CC i tym samym zmniejszenie ryzyka wznowy dzięki GvL/GvT wymaga tu dodatkowo przetoczenia limfocytów dawcy (donor lymphocytes infusion – DLI) (9;10). Niewątpliwą zaletą tej obciążonej mniejszą toksycznością procedury jest możliwość wykonania HCT w starszej grupie wiekowej i u osób ze współistniejącymi chorobami przewlekłymi (11-13).

Zasadniczym źródłem przeszczepianych od dawcy komórek hematopoetycznych jest krew szpikowa (bone marrow – BM) lub komórki progenitorowe, pobrane z krwi obwodowej po stymulacji czynnikami wzrostu (peripheral blood stem cells – PBSC). U osób dorosłych alternatywa, jaką jest krew pępowinowa, ma dotąd mniejsze znaczenie ze względu na zazwyczaj niewystarczającą ilość komórek progenitorowych (3;14;15).

Pomimo niewątpliwego postępu w dziedzinie transplantologii nadal obserwujemy niepowodzenia zarówno we wczesnym (do 100 doby po HCT), jak i późnym okresie po przeszczepieniu. Początkowo dominują powikłania związane z toksycznością kondycjonowania, aplazją szpiku (infekcyjne, krwotoczne) oraz ostrą postacią GvHD (acute GvHD – aGvHD). Powyżej 100 doby po HCT musimy się liczyć z możliwością wystąpienia przewlekłej postaci GvHD (chronic GvHD – cGvHD), infekcjami oportunistycznymi, wznową choroby zasadniczej, a także rozwojem wtórnych nowotworów (16-19). Jednak dalszy rozwój stanu wiedzy i stosowanie terapii wspomagających może w przyszłości zminimalizować ryzyko procedury dla pacjentów zakwalifikowanych do HCT (7).

1.2 Rekonstytucja immunologiczna a zaburzenia odporności

1.2.1 Wiadomości ogólne

U pacjentów poddanych HCT z powodu schorzeń hematologicznych przez długi czas obserwuje się zaburzenia jakościowe i ilościowe układu immunologicznego. Deficyty odporności humoralnej i komórkowej utrzymują się co najmniej rok. Ocena statusu układu odpornościowego pacjenta po HCT ma ogromne znaczenie ze względu na jego związek z ryzykiem wystąpienia ciężkich powikłań infekcyjnych (19).

Okres po przeszczepieniu dzieli się na kolejne fazy rekonstytucji immunologicznej, powiązane z zagrożeniem ze strony określonych patogenów. Po ekspozycji na chemioterapię/chemio-radioterapię (kondycjonowanie) dochodzi do aplazji szpiku i zazwyczaj po około 3 tygodniach od podania materiału

przeszczepowego obserwuje się stopniowy wzrost parametrów hematologicznych. Infekcje, na które zapadają pacjenci w 1 miesiącu po transplantacji (faza ‘przed wszczepieniem’ – ang. preengraftment), wynikają głównie z agranulocytozy i zaburzeń fagocytozy, przy uszkodzonej przez kondycjonowanie barierze skórno-słuzówkowej oraz stosowania centralnych wkłuc żylnych. Zagrożają zakażenia bakteryjne, grzybicze (głównie kandydoza i aspergilloza) oraz wirusowe (HSV). W okresie >30 doby po HCT (faza ‘po wszczepieniu’ – ang. postengraftment), przy braku cech aGvHD, funkcje cytotoksyczne i zdolność do fagocytozy wracają do normy (zazwyczaj około 100 doby po przeszczepieniu). Ilość komórek NK we krwi 2-3 miesiące po transplantacji u większości pacjentów jest prawidłowa, a nawet może być podwyższona. Dominują natomiast komplikacje wtórne do niedoborów swoistej odporności komórkowej, nasilanych przez stosowaną w tym okresie immunosupresję: reaktywacja cytomegalowirusa (CMV) i innych wirusów z grupy Herpesviridae, infekcje wywołane przez *Pneumocystis carinii*, *Toxoplasma gondii* i grzyby (głównie *Aspergillus*).

W fazie późniejszej (>100 doby po HCT) o statusie immunologicznym pacjenta decyduje tempo rekonstrukcji limfoidalnej B- i T-komórkowej oraz rozwój cGvHD. Od tych czynników zależy realne ryzyko związane z wirusami (CMV, VZV, EBV), bakteriami otoczkowymi (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*), grzybami (*Aspergillus*) i innymi patogenami. Przyjmuje się, że pełnej odnowy układu odpornościowego można oczekiwać najwcześniej po 1 – 2 latach po transplantacji (18).

1.2.2 Odporność humoralna

Zaburzenia odporności humoralnej mogą utrzymywać się co najmniej 1-2 lata po HCT. Bezwzględna ilość limfocytów B we krwi, identyfikowanych metodą cytometrii przepływowej dzięki obecności na ich powierzchni cząsteczki CD19 (ang. cluster of differentiation), staje się porównywalna do populacji ludzi zdrowych około roku po przeszczepieniu. Podobnie całkowite stężenie immunoglobulin (Ig) klasy IgM oraz podklas IgG1 i IgG3 u większości pacjentów wraca do normy w tym samym okresie, jednak długo może utrzymywać się ich oligoklonalny charakter (20-24). Tymczasem całkowite stężenie przeciwciał klasy IgA oraz podklas IgG2, IgG4 może pozostawać poniżej normy przez wiele lat. Ponieważ wiąże się to między innymi z upośledzoną aktywnością opsonizującą, stwierdza się korelację obniżonego stężenia wymienionych podklas Ig z zapadalnością na infekcje bakteriami otoczkowymi (20;21;25).

Za źródło swoistych przeciwciał u biorcy uważa się głównie limfocyty B pochodzące od dawcy, które różnicują się w komórki plazmatyczne, wyspecjalizowane do wydzielania Ig (26). Przez pierwsze 6 miesięcy po HCT wpływ na miano mogą mieć również utrzymujące się przeciwciała i przetrwale limfocyty B biorcy oraz biernie przeniesione przeciwciała wraz z przetaczanymi preparatami krwi (27;28).

U większości pacjentów zdolność do odpowiedzi humoralnej pierwotnej i wtórnej na zewnętrzny antygen (Ag) wraca do normy po około roku po HCT. U części biorców obserwuje się jednak przez wiele lat obniżoną zdolność do wytwarzania swoistych przeciwciał, czego wyrazem jest między innymi słaba reakcja na szczepienia ochronne. Natura tego zaburzenia nie jest jeszcze w pełni wyjaśniona. Uważa się, że skoro całkowite stężenie przeciwciał IgM, IgG1, IgG3 osiąga normę, przyczyną powyższych nieprawidłowości nie jest upośledzone wytwarzanie przeciwciał lub brak kooperacji z limfocytami pomocniczymi (helper T - Th; limfocyty CD4+) (20). Przypuszczano, że może być to zaburzenie zachodzące podczas kształtowania się swoistości Ig, które występuje w rozwoju ontogenetycznym i odpowiada za analogiczne anomalie odporności humoralnej u dzieci do 2 roku życia. W trakcie tego procesu dochodzi do łączenia się różnych kombinacji genów z rodziny VH, DH, JH kodujących regiony zmienne łańcuchów ciężkich Ig (tzw. zmienność kombinacyjna), przy czym w początkowym etapie życia człowieka wykorzystywane są tylko pewne warianty genów z rodziny V. W efekcie repertuar dostępnych swoistości przeciwciał jest węższy, a odzwierciedleniem tego może być brak odpowiedzi immunologicznej na antygeny polisacharydowe. Okazało się jednak, że nie ma zasadniczej różnicy między zakresem genów V wykorzystywanych przez zdrowe osoby dorosłe i biorców HCT (21). Bardziej prawdopodobne wydaje się więc zaburzenie zachodzące na jednym z późniejszych etapów: podczas zmiany klas immunoglobulin, dojrzewania powinowactwa lub różnicowania w komórki plazmatyczne (29). Po pobudzeniu limfocytów B przez swoiste Ag, dochodzi do ich proliferacji i dojrzewania w ośrodkach rozmnażania grudek limfatycznych. W tym okresie powstają liczne mutacje somatyczne w genach VJ i VDJ kodujących łańcuchy Ig, dzięki czemu zmienia się powinowactwo przeciwciał do Ag. Analizując geny VH limfocytów B u osób w okresie roku po przeszczepieniu wykazano znacznie mniejszą kumulację hipermutacji niż w populacji osób zdrowych (20;21). Uważa się, że może za to odpowiadać zaburzenie gromadzenia mutacji somatycznych, proces zależny od limfocytów Th

(kontaktu bezpośredniego CD40 z ligandem CD40 i za pośrednictwem wydzielanych cytokin), podobnie jak zmiana klas immunoglobulin. Przyczyną może być również defekt samych limfocytów B (20;21). Niezaprzeczalne znaczenie w dojrzewaniu komórek mają też oddziaływania mikrośrodowiska. Badania histopatologiczne węzłów chłonnych biorców HCT wykazały brak w nich ośrodków rozmnażania nawet kilka lat po przeszczepieniu, co może dodatkowo tłumaczyć opisanie zaburzenie końcowego etapu różnicowania limfocytów B. Za uszkodzenie narządów układu chłonnego odpowiedzialne jest zaś w głównej mierze kondycjonowanie zastosowane przed transplantacją (30;31).

Ponadto, ważny jest niewątpliwie wpływ regulacyjny cytokin: przewaga profilu Th1 nad Th2 poprzez oddziaływanie hamujące na proliferację limfocytów B, przełączanie klas Ig i produkcję przeciwciał IgG, może być dodatkowym czynnikiem modulującym odpowiedź humoralną po HCT (29).

1.2.3 Odporność komórkowa

Do niedawna uważano, że rekonstrukcja immunologiczna po HCT jest rekapitulacją ontogenezy (32). Jednak dokładne badania wykazały, że dojrzewanie limfocytów T przebiega inaczej (33). Przez okres 6 miesięcy po HCT limfocyty T obecne we krwi pacjenta pochodzą głównie z proliferacji komórek pamięci immunologicznej dawcy i mają w związku z tym ograniczony zakres swoistości. Niewielki odsetek wywodzi się z limfocytów biorcy, które przetrwały kondycjonowanie. Anergia i zmniejszony potencjał proliferacyjny limfocytów T w odpowiedzi na mitogeny (między innymi fitohemaglutyninę, mitogen szkarłatki) ustępują po roku od transplantacji (34). Zaburzenia odpowiedzi na swoisty antygen utrzymują się jednak dłużej. Na jakość odpowiedzi na Ag w tym okresie duży wpływ wywiera ilość i różnorodność limfocytów obecnych w puli komórek przeszczepianych od dawcy. Zależy to z kolei od wieku dawcy i źródła przeszczepu. Uważa się, że pod tym względem transplantacja z PBSC przewyższa BMT (35-37).

Miernikiem stopnia różnorodności puli komórek naiwnych jest badanie regionu CDR3 łańcucha β receptorów limfocytów T (T-cell receptor – TCR). Po HCT z deplecją limfocytów T znaleziono korelację między stopniem różnorodności receptorów TCR a liczbą naiwnych limfocytów T (immunofenotyp CD4+CD45RA+RO-). Jeszcze dokładniej można pośrednio ocenić repertuar swoistości dzięki locus δ TCR, analizując tzw. TREC (ang. T-cell receptor rearrangement excision DNA circles).

Pojawienia się komórek naiwnych CD4+ można oczekiwać dopiero 6 miesięcy po HCT, przy czym tempo odnowy puli tych komórek zależy od stopnia funkcjonowania grasicy, na co największy wpływ ma wiek biorcy. Dowodzi tego korelacja między niskim poziomem TREC a starszym wiekiem pacjentów (15;38-42). Natomiast uważa się, że powstawanie naiwnych limfocytów CD8+ może odbywać się poza grasicą (33;39). Odzwierciedleniem różnic ilościowych i jakościowych w regeneracji między subpopulacjami limfocytów jest utrzymująca się po przeszczepieniu szpiku inwersja stosunku limfocytów T CD4+ do CD8+.

1.2.4 Zaburzenia odporności związane z cGvHD

Przewlekła choroba przeszczep przeciw gospodarzowi rozwija się u 20-70% pacjentów po 100 dobie po HCT (43-45). Najczęściej objawy obserwuje się między 3 a 24 miesiącem po przeszczepieniu. Poprzedzona może być wystąpieniem postaci ostrej – aGvHD i według współczesnych poglądów to nie kryterium czasowe (>100 doby po HCT), ale cechy morfologiczne i kliniczne zmian decydują o postawieniu rozpoznania postaci przewlekłej. Obraz cGvHD przypomina choroby autoimmunologiczne i może dotyczyć praktycznie każdego narządu. Do najczęściej zajmowanych należą: skóra, gruczoły łzowe, wątroba, śluzówka przewodu pokarmowego (głównie jama ustna), płuca oraz układ ruchu (mięśnie, ścięgna, stawy) (44-49). Znaczące upośledzenie funkcji zajętego narządu może nawet doprowadzić do zgonu.

Dokładne mechanizmy doprowadzające do rozwoju cGvHD nie są jeszcze poznane. Za podłoże immunologiczne uważa się zaburzenia centralnych i obwodowych mechanizmów tolerancji, w tym negatywnej selekcji limfocytów. W rezultacie mamy do czynienia z ekspansją alloreaktywnych limfocytów Th dawcy, skierowanych przeciwko tkankom biorcy (47;50;51). Przewaga limfocytów wydzielających cytokiny o profilu Th2 (IL4, IL10) stwierdzana u pacjentów z cGvHD, przy zaburzonych mechanizmach tolerancji, może prowadzić do produkcji przez limfocyty B przeciwciał uszkadzających narządy biorcy (52-54). W surowicy części pacjentów wykrywa się przeciwciała przeciwnajdrowe, przeciwmitchondrialne, czynnik reumatoidalny oraz u prawie 90% chorych z zajęciem skóry znajduje się depozyty immunoglobulin i komplementu w warstwie skórno-naskórkowej (55-59). W warunkach przewlekłego stanu zapalnego fibroblasty są indukowane do produkcji włókien kolagenowych, co znajduje potwierdzenie w badaniach histopatologicznych. Istnieją doniesienia, że podłożem

włóknienia narządów w cGvHD, podobnie jak w sklerodermii, mogą być przeciwciała o typie stymulującym skierowane przeciwko receptorom dla płytkopochodnego czynnika wzrostu, które wykrywa się we krwi pacjentów z cGvHD (44;60;61).

Zmianom narządowym w przebiegu cGvHD towarzyszyć mogą cytopenie o podłożu immunologicznym oraz szereg innych zaburzeń układu odpornościowego, zwiększających ryzyko powikłań infekcyjnych. Generalnie uważa się, że poszczególne składowe rekonstrukcji immunologicznej u chorych z cGvHD są opóźnione w porównaniu do pacjentów po niepowikłanym HCT (24;34;46;62-64). Spośród najważniejszych nieprawidłowości układu immunologicznego charakterystycznych dla cGvHD wymienia się: zaburzenie chemotaksji granulocytów, obniżoną zdolność do reakcji na mitogeny, defekt odpowiedzi pierwotnej i wtórnej przeciwko bakteriofagom (w tym konwersji z IgM do IgG) oraz odpowiedzi na immunizację antygenami polisacharydowymi (55;65). Znamienne częściej obserwuje się czynnościowy hyposplenizm, z czym powiązana jest zwiększona zachorowalność na infekcje wywołane bakteriami otoczkowymi (66-68). W surowicy większości pacjentów obserwuje się normalne lub przewyższające normę stężenie immunoglobulin klasy IgG, z towarzyszącą zdolnością limfocytów B do spontanicznego wydzielania IgG 'in vitro', co wydaje się paradoksalne przy stwierdzanych defektach odporności humoralnej. Uważa się, że jest to wyraz poliklonalnej aktywacji limfocytów, związanej z różnicami w antygenach zgodności tkankowej między dawcą a biorcą. Pobudzone poliklonalnie limfocyty nie reagują przy tym odpowiednio na swoiste antygeny (59;65). Ponadto stwierdza się obecność znaczącego odsetka limfocytów T supresorowych, które obarcza się odpowiedzialnością za hamowanie produkcji swoistych przeciwciał przez limfocyty B oraz zaburzenie procesu różnicowania prekursorów limfocytów Th w komórki dojrzałe. Zwiększona aktywność komórek supresorowych u chorych z cGvHD wydaje się być mechanizmem kompensującym toczący się przewlekłe alloreaktywny proces zapalny. Jednocześnie ten permanentnie podwyższony stan supresji stanowi dodatkowy czynnik predysponujący do reaktywacji patogenów (zakażeń latentnych) i obniżonej zdolności do reagowania na zewnętrzne antygeny (55;59;69;70).

Zaburzenia odporności związane z samą chorobą pogłębia leczenie immunosupresyjne, w przypadku ciężkiej postaci cGvHD eskalowane do terapii wielolekowej. Do najczęściej stosowanych leków należą: glikokortykosteroidy

(prednizon, metylprednizon), inhibitory kalcineuryny (cyklosporyna, takrolimus) oraz mykofenolan mofetilu. Ponadto w terapii wykorzystywać można przeciwciała monoklonalne, leczenie miejscowe i różnorodne środki wspomagające (45;50;71-73). Pomimo coraz nowocześniejszych metod leczniczych i stosowanej profilaktyki przeciw infekcjom oportunistycznym, u części pacjentów dochodzi do istotnego pogorszenia jakości życia, a cGvHD jest nadal jedną z głównych przyczyn śmiertelności późnej po przeszczepieniu szpiku (43).

1.3 Pamięć immunologiczna a zjawisko adopcyjnego transferu odporności

Zjawisko pamięci immunologicznej odpowiada za zdolność do szybszej i skuteczniejszej reakcji układu odpornościowego na ponowną ekspozycję organizmu na Ag. W fazie poprzedzającej rozwój pamięci, układ immunologiczny przygotowuje się do kontaktu z różnymi antygenami tworząc ogromną ilość klonów dziewiczych (naiwnych) limfocytów B i T, z których każdy posiada receptory o unikalnej swoistości. Do wytworzenia pamięci dochodzi po naturalnym kontakcie z patogenem lub immunizacji za pomocą szczepienia ochronnego (etap zależny od antygeny). Po związaniu Ag ze swoistym receptorem na naiwnym limfocycie rozpoczyna się proces proliferacji i różnicowania. Aby właściwie chronić organizm przed chorobami infekcyjnymi, układ immunologiczny powinien dostosowywać odpowiedź do charakteru patogenu i w zależności od tego dążyć do wytworzenia limfocytów efektorowych wyspecjalizowanych do: produkcji przeciwciał neutralizujących (komórki plazmatyczne), wydzielania cytokin i stymulowania innych komórek uczestniczących w reakcji zapalnej (limfocyty T pomocnicze; helper T - Th; CD4+) oraz w razie potrzeby niszczących zainfekowane komórki gospodarza (limfocyty T cytotoksyczne; cytotoxic T - Tc; CD8+). Po wygaśnięciu pierwotnej reakcji komórki efektorowe ulegają apoptozie i pozostaje pula komórek pamięci immunologicznej, zabezpieczająca organizm przed reinfekcją. Za hipotetyczne mechanizmy utrzymywania się długotrwałego stanu odporności uważa się długowieczność limfocytów pamięci albo odnawianie się puli limfocytów pamięci pod wpływem długotrwałej prezentacji Ag przez komórki dendrytyczne lub na skutek reagujących krzyżowo antygenów, mitogenów, superantygenów. Ważne jest, aby pula komórek efektorowych generowana była szybko z komórek pamięci po ponownym kontakcie z Ag i aby stan tej gotowości utrzymywał się jak najdłużej, a w przypadku chorób przewlekłych nawet przez całe życie (74;75).

Limfocyty B pamięci immunologicznej w porównaniu do dziewiczych komórek różnią się większym powinowactwem do Ag zarówno receptorów immunoglobulinowych, jak i produkowanych przeciwciał. Jest to efekt hipermutacji w genach VDJ kodujących części zmienne łańcuchów immunoglobulinowych podczas dojrzewania powinowactwa. Dojrzewanie powinowactwa zachodzi po kontakcie z Ag głównie w centrach rozmnażania grudek chłonnych, skąd limfocyty B pamięci przemieszczają się do innych narządów limfatycznych. Uważa się, że dzięki wysokiej ekspresji Bcl6 (transkrypcyjnego czynnika hamującego) blokowane jest ostateczne różnicowanie komórek pamięci i utrzymywany jest ich potencjał replikacyjny. Ta zdolność do ciągłego odnawiania się populacji przypomina właściwości komórek pnia. W razie ponownego kontaktu z Ag limfocyty B pamięci mogą się szybko namnożyć i przejść etapy ostatecznego zróżnicowania w komórki plazmatyczne, wyspecjalizowane do wydzielania przeciwciał o wysokim stopniu powinowactwa do antygeny. Hipotezę tę potwierdza fakt, że w plazmocytach nie stwierdza się ekspresji Bcl6. Po wygaśnięciu odpowiedzi wtórnej pozostaje oczywiście rezerwuuar limfocytów, które nie przechodzą w stadium komórek efektorowych, by podtrzymać stan pamięci immunologicznej (75-77). Subpopulacje limfocytów B można zidentyfikować na podstawie różnych klas receptorów immunoglobulinowych oraz ekspresji CD27 na ich powierzchni. Limfocyty B naiwne mają immunofenotyp IgM+ i/lub IgD+ i nie posiadają antygeny CD27, podczas gdy na komórkach pamięci linii B wykrywa się CD27 i po zaistnieniu przełączenia klas receptory immunoglobulinowe IgG (IgA/IgE), współwystępujące niekiedy z receptorem IgM (78-81). Wyróżnia się też subpopulacje komórek B pamięci o immunofenotypach IgM+IgD-CD27+, IgM-IgD+CD27+, IgM+IgD+CD27+, odpowiedzialne najprawdopodobniej za produkcję przeciwciał we wczesnej fazie odpowiedzi wtórnej (78;82).

Limfocyty T pamięci charakteryzują się między innymi zwiększonym występowaniem na powierzchni cząstek biorących udział w adhezji do komórek prezentujących antygen (antygen presenting cell – APC), zdolnością pobudzenia za pośrednictwem sygnału przez TCR bez konieczności kostymulacji CD28-zależnej oraz ekspresją receptorów dla cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej klasy I (major histocompatibility complex – MHC), chroniących przed apoptozą indukowaną aktywacją. Komórki T naiwne i pamięci rozróżnić można za pomocą izoform fosfatazy tyrozynowej CD45, uczestniczącej w procesie aktywacji. Limfocyty T naiwne mają immunofenotyp CD45RA+RO-, podczas gdy limfocyty T

pamięci mają silną ekspresję izoformy RO (83-86). Dodatkowo, w obrębie limfocytów T pamięci immunologicznej (zarówno CD4+, jak i CD8+) wyodrębnia się przynajmniej dwie subpopulacje zróżnicowane pod względem miejsca występowania i funkcji: pamięci centralnej (central memory - T_{cm}) i pamięci efektorowej (effector memory - T_{em}). Limfocyty T_{cm} znajdują się głównie w narządach limfatycznych, co warunkuje wysoka ekspresja na ich powierzchni L-selektyny (CD62L) i chemokinowego receptora 7 (chemokine receptor 7 - CCR7). Komórki T_{cm} odpowiedzialne są za 'przechowywanie' pamięci, najprawdopodobniej mają zdolność do samoodnowy analogicznie do komórek Bcl6+ i z nich pochodzi pula komórek efektorowych i komórek pamięci efektorowej. Limfocyty T_{em} lokalizują się w tkankach obwodowych, a dzięki receptorom chemokinowym CCR2 i CCR5 wykazują szczególny tropizm do miejsc toczącego się stanu zapalnego. Na ich powierzchni, w przeciwieństwie do limfocytów T_{cm}, stwierdza się słabą ekspresję CD62L i brak CCR7. Wykazują aktywność cytotoxiczną i zdolność do produkcji cytokin. Odpowiadają za szybką wtórną odpowiedź immunologiczną po ponownym kontakcie z antygenem. Zaprogramowane są prawdopodobnie do ograniczonej ilości mitoz, zakończonych ostatecznym zróżnicowaniem w komórki efektorowe (75;87).

Zjawisko nabycia odporności przez przeniesienie limfocytów z ustroju uodpornionego do uodparnianego nosi nazwę adoptywnego transferu odporności. Istnieją dowody na to, że w puli komórek hematopoetycznych przeszczepianych biorcy znajdują się również komórki pamięci immunologicznej, które powstały w wyniku wcześniejszej immunizacji dawcy. Przemawia za tym obserwowana niekiedy po HCT od seropozytywnych dawców serokonwersja lub utrzymywanie przez kilka – kilkanaście miesięcy swoistych przeciwciał, przy czym udowodniono ostatnio ich pochodzenie od dawcy (26;88-94). Za komórki zdolne do produkcji przeciwciał u biorcy uważa się limfocyty B pamięci lub długożyjące komórki plazmatyczne (ang. long-lived plasma cells), których obecność w szpiku kostnym potwierdzono w badaniach (74;76;95). Do wytworzenia długotrwałego stanu odporności u biorcy konieczne może być również przeniesienie od dawcy limfocytów T_h pamięci o określonej swoistości (96). Dowodzi się, że utrzymywanie odpowiednio wysokiego miana swoistych przeciwciał po HCT uwarunkowane jest reimmunizacją biorcy, czyli reekspozycją limfocytów pamięci na Ag (94;97-100).

1.4 Znaczenie regulacyjne cytokin

Cytokiny należą do substancji regulujących aktywność, proliferację i różnicowanie komórek układu odpornościowego. Mają zdolność działania autokrynnego, parakrynnego, a nawet endokrynnego między innymi na limfocyty podejmujące swoje funkcje efektorowe po kontakcie z Ag. Przekazywanie sygnałów do komórek odbywa się za pośrednictwem receptorów składających się z domeny zewnątrzkomórkowej, transbłonowej i wewnątrzkomórkowej. Większość cytokin po połączeniu ze swoistym receptorem aktywuje szlak zależny od kinaz tyrozynowych JAK (ang. Janus kinases) i w następstwie białka STAT (ang. signal transducers and activators of transcription), które są przekaźnikami sygnałów i czynnikami transkrypcyjnymi. Zdolność do wydzielania cytokin posiadają zarówno limfocyty CD4+, jak i CD8+. W obrębie limfocytów T pomocniczych (Th) rodzaj produkowanych przez nie cytokin determinuje podział na subpopulację Th1, stymulującą za pośrednictwem IL2 oraz IFN γ głównie odpowiedź immunologiczną typu komórkowego i subpopulację Th2, wydzielającą między innymi IL4, IL5 i IL10, wspomagając w ten sposób odpowiedź typu humoralnego (101). Uważa się, że limfocyty tzw. dziewicze wydzielają przede wszystkim IL2, dojrzewając uzyskują zdolność do wytwarzania większości cytokin (stadium Th0), a po aktywacji antygenowej polaryzują się w kierunku Th1 lub Th2. Istnieją dowody, że pod wpływem określonych warunków (w tym interleukin IL4 i IL12) przed osiągnięciem ostatecznego fenotypu możliwa jest zmiana profilu produkowanych cytokin z Th1 na Th2 i odwrotnie (102). Wyodrębniono również mniej znaczące subpopulacje wydzielające jednocześnie cytokiny zaliczane do profilu Th1 i Th2 oraz czynniki wzrostu (GM-CSF, TGF β). W obrębie limfocytów T cytotoksycznych (Tc) obserwuje się również dychotomię zależną od profilu wydzielanych cytokin (103). Poniżej przedstawiono krótką charakterystykę znaczenia poszczególnych cytokin w odpowiedzi na Ag, w tym na immunizację czynną.

IFN γ , poza aktywowanymi limfocytami T, wydzielany jest również przez pobudzone komórki NK i makrofagi. Do najważniejszych efektów biologicznych należy wzmaganie cytotoksyczności limfocytów T CD8+ i komórek NK, aktywowanie makrofagów oraz stymulowanie prezentacji Ag limfocytom T przez komórki APC, poprzez zwiększanie ekspresji cząsteczek MHC klasy I i II. Wpływa na układ humoralny hamując czynności i proliferację komórek Th2, ale działając wspólnie z innymi cytokinami może również wspomagać powstawanie określonych podklas przeciwciał.

IL2 produkowana jest głównie przez Th1 oraz w niewielkim zakresie przez limfocyty CD8⁺ cytotoksyczne. Powoduje aktywację i stymuluje proliferację komórek Tc i NK, wraz z IL4 i IL5 pobudza proliferację i różnicowanie limfocytów B, a także pośredniczy w hamowaniu odpowiedzi immunologicznej po zniknięciu Ag.

IL4 wydzielana jest głównie przez aktywowane Ag limfocyty Th2, a także NK, komórki tuczne i bazofile. Cytokina ta pobudza limfocyty B, stymuluje ich proliferację oraz wydzielanie immunoglobulin IgE i IgG4. Wpływa na różnicowanie limfocytów T w kierunku Th2, razem z IL10 hamuje wydzielanie IFN γ przez komórki Th1 oraz sekrecję przeciwciał produkowanych pod wpływem IFN γ . Natomiast większość funkcji biologicznych IL4 antagonizuje IFN γ .

IL5 należy do cytokin wydzielanych przede wszystkim przez komórki Th2. Ma znaczenie głównie jako czynnik wzrostu granulocytów kwasochłonnych, ale również aktywuje proliferację komórek Tc poprzez regulowanie ekspresji receptora dla IL2. Wspólnie z IL4 pobudza limfocyty B produkujące IgM i niektóre podklasy IgG.

IL10 produkowana jest przez aktywowane antygenem limfocyty Th2, w mniejszym stopniu przez limfocyty B, monocyty i makrofagi. Należy do cytokin przeciwzapalnych, między innymi ogranicza zdolność do prezentowania Ag drogą zmniejszenia ekspresji cząsteczek MHC klasy II. Blokuje odpowiedź immunologiczną typu komórkowego hamując powstawanie limfocytów Th1 oraz wytwarzanie IFN γ i IL2. Na odpowiedź humoralną wpływa stymulując proliferację i różnicowanie aktywowanych limfocytów B.

Niewiele jest doniesień dotyczących zmian profilu cytokin w różnych okresach po HCT poza szczególnymi sytuacjami klinicznymi, takimi jak GvHD. We wczesnym okresie po HCT tzw. 'burza cytokinowa' z udziałem cytokin prozapalnych (IL1, IFN γ , TNF α), związana z nasiloną reakcją cytotoksyczną na uszkodzone chemioterapią tkanki biorcy, odpowiedzialna jest za obraz kliniczny aGvHD. W patomechanizmie aGvHD cytokiny nasilają prezentację antygenów MHC biorcy przez komórki APC, wzmagają aktywację alloreaktywnych limfocytów Tc i reakcje cytotoksyczne, doprowadzając w efekcie do zniszczenia tkanek gospodarza z udziałem komórek Tc, NK oraz TNF α , IL1, NO (104-108). W patogenezie cGvHD znaczenie ma najprawdopodobniej produkcja przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom biorcy stymulowana przez cytokiny o profilu

Th2, których wydzielanie indukują alloreaktywne limfocyty Tc dawcy (szczegółowy opis w rozdziale 1.2.4).

1.5 Profilaktyka przeciwwakaźna

Opisane zostały różnorodne zaburzenia rekonstrukcji immunologicznej po procedurze HCT. Kondycjonowanie doprowadza do zniszczenia hematopoezy biorcy wywołując dodatkowo stopniowy zanik nabytej drogą immunizacji czynnej odporności przeciwwakaźnej u biorcy. Wyrazem tego jest udokumentowane obniżanie się po transplantacji miana przeciwciał poszczepiennych poniżej ochronnego (109;110). W konsekwencji dochodzi do wzrostu ryzyka infekcji, które doprowadzić mogą do groźnych powikłań, a nawet śmierci. Rutynowo we wszystkich ośrodkach transplantacyjnych stosuje się po HCT profilaktykę przeciwwakaźną w okresie przyjmowania leków immunosupresyjnych (zazwyczaj przez minimum 6 miesięcy) (111).

W Klinice Hematologii i Transplantologii Akademii Medycznej w Gdańsku reaktywacji wirusa VZV i HSV zapobiega się podając acyklovir, przeciwgrzybiczo zastosowanie mają flukonazol lub itraconazol, a rozwojowi pneumocystodozy i toxoplazmozy przeciwdziała się stosując trimetoprim/sulfametoksazol. Ze względu na zagrożenie infekcjami wywołanymi przez bakterie otoczkowe, szczególnie u chorych z wielolekową terapią immunosupresyjną z powodu ciężkiej postaci cGvHD, podaje się profilaktycznie fenoksymetylopenicylinę. U części pacjentów z tej grupy dochodzi to nawracających reaktywacji wirusa CMV. Po zakończeniu terapii dożylniej (gancyklovirem lub foscarnetem) i negatywizacji wirusa w badaniu PCR (ang. polimerase chain reaction) i IEA (ang. immediate early antygen) próbuje się stosować doustny preparat valgancykloviru, aby zapobiec ponownej replikacji CMV.

Od dawna sprawdzoną metodą profilaktyki chorób zakaźnych są szczepienia ochronne, zalecane również u chorych po HCT. Wobec braku jednoznacznych badań prospektywnych przeprowadzonych na dużych grupach chorych, Europejska Grupa ds. Przeszczepiania Krwi i Szpiku (European Group of Blood and Marrow Transplantation - EBMT) wraz z Amerykańskim Towarzystwem Przeszczepiania Krwi i Szpiku (American Society of Blood and Marrow Transplantation - ASBMT) zalecają jednolity system szczepień, niezależnie od typu i źródła przeszczepu (112). Mimo powyższych zaleceń w dużej części ośrodków transplantacyjnych wielokrotna immunizacja nie stanowi rutynowego postępowania profilaktycznego (113).

Za bezpieczne uważa się szczepionki z martwych patogenów inaktywowanych chemicznie lub termicznie, z oczyszczonych produktów drobnoustrojów (polisacharydy otoczkowe, toksyny) oraz z rekombinowanych białek. Przeciwwskazane jest stosowanie, także w otoczeniu chorego, szczepionek z żywych atenuowanych patogenów. Zaleca się u wszystkich pacjentów trzykrotne szczepienie przeciwko wirusowi polio (intramuscular polio vaccine – IPV) oraz przeciwko błonicy i tężcowi (tetanus/diphtheria – Td). Raz do roku w okresie jesiennym obowiązuje immunizacja przeciw wirusowi grypy (114). Należy podać przynajmniej dwukrotnie szczepionkę przeciwko bakteriom otoczkowym *Haemophilus influenzae* typu b (Hib) i *Streptococcus pneumoniae* (Pneumo). Według ASBMT, w krajach o wysokim ryzyku zakażenia wirusem HBV, pacjenci nieposiadający ochronnego miana przeciwciał antyHBs powinni być trzykrotnie immunizowani dużą dawką rekombinowanego antygenu HBs wirusa (rHBsAg). 1-2 miesiące po zakończeniu serii zaleca się kontrolę stężenia antyHBs i ewentualne powtórzenie cyklu. Rozpoczęcie programu szczepień rekomenduje się zazwyczaj między 6 a 12 miesiącem po HCT, 4-6 tygodni po zakończeniu immunosupresji. Wyjątkiem jest według niektórych badaczy immunizacja Hib, której pierwsza dawka zalecana jest już 4 miesiące po procedurze transplantacji, kiedy znamienna większość pacjentów otrzymuje jeszcze profilaktykę immunosupresyjną. Natomiast szczepienie przeciwko innej groźnej bakterii otoczkowej *Streptococcus pneumoniae*, zdaniem większości klinicystów, nie powinno być rozpoczynane przed 12, a nawet 24 miesiącem po HCT, ponieważ z powodu zaburzeń odporności humoralnej przed tym okresem chorzy nie wytwarzają przeciwciał opsonizujących (112). Ważne jest, aby kolejne dawki tych samych szczepionek podawać w odstępach czasu nie krótszych niż 4 tygodnie.

Pomimo stosowania wielokrotnych immunizacji pozytywna odpowiedź na podany antygen, warunkująca długotrwałą odporność, pojawia się u mniejszego odsetka osób w porównaniu ze zdrową populacją (115). Aby poprawić skuteczność szczepionek, należy mieć na uwadze opisane powyżej dane dotyczące rekonstrukcji immunologicznej i czynników regulujących jakość odpowiedzi na Ag. Logicznym rozwiązaniem wydaje się dostosowanie kalendarza szczepień do statusu immunologicznego pacjenta i, co jest sugerowane przez wielu badaczy, potrzebne są dobrze zaplanowane badania pozwalające określić związek pomiędzy rekonstrukcją immunologiczną a stopniem odpowiedzi na immunizację (18).

2 CEL PRACY

Celem pracy badawczej były:

1. Ocena rekonstrukcji immunologicznej u chorych we wczesnym (>6 miesięcy) i późnym (>24 miesięcy) okresie po przeszczepieniu allogenicznym komórek hematopoetycznych:
 - monitorowanie liczby neutrocytów, limfocytów i stężenia klas immunoglobulin w okresie do 3 lat po HCT
 - określenie immunofenotypu powierzchniowego limfocytów krwi obwodowej ze szczególnym uwzględnieniem ekspresji molekuł determinujących podział na komórki naiwne i pamięci immunologicznej linii B i T
 - ocena ekspresji wewnątrzcytoplazmatycznej cytokin charakterystycznych dla profilu Th1 (IFN γ , IL2) oraz Th2 (IL4, IL5, IL10) w obrębie limfocytów T CD4 i CD8
2. Przeprowadzenie programu szczepień ochronnych u pacjentów po procedurze przeszczepienia allogenicznego:
 - ocena stopnia odporności przeciwko WZW B po HCT
 - określenie korelacji między stopniem odpowiedzi na immunizację rHBsAg po HCT a badanymi parametrami rekonstrukcji immunologicznej oraz czynnikami zależnymi od dawcy i biorcy
 - opracowanie kalendarza szczepień ochronnych dostosowanego do statusu immunologicznego pacjenta oraz systemu wizyt w poradni transplantacyjnej

3 MATERIAŁ I METODY

Badania cytometryczne i cykl szczepień ochronnych przeprowadzono u 61 chorych z rozpoznaniem ostrych i przewlekłych schorzeń hematologicznych, poddanych postępowaniu kondycjonującemu z następowym HCT od dawców rodzinnych lub niespokrewnionych. Procedurę u wszystkich chorych wykonano w Katedrze i Klinice Hematologii i Transplantologii Akademii Medycznej w Gdańsku w latach 1996-2005.

Pacjentów zakwalifikowanych do programu szczepień ochronnych podzielono na dwie grupy w zależności od czasokresu, który upłynął od transplantacji: grupę wczesną (między 6 a 24 miesiącem po HCT) oraz grupę późną (powyżej 24 miesiąca po HCT).

Projekt uzyskał zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku. Na realizację części badawczej uzyskano finansowanie z Komisji Badań Naukowych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (grant promotorski 2 P05B 080 26).

3.1 Badani chorzy

Do ostatecznej analizy włączono dane 49 pacjentów. W celu ujednolicenia grupy badanej wykluczono biorców HCT po postępowaniu przygotowującym o zredukowanej intensywności, jednego pacjenta po przeszczepieniu z krwi pępowinowej oraz chorych z rozpoznaniem przewlekłej białaczki limfocytowej ze względu na odmienny typ kondycjonowania. Wszyscy analizowani chorzy otrzymali kondycjonowanie mieloablacyjne. U 34 chorych źródłem materiału przeszczepowego były komórki progenitorowe krwi obwodowej (PBSC), u 15 krew szpikowa (BM).

W 43 przypadkach transplantacje przeprowadzono od dawców rodzinnych (related donor – RD), a w 6 od dawców niespokrewnionych (matched unrelated donor – MUD). Wszyscy dawcy PBSC byli mobilizowani granulocytarnym czynnikiem wzrostu (granulocyte-colony stimulating factor – G-CSF) w dawce 10 µg/kg masy ciała/dobę. Kolekcję komórek progenitorowych wykonywano 12 godzin po 4 i 5 dawce G-CSF drogą leukaferazy za pomocą separatora komórkowego (Fenwall 3000+). Krew szpikową pobierano w warunkach sali

operacyjnej w znieczuleniu ogólnym poprzez aspirację z talerza biodrowego, bez stymulacji G-CSF.

6 pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL) oraz 4 chorych z przewlekłą białaczką szpikową (CML) przeszczepionych od dawców niespokrewnionych otrzymało jako kondycjonowanie naświetlenie całego ciała (total body irradiation – TBI) w łącznej dawce 12Gy (w 6 frakcjach) oraz cyklofosfamid (Cy) dożylny w dawce całkowitej 120mg/kg masy ciała (u chorych, których waga odbiegała o ponad 25% od tzw. idealnej masy ciała, dawkę leku obliczano według idealnej dostosowanej wagi ciała). Pozostałych 39 pacjentów otrzymało kondycjonowanie według schematu BuCy120: busulfan podawany doustnie (dawka całkowita 16mg/kg masy ciała) oraz Cy dożylnie w łącznej dawce 120mg/kg masy ciała (116-118).

Chorym poddanym transplantacji z PBSC przetoczono $6,5 \times 10^6$ CD34+ komórek/kg masy ciała (mediana); (zakres 2,7 - 8,9 $\times 10^6$).

Pacjenci, u których źródłem komórek macierzystych był BM, otrzymali $3,3 \times 10^6$ CD34+ komórek/kg masy ciała (mediana); (zakres 1,2 - 5,4 $\times 10^6$). Ogólną charakterystykę dawców i biorców przedstawia Tabela 1.

Profilaktyka choroby przeszczep przeciw gospodarzowi z zastosowaniem cyklosporyny A (CsA) i metotreksatu (MTX) zgodna była z protokołem ze Seattle (3;8;119). Cyklosporyna podawana była początkowo dożylnie w dawce 3mg/kg masy ciała/dobę, a następnie doustnie, przy czym dawkowanie dostosowywano w celu utrzymania stężenia terapeutycznego leku we krwi w zakresie 150-300 µg/l. Jeżeli u chorego nie obserwowano cech cGvHD, od doby 101 do 180 stopniowo redukowano dawkę CsA i następnie odstawiano lek. Natomiast MTX podawano dożylnie w dobach: 1 (15mg/m² powierzchni ciała), 3, 6 i 11 po transplantacji (10mg/m² powierzchni ciała). Chorzy poddani transplantacji od dawcy niespokrewnionego (MUD) otrzymali jako dodatkowy składnik postępowania przygotowującego globulinę antytymocytarną.

U wszystkich pacjentów doszło do wszczepienia przed dobą 30 po HCT. Jako kryterium przyjmuje się bezwzględną liczbę neutrocytów $>0,5 \text{ G/l}$ przez dwie kolejne doby i utrzymywanie się trombocytów $\geq 20 \text{ G/l}$ bez transfuzji przez trzy kolejne doby (18).

Tabela 1 Charakterystyka dawców i biorców

Charakterystyka dawców i biorców	
	Wiek w dniu transplantacji, <i>mediana (zakres)</i>
Pacjenci	35 (16-54)
Dawcy	38 (10-67)
	Wiek w czasie immunizacji, <i>mediana (zakres)</i>
Pacjenci	39 (20-57)
	Płeć pacjentów
Kobiety	22
Mężczyźni	27
	Choroba zasadnicza
AML*	13
ALL*	6
CML*	26
MDS*	2
Inne (CEL, PNH)*	2

*AML (*Acute Myeloid Leukemia*) - ostra białaczka szpikowa, ALL (*Acute Lymphoblastic Leukemia*) - ostra białaczka limfoblastyczna, CML (*Chronic Myeloid Leukemia*) - przewlekła białaczka szpikowa, MDS (*Myelodysplastic Syndrome*) – zespół mielodysplastyczny, CEL (*Chronic Eosinophilic Leukemia*) - białaczka eozynofilowa, PNH (*Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria*) - nocna napadowa hemoglobinuria

3.1.1 Ocena rekonstrukcji immunologicznej

W celu oceny rekonstrukcji immunologicznej zebrano z dokumentacji pacjentów następujące dane retrospektywne: bezwzględną liczbę neutrocytów i limfocytów, odsetek γ -globulin, stężenie immunoglobulin IgG, IgM, IgA w dobie 100, 180, rok, 2 lata po HCT w obu grupach oraz dodatkowo 3 lata po HCT w grupie późnej i u większości pacjentów z grupy wczesnej. Prospektywnie zaplanowano wykonanie tych samych badań przed rozpoczęciem programu szczepień oraz 4-8 tygodni po każdorazowym podaniu szczepionek.

Ponadto ocenę rekonstrukcji pogłębiono o analizę cytometryczną subpopulacji limfocytów krwi obwodowej ze szczególnym uwzględnieniem komórek tzw. naiwnych i pamięci immunologicznej linii B i T oraz badano limfocyty pod kątem wydzielanego profilu cytokinowego (Th1/Th2). Wymienione badania wykonywano u każdego pacjenta trzykrotnie: przed rozpoczęciem cyklu szczepień ochronnych, w trakcie oraz 4 - 8 tygodni po zakończeniu cyklu podstawowego. U części badanych komplet oznaczeń powtarzano 4 – 8 tygodni po podaniu dawki przypominającej szczepionki przeciwko WZW B.

3.1.2 Choroba przeszczep przeciw gospodarzowi

Ocenę ostrej (aGvHD) oraz przewlekłej choroby przeszczep przeciw gospodarzowi (cGvHD) dokonywano zgodnie z kryteriami Seattle (Tabela 2, 3, 4) (48;120;121) i nowymi kryteriami ASBMT z 2005 roku (Tabela 5) (46).

U części biorców HCT rozwój choroby przewlekłej poprzedzony był wystąpieniem aGvHD (bezpośrednio lub po okresie wyciszenia). Gdy obraz kliniczny charakterystyczny dla cGvHD pojawił się bez poprzedzającej postaci ostrej rozpoznawano typ 'de novo'.

Przy rozpoznaniu określono również stopień zaawansowania cGvHD. Pierwotna klasyfikacja Seattle opracowana w latach 80-tych definiowała nasilenie choroby w oparciu o podział na postać ograniczoną lub rozległą, wymagającą leczenia systemowego (48). Zmodyfikowana klasyfikacja wprowadziła bardziej precyzyjne kryteria ilościowe rozpoznania postaci ograniczonej i rozległej, jednak posiada niskie znaczenie prognostyczne (121).

Tabela 2 Stopniowanie ostrej choroby przeszczep przeciw gospodarzowi

Stopień	Skóra	Wątroba	Jelito
+	Rumień <25% powierzchni ciała	Bilirubina 2-3 mg/dl	Biegunka, 500-1000 ml/dobę lub nudności *
++	Rumień 25 – 50 % powierzchni ciała	Bilirubina 3-6 mg/dl	Biegunka, 1000-1500 ml/dobę
+++	Uogólniona erytrodermia	Bilirubina 6-15 mg/dl	Biegunka >1500 ml/dobę
++++	Złuszczenie lub pęcherze	Bilirubina >15 mg/dl	Ból +/- niedrożność

**Rozpoznanie aGvHD na podstawie utrzymujących się nudności wymaga potwierdzenia biopsją żołądka lub dwunastnicy*

Tabela 3 Zaawansowanie aGvHD

	Zaawansowanie aGvHD			
	Skóra	Wątroba	Jelito	Zaburzenia funkcji
0	0	0	0	0
I	+ do ++	0	0	0
II	+ do +++	+	+	+
III	++ do +++	++ do +++	++ do +++	++
IV	++ do ++++	++ do ++++	++ do ++++	+++

Tabela 4 Oryginalna i zmodyfikowana klasyfikacja Seattle cGvHD

Oryginalna klasyfikacja Seattle (Shulman et al., 1980)	Zmodyfikowana klasyfikacja Seattle (Lee et al., 2003)
Postać ograniczona	
1. ograniczone zajęcie skóry	1. Zmiany na śluzówkach jamy ustnej w przebiegu cGvHD, dodatnia biopsja skóry lub wargi bez innych objawów cGvHD
2. dysfunkcja wątroby spowodowana cGvHD	2. Zwiększona aktywność fosfatazy alkalicznej (FALK $\leq 2 \times$ norma, AST, ALT $\leq 3 \times$ norma, bilirubina całkowita $\leq 27,3 \mu\text{mol/l}$) z dodatnią biopsją skóry lub wargi bez innych objawów cGvHD
	3. Niewielkie zmiany skórne: mniej niż 6 zmian grudkowo - łuskowych, rumień $<20\%$ powierzchni ciała (BSA), lub rumień $<50\%$ BSA, dodatnia biopsja skóry bez innych objawów cGvHD
	4. Dodatni test Schirmera ≤ 5 mm bez innych zmian w narządzie wzroku, dodatnia biopsja skóry lub wargi bez innych objawów cGvHD
	5. Zmiany w narządach płciowych potwierdzone biopsją bez innych objawów cGvHD
Postać rozległa	
1. uogólnione zajęcie skóry	1. Zajęcie 2 lub więcej narządów w przebiegu cGvHD, potwierdzone biopsją jednego z nich
2. Ograniczone zmiany skórne lub dysfunkcja wątroby w przebiegu cGvHD plus:	2. Karnofsky $<60\%$, utrata masy ciała $\geq 15\%$, nawracające infekcje bez innej przyczyny, potwierdzona biopsją cGvHD w jakimkolwiek innym narządzie
a. w biopsji przewlekłe postępujące zapalenie wątroby, martwica mostowa, marskość wątroby	3. Potwierdzone biopsją zajęcie skóry o powierzchni większej niż w postaci ograniczonej
b. zmiany oczne (dodatni test Schirmera ≤ 5 mm) lub	4. Twardzina
c. potwierdzone biopsją zmiany śluzówek jamy ustnej lub gruczołów ślinowych	5. Onycholysis (oddzielanie się łożyska od paznokcia) lub onychodystrofia, potwierdzona biopsją cGvHD w jakimkolwiek narządzie
d. zajęcie jakiegokolwiek innego organu	6. Zapalenie obturacyjne oskrzelików nie spowodowane inną przyczyną
	7. Dodatnia biopsja wątroby lub (FALK) $>2 \times$ norma, AST, ALT $> 3 \times$ norma, bilirubina całkowita $> 27,3 \mu\text{mol/l}$) z potwierdzeniem cGvHD w innym narządzie
	8. Potwierdzone biopsją zmiany górnego lub dolnego odcinka przewodu pokarmowego
	9. Zapalenie powięzi lub błon surowiczych bez innej przyczyny; Przykurcze spowodowane przez cGvHD

Nowe podejście do stopniowania zaawansowania klinicznego choroby przeszczep przeciw gospodarzowi zaproponowane w 2005 roku przez ASBMT (46) przywiązuje mniejszą wagę do kryterium czasowego przy odróżnianiu aGvHD od cGvHD, a o rozpoznaniu decyduje tu obraz kliniczny. Uwzględnia się też tzw. zespół nakładania, w którym współlistnieją cechy aGvHD i cGvHD. Ocenia się stopień upośledzenia funkcji każdego z narządów w 4-punktowej skali (0-3), gdzie 0 oznacza brak zajęcia danego narządu, a 3 odpowiada ciężkiemu uszkodzeniu narządu. Narządy poddawane analizie to: skóra, śluzówki jamy ustnej, oczy, przewód pokarmowy, wątroba, płuca, powięzi i stawy, żeńskie drogi płciowe. Dodatkowo bierze się pod uwagę rzadziej występujące powikłania lub objawy towarzyszące: zwężenie przelyku, zapalenie błon surowiczych z wysiękiem, miastenia gravis, zapalenie nerwowo-mięśniowe, zespół nerczycowy, kardiomiopatię, neuropatię obwodową, małopłytkowość, eozynofilię. Konieczne jest stwierdzenie obecności tzw. objawów diagnostycznych, charakterystycznych dla zajęcia danego narządu przez GvHD. Jeśli występują cechy niewystarczające do rozpoznania GvHD, wymagane jest potwierdzenie biopsyjne, laboratoryjne lub radiologiczne. Po podsumowaniu określa się globalny stopień zaawansowania GvHD.

Stopniowanie cGvHD:

- Łagodna postać przewlekłego GvHD (ang. mild cGvHD) – zajęcie 1 lub 2 organów (z wyjątkiem płuc) bez znacznego upośledzenia funkcji (maksymalnie 1 punkt w zajętych narządach)
- Umiarkowana postać przewlekłego GvHD (ang. moderate cGvHD) – zajęcie w znacznym stopniu 1 narządu (maksymalnie 2 punkty) lub zajęcie w nieznacznym stopniu 3 lub więcej narządów (maksymalnie 1 punkt w każdym z zajętych narządów), w tym nieznaczne zajęcie płuc (1 punkt)
- Ciężka postać przewlekłego GvHD (ang. severe cGvHD) – bardzo znaczne upośledzenie czynności zajętego narządu (3 punkty w jakimkolwiek organie) lub znaczące zajęcie płuc (≥ 2 punkty)

Na podstawie notatek w dokumentacji pacjentów, obok rozpoznania postawionego według zmodyfikowanych kryteriów Seattle, retrospektywnie oszacowano zaawansowanie choroby według kryteriów ASBMT.

Tabela 5 Kategorie ostrej i przewlekłej choroby przeszczep przeciw gospodarzowi (ASBMT 2005)

Kategorie	Okres ujawnienia się objawów po HCT lub DLI	Obecność cech typowych dla aGvHD	Obecność cech typowych dla cGvHD
Klasyczne aGvHD	≤100 doby	Tak	Nie
Przetrwałe, nawracające lub o późnym początku* aGvHD	>100 doby	Tak	Nie
Klasyczne cGvHD	bez granic czasowych	Nie	Tak
Zespół nakładania	bez granic czasowych	Tak	Tak

**np. przy odstawianiu immunosupresji*

3.1.3 Kryteria włączenia do programu szczepień ochronnych po HCT

Do programu szczepień ochronnych włączono pacjentów po HCT, u których minęły przynajmniej 2 miesiące od odstawienia immunosupresji. Dopuszczeni zostali pacjenci z cechami cGvHD w stopniu łagodnym oraz po leczeniu umiarkowanej (moderate cGvHD) i ciężkiej postaci, bez cech zaostrzenia. Do grupy wczesnej zaliczono 19 pacjentów, a do grupy późnej 30 osób.

W grupie 49 badanych 5 przebyło WZW B, ale wyeliminowało wirusa (antygen HBs ujemny), w tym 4 przed i 1 osoba po HCT. U tych osób (3 z grupy wczesnej i 2 z grupy późnej) nie podawano rHBsAg ze względu na ochronne miano antyHBs z zamiarem immunizacji w razie obniżania się stężenia swoistych przeciwciał. Wśród nich u 3 osób miano wynosiło >1000mIU/ml. Dodatkowo u 3 pacjentów z grupy późnej dzięki adoptywnemu transferowi odporności przed długi okres czasu utrzymywało się ochronne miano przeciwciał antyHBs; dwojgu z nich podano rHBsAg z powodu malejącego stężenia przeciwciał. Reasumując, pełen cykl szczepień ochronnych w grupie wczesnej otrzymało 16 osób, a w grupie późnej 27 osób, podczas gdy cykl szczepień pozbawiony rHBsAg w obu grupach podano 3 pacjentom.

3.1.4 Kalendarz szczepień ochronnych

Wyjściowy kalendarz szczepień ochronnych (Tabela 6) opracowano w oparciu o program realizowany w Fred Hutchinson Cancer Research Center w Seattle, USA, doniesienia literaturowe dotyczące wyników immunizacji czynnej poszczególnymi szczepionkami u pacjentów z zaburzeniami odporności oraz rekomendacje EBMT, ASBMT i Myeloma and Transplantation Research Center, Little Rock, Arkansas,

USA. Program szczepień wdrożono w maju 2004 roku włączając stopniowo pacjentów z obu grup przychodzących na rutynowe wizyty kontrolne do Poradni dla Chorych po Przeszczepie Szpiku Kostnego. Podczas kwalifikowania do immunizacji czynnej pacjenci byli każdorazowo badani, aby wykluczyć infekcje jako przeciwwskazania do podania szczepionki. Lista szczepionek użytych w realizowaniu programu immunizacji znajduje się w tabeli (Tabela 7).

Jednocześnie podawane były maksymalnie 3 szczepienia domięśniowe (np. Td, IPV, WZW B), w odległe części ciała (np. ramię prawe, ramię lewe, pośladek), w odstępach czasu nie większych niż 3 minuty. Kolejne dawki podawano po 4-8 tygodniach. Odstępstwem od zaplanowanego kalendarza była pierwsza immunizacja szczepionką Hib, której nie podawano 4 miesiące po HCT, aby wykluczyć jej wpływ na wyniki badań immunologicznych rozpoczynanych po odstawieniu immunosupresji (>6 miesięcy po transplantacji).

Tabela 6 Kalendarz szczepień ochronnych - stosowany formularz

KARTA SZCZEPIEŃ PO PRZESZCZEPIENIU ALLOGENICZNYM

MIESIĄC po HCT	DATA	PIECZĄTKA LEKARZA	SZCZEPIENIE
4			Hib (I)
6			WZW B (0)
			GRYPA
7			WZW B (1)
8			(WZW B) (2)
10			Hib (II)
12			WZW B (6)
			Pneumo (i) (ew. z II dawką Hib)
			Td + IPV (I)
14			Td + IPV (II)
16			Td + IPV (III)
18			WZW B (12)
24			Pneumo (II)

Tabela 7 Charakterystyka szczepionek

Nazwa skrócona	Aktywność szczepionki/toksoidu	Nazwa handlowa	Producent/dystrybutor
<i>Grypa</i>	przeciwno wirusowi grypy	Influvac	Solvay Pharmaceuticals
<i>Grypa</i>	przeciwno wirusowi grypy	Vaxigrip	Aventis Pasteur
<i>Hib</i>	przeciwno <i>Haemophilus influenza</i> typu B	Hiberix	GlaxoSmithKline Biologicals
<i>IPV</i>	przeciwno wirusowi Polio (inaktywowana)	Imovax Polio	Aventis Pasteur
<i>Pneumo</i>	przeciwno <i>Streptococcus pneumoniae</i> (23-walentna)	Pneumovax 23	Merck Sharp & Dohme
<i>Td</i>	przeciwno tężcowi i błonicy	Td	Biomed S.A.
<i>WZW B</i>	przeciwno wirusowemu zapaleniu wątroby typu B	Engerix B	GlaxoSmithKline Biologicals

3.1.5 Kryteria odpowiedzi na immunizację rHBsAg

Miano przeciwciał antyHBs jest rutynowym badaniem wykonywanym przez Centralne Laboratorium Kliniczne. Dzięki wieloletniemu monitorowaniu miana przeciwciał antyHBs u chorych przed i po transplantacji oraz u ich dawców, można było retrospektywnie ocenić wpływ immunologicznego statusu dawcy i biorcy przed HCT na utrzymywanie się ochronnego stężenia przeciwciał antyHBs i kształtowanie się odpowiedzi na ponowne podanie rHBsAg. U pacjentów zakwalifikowanych do szczepienia przeciwno WZW B podawano domięśniowo oczyszczony, główny antygen powierzchniowy wirusa HBV, otrzymywany z rekombinowanych komórek drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*), adsorbowany na związkach glinu.

Jako serokonwersję traktowano wystąpienie poszczepiennego miana antyHBs >1mUI/ml przy wyjściowym poziomie antyHBs <1mUI/ml. Za miano niskie zabezpieczające przyjęto zakres antyHBs między 10-100mUI/ml, miano zapewniające odporność powyżej roku zakres antyHBs między 100-1000mUI/ml, a dające wieloletnią odporność miano >1000mUI/ml.

Pierwsza podawana dawka rHBsAg była u wszystkich pacjentów podwójna (40μg). Kolejne dawki zależały od miana antyHBs. Brak serokonwersji lub utrzymywanie się niskiego miana poszczepiennych przeciwciał po kolejnych podaniach rHBsAg (antyHBs <10mUI/ml) wymuszał konieczność podawania nadal dawki 40μg, aż do uzyskania antyHBs >10mUI/ml. W przypadku wystąpienia serokonwersji lub wzrostu miana antyHBs >10mUI/ml już po pierwszej dawce

szczepionki, zdecydowano się na podawanie pojedynczych dawek szczepionki (20µg) przy kolejnych immunizacjach.

Miano antyHBs kontrolowano po każdym podaniu rHBsAg i monitorowano po zakończeniu programu szczepień podczas kontrolnych wizyt w poradni. Grupę pacjentów immunizowanych przeciwko WZW B podzielono na 3 grupy w zależności od stężenia poszczepiennego antyHBs, ilości podanych dawek szczepionki oraz czasokresu utrzymywania się ochronnego miana przeciwciał:

1. Grupa słabo odpowiadająca na szczepienie (SO)

- konieczność podawania przynajmniej 4 dawek w celu osiągnięcia miana antyHBs 10-100mUI/ml
- miano ochronne >100mUI/ml osiągnięto po 2 - 4 dawkach, ale utrzymywało się >100 mUI/ml poniżej roku

2. Grupa dobrze odpowiadająca na szczepienie (DO)

- miano ochronne >100mUI/ml osiągnięto po 3 - 4 dawkach i utrzymywało się >100 mUI/ml minimum rok

3. Grupa bardzo dobrze odpowiadająca na szczepienie (BDO)

- miano ochronne >100mUI/ml uzyskano po 1 - 2 dawkach i utrzymywało się >100mUI/ml minimum rok

3.2 Metody badań

Badania morfologii krwi, elektroforezy białek surowicy, stężenia immunoglobulin IgG, IgM, IgA, markerów WZW są rutynowymi badaniami wykonywanymi w Centralnym Laboratorium Klinicznym Akademickiego Centrum Klinicznego podczas wizyt kontrolnych pacjentów w Poradni dla Chorych po Przeszczepie Szpiku Kostnego. Pozostałe badania doświadczalne wykonano samodzielnie w Pracowni Preparatyki i Hodowli Komórkowych Szpiku Kostnego oraz Pracowni Cytometrii i Cytomorfologii Katedry i Kliniki Hematologii i Transplantologii Akademii Medycznej w Gdańsku. Część doświadczalna pracy doktorskiej przeprowadzona została dzięki zdobytym umiejętnościom i badaniom wykonanym w Pracowni Cytometrii, Laboratorium Immunologii Uniwersyteckiego Centrum Szpitalnego Rangueil (Toulouse, Francja).

3.2.1 Ocena subpopulacji leukocytów krwi obwodowej

Ocenę subpopulacji leukocytów krwi obwodowej wykonywano w Pracowni Cytometrii i Cytomorfologii Katedry i Kliniki Hematologii i Transplantologii Akademii Medycznej w Gdańsku przy użyciu cytometru przepływowego FACS - Calibur (Becton Dickinson, San Jose, USA). Znakowanie antygenów na powierzchni limfocytów linii T przeprowadzano z krwi pełnej. W celu zwiększenia czułości oceny antygenów na powierzchni mniej licznych limfocytów B, znakowanie wykonywano na izolowanej z krwi pełnej populacji komórek jednojądrzastych (Peripheral Blood Mononuclear Cell – PBMC).

Izolacja jednojądrzastych komórek krwi obwodowej

Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC) uzyskiwano drogą wirowania (wirówka MPW 342) pobranej krwi żyłnej w gradiencie stężeń, przy użyciu Histopaq 1077 (Sigma, nr kat. H8889). W warunkach aseptycznych w komorze z laminarnym nawiewem jałowego powietrza do 5ml krwi pobranej na heparynę dodawano ekwiwalentną (1:1) objętość RPMI (Tominex, nr kat. 36750) z dodatkiem 10% roztworu FBS (Tominex, nr kat. 06400), następnie nawarstwiano na 5ml Histopaq 1077 i wirowano przez 25 minut (RCF 400) w temperaturze 20°C. Po odwirowaniu uzyskiwano widoczne rozdzielenie faz z wyraźnie zaznaczonym pierścieniem komórek jednojądrzastych, które przenoszono jałową pipetą do innej probówki. Po jednokrotnym płukaniu komórek w RPMI (10 minut; RCF 450)

usuwano supernatant, a osad komórkowy zawieszano w roztworze RPMI z FBS do uzyskania objętości 1ml. Następnie za pomocą analizatora komórkowego Miros 60 (ABX, Montpellier, Francja) oznaczano ilość limfocytów w rozcieńczonej 10-krotnie próbce pobranej z 1ml zawiesiny PBMC. Po uzyskaniu wyniku zawiesinę rozcieńczano z użyciem roztworu RPMI z FBS tak, aby koncentracja limfocytów wynosiła 2×10^6 /ml. Część wyizolowanych limfocytów wykorzystywano do hodowli z mitogenami do określenia ekspresji wewnątrzcytoplazmatycznej cytokin Th1 i Th2, pozostałe limfocyty służyły do wyznakowania wybranych antygenów linii B.

Przygotowanie do analizy cytometrycznej zawiesiny leukocytów z krwi pełnej bez izolacji

Do 1 ml krwi żyłnej dodawano 3 ml roztworu lizującego erytrocyty (FACS lysing solution, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), po 10 min inkubacji w ciemności próbkę odwirowywano (5 minut, RCF 650), usuwano supernatant i procedurę lizy erytrocytów powtarzano. Uzyskany osad komórek płukano przez dodanie 2ml roztworu PBS (CellWASH, Becton Dickinson, USA), wymieszanie oraz odwirowanie zawiesiny. Odsączony osad komórek zawieszano w PBS z dodatkiem albuminy (2% roztwór). Komórkowość zawiesiny określano za pomocą analizatora komórkowego Micros 60.

Oznaczanie subpopulacji komórek naiwnych i pamięci immunologicznej limfocytów B i T

Do wyodrębnienia subpopulacji komórek naiwnych i pamięci immunologicznej limfocytów linii B i T stosowano trójkolorowe barwienia. Dokładną listę użytych przeciwciał wraz z fluorochromami przedstawia Tabela 8. Wszystkie przeciwciała pochodziły z firmy Becton Dickinson, San Jose, CA, USA.

W osobnych próbkach zawiesiny komórkowe inkubowano z 10 μ l monoklonalnych przeciwciał w następujących zestawach: z linii B antyCD19, antyCD27, antyIgM; antyCD19, antyCD27, antyIgD; antyCD19, antyCD27, antyIgG, a z linii T antyCD3, antyCD4, antyCD8; antyCD4, antyCD45RA, antyCD45RO; antyCD8, antyCD45RA, antyCD45RO. Stosowano również kontrolę izotypową γ 1/ γ 2a. Komórki inkubowano przez 30 minut w ciemności, po czym płukano w PBS (5 minut; RCF 650). Następnie usuwano supernatant, a odsączony osad wyznakowanych fluorochromami komórek zawieszano w PBS z albuminami i poddawano analizie cytometrycznej. Populacje komórek badano w bramce limfocytarnej i wyznaczano na podstawie dodatniego sygnału fluorescencji powyżej fluorescencji kontroli izotypowej. Wartość bezwzględna określonych subpopulacji

wyliczano na podstawie odsetka pozytywnych komórek z bramki limfocytarnej oraz liczby limfocytów oznaczonej w badanej próbce krwi przez analizator komórkowy. Jako komórki linii B traktowano limfocyty z ekspresją powierzchniową CD19+, z których wyodrębniano komórki tzw. naiwne o immunofenotypie CD27-IgM+ oraz CD27-IgD+ i komórki pamięci immunologicznej CD27+IgG+, CD27+IgM+, CD27+IgD+. W linii T (CD3+) badano stosunek komórek CD4 do CD8 oraz subpopulacje komórek naiwnych linii T CD45RA+RO-, komórek pamięci immunologicznej CD45RA-RO+ oraz komórek ‘podwójnie pozytywnych’ CD45RA+RO+ w obrębie limfocytów CD4+ i CD8+. Wyodrębniono również grupę komórek CD3-CD8+ należącą do komórek NK.

Tabela 8 Charakterystyka przeciwciał użytych w badaniu ekspresji antygenów powierzchniowych

Specyficzność przeciwciała (fluorochrom)	Klon	Pochodzenie	Podklasa immunoglobulin	Nr katalogowy
$\gamma 1/\gamma 2a$ (FITC/PE)	X39/X40	mysie	IgG1	342409
CD3 (PerCP)	SK7	mysie	IgG1, κ	345766
CD4 (PE, PerCP)	SK3	mysie	IgG2a, κ	345769, 345770
CD8 (FITC, PerCP)	SK1	mysie	IgG1, κ	345772, 345774
CD19 (CyChrome)	HIB19	mysie	IgG1, κ	555414
CD27 (PE)	L128	mysie	IgG1, κ	340425
CD45RA (FITC)	L48	mysie	IgG1, κ	347723
CD45RO (PE)	UCHL-1	mysie	IgG2a, κ	347967
IgD (FITC)	IA6-2	mysie	IgG2a, κ	555778
IgG (FITC)	G18-145	mysie	IgG1, κ	555786
IgM (FITC)	G20-127	mysie	IgG1, κ	555782

3.2.2 Ocena wewnątrzkomórkowej ekspresji cytokin profilu Th1 i Th2

Izolacja komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (opisana wyżej)

Stymulacja komórek jednojądrzastych z użyciem PMA i jonomycyny w obecności brefeldyny A.

W celu oznaczenia ekspresji wewnątrzcytoplazmatycznej cytokin profilu Th1 i Th2 posłużono się protokołami z Pracowni Cytometrii, Laboratorium Immunologii Uniwersyteckiego Centrum Szpitalnego Rangueil (Toulouse, Francja), opartymi na sprawdzonej metodzie Sandersa i wsp. (1991 rok), z modyfikacją wprowadzoną przez Junga i wsp. (1993 rok). Inkubacja limfocytów z estrami

forbolu - PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate; Sigma-Aldrich, nr kat. P 1585) i solą wapniową jonomycyny (Sigma-Aldrich, nr kat. I 0634) stymuluje produkcję cytokin, a obecność brefeldyny A (substancja blokująca translokację białek z retikulum endoplazmatycznego do aparatu Golgiego; GolgiPlug, Becton Dickinson, nr kat. 555029) zatrzymuje je wewnątrz komórki. W konsekwencji po wyznakowaniu cytokin przy pomocy przeciwciał sprzężonych z substancją fluoryzującą uzyskuje się sygnał wzmocniony wystarczająco do wykonania pomiaru w cytometrze przepływowym. W Tabeli 9 przedstawiono listę przeciwciał wykorzystanych do detekcji cytokin.

Hodowlę limfocytów z substancjami aktywującymi przygotowywano w sterylnych warunkach w komorze z laminarnym nawiewem jałowego powietrza na płytce 24-dolkowej. W celu uzyskania większej ilości komórek do oznaczeń cytometrycznych prowadzono równolegle w kilku dolkach inkubację komórek od jednego pacjenta, w każdym z nich około 1×10^6 limfocytów. Do dołek z zawiesiną komórek dodawano przygotowane uprzednio w odpowiednich stężeniach: 10 μ l GolgiPlug (10 μ g/ml – końcowe stężenie w dolku), 5 μ l PMA (25 ng/ml – końcowe stężenie w dolku), 100 μ l jonomycyny (1 μ g/ml – końcowe stężenie w dolku), następnie dopełniano do 1 ml roztworem RPMI10%FBS i dokładnie mieszano z użyciem pipety. 5-6h inkubacja odbywała się w temperaturze 37°C w atmosferze 5%CO₂.

Zastosowane stężenia PMA i jonomycyny były nieco wyższe niż stosowane standardowo w Toulouse. Jest to efekt doświadczeń własnych w tamtejszym laboratorium z różnymi stężeniami i czasami aktywacji limfocytów w celu uzyskania optymalnego pomiaru ekspresji różnych cytokin wykonywanego w tym samym czasie.

Po kontakcie z PMA dochodzi do znacznego spadku ekspresji antygenu CD4 na powierzchni limfocytów, natomiast ekspresja antygenu CD8 nie zmienia się. Z tego względu do zróżnicowania limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ używa się przeciwciała antyCD8 i uznaje się komórki CD3⁺CD8⁻ za CD3⁺CD4⁺.

Oznaczanie ekspresji antygenów linii T na powierzchni komórek

Po upływie 5-6h zawiesinę komórek pobierano z dołek hodowlanych przy pomocy pipety, płukano (dodawano 2 ml PBS) i wirowano (5min., RCF 650). Odsączony osad zawieszano w PBS z albuminami, rozdzielano do kilku probówek i dodawano przeciwciała antyCD3 sprzężone z PerCP (ang. peridinin chlorophyll)

oraz antyCD8 sprzężone z FITC (ang. fluorescein isothiocyanate). Po 20 minutach inkubacji w ciemności zawiesinę płukano (opis powyżej). Do odsączonych komórek dodawano 500µl 3% formaldehydu i inkubowano 15 minut w ciemności w celu utrwalenia struktury komórek.

Oznaczanie ekspresji cytokin wewnątrz limfocytów T

Aby możliwe było wyznakowanie cytokin wewnątrz komórek konieczne jest zwiększenie przepuszczalności błon komórkowych. W tym celu do utrwalonej formaldehydem zawiesiny, po płukaniu w PBS i odwirowaniu, dodawano 500µl 10-krotnie rozcieńzonego w wodzie dejonizowanej roztworu saponiny - Facs permeabilizing solution (Perm 2, Becton Dickinson, nr kat. 347692). Probówki inkubowano 15 minut w ciemności i ponownie płukano w PBS. Po odwirowaniu i odsączeniu, osad komórek zawieszano w PBS z albuminą i dodawano po 10µl przeciwciał przeciwko cytokinom (IFN γ , IL2, IL4, IL10, IL5) znakowanych fluorochromami (FITC, PE – ang. phycoerytrin). Po 30 minutach inkubacji w ciemności, wybarwione komórki płukano i po odwirowaniu zawieszano w 200µl 0,5% roztworu formaldehydu. Odczytu w cytometrze przepływowym dokonywano przed upływem 24h od momentu zakończenia procedury barwienia. Ekspresję cytokin badano w bramce limfocytarnej w komórkach CD3+, z podziałem na populację CD8+ i CD8- (które uznaje się za limfocyty CD4+) i wyznaczano na podstawie dodatniego sygnału fluorescencji powyżej fluorescencji kontroli izotypowej.

Tabela 9 Charakterystyka przeciwciał użytych do detekcji wewnątrzcytoplazmatycznej cytokin

Specyficzność przeciwciała (fluorochrom)	Klon	Pochodzenie	Podklasa immunoglobulin	Numer katalogowy
<i>Human IFNγ</i> (PE, FITC)	25723.11	mysie	IgG2b, κ	340449, 340452
<i>Human IL2</i> (PE, FITC)	5344.111	mysie	IgG1, κ	340448, 340450
<i>Human IL4</i> (PE)	3010.211	mysie	IgG1, κ	340451
<i>Human IL5</i> (PE)	JES1-39D10	szczurze	IgG2a	559332
<i>Human IL10</i> (PE)	JES3-12G8	szczurze	IgG2a	559076

3.3 Analiza statystyczna

Każdą zmienną o charakterze ciągłym oceniano pod względem zgodności jej rozkładu z rozkładem normalnym (ocena histogramów, test Kołmogorowa-Smirnowa). Zmienne o rozkładzie zgodnym z rozkładem normalnym analizowano metodami parametrycznymi. Do oceny różnic pomiędzy takimi zmiennymi stosowano test t-Studenta oraz analizę wariancji (ANOVA) z testami post-hoc (założenia analizy wariancji weryfikowano standardowymi metodami). Do oceny zmienności parametrów w czasie stosowano test t-Studenta dla danych sparowanych lub ANOVA - układy z powtarzanymi pomiarami.

Zmienne, których rozkład odbiegał od rozkładu normalnego, analizowano metodami nieparametrycznymi. Dla porównania dwóch zmiennych o charakterze ciągłym stosowano test U Manna-Whitneya. Związki pomiędzy zmiennymi skategoryzowanymi oceniano przy pomocy testu χ^2 . Do oceny wpływu jednej ze zmiennych na wynik immunizacji zastosowano metodę Kaplana-Meiera.

W pracy przyjęto poziom istotności statystycznej $p < 0,05$. Obliczenia zostały przeprowadzone przy użyciu programu komputerowego „Statistica 7.1” firmy Stat-Soft licencjonowanego dla Akademii Medycznej w Gdańsku.

4 WYNIKI

4.1 Ocena rekonstrukcji immunologicznej po HCT

4.1.1 Wybrane parametry morfologii krwi obwodowej

Retrospektywna analiza parametrów krwi obwodowej 49 pacjentów w dobie +100,+180 oraz 1, 2, 3 lata po HCT wykazała stopniowy wzrost bezwzględnej ilości neutrocytów (absolut neutrophil count; ANC) oraz limfocytów wraz z upływem czasu od HCT.

Neutrocyty

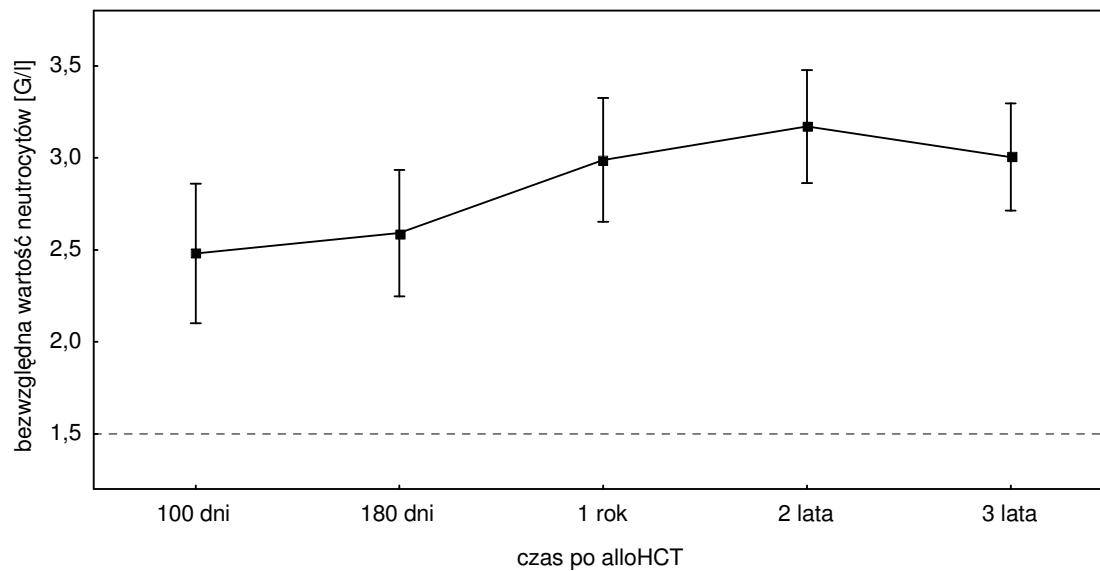
W badanej grupie u żadnego z pacjentów w dobach +100, +180 oraz 1, 2, 3 lata po HCT nie obserwowano agranulocytozy ($ANC < 0,5 G/l$). Granulocytopenia ($ANC < 1,5 G/l$) występowała w ocenianych okresach po przeszczepieniu u malejącego z czasem odsetka chorych.

W dobie +100 granulocytopenię obserwowano u 14 (28,6%) chorych, w tym minimalna zanotowana wartość ANC wynosiła $0,7 G/l$, a średnia wartość $2,42 G/l$ ($\pm 1,24$). W dobie +180 u 6 (12,2%) pacjentów występowała nadal obniżona ilość granulocytów z minimalną wartością $0,8 G/l$ i średnią $2,6 G/l$ ($\pm 1,11$). Rok po HCT u 5 (10,2%) badanych zanotowano granulocytopenię z minimum $1,0 G/l$, podczas gdy wartość średnia w tym okresie wynosiła $2,9 G/l$ ($\pm 1,1$). Po 2 latach od transplantacji jedynie u 2 (4,1%) chorych utrzymywała się granulocytopenia z minimalną wartością $1,24 G/l$, a średnia wzrosła do $3,1 G/l$ ($\pm 1,01$). 3 lata po HCT minimalna zanotowana wartość ANC w badanej grupie wynosiła $1,5 G/l$, przy średniej $3,0 G/l$ ($\pm 0,97$).

Wzrost parametru ANC od doby 100 do 3 lat po HCT przedstawia Rycina 1. Trend zmienności ANC wraz z upływem czasu od transplantacji jest istotny statystycznie ($p=0,002$).

Rycina 1 Bezwzględna wartość neutrocytów (ANC) w 100 dobie, 180 dobie, 1 rok, 2 lata, 3 lata po HCT

Na wykresie przedstawiono średnie wartości ANC i ich 95% przedziały ufności. Linia przerywana oznacza graniczną wartość (1,5 G/l), poniżej której rozpoznaje się granulocytopenię.



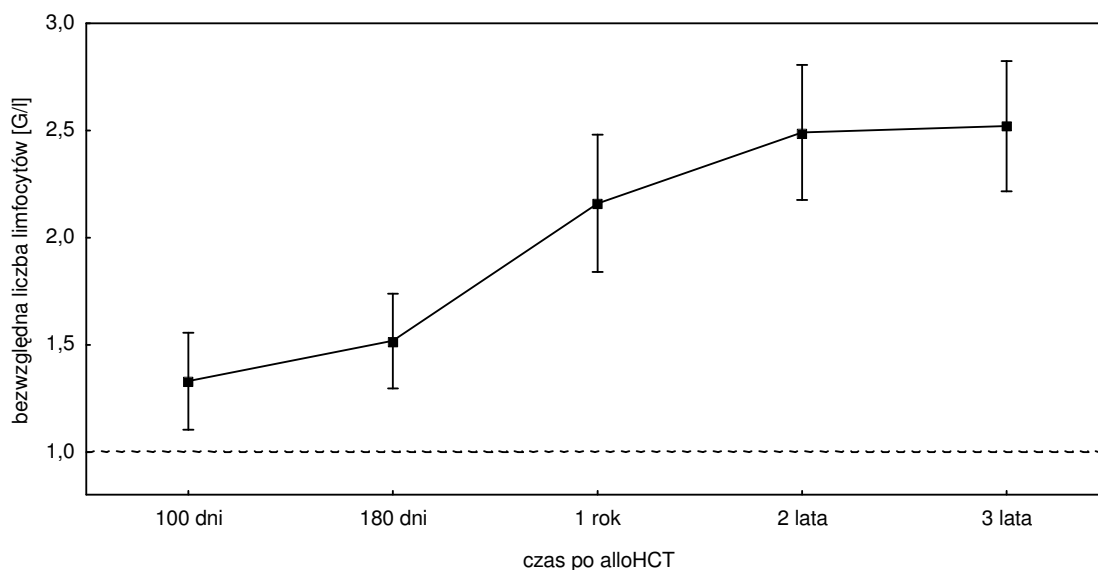
Limfocyty

Występowanie limfopenii ($<1,0\text{G/l}$) w grupie badanych pacjentów kształtowało się podobnie jak w przypadku ANC - malało z upływem czasu od przeszczepienia. W dobie +100 limfopenię zaobserwowano u 22 (44,9%) biorców HCT z minimalną wartością $0,21\text{G/l}$, przy średniej w grupie $1,3\text{G/l}$ ($\pm 0,73$). W dobie +180 występowała u 12 (24,5%) pacjentów z minimum $0,3\text{G/l}$ i średnią wartością w tym okresie $1,6\text{G/l}$ ($\pm 0,94$). W okresie roku po HCT obniżoną wartość limfocytów obserwowano nadal u 8 (16,3%) osób z minimum $0,7\text{G/l}$, podczas gdy wartość średnia wynosiła $2,2\text{G/l}$ ($\pm 1,09$). Po 2 latach u 2 (4,1%) pacjentów obserwowano limfopenię z minimalną wartością $0,7\text{G/l}$ i średnią w grupie $2,5\text{G/l}$ ($\pm 1,04$). 3 lata po HCT minimalna ilość limfocytów we krwi badanej grupy wynosiła $1,0\text{G/l}$, przy utrzymującej się średniej wartości $2,5\text{G/l}$ ($\pm 1,01$).

Zmiany wartości bezwzględnej limfocytów we krwi pacjentów w dobach +100, +180 oraz rok, 2 lata i 3 lata po transplantacji przedstawia Rycina 2. Wzrost tego parametru wraz z upływem czasu po HCT wykazuje znamienność statystyczną ($p < 0,001$).

Rycina 2 Liczba limfocytów w 100 dobie, 180 dobie, 1 rok, 2 lata, 3 lata po HCT

Na wykresie przedstawiono średnie liczby limfocytów i ich 95% przedziały ufności. Linia przerywana oznacza graniczną wartość ($1,0\text{ G/l}$), poniżej której rozpoznaje się limfocytopenię.



4.1.2 Wybrane parametry białkowe

Retrospektywna ocena odsetka γ -globulin w elektroforezie białek surowicy oraz stężenia immunoglobulin IgG, IgA, IgM w grupie 49 pacjentów w dobie +100,+180 oraz 1, 2, 3 lata po przeszczepieniu allogenicznym wykazała wzrost tych parametrów wraz z upływem czasu od HCT. Jako zakres norm gammaglobulin oraz immunoglobulin IgG, IgM, IgA przyjęto zakresy przedstawione w podręczniku Chorób Wewnętrznych pod redakcją Prof. Szczeklika

Elektroforeza białek surowicy

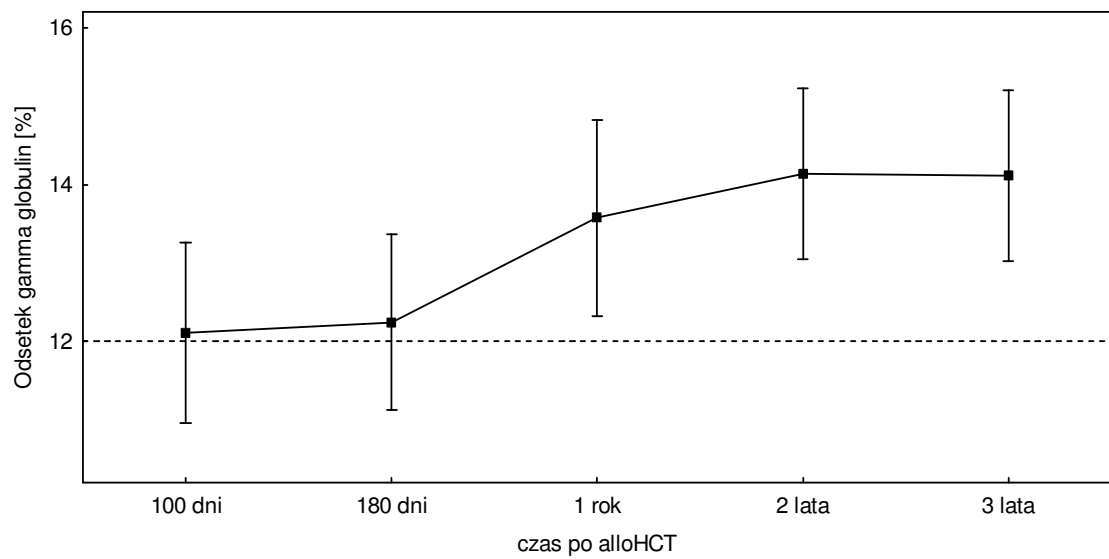
Hipogammaglobulinemia (przyjęto odsetek γ -globulin $\leq 12\%$) występowała do 180 doby u 53% pacjentów z minimalną wartością 5%, przy średnim odsetku 12,4% ($\pm 3,76$). W okresie roku po HCT częstość występowania hipogammaglobulinemii zredukowała się do 40,8% (minimum 4%; średnia 13,5%, $\pm 4,32$). Hipogammaglobulinemia utrzymywała się nadal 2 i 3 lata po przeszczepieniu u 35% biorców HCT przy wartościach średnich odpowiednio 14,4% ($\pm 3,66$) i 14,1% ($\pm 3,63$).

Hipergammaglobulinemię (przyjęto γ -globuliny $\geq 18\%$) zanotowano natomiast u odpowiednio 8% pacjentów w dobie +100, 10% w dobie +180, 20% rok po HCT, 18% chorych 2 lata i 24% biorców 3 lata po przeszczepieniu.

Zmiany odsetka gammaglobulin w elektroforezie białek u pacjentów w okresie od doby +100 do 3 lat po HCT przedstawia Rycina 3. Trend zmienności tego parametru po transplantacji jest istotny statystycznie ($p < 0,001$).

Rycina 3 Odsetek γ -globulin w 100 dobie, 180 dobie, 1 rok, 2 lata, 3 lata po HCT

Na wykresie przedstawiono średnie odsetki γ -globulin i ich 95% przedziały ufności. Linia przerywana oznacza dolną granicę wartości prawidłowych (12%), poza którą rozpoznaje się hipogammaglobulinemię.

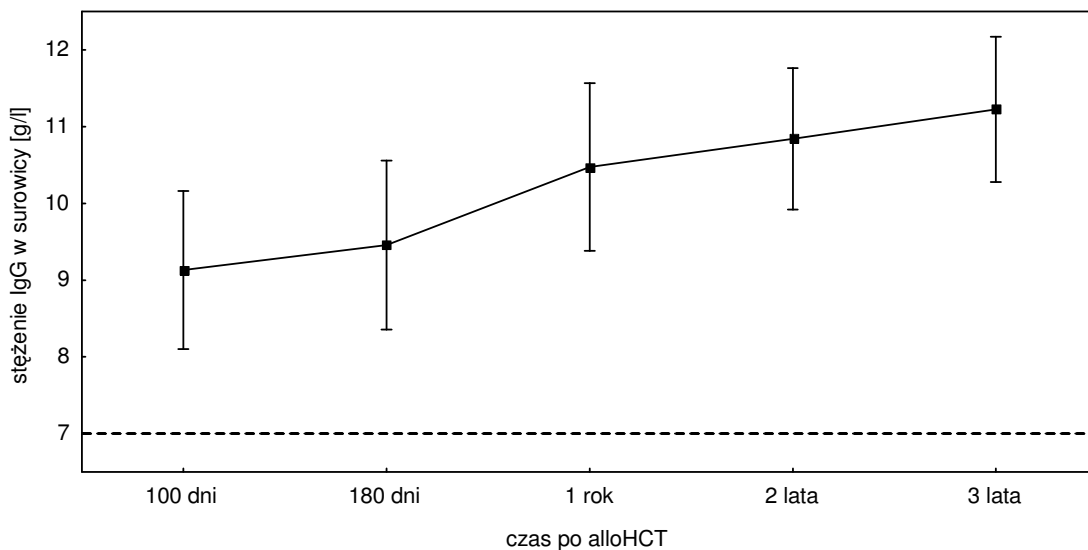


Immunoglobuliny

Obniżone stężenie immunoglobuliny IgG (przyjęto $\leq 7\text{g/l}$) stwierdzano u malejącego z czasem odsetka chorych: u 30% w dobie +100 (minimum 4,3g/l), 24% w dobie +180 (minimum 3,3g/l), 16% rok po HCT (minimum 3,4g/l) i 6% 2 i 3 lata po przeszczepieniu (minimum odpowiednio 4,9 i 5,2g/l). Wraz z upływem czasu od transplantacji obserwowano wzrost odsetka pacjentów ze stężeniem IgG przekraczającym 16g/l z 2% w dobie +100 do 12% rok po przeszczepieniu, podczas gdy 2 i 3 lata po HCT podwyższone stężenie IgG utrzymywało się u 8% biorców. Średnie stężenia IgG wynosiły w wymienionych przedziałach czasowych odpowiednio 9,1g/l ($\pm 3,4$), 9,8g/l ($\pm 3,69$), 10,9g/l ($\pm 4,26$), 11,2g/l ($\pm 3,4$), 11,2g/l ($\pm 3,15$). Zmiany w stężeniu immunoglobuliny IgG wraz z upływem czasu od transplantacji obrazuje Rycina 4. Wzrost tego parametru w zależności od okresu po HCT wykazuje znamienność statystyczną ($p < 0,001$).

Rycina 4 Stężenie immunoglobuliny IgG w 100 dobie, 180 dobie, 1 rok, 2 lata, 3 lata po HCT

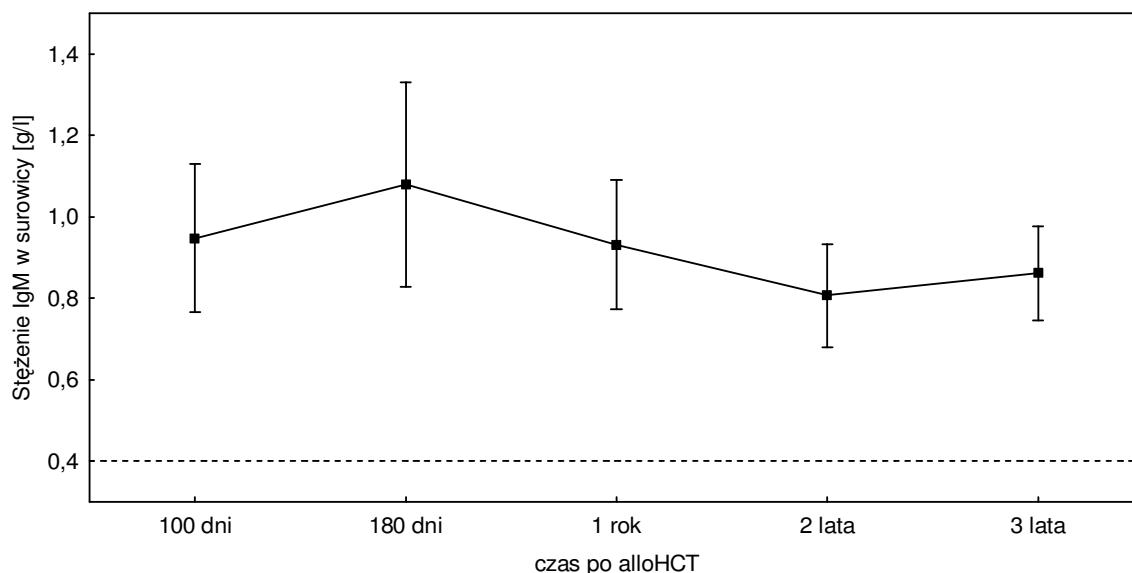
Na wykresie przedstawiono średnie stężenia immunoglobulin klasy IgG i ich 95% przedziały ufności. Linia przerywana oznacza dolną granicę wartości prawidłowych (7 g/l).



Obniżona wartość immunoglobuliny IgM (przyjęto $\leq 0,4\text{g/l}$) utrzymywała się u 12% pacjentów do 2 lat po przeszczepieniu, odsetek ten zmniejszył się do 8% wraz z upływem 3 lat po HCT. Minimalne obserwowane stężenia IgM mieściły się w zakresie 0,2-0,3g/l. Średnie stężenia wynosiły odpowiednio 0,9g/l ($\pm 0,59$) w dobie +100, 1,2g/l ($\pm 1,2$) w dobie +180, 1,0g/l ($\pm 0,51$) rok po przeszczepieniu, 0,8g/l ($\pm 0,43$) 2 lata oraz 0,9g/l ($\pm 0,38$) 3 lata po HCT. Na wykresie poniżej (Rycina 5) przedstawiono zmienność stężenia immunoglobuliny IgM w omówionych przedziałach czasowych. Trend ten wykazuje znamienność statystyczną ($p=0,041$).

Rycina 5 Wykres obrazujący zmienność stężenia immunoglobuliny IgM w 100 dobie, 180 dobie, 1 rok, 2 lata, 3 lata po HCT

Na wykresie przedstawiono średnie stężenia immunoglobulin klasy IgM i ich 95% przedziały ufności. Linia przerywana oznacza dolną granicę wartości prawidłowych (0,4 g/l).

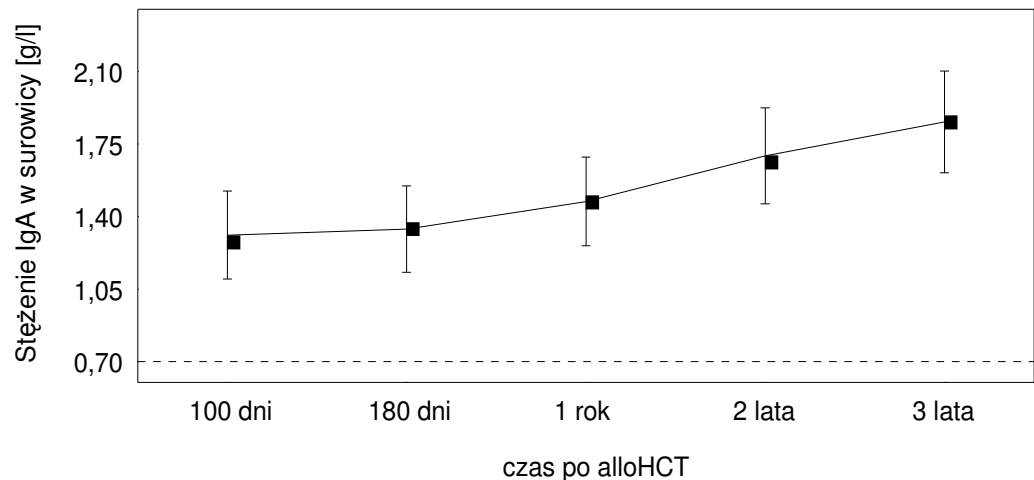


Częstość występowania obniżonego stężenia immunoglobuliny IgA (przyjęto $\leq 0,7\text{g/l}$) stopniowo malała wraz z upływem czasu od procedury przeszczepienia szpiku. Dotyczyło to 26% pacjentów w dobie +100, 22% w dobie +180, 20% chorych po roku oraz 10% 2 lata i 6% osób 3 lata po HCT. Wartości minimalne stężenia kształtowały się w zakresie 0,2-0,4g/l. Nie zanotowano stężenia IgA przewyższającego górną granicę normy (5,0g/l). Średnie stężenia immunoglobuliny IgA wynosiły w wymienionych przedziałach czasowych odpowiednio: 1,3g/l ($\pm 0,71$); 1,3g/l ($\pm 0,69$); 1,5g/l ($\pm 0,72$); 1,7g/l ($\pm 0,75$); 1,9g/l ($\pm 0,82$).

Zmienność stężenia immunoglobuliny IgA w powyższych przedziałach czasowych przedstawia Rycina 6. Trend wzrostu stężenia IgA wraz z upływem czasu od transplantacji jest istotny statystycznie ($p < 0,001$).

Rycina 6 Stężenie immunoglobuliny IgA w 100 dobie, 180 dobie, 1 rok, 2 lata, 3 lata po HCT

Na wykresie przedstawiono średnie stężenia immunoglobulin klasy IgA i ich 95% przedziały ufności. Linia przerywana oznacza dolną granicę wartości prawidłowych (0,4 g/l)



4.2 Porównanie parametrów rekonstrukcji immunologicznej po HCT w grupie wczesnej i późnej

4.2.1 Informacje ogólne o grupie wczesnej i późnej

49 pacjentów włączonych do programu szczepień ochronnych podzielono na dwie grupy w zależności od czasu, który upłynął od procedury przeszczepienia. W okresie wczesnym (>6 miesięcy a <24 miesięcy po HCT) szczepienia ochronne można było wprowadzić u 19 chorych, podczas gdy w okresie późnym (>24 miesięcy po HCT) u 30 chorych.

Grupy wczesna i późna różniły się zasadniczo czasem rozpoczęcia immunizacji czynnej. Mediana czasu rozpoczęcia szczepień w grupie wczesnej wynosiła 20 miesięcy po HCT, 7 miesięcy po odstawieniu immunosupresji. W grupie późnej mediana czasu rozpoczęcia immunizacji czynnej to 56,5 miesiąca, 20 miesięcy po zakończeniu terapii immunosupresyjnej.

Wiek pacjentów w okresie rozpoczęcia szczepień ochronnych był istotnie wyższy w grupie późnej w porównaniu do grupy wczesnej (mediana 43,5 v 35) ($p=0,002$). Grupy nie różniły się znamienne rozkładem płci.

Oceniane przed szczepieniem: ilość bezwzględna limfocytów, odsetek γ -globulin oraz stężenie immunoglobulin IgG i IgM były porównywalne w obu grupach. Obserwowano natomiast znamienne statystycznie różnicę w stężeniu immunoglobuliny IgA między grupami ($p=0,005$). Mediana stężenia IgA była wyższa w grupie późnej (2,1 v 1,36g/l).

Szczegółowe porównanie wymienionych parametrów w grupie wczesnej i późnej przedstawia Tabela 10.

Tabela 10 Charakterystyka grupy wczesnej i późnej pod względem liczebności, rozkładu płci i czasu oraz podstawowych laboratoryjnych parametrów immunologicznych

	<i>Grupa wczesna</i>	<i>Grupa późna</i>
liczba biorców HCT	19	30
kobiety/mężczyźni	42% / 58%	47% / 53%
wiek w czasie immunizacji *	35 (21-50)	43,5 (20-57)
liczba miesięcy po HCT *	20 (12-24)	56,5 (31-119)
liczba miesięcy po odstawieniu immunosupresji *	7 (2-19)	20 (12-31)

Wybrane parametry laboratoryjne oceniane przez rozpoczęciem immunizacji:		
limfocyty **	2,05 G/l ($\pm 0,91$)	2,42 G/l ($\pm 0,91$)
γ -globuliny **	13,7% ($\pm 2,8$)	14,4% ($\pm 3,1$)
immunoglobulina IgG**	11,36 g/l ($\pm 4,11$)	11,55 g/l ($\pm 2,56$)
immunoglobulina IgM **	0,81 g/l ($\pm 0,42$)	0,96 g/l ($\pm 0,45$)
immunoglobulina IgA **	1,36 g/l ($\pm 0,68$)	2,1 g/l ($\pm 0,97$)

*mediana (w nawiasie wartości minimalne i maksymalne)

**średnia arytmetyczna (w nawiasie odchylenie standardowe)

Występowanie choroby przeszczep przeciw gospodarzowi

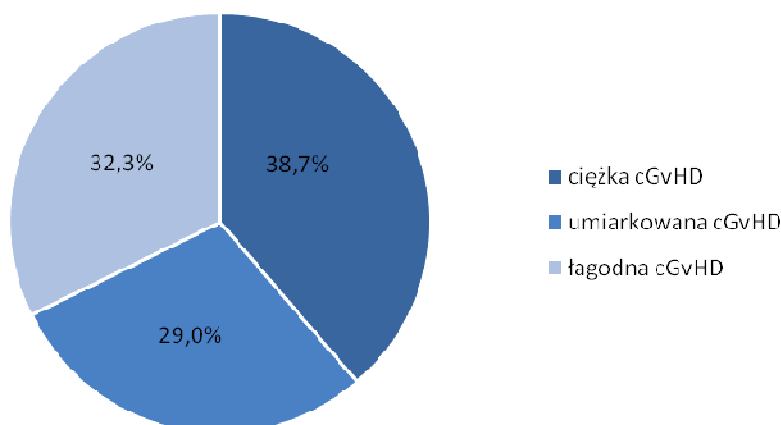
Ostrą chorobę przeszczep przeciw gospodarzowi (aGvHD) rozpoznano u 22 (44,9%) pacjentów, w tym u 16 maksymalnie w 2 stopniu, a u 6 osób w 3 stopniu zaawansowania. W badanej grupie nie rozpoznano 4 stopnia aGvHD. 13 chorych wymagało intensyfikacji terapii immunosupresyjnej na 2-lekową.

Rozpoznanie przewlekłej choroby przeszczep przeciw gospodarzowi (cGvHD) postawiono u 31 (63,3%) chorych. U 15 (48,4%) chorych z cGvHD choroba ta rozwinęła się 'de novo'. U pozostałych poprzedzona była wystąpieniem aGvHD, przy czym u 8 (25,8%) doszło do rozwoju cGvHD po okresie wygaśnięcia cech aGvHD i u kolejnych 8 pacjentów objawy cGvHD wystąpiły podczas redukcji dawki terapii immunosupresyjnej włączonej z powodu aGvHD.

Oceniając rozległość choroby w oparciu o kryteria Seattle, postać ograniczoną rozwinęło 11 (35,5%), a rozległą 20 (64,5%). Kwalifikacja zaawansowania według ASBMT pozwoliła na postawienie rozpoznania postaci łagodnej u 32,3%, umiarkowanej u 29% i ciężkiej u 38,7% pacjentów z cGvHD (Rycina 7).

Rycina 7 Stopnie zaawansowania cGvHD (według klasyfikacji ASBMT) w badanej grupie

Wykres przedstawia odsetek przypadków określonej postaci zaawansowania cGvHD w grupie 31 pacjentów, u których rozpoznano chorobę po HCT.

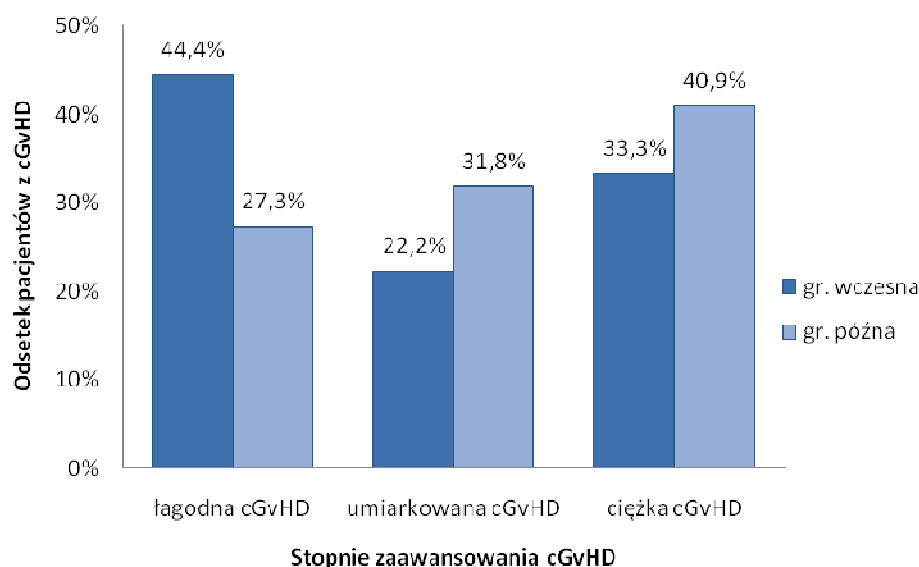


W grupie wczesnej u 47,4% chorych w okresie potransplantacyjnym zdiagnozowano cGvHD, a w grupie późnej u 73,3%. Różnica ta jest na granicy istotności statystycznej ($p=0,06$). Stopień łagodny cGvHD występował częściej w grupie wczesnej, podczas gdy postać ciężką obserwowano w większym odsetku pacjentów w grupie późnej, jednak różnice te nie są znamienne statystycznie ($p=0,64$). Rycina 8 przedstawia porównanie rozkładu poszczególnych stopni zaawansowania cGvHD w obu grupach.

19 (61,3%) chorych wymagało 2 lub 3-lekowej terapii immunosupresyjnej z powodu umiarkowanej lub ciężkiej postaci cGvHD. Mediana czasu odstawienia immunosupresji wynosi 13 miesięcy (zakres 4 - 96 miesięcy).

Rycina 8 Porównanie częstości występowania podtypów cGvHD w grupie wczesnej i późnej

Wartości procentowe oznaczają odsetek pacjentów w obrębie danej grupy (wczesnej lub późnej) z określoną postacią cGvHD



4.2.2 Subpopulacje limfocytów

Limfocyty B

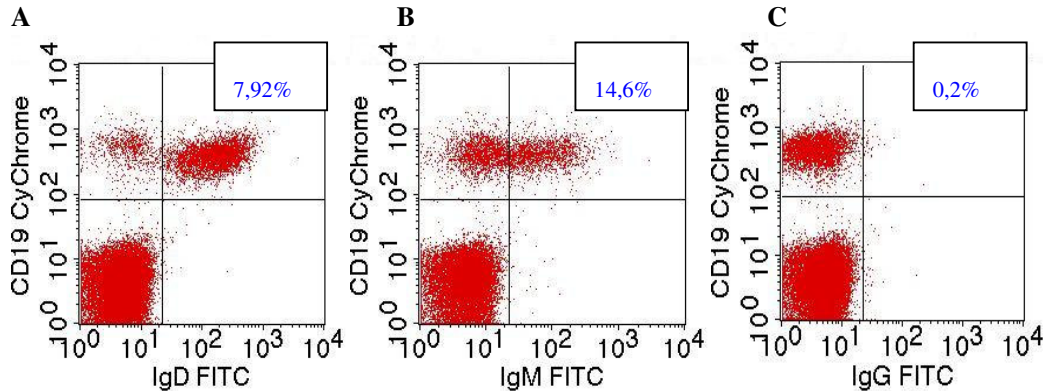
Rekonstrukcja immunologiczna subpopulacji limfocytów B była porównywalna w grupie wczesnej i późnej. Nie wykazano różnic znamienych statystycznie w zakresie wartości procentowych i ilości bezwzględnych limfocytów B (komórek CD19+) oraz poszczególnych subpopulacji zależnych od obecności na powierzchni receptorów immunoglobulinowych IgM, IgD, IgG. Ze względu na zbliżone do zera wartości bezwzględne komórek CD19+IgG+ wynikające z bardzo niskiego ich odsetka we krwi obwodowej, przedstawiono jedynie wartości procentowe tej grupy limfocytów.

Parametry te oznaczano w bramce limfocytarnej (tzn. w populacji odpowiadającej na cytogramie limfocytom). Poniżej umieszczono przykładowe graficzne wyniki immunofenotypizacji limfocytów B (Rycina 9): w prawym górnym polu na pierwszym cytogramie (A) wyodrębnione są komórki CD19+IgM+, na drugim (B) komórki CD19+IgD+, na trzecim (C) CD19+IgG+. Dokładne

wyniki ilościowe wymienionych parametrów w grupie wczesnej i późnej znajdują się w tabeli (Tabela 11).

Rycina 9 Cytogramy przedstawiające subpopulację limfocytów CD19 z zależności od obecności receptora immunoglobulinowego: IgM (A), IgD (B), IgG (C).

W prawym górnym polu znajdują się punkty odpowiadające komórkom CD19+ wykazującym ekspresję receptorów immunoglobulinowych, wartość procentowa wyraża odsetek tych komórek w populacji limfocytów.

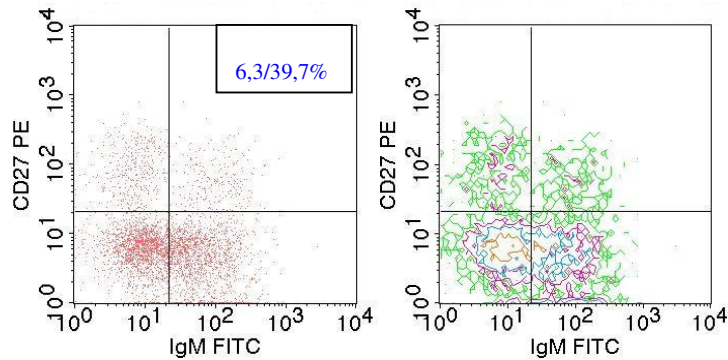


Obecność lub brak antygenu CD27 jest kryterium podziału komórek CD19+ na naiwne (CD27-) i pamięci immunologicznej (CD27+). Analizę wykonano w bramce komórek CD19+ i wyniki przedstawiono w formie wartości procentowych. Zarówno w grupie wczesnej jak i późnej przeważały komórki naiwne ($p < 0.0001$). W puli limfocytów pozbawionych CD27 większość stanowiły komórki z receptorem immunoglobulinowym IgD (IgD+). W bramce CD19+ stwierdzono występowanie niewielkiego odsetka komórek z antygenem CD27 na powierzchni, przewagę miały limfocyty z receptorem IgD (mediana 2,01 v 2,75% odpowiednio w grupie wczesnej i późnej) i/lub IgM (mediana 2,5 v 2,7%), w mniejszym odsetku IgG (mediana 0,6 v 0,25%). Przykładowe cytogramy obrazujące ekspresję antygenu CD27 wśród limfocytów B posiadających na powierzchni receptory immunoglobulinowe przedstawia Rycina 10. Szczegółowe wyniki zebrano w tabeli (Tabela 11).

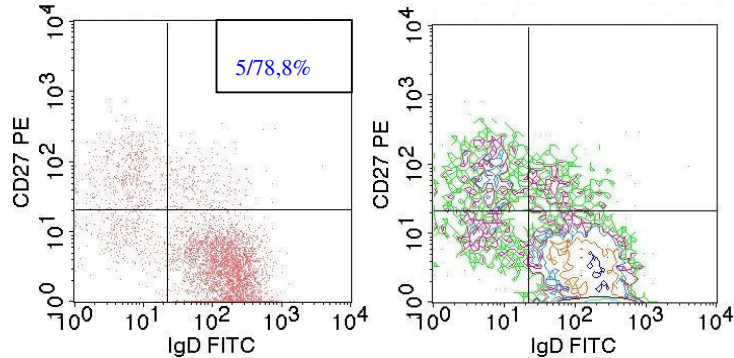
Rycina 10 Przykładowe cytogramy przedstawiające w bramce komórek CD19+ ekspresję antygeny CD27 wśród limfocytów B posiadających na powierzchni receptory immunoglobulinowe IgM (A), IgD (B), IgG (C).

Pole górne prawe odpowiada komórkom pamięci immunologicznej (CD27+), a pole dolne prawe odpowiada subpopulacji komórek naiwnych (CD27-). Wartość procentowa wyraża odsetek tych komórek w populacji limfocytów CD19+. Obok klasycznego cytogramu umieszczono tzw. 'contour plot', aby lepiej uwidocznic rozgraniczenie między grupami komórek.

A Ekspresja antygeny CD27 na limfocytach CD19+IgM+



B Ekspresja antygeny CD27 na limfocytach CD19+IgD+



C Ekspresja antygeny CD27 na limfocytach CD19+IgG+

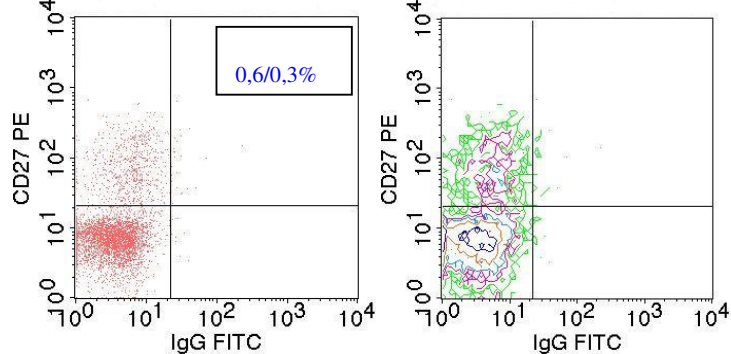


Tabela 11 Porównanie wyników immunofenotypizacji subpopulacji limfocytów B w grupie wczesnej i późnej

W tabeli przedstawiono wyniki pierwszego etapu badań poprzedzającego immunizację czynną. Obok mediany umieszczono wartość minimalną i maksymalną.

Immunofenotyp komórek	Grupa wczesna		Grupa późna	
	% komórek	ilość bezwzględna (G/l)	% komórek	ilość bezwzględna (G/l)
CD19+	13,6 (6,0-40,8)	0,28 (0,09-1,42)	18,0 (7,1-34)	0,41 (0,12-1,5)
CD19+IgM+	6,1 (1,5-19,0)	0,11 (0,03-0,69)	7,15 (3,1-20,5)	0,16 (0,05-0,84)
CD19+IgD+	9,2 (3-36,4)	0,21 (0,06-1,32)	13,3 (5,7-31,5)	0,31 (0,08-1,27)
CD19+IgG+	0,2 (0-1,4)		0,1 (0-0,5)	
Limfocyty naiwne (dziewicze) linii B:				
CD19+IgM+CD27-	50,0 (22,0-72,0)		42,6 (16,0-65,5)	
CD19+IgD+CD27-	81,0 (62,8-93,5)		83,15 (38,0-92,0)	
Limfocyty pamięci immunologicznej linii B:				
CD19+IgG+CD27+	0,6 (0-3,5)		0,25 (0-2,3)	
CD19+IgM+CD27+	2,5 (0,7-6,4)		2,7 (1,1-6,0)	
CD19+IgD+CD27+	2,01 (0,8-5,7)		2,75 (0,6-6,2)	

Limfocyty T

Grupa wczesna i późna różniły się istotnie statystycznie w stopniu rekonstrukcji limfocytów T ocenianej badaniem immunofenotypowym.

Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała różnic w ilości komórek CD3+ oraz CD3+CD8+ między grupami. Natomiast odsetek oraz liczba bezwzględna limfocytów CD3+CD4+ okazały się znacząco niższe w grupie wczesnej ($p=0,006$), a mediany tych parametrów wynosiły odpowiednio w grupie wczesnej i późnej 18,2 v 25,55% oraz 0,33 v 0,53G/l. Liczbę bezwzględną limfocytów CD3+CD4+ w zakresie $>0,2\text{G/l}$, jako prawdopodobnie istotną dla skutecznej immunizacji, wykazano u 73,7% pacjentów w grupie wczesnej oraz u 93,3% w grupie późnej ($p=0,055$).

Przewaga liczebności komórek CD3+CD8+ nad komórkami CD3+CD4+ przełożyła się na stwierdzony w obu grupach odwrócony stosunek limfocytów CD4+ do CD8+ (CD4/CD8). W grupie wczesnej mediana CD4/CD8 wynosiła 0,52, a w grupie późnej 0,86. Różnica ta jest statystycznie znacząca ($p=0,008$).

Przykładowe graficzne wyniki immunofenotypizacji limfocytów T przedstawia Rycina 11. Cytogramy A i B wykonano w bramce limfocytarnej; na cytogramie A pole górne prawe odpowiada limfocytom CD3+CD4+, a na cytogramie B pole to odpowiada limfocytom CD3+CD8+.

Limfocyty tzw. ‘podwójnie dodatnie’ o immunofenotypie CD3+CD4+CD8+ występowały w obu grupach, w wyższym jednak odsetku w grupie późnej (mediana 1,0 v 1,3%; $p=0,05$). Pole górne prawe na umieszczonym poniżej cytogramie C (Rycina 11) odpowiada tej grupie komórek. Cytogram ten obrazuje limfocyty w bramce komórek CD3+.

Analiza porównawcza komórek o immunofenotypie CD3-CD8+ (NK) nie wykazała istotnych różnic między grupami. Komórki te reprezentuje pole górne lewe na poniższym cytogramie B (Rycina 11).

Szczegółowe dane liczbowe odzwierciedlające opisane wyniki znajdują się w Tabeli 12.

Rycina 11 Przykładowe cytogramy przedstawiające subpopulacje limfocytów T w zależności od ekspresji antygenów CD4 i CD8

(cytogram A i B wykonano w bramce limfocytarnej, cytogram C w bramce komórek CD3+)

Cytogram A: pole górne prawe odpowiada limfocytom CD3+CD4+.

Cytogram B: pole górne prawe reprezentuje komórki CD3+CD8+, pole górne lewe komórki CD3-CD8+.

Cytogram C: pole górne prawe odpowiada komórkom CD4+CD8+.

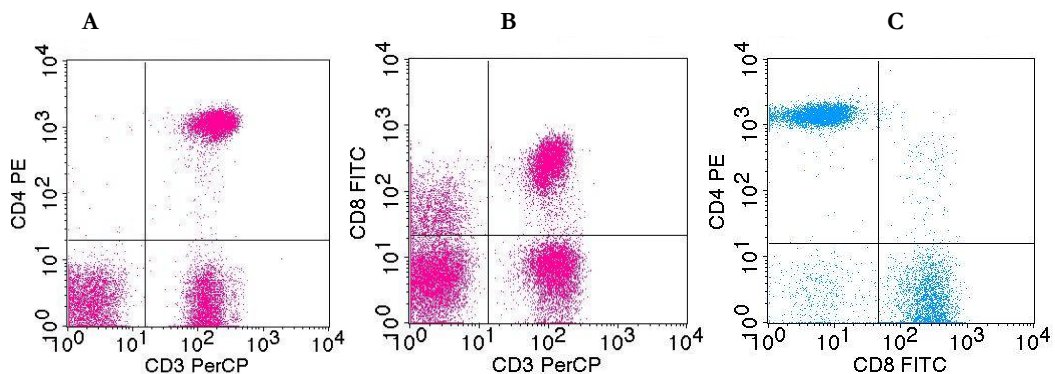


Tabela 12 Porównanie wyników immunofenotypizacji subpopulacji limfocytów T w grupie wczesnej i późnej

W tabeli przedstawiono wyniki pierwszego etapu badań poprzedzającego immunizację czynną. Obok mediany umieszczono wartość minimalną i maksymalną. Pogrubioną czcionką zaznaczono parametry i wyniki, w których wykazano istotne statystycznie różnice.

Immunofenotyp komórek	Grupa wczesna		Grupa późna	
	% komórek	ilość bezwzględna (G/l)	% komórek	ilość bezwzględna (G/l)
CD3+	55,6 (30,8-89,3)	1,07 (0,26-3,61)	60,55 (22,0-82,0)	1,25 (0,55-3,35)
CD3+CD4+	18,2 (5,0-30,4)	0,33 (0,07-0,92)	25,55 (9,2-46,0)	0,53 (0,16-1,57)
CD3+CD8+	35,5 (12,0-75,9)	0,73 (0,1-3,27)	34,95 (11,6-61,9)	0,7 (0,19-2,29)
CD4/CD8		0,52 (0,13-1,51)		0,86 (0,29-2,2)
CD3-CD8+	5,2 (1,0-14,0)	0,08 (0,04-0,35)	5,15 (0,8-16,0)	0,11 (0,02-0,39)
CD3+CD4+CD8+	1,0 (0,3-4,7)		1,3 (0,3-3,0)	

Ekspresja izoform antygenu CD45 (RA i RO) w populacji limfocytów CD4

CD4+CD45RA+	25,0 (2,0-59,6)	0,08 (0,01-0,17)	20,4 (2,3-49,0)	0,1 (0,01-0,33)
CD4+CD45RO+	61,0 (33,5-82,2)	0,21 (0,05-0,67)	65,9 (35,7-89,0)	0,34 (0,12-1,06)
CD4+CD45RA+RO+	12,3 (5,4-22)	0,04 (0,01-0,1)	14,5 (6,2-26,0)	0,07 (0,01-0,41)

Ekspresja izoform antygenu CD45 (RA i RO) w populacji limfocytów CD8

CD8+CD45RA+	41,1 (10,0-72,8)	0,29 (0,08-0,75)	44,9 (24,2-80,0)	0,3 (0,07-0,75)
CD8+CD45RO+	26,3 (15,0-46,0)	0,2 (0,02-1,37)	26,5 (13,0-46,0)	0,19 (0,05-1,06)
CD8+CD45RA+RO+	28,0 (9,4-47,0)	0,2 (0,01-1,54)	27,1 (7,0-46,0)	0,19 (0,04-0,8)

Kolejna analiza immunofenotypowa dotyczyła ekspresji izoform RA i RO antygenu CD45 na powierzchni limfocytów CD4+ i CD8+. W obu grupach zarówno liczba bezwzględna, jak i odsetek komórek naiwnych CD4+CD45RA+RO- były znamienne niższe niż subpopulacji limfocytów CD4+CD45RA-RO+, odpowiadającej komórkom pamięci immunologicznej ($p < 0,001$).

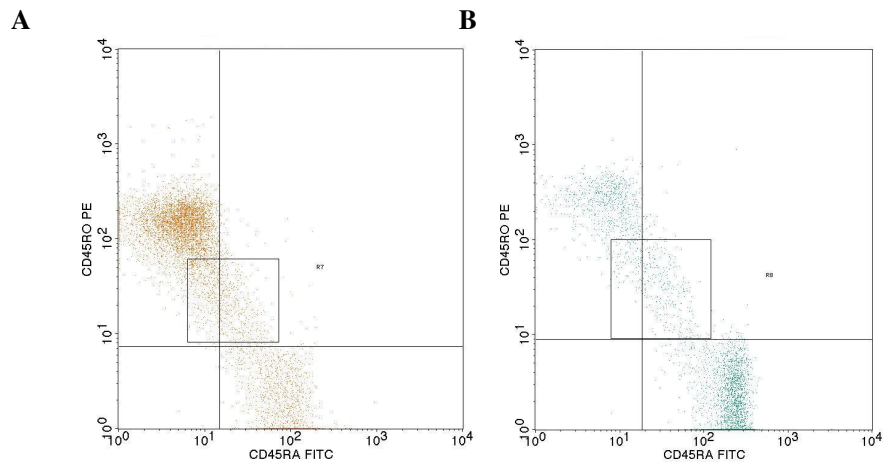
Liczba bezwzględna komórek naiwnych linii T (CD4+CD45RA+) wykazywała niższe wartości w grupie wczesnej (mediana 0,08 v 0,1G/l; $p = 0,096$). Znamienne wyższą liczbę bezwzględną komórek pamięci immunologicznej linii T o immunofenotypie CD4+CD45RO+ stwierdzono w grupie późnej (mediana 0,34 v 0,21G/l; $p = 0,011$). Podobnie było w przypadku komórek tzw. ‘podwójnie dodatnich’ (CD4+CD45RA+RO+), bardziej licznych w grupie późnej (0,07 v 0,04G/l; $p = 0,007$).

W subpopulacji komórek CD8+ liczba komórek wykazujących ekspresję izoform RA i RO antygenu CD45 kształtuje się podobnie w grupie wczesnej i późnej.

Dokładne wyniki liczbowe opisanych analiz wykonanych metodą cytometrii przepływowej umieszczono w tabeli 12. Rycina 12 obrazuje przykładowe cytogramy subpopulacji komórek naiwnych i pamięci immunologicznej limfocytów T. Na cytogramie A w bramce komórek CD4+, a na cytogramie B w bramce komórek CD8+ pole górne lewe reprezentuje komórki CD45RA+RO-, pole dolne prawe CD45RA-RO+, a czworokątna bramka obejmuje komórki CD45RA+RO+.

Rycina 12 Przykładowe cytogramy obrazujące subpopulacje limfocytów T w zależności od ekspresji izoformy RA i RO antygeny CD45

Subpopulacje komórek naiwnych (CD45RA+RO-), pamięci immunologicznej (CD45RA-RO+) oraz komórek 'podwójnie dodatnich' (CD45RA+RO+) przedstawiono w bramce komórek CD4+ (cytogram A) i w bramce CD8+ (cytogram B).



4.2.3 Cytokiny Th1 i Th2

Ekspresję wewnątrzcytoplazmatyczną cytokin oznaczono w bramce komórek CD3+. Wyniki przedstawiono w formie wartości procentowych. Komórki CD3+CD8- są równoważne z komórkami CD3+CD4+.

Cytokiny Th1 (IL2, IFN γ)

W obu grupach wykazano znacznie wyższą ekspresję IL2 w komórkach CD8- w porównaniu do komórek CD8+. Obserwowano wyższy odsetek komórek CD8-IL2+ i CD8+IL2+ w grupie późnej (mediana 26,17 v 19,05% oraz 5,0 v 3,07%), jednak różnice te nie były statystycznie istotne. Przykładowy wynik obrazujący odsetek limfocytów T wykazujących ekspresję IL2 umieszczono poniżej na cytogramie A (Rycina 13): w polu górnym lewym w komórkach CD8-, a w polu górnym prawym w CD8+.

Ekspresja IFN γ wyrażona była silniej w komórkach CD8+ w porównaniu z komórkami CD8-. Biorąc pod uwagę odsetek komórek CD8- wykazujących ekspresję IFN γ , uzyskano zbliżone wyniki w obu grupach. Natomiast stwierdzono istotnie wyższy odsetek komórek CD8+IFN γ + w grupie wczesnej w porównaniu do grupy późnej (mediana 34,23 v 27,83%; $p=0,052$). Przykładowy wynik przedstawiający ekspresję IFN γ znajduje się poniżej (cytogram B; Rycina 13), przy czym w polu górnym lewym w limfocytach CD8-, a w polu górnym prawym w limfocytach CD8+.

Każdorazowo wykonano również doświadczenie mające na celu wykazanie równoczesnej ekspresji obu cytokin Th1 w limfocytach CD3+ (ze względu na ograniczenia techniczne dostępnego cytometru przepływowego nie można było wykonać dodatkowego równoczesnego barwienia antygenu CD8 na powierzchni limfocytów). Jednoczesną ekspresję IL2 i IFN γ stwierdzono w nieco wyższym odsetku komórek w grupie późnej (mediana 11,08 v 6,97%), jednak różnica ta nie osiągnęła znaczenia statystycznego. Natomiast wykazano istotnie wyższy odsetek limfocytów T IL2-IFN γ + w grupie wczesnej (mediana 49,14 v 38,13%; $p=0,018$) w przeciwieństwie do odsetka limfocytów T IL2+IFN γ -, który był istotnie wyższy w grupie późnej (mediana 21,62 v 14,74%; $p=0,011$).

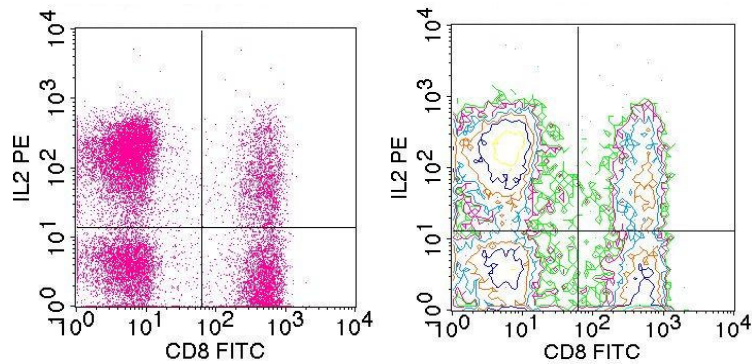
Przykładowy wynik przedstawiający jednoczesną ekspresję IL2 i IFN γ znajduje się poniżej na cytogramie C (Rycina 13), na którym pole górne prawe odpowiada komórkom 'podwójnie dodatnim' IL2+IFN γ +, górne lewe komórkom IL2-IFN γ +, a dolne prawe komórkom IL2+IFN γ -.

Szczegółowe wyniki immunofenotypizacji wewnątrzcytoplazmatycznej cytokin Th1 umieszczono w Tabeli 13.

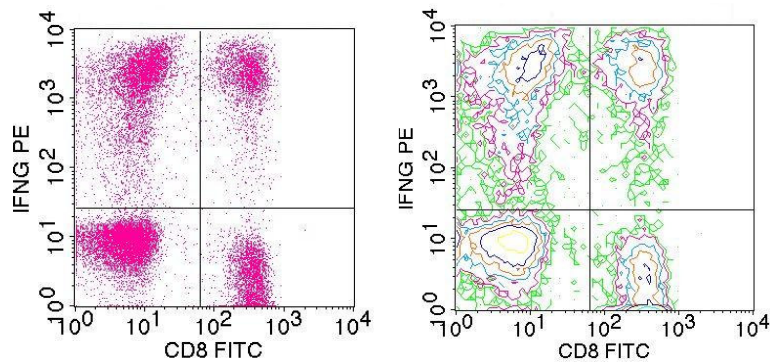
Rycina 13 Przykładowe cytogramy przedstawiające ekspresję wewnątrzcytoplazmatyczną cytokin Th1.

Obok klasycznego cytogramu umieszczono tzw. 'contour plot', aby lepiej uwidocznienie rozgraniczenie między grupami komórek.

A Ekspresja IL2: w polu górnym lewym w komórkach CD8-, a w polu górnym prawym w CD8+



B Ekspresja IFN γ : w polu górnym lewym w komórkach CD8-, a w polu górnym prawym w CD8+



C. Poniższy cytogram jest wyrazem jednoczesnego wyznakowania IL2 i IFN γ (pole górne prawe odpowiada komórkom wykazującym podwójną ekspresję IL2+IFN γ +))

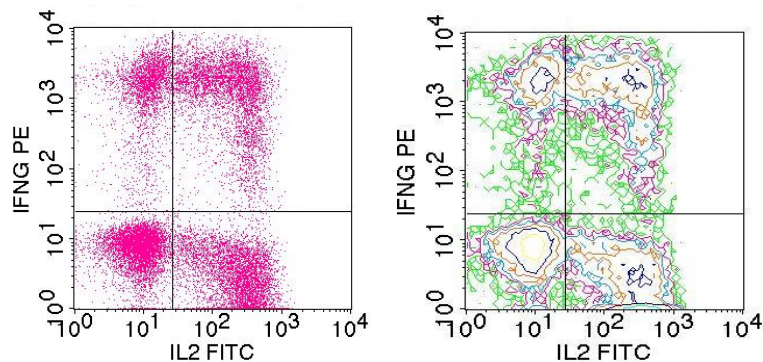


Tabela 13 Porównanie ekspresji wewnątrzcytoplazmatycznej cytokin Th1 w grupie wczesnej i późnej

W tabeli przedstawiono wyniki pierwszego etapu badań poprzedzającego immunizację czynną: medianę oraz zakres wartości minimalnej i maksymalnej; pogrubioną czcionką podkreślono parametry i wyniki, w których wykazano istotne statystycznie różnice.

Immunofenotyp*	Grupa wczesna	Grupa późna
CD3+ (limfocyty T)		
IL2+INF γ +	6,97 (1,2-26,05)	11,08 (1,52-28,25)
IL2+INF γ -	14,74 (5,42-32,58)	21,62 (5,84-36,48)
IL2-INF γ +	49,14 (11,29-81,61)	38,13 (10,86-60,05)
CD3+CD8- (limfocyty Th)		
INF γ +	17,9 (9,9-42,49)	20,22 (7,84-33,51)
IL2+	19,05 (4,5-38,9)	26,17 (8,45-41,9)
CD3+CD8+ (limfocyty Tc/s)		
INF γ +	34,23 (5,71-61,68)	27,83 (4,22-64,46)
IL2+	3,07 (0,65-14,5)	5,0 (0,57-10,85)

**wyniki przedstawiono w formie wartości procentowych (% komórek)*

Cytokiny Th2 (IL4, IL5, IL10)

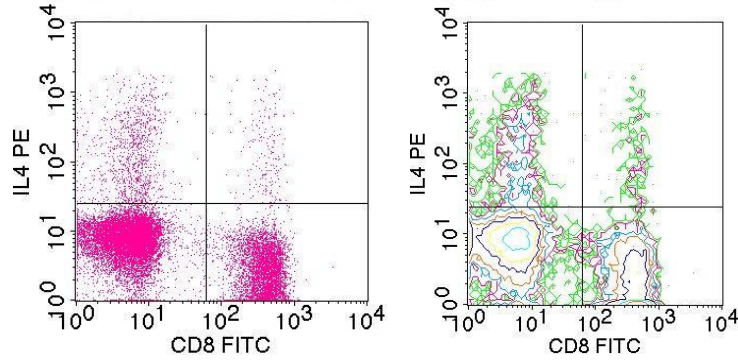
Ekspresję cytokin Th2 stwierdzono głównie w komórkach CD3+CD8- w obu grupach. Porównując ekspresję poszczególnych cytokin Th2, przeważały komórki produkujące IL4, a limfocyty IL5+ oraz IL10+ występowały w odsetku komórek nieprzekraczającym 1%. Nie wykazano statystycznie znamiennych różnic w ekspresji cytokin Th2 między grupą wczesną i późną.

Dokładne wartości liczbowe zebrano w Tabeli 14 umieszczonej poniżej. Przykładowe cytogramy prezentuje Rycina 14: ekspresję IL4 cytogram A, IL5 cytogram B, IL10 cytogram C, na których pole górne lewe odpowiada komórkom CD8-, a pole górne prawe komórkom CD8+.

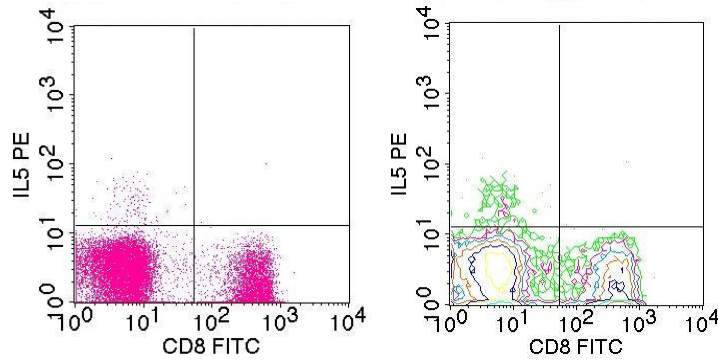
Rycina 14 Przykładowe cytogramy obrazujące ekspresję cytokin Th2

Obok klasycznego cytogramu umieszczono tzw. 'contour plot', aby lepiej uwidocznili rozgraniczenie między grupami komórek.

A Ekspresja IL4: w polu górnym lewym w komórkach CD8-, a w polu górnym prawym w CD8+



B Ekspresja IL5: w polu górnym lewym w komórkach CD8-, a w polu górnym prawym w CD8+



C Ekspresja IL10: w polu górnym lewym w komórkach CD8-, a w polu górnym prawym w CD8+

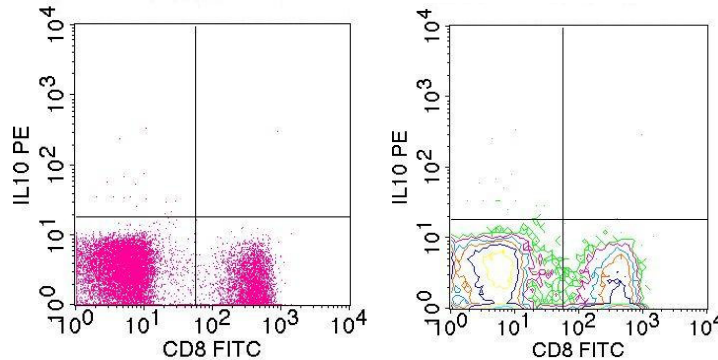


Tabela 14 Porównanie ekspresji wewnątrzcytoplazmatycznej cytokin Th2 w grupie wczesnej i późnej

W tabeli przedstawiono wyniki pierwszego etapu badań poprzedzającego immunizację czynną: medianę oraz zakres wartości minimalnej i maksymalnej.

Immunofenotyp*	Grupa wczesna	Grupa późna
CD3+CD8- (limfocyty Th)		
IL4+	1,79% (0,38-5,0)	2,15% (0,57-10,85)
IL5+	0,09% (0,03-0,22)	0,15% (0,01-0,4)
IL10+	0,12% (0,04-0,39)	0,12% (0,04-0,4)
CD3+CD8+ (limfocyty Tc/s)		
IL4+	0,41% (0,1-1,54)	0,48% (0,11-7,94)
IL5+	0,05% (0,01-0,18)	0,04% (0-0,26)
IL10+	0,04% (0-0,24)	0,03% (0-0,09)

*wyniki przedstawiono w formie wartości procentowych (% komórek)

Stosunek Th1/Th2

Porównując ekspresję cytokin Th1 i Th2 w komórkach CD8- w obu grupach przed rozpoczęciem programu immunizacji, produkcję IFN γ , IL2, IL4 i IL5 wykazano w większym odsetku komórek u pacjentów z grupy późnej, ale różnice nie osiągnęły istotności statystycznej. Wynik ekspresji IL10 był porównywalny w obu grupach. Obserwowano wyższy odsetek komórek produkujących cytokiny o profilu Th1 niż Th2 w obu grupach. Stosunek profilu Th1 do Th2 (IL2 do IL4) był wyższy w grupie wczesnej (mediana 11,94; zakres 3,7-25,58) niż w grupie późnej (mediana 9,62; zakres 3,36-24,63), jednak różnica nie była znamienna statystycznie.

4.3 Charakterystyka odpowiedzi na immunizację czynną

4.3.1 Tempo zanikania przeciwciał antyHBs po HCT

Status serologiczny dawców i biorców przed HCT

W badanej grupie przeciwciała antyHBs przed transplantacją wykryto u 31 (63,3%) pacjentów (miano >1 mUI/ml), w tym u znacznej większości z nich (25 osób) były to przeciwciała po szczepieniu rHBsAg, a u 4 chorych po przebyciu infekcji WZW B. 5 (16%) z 31 pacjentów szczepionych rHBsAg przed procedurą HCT nie odpowiedziało na immunizację wzrostem antyHBs >1 mUI/ml, 6 (19,3%) osób wytworzyło po szczepieniu niskie miano ochronne 10-100 mUI/ml, a 11 (35,5%) chorych miano >100 mUI/ml. W sumie 7 pacjentów przed HCT

posiadało miano przeciwciał antyHBs w zakresie 10-100mUI/ml, a 15 chorych miano >100mUI/ml.

20 (40,8%) pacjentów przed transplantacją było immunizowanych biernie gammaglobuliną antyHBs, z czego 12 biorców nie posiadało w ogóle przeciwciał antyHBs, natomiast u 8 osób miano było zbyt niskie (<10 mUI/ml).

25 (58%) osób z 43 dawców rodzinnych było immunizowanych rHBsAg przed donacją, z czego 15 (60%) wytworzyło przeciwciała w mianie >10mUI/ml, w tym 9 (36%) w wysokim mianie ochronnym (>100 mUI/ml). 3 dawców posiadało przeciwciała antyHBs po zakażeniu i wyeliminowaniu wirusa HBV. 1 dawca był nosicielem wirusa HBV. W 19 (44,2%) przypadkach transplantacji rodzinnych szczepiony był zarówno dawca jak i biorca.

W analizie nie uwzględniono dawców niespokrewnionych z powodu braku danych dotyczących ich immunizacji i miana przeciwciał antyHBs przed donacją. Natomiast w przypadku donacji spokrewnionych, nie została odnotowana w dokumentacji dokładna ilość dawek szczepionki, którą otrzymali dawcy, więc niemożliwe było porównanie wyników immunizacji rHBsAg zdrowych dawców jako grupy kontrolnej z obciążonych chorobami hematologicznymi pacjentów zakwalifikowanych do HCT.

Doba +100

Przeciwciała antyHBs wykrywano u 87,8 % biorców HCT, przy czym u 40,8% miano było w zakresie 10-100, u 30,6% w mianie >100mUI/ml. Obecność przeciwciał w surowicy w dobie +100 wydaje się być udziałem przeciwciał pochodzących od dawcy, od biorcy i po immunizacji gammaglobuliną antyHBs (nie wykazano różnic znamienych statystycznie).

Doba +180

Obecność przeciwciał antyHBs stwierdzono u 69,4% pacjentów po HCT, w tym u 32,6% w zakresie 10-100mUI/ml i jedynie u 14,3% w mianie >100mUI/ml. Znamienne częściej antyHBs wykrywano u pacjentów immunizowanych czynnie przed transplantacją ($p=0,025$) i biorców HCT od dawców szczepionych przeciwko WZW B ($p=0,006$). Nie wykazano takiej zależności w grupie pacjentów immunizowanych biernie.

Po 1 roku

W tym okresie po HCT przeciwciała antyHBs wykryto w badanej grupie u 40,8% pacjentów, przy czym jedynie 16,3% chorych posiadało stężenie przeciwciał w przedziale 10-100mUI/ml, a 8% >100mUI/ml (głównie osoby po infekcji HBV). Znamienne więcej pacjentów immunizowanych biernie nie posiadało przeciwciał antyHBs ($p=0,014$).

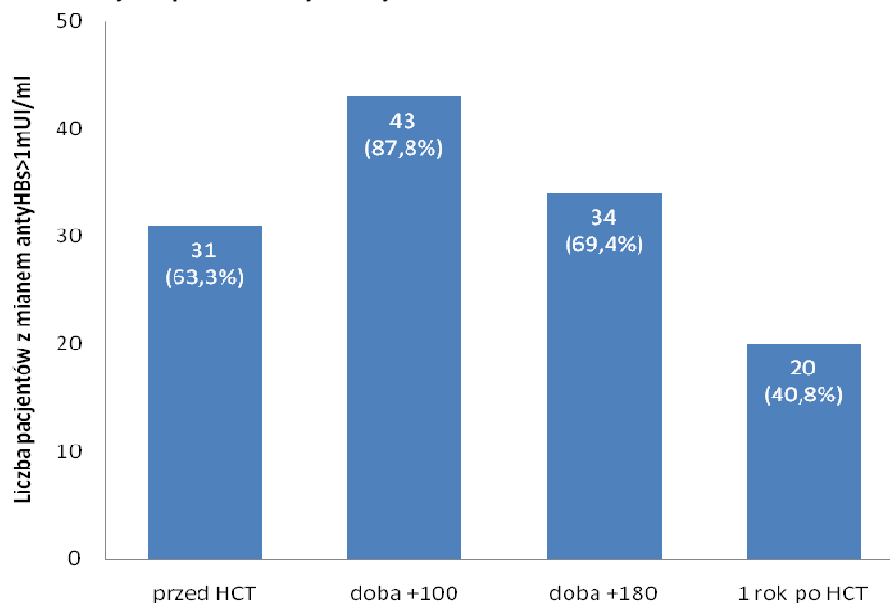
W okresie 12 miesięcy po HCT na obecność przeciwciał we krwi biorcy wpływ miała efektywność immunizacji jego dawcy. W badanej grupie zaobserwowano, że jeśli miano przeciwciał u dawcy przed donacją przekraczało 10mUI/ml, antyHBs wykrywano u 61,1% biorców HCT ($p=0,006$). Natomiast biorąc pod uwagę immunizację pacjentów przed HCT, u 16 (51,6%) z nich wykrywano przeciwciała antyHBs rok po przeszczepieniu ($p=0,04$). Uwzględniając fakt jednoczesnego szczepienia dawcy i biorcy przed HCT, na 19 takich przypadków rok po transplantacji przeciwciała antyHBs wykrywano u 10 (52,6%) biorców ($p=0,062$).

Zjawisko adoptywnego transferu odporności obserwowano u 10 pacjentów w grupie chorych po HCT od dawców rodzinnych.

Ilość biorców, u których stwierdzano obecność przeciwciał antyHBs przed HCT i do roku po HCT w omówionych zakresach stężeń (>1, 10-100, >100mUI/ml) obrazują umieszczone poniżej wykresy (Rycina 15, 16, 17). Bezpośrednio po immunizacji biernej nie kontrolowane było ponownie stężenie przeciwciał antyHBs, dlatego na wykresach umieszczonych poniżej status serologiczny biorców przed HCT nie uwzględnia miana antyHBs po immunizacji biernej.

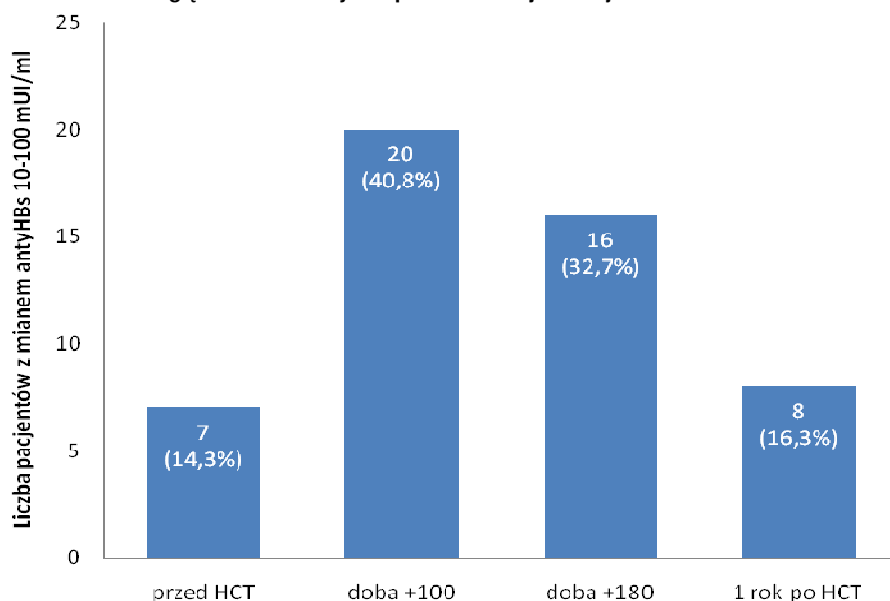
Rycina 15 Wykrywalność przeciwciał antiHBs (miano >1mUI/ml) w okresie 1 roku po HCT

Wysokość kolumn (oś Y) odpowiada ilości pacjentów, u których wykrywano przeciwciała antiHBs (miano >1mUI/ml) przed przeszczepieniem i utrzymywały się po HCT (oś X). Wzrost w dobie +100 i +180 chorych z wykrywalnymi przeciwciałami nastąpił dzięki immunizacji biernej przed infuzją materiału przeszczepowego i immunizacji czynnej dawców. Bezpośrednio po immunizacji biernej nie kontrolowane było ponownie stężenie przeciwciał antiHBs, dlatego na wykresach umieszczonych poniżej status serologiczny biorców przed HCT nie uwzględnia miana antiHBs po immunizacji biernej.



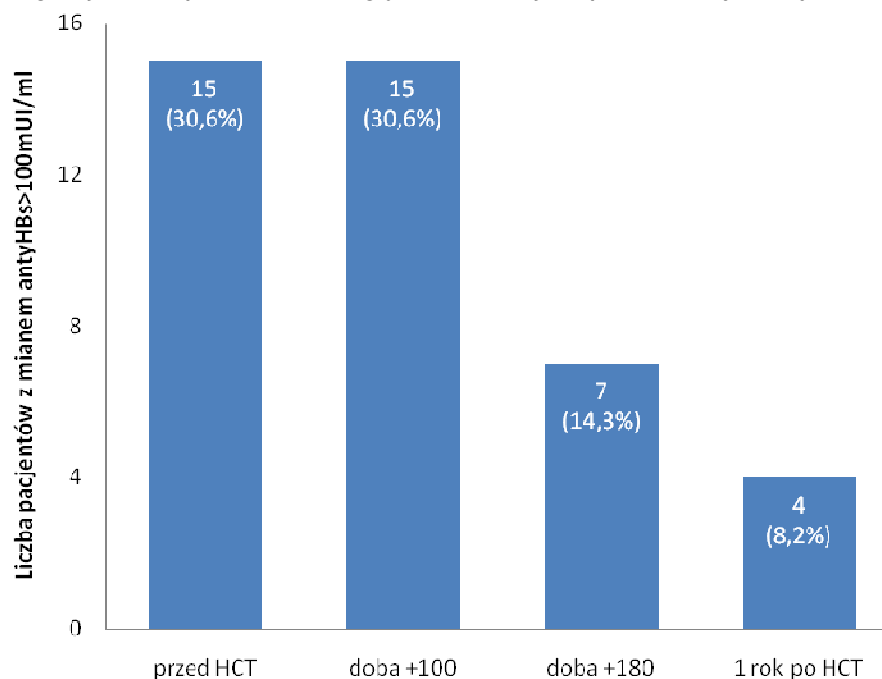
Rycina 16 Występowanie przeciwciał antiHBs w mianie 10-100mUI/ml w okresie 1 roku po HCT

Wysokość kolumn (oś Y) odpowiada ilości pacjentów, u których wykrywano przeciwciała antiHBs w mianie 10-100mUI/ml przed przeszczepieniem i obserwowane były na tym poziomie po HCT (oś X). Wzrost w dobie +100 i +180 chorych z przeciwciałami antiHBs nastąpił dzięki immunizacji biernej przed infuzją materiału przeszczepowego oraz immunizacji czynnej dawców. Bezpośrednio po immunizacji biernej nie kontrolowane było ponownie stężenie przeciwciał antiHBs, dlatego na wykresach umieszczonych poniżej status serologiczny biorców przed HCT nie uwzględnia miana antiHBs po immunizacji biernej.



Rycina 17 Stopniowy spadek ilości pacjentów z mianem antyHBs >100mUI/ml w okresie 1 roku po HCT

Wysokość kolumn (oś Y) odpowiada ilości pacjentów, u których miano przeciwciał antyHBs wynosiło >100mUI/ml przed przeszczepieniem i utrzymywało się na tym poziomie po HCT (oś X). 1 rok po HCT są to głównie pacjenci po infekcji HBV i wyeliminowaniu wirusa. Bezpośrednio po immunizacji biernej nie kontrolowane było ponownie stężenie przeciwciał antyHBs, dlatego na wykresach umieszczonych poniżej status serologiczny biorców przed HCT nie uwzględnia miana antyHBs po immunizacji biernej.

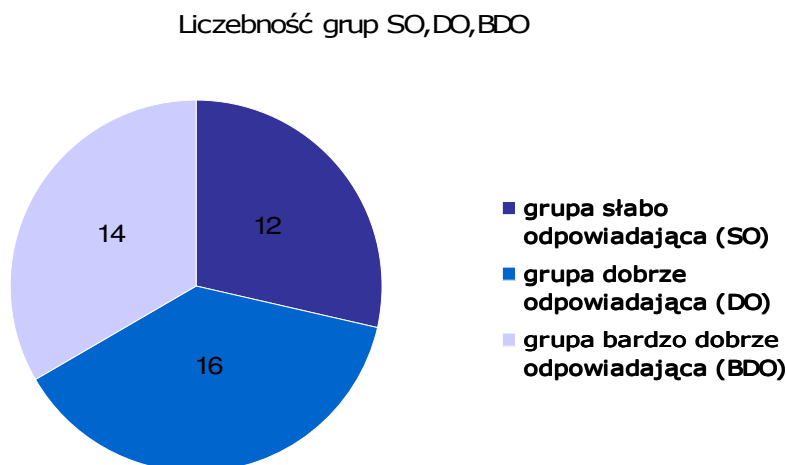


4.3.2 Podział na grupy SO, DO, BDO; ilość dawek rHBsAg w poszczególnych grupach

Program szczepień ochronnych u wszystkich włączonych pacjentów przeprowadzono bez powikłań. Zaobserwowano jedynie miejscowe odczyny zapalne utrzymujące się przez kilka dni. Cała grupa 42 chorych immunizowanych rHBsAg odpowiedziała pozytywnie wytworzeniem przeciwciał antyHBs. Na podstawie wyników immunizacji (miana i czasu utrzymywania się przeciwciał) do wyodrębnionej grupy pacjentów słabo odpowiadających (SO) zaliczono 12 osób, dobrze odpowiadających (DO) 16 osób, bardzo dobrze odpowiadających (BDO) 14 osób. Obrazuje to umieszczona poniżej Rycina 18.

Rycina 18 Podział na grupy SO,BO,BDO w zależności od odpowiedzi na immunizację rHBsAg

Dane liczbowe odpowiadają ilości pacjentów po HCT, którzy słabo (SO), dobrze (DO) lub bardzo dobrze (BDO) odpowiedzieli na szczepienie ochronne przeciwko WZW B (rHBsAg).



W grupie słabo odpowiadającej na immunizację czynną u 7 (58,3%) pacjentów serokonwersję uzyskano po 1 podaniu szczepionki, u kolejnych 3 (25%) po 2 dawce i u 2 (16,7%) po 3 próbie immunizacji. Żaden chory nie wytworzył niskiego ochronnego miana przeciwciał po 1 dawce rHBsAg, 1 (8,3%) pacjent po 2 dawkach, 6 (50%) po 3 podaniach i 5 (41,7%) dopiero po 4 próbie immunizacji (Rycina 19). Miano antyHBs >100mUI/ml 2 osoby (16,7%) uzyskały po 3 dawkach szczepionki, 6 (50%) po 4 dawkach i 4 (33,3%) chorych po 5 próbie immunizacji (Rycina 20). U żadnego pacjenta z grupy SO stężenie przeciwciał nie przekroczyło 1000mUI/ml po kolejnych immunizacjach.

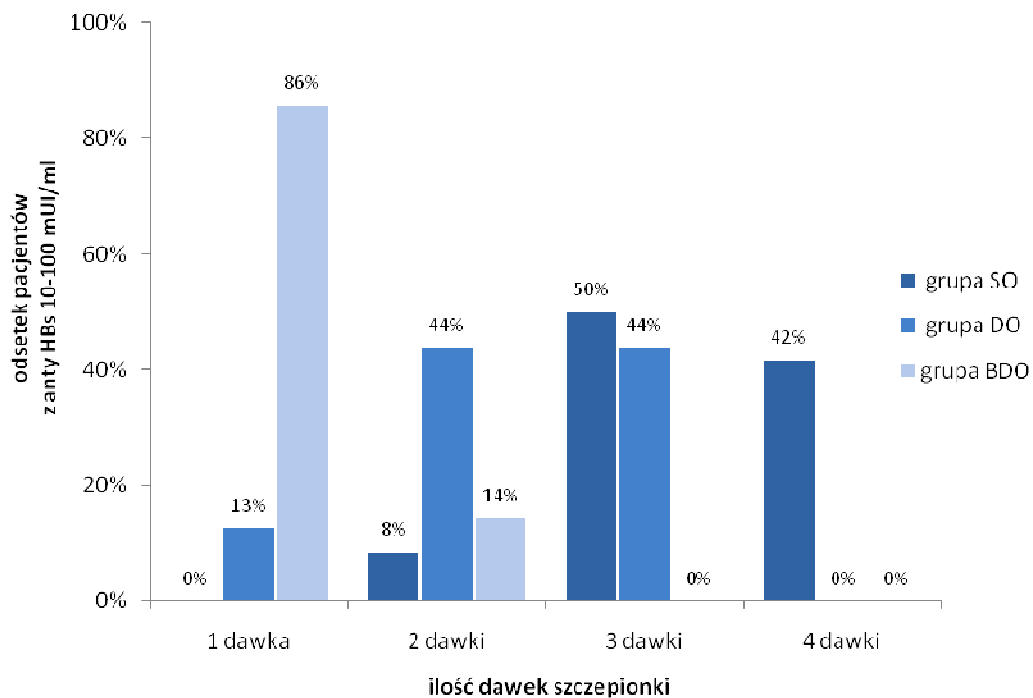
W grupie dobrze odpowiadającej na szczepienie rHBsAg u 7 (43,75%) chorych serokonwersja została osiągnięta po 1 próbie immunizacji, u pozostałych 9 (56,25%) po 2 szczepieniu. U 2 (12,5%) chorych uzyskano stężenie przeciwciał >10mUI/ml już po 1 dawce, u 7 (43,75%) po 2 dawce i u kolejnych 7 (43,75%) po 3 dawce (Rycina 19). W tej grupie miano antyHBs>100mUI/ml 11 chorych (68,75%) wytworzyło po 3 dawce i pozostałych 5 chorych (31,25%) po 4 dawce szczepionki (Rycina 20).

W grupie bardzo dobrze odpowiadającej na szczepienie u wszystkich chorych serokonwersja wystąpiła po 1 podaniu rHBsAg, w tym znaczna większość

pacjentów (85,7%) jednocześnie uzyskala ochronne miano >10mUI/ml. U pozostałych 2 (14,3%) osób miano >10mUI/ml zostało osiągnięte po 2 próbie immunizacji (Rycina 19). Dodatkowo, już po 1 dawce szczepionki u 9 (64,3%) pacjentów stężenie przeciwciał przekraczało 100mUI/ml, po 2 dawce u pozostałych 5 (35,7%) chorych (Rycina 20). U 5 osób po 2 dawce szczepionki miano antyHBs przekroczyło 1000mUI/ml.

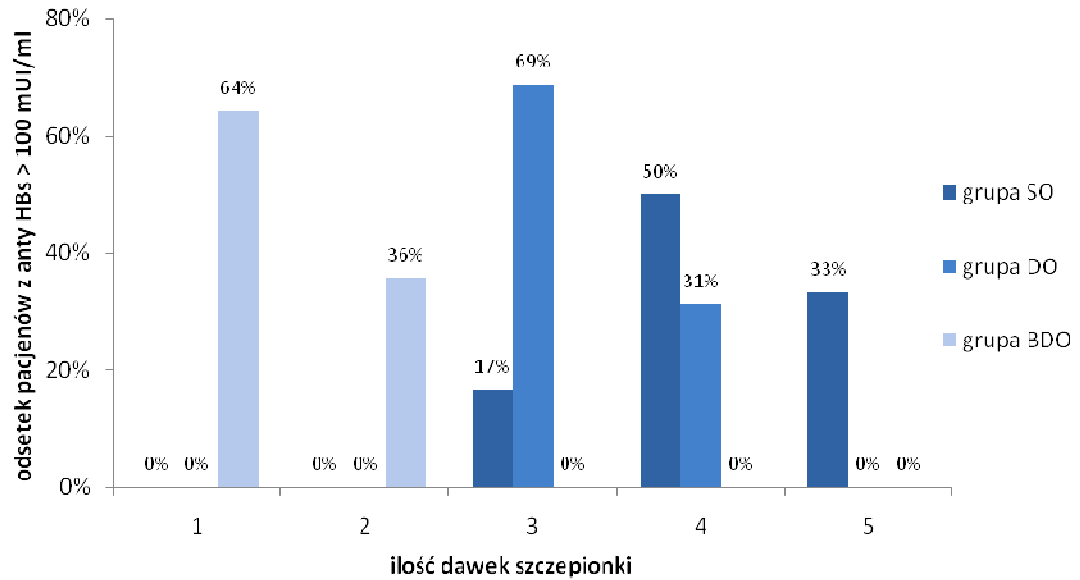
Rycina 19 Ilość dawek szczepionki potrzebna do uzyskania miana antyHBs 10-100mUI/ml w poszczególnych grupach (SO, DO i BDO)

Wysokość kolumn odpowiada odsetkowi pacjentów z poszczególnej grupy (oś Y), u których wymagane było 1,2,3 lub 4 dawki szczepionki (oś X). W grupie bardzo dobrze odpowiadającej na rHBsAg (BDO) u znaczącej większości chorych wystarczająca była 1 dawka, podczas gdy grupa słabo odpowiadająca (SO) wymagała 3 lub 4 dawek do uzyskania miana antyHBs 10-100mUI/ml.



Rycina 20 Rozkład dawek szczepionki podanych do uzyskania miana >100mUI/ml w poszczególnych grupach (SO, DO, BDO)

Wysokość kolumn odpowiada odsetkowi pacjentów z poszczególnej grupy (oś Y), u których wymagane było 1,2,3,4 lub 5 dawek szczepionki (oś X). W grupie bardzo dobrze odpowiadającej na rHBsAg (BDO) u większości pacjentów wystarczająca była 1 dawka, w grupie dobrze odpowiadającej (DO) 3 dawki, a grupa słabo odpowiadająca (SO) wymagała 4 lub 5 dawek do uzyskania miana antyHBs >100mUI/ml.



4.3.3 Zależność między parametrami rekonstrukcji immunologicznej oraz czynnikami zależnymi od biorcy i dawcy a odpowiedzią na immunizację rHBsAg

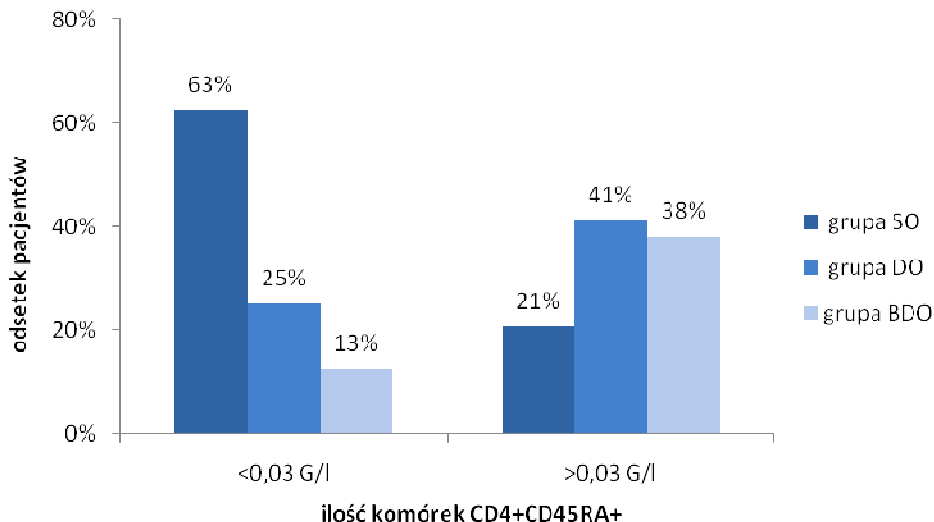
Rekonstrukcja limfocytów T

Wszyscy chorzy z grupy bardzo dobrze odpowiadającej posiadali bezwzględną liczbę limfocytów pomocniczych (CD3+CD4+) $>0,2$ G/l w chwili rozpoczęcia szczepień. Spośród 6 pacjentów, u których wartość ta była poniżej 0,2G/l, 3 osoby słabo i 3 dobrze odpowiedziały na immunizację ($p=0,063$).

Biorąc pod uwagę prawdopodobnie istotną dla wyniku immunizacji liczbę bezwzględną limfocytów naiwnych linii T CD4+ (CD4+CD45RA+RO-), przeanalizowano dwie wartości graniczne tych komórek przed rozpoczęciem szczepień ochronnych: 0,05 i 0,03G/l. Dla wartości $>0,05$ G/l przed immunizacją nie wykazano różnicy znamiennej statystycznie tego parametru między grupami SO, DO, BDO. Natomiast znamienne wyższy odsetek chorych (63%), którzy przy rozpoczęciu immunizacji czynnej nie osiągnęli wartości bezwzględnej komórek CD4+CD45RA+RO- powyżej 0,03G/l, słabo odpowiedziało na szczepienie rHBsAg ($p=0,057$), podczas gdy pacjenci, którzy osiągnęli poziom tych komórek powyżej 0,03G/l, należeli głównie do grupy dobrze (41%) lub bardzo dobrze odpowiadającej na immunizację (38%). Różnicę tę obrazuje umieszczona poniżej Rycina 21.

Rycina 21 Różnice w odpowiedzi na immunizację w zależności od ilości komórek CD4+CD45RA+

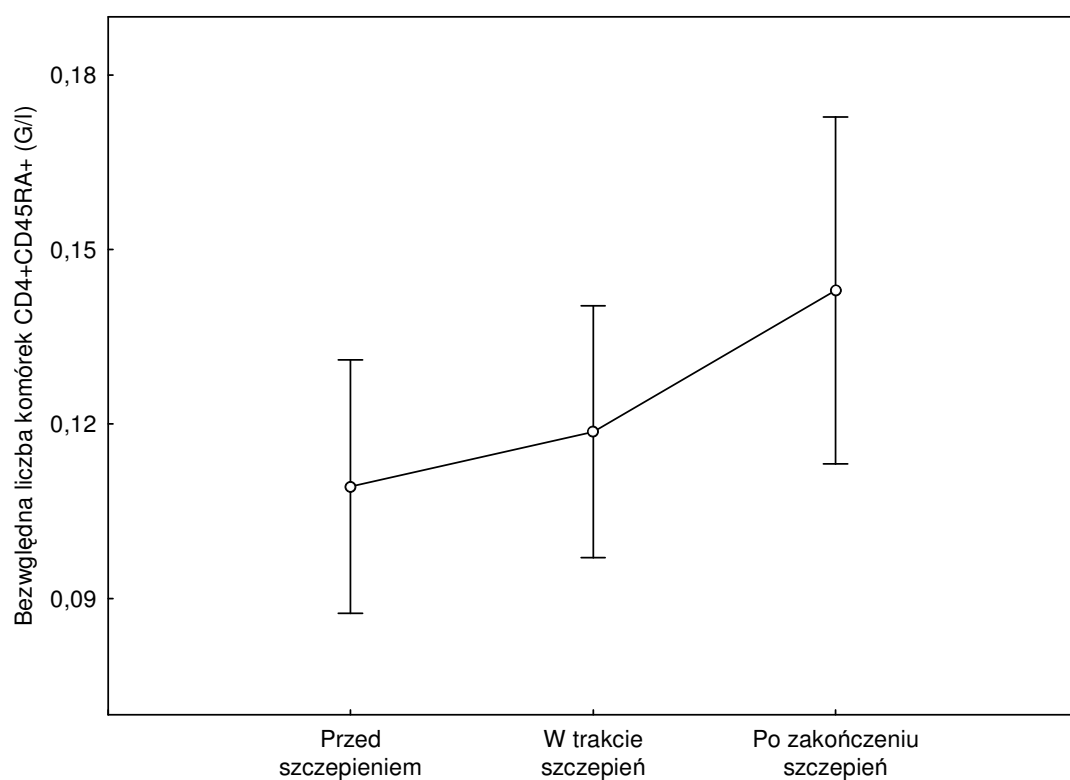
Pacjentów immunizowanych podzielono w zależności od ilości bezwzględnej komórek CD4+CD45RA+ na dwie grupy: $\leq 0,03$ G/l i $>0,03$ G/l (oś X). Wysokość kolumn (oś Y) odpowiada odsetkowi pacjentów w każdej z tych grup, którzy słabo (SO), dobrze (DO) lub bardzo dobrze odpowiedzieli (BDO) na szczepienie rHBsAg.



Porównując ilość bezwzględną komórek naiwnych CD4+CD45RA+ i komórek pamięci immunologicznej CD4+CD45RO+ podczas programu szczepień ochronnych (w trakcie i po jego zakończeniu) zaobserwowano znamienne statystycznie ($p < 0,001$) stopniowy wzrost obu parametrów w porównaniu do wartości wyjściowych (przed szczepieniem). Trend ten obrazują umieszczone poniżej wykresy (Rycina 22, 23).

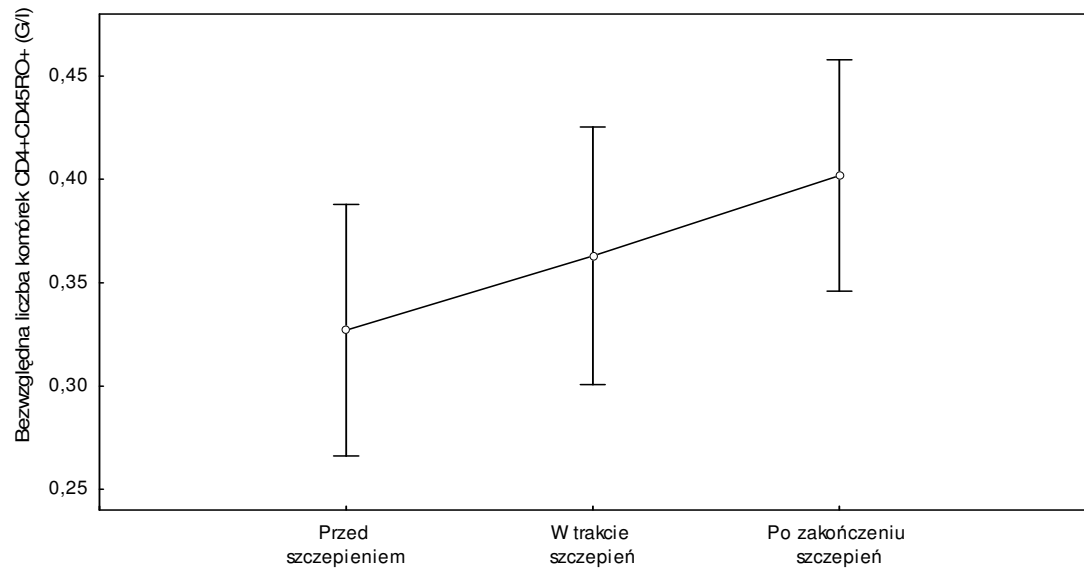
Rycina 22 Zmiana ilości bezwzględnej komórek naiwnych CD4+ w trakcie programu szczepień

Na wykresie przedstawiono oznaczone przed rozpoczęciem programu szczepień, w trakcie i po zakończeniu immunizacji średnie ilości bezwzględne komórek CD4+CD45RA+ i ich 95% przedziały ufności.



Rycina 23 Zmiana ilości bezwzględnej komórek pamięci immunologicznej CD4+ w trakcie programu szczepień

Na wykresie przedstawiono oznaczone przed rozpoczęciem programu szczepień, w trakcie i po zakończeniu immunizacji średnie ilości bezwzględne komórek CD4+CD45RO+ i ich 95% przedziały ufności.



Rekonstytucja limfocytów B

W przeprowadzonej analizie statystycznej nie wykazano istotnych różnic w badanych parametrach rekonstytucji limfocytów B między trzema grupami odpowiedzi na szczepienie.

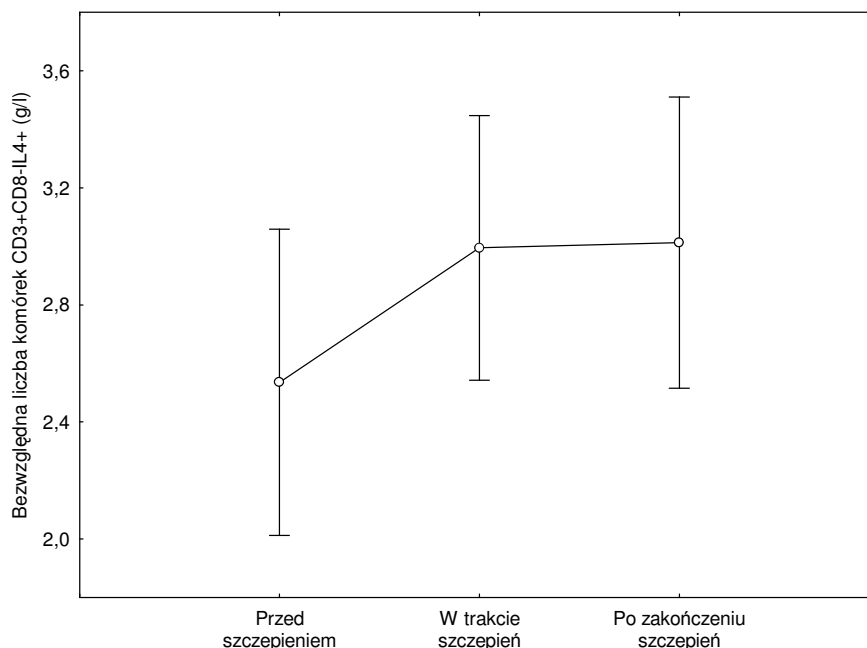
Cytokiny

Porównując badane przed immunizacją czynną wyniki cytokin profilu Th1 i Th2, uzyskane pod wpływem niespecyficznego stymulacji, nie wykazano znamiennych statystycznie różnic między grupami pacjentów, którzy słabo, dobrze lub bardzo dobrze odpowiedzieli na immunizację specyficznym antygenem (rHBsAg).

W kolejnych pomiarach profilu Th1/Th2 (w trakcie programu szczepień i po jego zakończeniu) zaobserwowano zwiększony udział odsetkowy limfocytów CD8- wykazujących ekspresję cytokin Th2 w porównaniu z wyjściowymi wynikami. Trend ten dla komórek IL4+ osiągnął znamienność statystyczną ($p=0,005$) i obrazuje go wykres umieszczony poniżej (Rycina 24).

Rycina 24 Kształtowanie się odsetka limfocytów T CD8-IL4+ w trakcie programu szczepień ochronnych

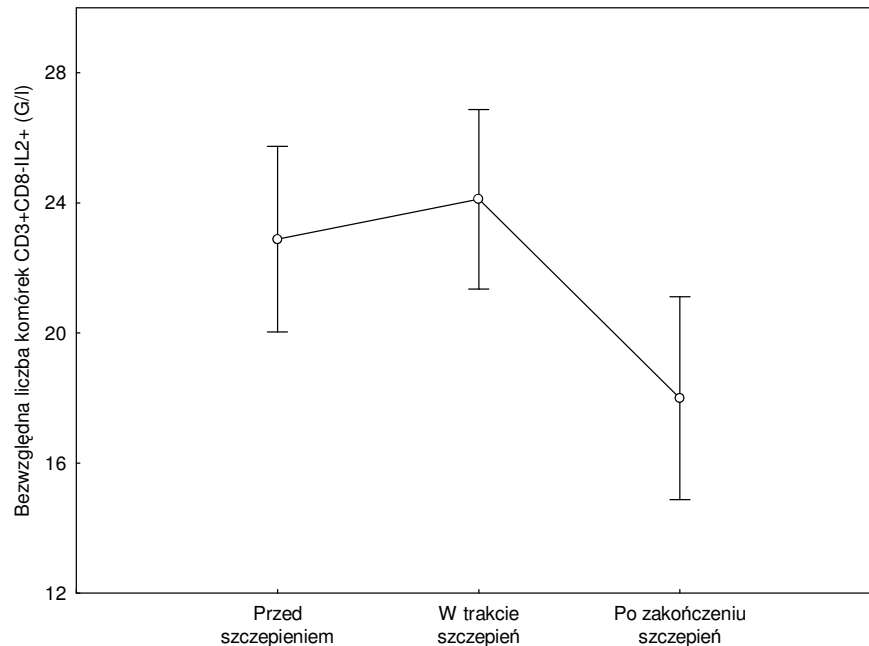
Na wykresie przedstawiono oznaczone przed rozpoczęciem programu szczepień, w trakcie i po zakończeniu immunizacji średnie odsetki limfocytów CD3+CD8- wykazujących ekspresję IL4 i ich 95% przedziały ufności.



Odsetek komórek CD8-IFN γ + wzrastał w niewielkim stopniu, podczas gdy odsetek komórek CD8-IL2+ był istotnie niższy po zakończeniu programu szczepień ($p=0,035$). Trend zmiany odsetka limfocytów T wykazujących ekspresję IL2 przedstawiono na wykresie (Rycina 25).

Rycina 25 Kształtowanie się odsetka limfocytów T CD8-IL2+ w trakcie programu szczepień ochronnych

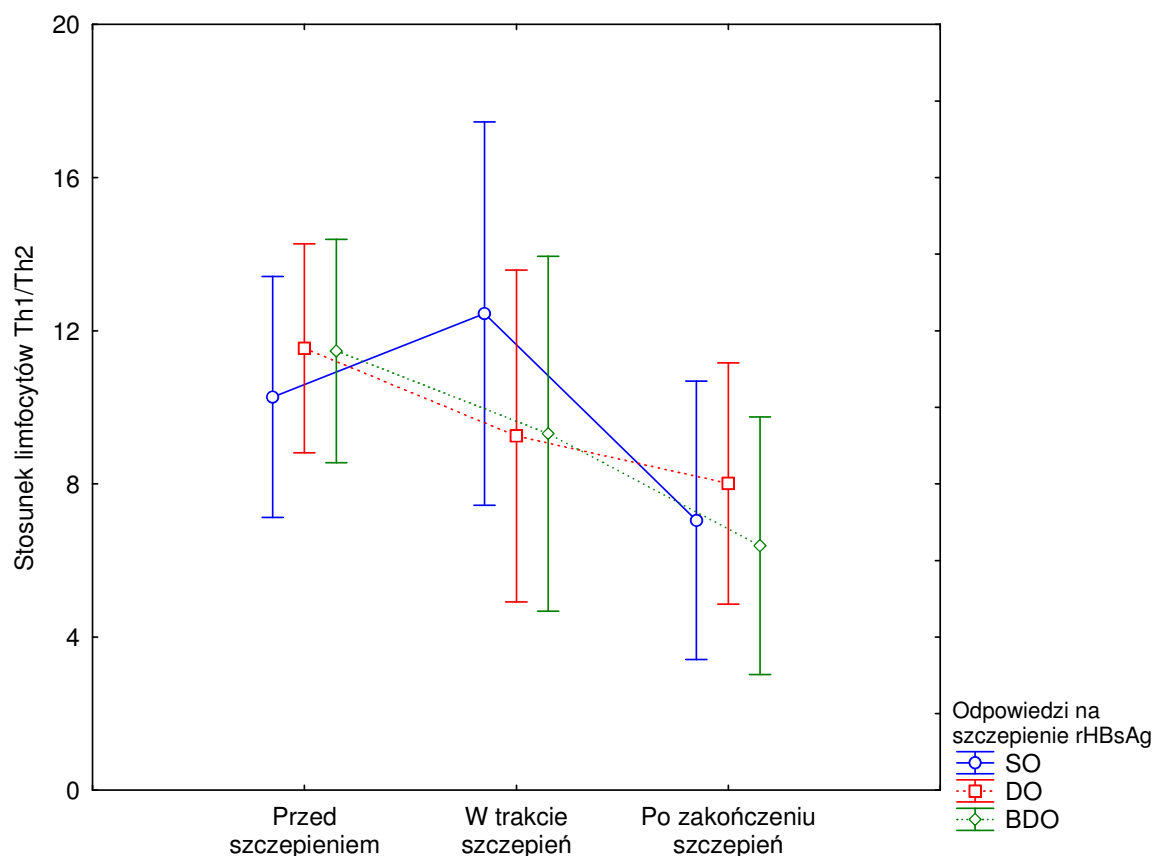
Na wykresie przedstawiono oznaczone przed rozpoczęciem programu szczepień, w trakcie i po zakończeniu programu immunizacji średnie odsetki limfocytów CD3+CD8- wykazujących ekspresję IL2 i ich 95% przedziały ufności.



Obniżenie się odsetka komórek wykazujących ekspresję IL2 przy wzroście udziału komórek IL4+ znalazło odzwierciedlenie w obniżeniu się stosunku Th1/Th2 w trakcie realizowania programu szczepień. Porównując ten parametr w trzech grupach odpowiedzi na rHBsAg nie wykazano istotnych różnic. Grupy dobrze (DO) i bardzo dobrze odpowiadająca (BDO) wykazywały zbliżone średnie wartości Th1/Th2, podczas gdy grupa pacjentów słabo odpowiadających (SO) w trakcie programu szczepień wykazywała jako jedyna wzrost stosunku Th1/Th2. Zmiany te obrazują umieszczone poniżej wykresy (Rycina 26).

Rycina 26 Kształtowanie się stosunku Th1/Th2 w trakcie programu szczepień ochronnych w trzech grupach odpowiedzi na rHBsAg.

Parametr Th1/Th2 wyliczono ze stosunku IL2 (Th1) do IL4 (Th2). Na wykresie przedstawiono oznaczone przed rozpoczęciem programu szczepień, w trakcie i po zakończeniu immunizacji średnie wartości tego parametru i ich 95% przedziały ufności.



Czynniki zależne od biorcy

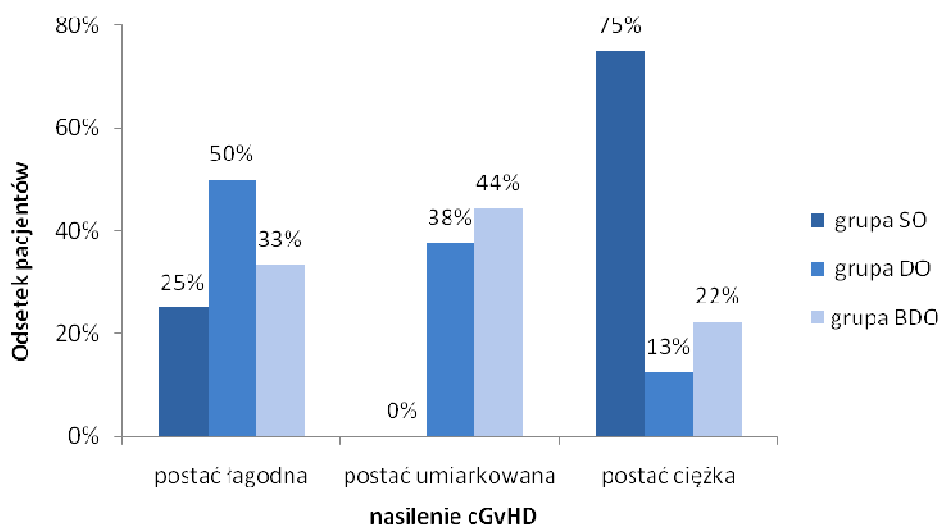
Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała wpływu przynależności do grupy wczesnej lub późnej na wyniki immunizacji czynnej rHBsAg ($p=0,772$). Analizując występowanie czynników takich jak: rodzaj choroby zasadniczej, leczenie chemioterapią przed HCT, typ kondycjonowania, źródło przeszczepu, typ przeszczepu (MUD v RD) w poszczególnych grupach odpowiedzi na szczepienie nie uzyskano różnic znamiennych statystycznie.

W badanej populacji pacjentów po HCT nie obserwowano pozytywnego wpływu szczepienia biorcy przed transplantacją na wynik immunizacji czynnej po transplantacji ($p=0,96$).

Nie wykazano znaczenia faktu wystąpienia cGvHD u pacjentów po HCT na wynik późniejszej immunizacji rHBsAg ($p=0,61$). Natomiast biorąc pod uwagę stopień nasilenia choroby, 75% pacjentów, którzy słabo odpowiedzieli na szczepienie (SO), leczeni byli przed immunizacją z powodu ciężkiej postaci cGvHD ($p=0,057$). Obserwację tę wraz z rozkładem procentowym postaci łagodnej, umiarkowanej i ciężkiej cGvHD w poszczególnych grupach odpowiedzi na rHBsAg przedstawia wykres umieszczony poniżej (Rycina 27).

Rycina 27 Występowanie poszczególnych postaci cGvHD w grupach SO, DO, BDO

Wysokość kolumn odpowiada odsetkowi pacjentów w każdej z grup z określoną postacią cGvHD po HCT (oś Y). Na osi X zaznaczono trzy stopnie zaawansowania cGvHD. Zwraca uwagę zwiększone występowanie postaci ciężkiej cGvHD w grupie słabo odpowiadającej na rHBsAg.



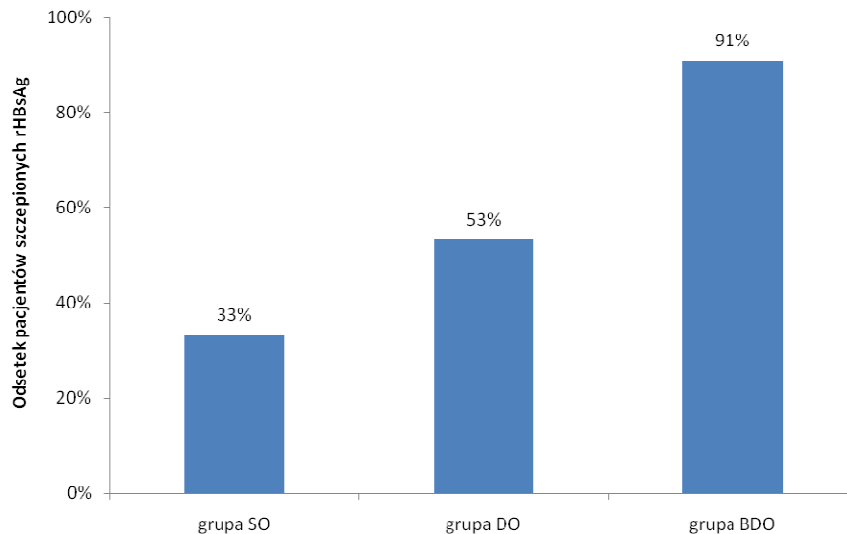
Czynniki zależne od dawcy (adoptywny transfer odporności)

Serokonwersję po 1 dawce szczepionki zmiennie częściej obserwowano u biorców HCT od dawców immunizowanych rHBsAg ($p=0,022$).

Znamienna większość pacjentów (90,9%), którzy bardzo dobrze odpowiedzieli na szczepienie rHBsAg, otrzymała przeszczep od dawców immunizowanych przed donacją, w przeciwieństwie do grupy słabo odpowiadającej, w której przeważają pacjenci (66,7%) po HCT od dawców nieimmunizowanych rHBsAg ($p=0,018$) (Rycina 28).

Rycina 28 Wpływ szczepienia dawcy rHBsAg przed HCT na wynik immunizacji biorcy po transplantacji

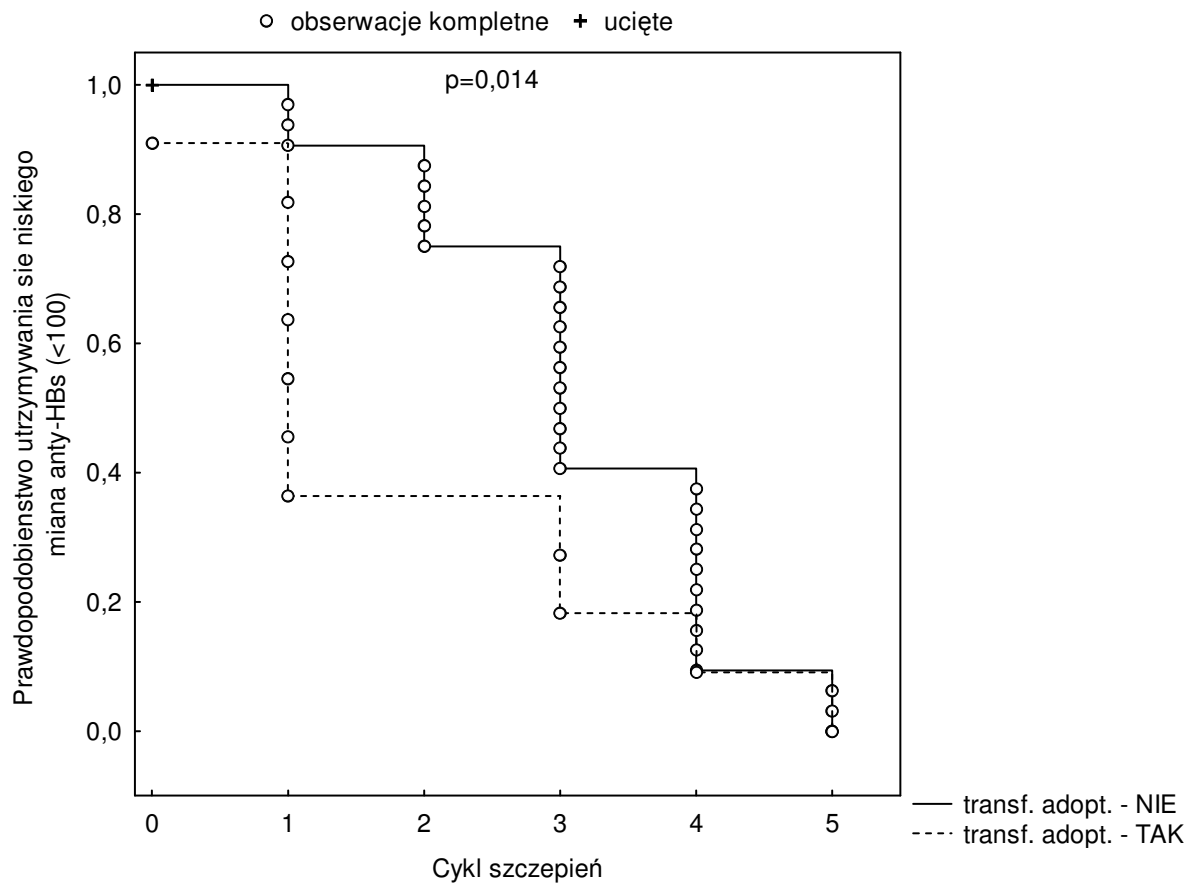
Na osi X zaznaczono grupy odpowiedzi na szczepienie (SO, DO lub BDO). Wysokość kolumn odpowiada odsetkowi pacjentów z danej grupy, których dawcy byli immunizowani p/WZW B przed HCT (oś Y). Zwraca uwagę znaczna przewaga pacjentów po przeszczepieniu od dawcy immunizowanego przed donacją w grupie BDO.



Spośród 10 biorców, u których po HCT obserwowano adoktywny transfer odporności od dawcy, po immunizacji czynnej 6 pacjentów bardzo dobrze odpowiedziało na podanie rHBsAg, a 1 pacjent został zaliczony do grupy słabo odpowiadającej. Stosując metodę Kapłana-Meiera porównano odpowiedź na immunizację czynną pacjentów, u których wystąpiło to zjawisko z pozostałymi chorymi i wykazano istotny wpływ adoktywnego transferu odporności przeciwko WZW B na odpowiedź na szczepienie rHBsAg ($p=0,014$). Prawdopodobieństwo utrzymywania się miana antyHBs<100mUI/ml po kolejnych dawkach rHBsAg w cyklu szczepień ochronnych w tych dwóch grupach przedstawia Rycina 29.

Rysunek 29 Różnice w odpowiedzi na szczepienie rHBsAg u pacjentów, u których wystąpiło zjawisko adoktrywnego transferu i u pozostałych pacjentów

Na osi X zaznaczono kolejne dawki szczepionki (rHBsAg w cyklu szczepień). Wykresy przedstawiają prawdopodobieństwo utrzymywania się miana <100mIU/ml po każdej z dawek w dwóch grupach. U pacjentów, u których po HCT doszło do adoktrywnego transferu odporności przeciwko WZW B od dawcy mają niższe prawdopodobieństwo suboptymalnej odpowiedzi na immunizację czynną rHBsAg.



5 OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Wraz z rozwojem wiedzy i doświadczenia związanego z procedurą przeszczepienia allogenicznego komórek hematopoetycznych wielu pacjentów ze schorzeniami hematologicznymi otrzymało szansę na długotrwałe przeżycie wolne od choroby. Po ustąpieniu zagrożenia związanego z wczesnym okresem pancytopenii po HCT i osiągnięciu regeneracji hematologicznej, jednym z problemów dotyczących opieki w okresie po transplantacji pozostają nadal powikłania infekcyjne. Ryzyko rozwoju zakażeń zmniejsza się przez stosowanie w okresie immunosupresji profilaktyki farmakologicznej (przeciwwirusowej, przeciwgrzybiczej i przeciwko pierwotniakom). W wyjaśnieniu podłoża zapadalności na infekcje nawet w późnym okresie potransplantacyjnym (>2 lat) pomogły badania rekonstrukcji immunologicznej, które dowiodły, że nie jest to rekapitulacja ontogenezy. Wpływ na jej tempo ma wiele czynników zależnych od samej procedury, wystąpienia GvHD i czynników zależnych od dawcy i biorcy. Okazało się, że w przebiegu HCT zanika nabyta przez pacjenta w okresie dzieciństwa odporność poszczepienna i dodatkowo zwiększa się ryzyko zakażeń bakteriami otoczkowymi, przeciwko którym rutynowo nie immunizuje się osób dorosłych. W ośrodkach transplantacyjnych zaczęto wprowadzać różne protokoły szczepień ochronnych, przy realizowaniu których stwierdzono obniżoną reakcję na immunizację pacjentów po HCT w porównaniu z populacją ludzi zdrowych. Z tych obserwacji wyniknął pomysł przebadania wielu czynników, które potencjalnie mogą decydować o odpowiedzi immunologicznej na podany antygen szczepionki. Wyniki tych badań miały posłużyć opracowaniu optymalnego kalendarza szczepień ochronnych, który zwiększyłby szanse pacjentów po HCT na wytworzenie ochrony przeciwko patogenom.

5.1 Rekonstrukcja immunologiczna po HCT

Cechami charakterystycznymi rekonstrukcji immunologicznej po procedurze HCT są zmiany ilościowe i jakościowe w subpopulacjach komórek odpornościowych. Ponadto na odpowiedź immunologiczną na antygen wpływ mają różne mechanizmy i związane z nimi substancje regulujące, do których należą cytokiny. Warunkiem optymalnej dla organizmu reakcji na antygen jest odzyskanie

prawidłowej kooperacji między poszczególnymi składowymi układu odpornościowego na każdym z etapów odpowiedzi immunologicznej. Unikalnym zjawiskiem charakterystycznym dla okresu potransplantacyjnego jest choroba przeszczep przeciw gospodarzowi, która jest efektem zaburzenia tolerancji limfocytów T dawcy na antygeny układu zgodności tkankowej biorcy. Wystąpienie cGvHD niesie za sobą szereg głębokich nieprawidłowości układu immunologicznego, które zaburzają jego prawidłową rekonstrukcję.

5.1.1 Odporność humoralna i komórkowa

Ocena wybranych parametrów immunologicznych w okresie do 3 lat po HCT

W badanej grupie pacjentów po HCT przeanalizowano bezwzględną liczbę neutrocytów, limfocytów, odsetek γ -globulin oraz stężenie immunoglobulin IgG, IgM, IgA jako dostępnych w rutynowych badaniach mierników statusu układu immunologicznego w okresie od doby +100 po 3 lat po HCT. Trend wzrostu każdego z badanych parametrów wraz z upływem czasu od transplantacji wykazywał znamienność statystyczną. Uzyskane wyniki zgodne są z doniesieniami literaturowymi (18;27;34;122).

Liczba bezwzględna neutrocytów i limfocytów u przeważającej większości biorców występowała w granicach normy w dobie +180 po HCT i obserwowano jedynie pojedyncze przypadki (4,1%) neutropenii i limfopenii w okresie powyżej 2 lat po HCT. Natomiast u większego odsetka osób utrzymywały się zaburzenia ilościowe w obrębie immunoglobulin. Hipogammaglobulinemię obserwowano nadal u 35% pacjentów 3 lata po transplantacji. Obniżone stężenie immunoglobulin IgG, IgM i IgA występowało jeszcze 2 lata po HCT u niewielkiego odsetka pacjentów. Odchylenia w wartościach tych parametrów są odzwierciedleniem utrzymujących się u pacjentów do około 2 lat po przeszczepieniu deficytów odporności humoralnej (21-23;59). Potwierdza to również istotnie niższe stężenie IgA u chorych w okresie wczesnym (<2 lat po HCT) w porównaniu do chorych powyżej 2 lat po transplantacji.

W okresie 1-3 lat po HCT u około 20% biorców zanotowano występowanie hipergammaglobulinemii oraz u 8-12% podwyższonego stężenia IgG. Przypisywane jest to w literaturze głównie pacjentom z cGvHD jako efekt poliklonalnej aktywacji limfocytów pochodzących od dawcy w odpowiedzi na różnice w antygenach zgodności tkankowej u biorcy (59;65).

Subpopulacje limfocytów B

U pacjentów zakwalifikowanych do przeprowadzenia cyklu szczepień ochronnych oceniono subpopulacje limfocytów B i T (komórek naiwnych i pamięci immunologicznej) metodą cytometrii przepływowej na podstawie ekspresji na ich powierzchni charakterystycznych molekuł (antygenów CD i receptorów immunoglobulinowych). Ze względu na ograniczenia techniczne dostępnego cytometru przepływowego możliwe było jednoczesne wyznakowanie na komórkach tylko trzech antygenów.

Badając ilościowo limfocyty B (CD19+), w tym także analizując ilość komórek naiwnych (CD27-) i pamięci immunologicznej (CD27+), nie wykazano różnic znamiennych statystycznie między pacjentami we wczesnym i późnym okresie po HCT. U biorców HCT w obu grupach przeważały naiwne limfocyty B, wykazujące ekspresję receptora immunoglobulinowego IgD i/lub IgM. Ze względu na używanie przeciwciał sprzężonych z tym samym fluorochromem do wyznakowania receptorów immunoglobulinowych, niemożliwe było sprawdzenie jaka część komórek CD19+ wykazuje jednoczesną ekspresję IgD i IgM. Brak istotnych różnic między subpopulacjami limfocytów B u pacjentów z grupy wczesnej i późnej potwierdzałby doniesienia literaturowe dotyczące ustępowania ilościowych zaburzeń w obrębie limfocytów B u większości pacjentów do około roku po HCT (20;23).

Wiadomo jednak, że u części pacjentów znacznie dłużej mogą utrzymywać się zaburzenia jakościowe: oligoklonalny charakter Ig i upośledzona aktywność opsonizująca. Z tym związane jest zwiększone ryzyko infekcji bakteriami otoczkowymi oraz obniżona odpowiedź swoista, w tym reakcja na antygeny szczepionki (20-24;123). Pacjenci włączeni do programu immunizowani byli między innymi antygenami polisacharydowymi (szczepionka Pneumo23 i Hiberix). Niemożliwa była ocena miana przeciwciał przeciwko antygenom tych szczepionek, ale na uwagę zasługuje fakt, że u żadnego z pacjentów nie doszło do rozwoju infekcji dróg oddechowych o ciężkim przebiegu, które zdarzały się u chorych z badanego ośrodka transplantacyjnego przed wprowadzeniem programu szczepień ochronnych. Oceniano natomiast odpowiedź na rHBsAg u pacjentów nieposiadających przeciwciał przeciwko WZW B (antyHBs). Nie wykazano jednak wpływu żadnego z analizowanych parametrów rekonstytucji immunologicznej linii B na jakość odpowiedzi humoralnej na antygen szczepionki.

Subpopulacje limfocytów T

Wstępna analiza subpopulacji limfocytów T metodą cytometrii przepływowej polegała na ocenie ekspresji na ich powierzchni antygenów CD4 i CD8. Jedną z charakterystycznych cech wykazanych w badanej grupie była opóźniona regeneracja komórek CD3+CD4+ w stosunku do CD3+CD8+. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi dysproporcja ta powinna zmniejszać się wraz z upływem czasu od transplantacji (33;34;124;125). W badanej grupie znajduje to swoje potwierdzenie w znamienne niższym odsetku i ilości bezwzględnej komórek CD3+CD4+ u pacjentów w okresie wczesnym w porównaniu do okresu późnego po HCT ($p=0,006$). Zależności takiej nie wykazano analizując komórki CD3+CD8+. Dodatkowo oceniano odsetek pacjentów z liczbą bezwzględną komórek CD3+CD4+ $>0,2\text{G/l}$, zakres wartości uważany za istotny dla prawidłowego funkcjonowania odporności i wyników immunizacji. Według doniesień Maury i wsp. po roku od transplantacji nadal u około 1/3 pacjentów liczba limfocytów CD3+CD4+ nie przekracza tej wartości (34). Zbliżone dane zaobserwowano w badanej grupie, ponieważ w okresie wczesnym po HCT liczbę limfocytów CD3+CD4+ $>0,2\text{G/l}$ wykazano u 73,7% pacjentów, pozostali (około 26,3%) nie osiągnęli tej wartości. Z uwagi na fakt, że w grupie tej byli również biorcy blisko 2 lata po transplantacji, odsetek osób z tym wskaźnikiem regeneracji był odpowiednio wyższy niż w grupie doświadczalnej Maury i wsp. Natomiast po 2 latach od transplantacji (grupa późna) u znamienne wyższego odsetka pacjentów (93,3%) wykazano liczbę komórek CD3+CD4+ na poziomie $>0,2\text{G/l}$ ($p=0,055$). Wartość kliniczną tego parametru potwierdza wynik immunizacji rHBsAg, ponieważ w badanej grupie u wszystkich pacjentów, którzy bardzo dobrze odpowiedzieli na szczepienie, liczba komórek CD3+CD4+ wynosiła $>0,2\text{G/l}$.

Dysproporcja między dwoma subpopulacjami komórek CD3+ znajduje odzwierciedlenie w odwróconym stosunku komórek CD4+ do CD8+ (CD4/CD8). Według danych z piśmiennictwa dotyczy to około 78% pacjentów w okresie roku po HCT i może utrzymywać się wiele lat po transplantacji. Dla porównania w populacji osób zdrowych stosunek CD4/CD8 wynosi średnio 1,3-2 (zakres 0,5-7) (34;101;126). Odwrócony stosunek CD4/CD8 u pacjentów po HCT zaobserwowano zarówno w grupie wczesnej jak i późnej, a mediana stosunku CD4/CD8 nie przekraczała wartości 1 (wynosiła odpowiednio w grupach 0,52 v 0,86) i była znamienne niższa u osób w okresie wczesnym ($p=0,008$).

U pacjentów po HCT obserwuje się ponadto unikalne zjawisko obecności w krwi obwodowej komórek tzw. ‘podwójnie dodatnich’ CD4+CD8+, co jest charakterystyczne również dla wczesnego okresu ontogenezy (127). Komórki o tym immunofenotypie występowały w odsetku sięgającym maksymalnie 4,7% limfocytów, przy czym mediana była istotnie wyższa w grupie późnej (1,0 v 1,3%; $p=0,05$). Brak jest danych jak długo populacja komórek ‘podwójnie dodatnich’ CD4+CD8+ może utrzymywać się we krwi biorców HCT.

W analizie ujęto również komórki o immunofenotypie CD3-CD8+, które odpowiadają komórkom NK. Nie zaobserwowano różnic w ilości tych komórek między okresem wczesnym i późnym po HCT, co potwierdzałoby badania innych autorów, według których stopień rekonstrukcji komórek NK jest prawidłowy już 2 miesiące po transplantacji (18;127).

Na podstawie stopnia ekspresji izoform RA i RO antygenu CD45 identyfikowano komórki naiwne i pamięci immunologicznej w obrębie komórek CD4+ i CD8+. W ciągu pierwszych 6 miesięcy po HCT pula limfocytów T obecnych w organizmie pochodzi z ekspansji dojrzałych komórek, które przetrwały kondycjonowanie lub zostały przetoczone w materiale przeszczepowym. Z tej oligoklonalności wynika wąski zakres swoistości dostępnych limfocytów i tzw. nisze w ich repertuarze. Dopiero później zaczynają się pojawiać komórki naiwne powstałe ‘de novo’ (33;128;129). W badanej grupie liczba bezwzględna komórek CD4+CD45RA+RO- wykazywała niższe wartości u pacjentów we wczesnym okresie po transplantacji, ale różnica ta nie była statystycznie znamienne ($p=0,096$). Potwierdza to obserwacje, że stopień rekonstrukcji tej puli komórek uzależnia się nie tyle od czasu po HCT, co od funkcjonowania grasicy. Na to natomiast wpływ mają głównie wiek pacjenta, agresywność terapii stosowanej przed HCT oraz rozwój cGvHD. W badanej grupie komórki CD4+ wykazywały silną ekspresję izoformy CD45RO, charakterystycznej dla komórek pamięci immunologicznej, zarówno u pacjentów w grupie wczesnej, jak i późnej. Natomiast liczba bezwzględna komórek CD4+CD45RA-RO+ była niższa u pacjentów w grupie wczesnej i różnica ta była statystycznie znamienne ($p=0,011$).

Uważa się, że grasicca odpowiada za regenerację głównie puli komórek naiwnych CD4+, natomiast komórki naiwne CD8+ powstają prawdopodobnie poza grasicą, gdyż odnowa tej subpopulacji po HCT jest sprawniejsza i niezależna od wieku pacjenta (33;39). Dane uzyskane w badanej grupie potwierdzają wyniki innych badaczy, ponieważ wartość bezwzględna komórek CD8+ wykazujących

ekspresję izoformy CD45RA i komórek CD8+45RO+ nie wykazywały istotnych różnic między chorymi w okresie wczesnym i późnym po przeszczepieniu. Niektórzy autorzy twierdzą jednak, że immunofenotyp rozróżniający komórki naiwne i pamięci w puli komórek CD8 jest bardziej złożony i same izoformy CD45RA/RO nie są doskonałymi markerami różnicującymi (33;130)

W puli komórek CD4+ i CD8+ znajdują się również komórki ‘podwójnie dodatnie’ pod względem ekspresji izoform antygenu CD45 (CD45RA+RO+). Uważa się, że są to komórki pamięci CD45RO+, na których doszło do reekspresji izoformy RA (128). Wśród limfocytów CD4 znamienne więcej komórek CD45RA+RO+ obserwowano w grupie późnej ($p=0,007$), podczas gdy wśród limfocytów CD8 nie wykazano takiej różnicy.

5.1.2 Profil cytokin Th1/Th2

Typ odpowiedzi immunologicznej Th-zależnej może ukierunkować reakcję na podany antygen szczepionki w stronę odporności humoralnej lub komórkowej. Detekcja komórek o profilu Th1 i Th2 możliwa jest dzięki metodzie cytometrii przepływowej, po stymulacji niespecyficznej limfocytów z udziałem PMA i jonomycyny oraz, w celu wzmocnienia sygnału, po zablokowaniu za pomocą brefeldyny wydzielania z komórki wytworzonych cytokin (131;132). W grupie chorych po HCT badano cytokiny z profilu Th1 (IL2, IFN γ) oraz Th2 (IL4, IL5, IL10) przed i w trakcie realizowania programu szczepień ochronnych.

U pacjentów po HCT po stymulacji niespecyficznej wykazano silną aktywację układu Th1 wyrażoną wysokimi odsetkami komórek IL2+ i IFN γ + w porównaniu do komórek IL4, IL5 i IL10+ zarówno w komórkach T CD8- (CD4+), jak i CD8+. Taki obraz profilu cytokin porównywalny jest z wynikami z innych ośrodków. Bardzo trudno jest uzyskać wyższy odsetek komórek wykazujących ekspresję cytokin Th2 także u zdrowych osób. Tłumaczone jest to nie tyle niedoskonałością stosowanych stymulacji, co stanem spoczynkowym komórek Th2 lub rzeczywistą, małą częstością tej subpopulacji limfocytów za wyjątkiem specyficznych sytuacji klinicznych, takich jak hipereozynofilia czy alergia (132). W badanej grupie zastosowano jedynie krótki czas stymulacji (5-6h), ponieważ w doświadczeniach własnych i innych badaczy po 4h stymulacji cytokiny Th1 i Th2 wykazywały wystarczająco wysoką ekspresję do pomiaru metodą cytometrii przepływowej (dla limfocytów produkujących IL2, IL4, IL10 i IFN γ przypada wówczas

maksymalny okres wydzielania) bez wpływu na żywotność komórek w warunkach 'in vitro' (po długiej stymulacji część komórek ulega apoptozie).

Porównując wyniki badanej grupy z obserwacjami Picker i wsp.(131) uzyskano zbliżony generalny trend wydzielania poszczególnych cytokin przez limfocyty CD4 (IL2> IFN γ >IL4) oraz CD8 (IFN γ >IL2 i minimalna produkcja IL4). Nie można było jednak dokładnie skonfrontować wyników grupy badanej z uzyskanymi w grupie doświadczalnej Picker i wsp., ponieważ w doświadczeniu Picker'a zastosowano nieco niższe stężenie PMA i jonomycyny.

W doświadczeniu przeprowadzonym w Laboratorium Immunologii w Toulouse na grupie zdrowych wolontariuszy przez Rostaing i wsp. (132) stwierdzono osobniczą zmienność ekspresji cytokin Th1 i Th2 i nie udało się określić zakresu wartości 'prawidłowych'. W badaniu tym zastosowano również niższe stężenia PMA i jonomycyny oraz monensynę jako substancję blokującą wydzielanie cytokin. Pomimo tych różnic stwierdzono zbliżone zakresy wartości po krótkiej stymulacji dla IL2 oraz IL4 u biorców HCT i zdrowych osób z doświadczenia Rostaing i wsp. U pacjentów po transplantacji nie udało się natomiast uzyskać wartości przekraczających 1% limfocytów pozytywnych pod względem ekspresji IL5 i IL10 pomimo zastosowania silniejszej stymulacji, podczas gdy wśród większości zdrowych osób otrzymano takie wartości. Tymczasem w badanej grupie biorców HCT wykazano w znacznie wyższym odsetku komórek ekspresję IFN γ przekraczającą ponad dwukrotnie średnią wartość stwierdzaną w grupie reprezentującej zdrową populację. Wysoki odsetek komórek IFN γ + w badanej grupie pacjentów po HCT dotyczył głównie subpopulacji CD8+ spełniającej funkcje cytotoksyczne lub supresorowe w organizmie. Ciekawą obserwacją jest fakt, że ten znamienne wyższy odsetek komórek CD8+IFN γ + stwierdzony był u pacjentów w okresie do 2 lat po transplantacji ($p=0,052$), co może świadczyć o dużym stopniu aktywacji mechanizmów odporności komórkowej we wczesnym okresie po HCT.

Porównując odsetek limfocytów wykazujących typową dla profilu Th1 koekspresję IL2 i IFN γ uzyskano wyniki zbliżone do Rostaing i wsp., czyli zadziwiająco niski odsetek komórek 'podwójnie pozytywnych' w stosunku do komórek IL2+IFN γ - i IL2-IFN γ +. W badanej grupie pacjentów po HCT nie wykazano różnic istotnych statystycznie w odsetku komórek 'podwójnie pozytywnych' między okresem wczesnym i późnym po transplantacji. Znamienne wyższy był natomiast odsetek limfocytów CD3+ wykazujących jedynie ekspresję

IFN γ (IL2-IFN γ +) u osób z grupy wczesnej w porównaniu do wyników stwierdzanych w grupie osób po 2 latach od transplantacji ($p=0,018$).

Do określenia profilu cytokinowego komórek Th danej osoby, podobnie jak w badaniu Rostaing i wsp., użyto parametru Th1/Th2. W badanej grupie parametr ten określono przez stosunek IL2 do IL4 w populacji komórek CD8- (CD4+). W wyborze kierowano się występowaniem obu cytokin głównie w komórkach CD8- oraz w przypadku profilu Th2 wysoką ekspresją IL4 w porównaniu do IL5 i IL10. Mediana stosunku Th1/Th2 wykazywała nieco wyższe wartości u pacjentów z grupy wczesnej, jednak nie wykazano znamienności statystycznej tej różnicy.

5.2 Szczepienia ochronne po HCT

Stosowanie szczepień ochronnych u chorych po HCT jest bardzo ważnym aspektem opieki, zmniejszającym ryzyko powikłań związanych z zakażeniem. Przeprowadzenie programu szczepień nie zapewnia jednak wszystkim chorym pewnej ochrony ze względu na obniżoną, w porównaniu do zdrowej populacji, odpowiedź na antygeny szczepionek. Wynika to między innymi z konieczności stosowania mniej immunogennych szczepionek oraz zaburzonych na różnych etapach mechanizmów odporności. W badanej grupie u wszystkich pacjentów przeprowadzono program immunizacji czynnej zgodnie z przygotowanym wstępnie kalendarzem szczepień, uwzględniając szczepienie przeciwko polio, tężcowi, błonicy, bakteriom otoczkowym (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*). U osób nieposiadających ochronnego miana antyHBs podawano również szczepionkę przeciwko WZW B. W gdańskim ośrodku transplantacyjnym, poza oznaczaniem miana antyHBs, nie było możliwości monitorowania poszczepiennego miana przeciwciał przeciwko antygenom innych szczepionek. Skupiono się więc na wyniku szczepienia przeciwko WZW B ze względu na duże znaczenie epidemiologiczne ochrony przeciwko wirusowi HBV oraz możliwość oznaczania miana antyHBs w zakresie rutynowych badań laboratoryjnych. Wszystkie analizowane czynniki porównywano więc do wyników immunizacji rHBsAg.

5.2.1 Czynniki decydujące o odpowiedzi na szczepienie

Rekonstytucja limfocytów T naiwnych (CD4+CD45RA+RO-)

Uważa się, że wraz ze wzrostem odsetka powstałych 'de novo' komórek naiwnych, dzięki którym poszerza się repertuar swoistości, organizm zyskuje stopniowo zdolność do reagowania na większą różnorodność antygenów i wytworzenia przeciwko nim odporności. Pojawiają się doniesienia dowodzące, że obniżona odpowiedź na szczepienia ochronne po HCT wynika właśnie z niewystarczającej różnorodności swoistych limfocytów T, które mogą odpowiedzieć na podane w szczepionce antygeny. Wskazują na to badania Roux i wsp., z których wynika, że liczba komórek naiwnych CD4+ lepiej koreluje ze zdolnością do wytworzenia stanu odporności przez układ immunologiczny pacjenta niż czas immunizacji (ilość miesięcy po przeszczepieniu), wiek pacjenta, czy

liczba bezwzględna limfocytów CD4+. Na potwierdzenie tej tezy w doświadczeniu Roux sprawdzono odpowiedź na szczepienie przeciwko tężcowi (miano przeciwciał antyTT) u pacjentów w różnym okresie po transplantacji. Wykazano, że pacjenci z niewystarczającym funkcjonowaniem grasicy, stwierdzonym na podstawie liczby komórek CD4+CD45RA+RO- $<0,03\text{G/l}$, bardzo słabo odpowiedzieli na podane trzy dawki szczepionki w przeciwieństwie do chorych z wyższą liczbą tych komórek (130). Podobną zależność zaobserwowano w badanej grupie badając skuteczność immunizacji rHBsAg. Nie wykazano różnic w stopniu odpowiedzi na szczepionkę przeciwko WZW B między pacjentami z liczbą komórek naiwnych CD4+ powyżej i poniżej $0,05\text{G/l}$. Podobnie jak w badaniu Roux i wsp. krytyczna wydaje się być ilość CD4+CD45RA+RO- na poziomie $0,03\text{G/l}$, ponieważ znamienne wyższy odsetek pacjentów, którzy nie przekroczyli tej wartości, słabo odpowiedzieli na szczepionkę, w przeciwieństwie do pacjentów z zadowalającym statusem $>0,03\text{G/l}$ komórek naiwnych ($p=0,057$). Jest to kolejny dowód potwierdzający znaczenie grasicy i komórek naiwnych CD4+ w uzupełnianiu nisz w repertuarze swoistości po transplantacji. Dodatkowo, jest to cenna klinicznie obserwacja, która może służyć zidentyfikowaniu pacjentów z opóźnioną rekonstytucją. Aby zwiększyć u nich szansę na efektywniejszą odpowiedź na antygeny szczepionek, należałoby odroczyć immunizację do czasu pełniejszej odnowy repertuaru immunologicznego limfocytów T CD4+.

Z drugiej strony immunizowanie pacjenta antygenami szczepionek wydaje się mieć również wpływ modulujący na pulę komórek naiwnych i pamięci immunologicznej. Ciekawa wydaje się być obserwacja porównująca te subpopulacje podczas realizowania programu szczepień ochronnych z wyjściowymi parametrami oznaczonymi przed immunizacją. Wykazano, że zarówno liczba komórek CD4+CD45RA+RO-, jak i CD4+CD45RA-RO+ zwiększa się po immunizacji czynnej, uzyskując najwyższe wartości po zakończeniu cyklu szczepień ($p<0,001$).

Znaczenie profilu cytokin Th1/Th2

Produkcja przeciwciał antyHBs w odpowiedzi na immunizację czynną jest efektem pobudzenia swoistych limfocytów B w mechanizmie zależnym od limfocytów T. Skoordynowane działanie cytokin Th1 i Th2 wydzielanych przez limfocyty T warunkuje optymalne dojrzewanie i różnicowanie specyficznych dla Ag szczepionki limfocytów B. Parametr Th1/Th2 określony przed rozpoczęciem immunizacji porównywano między trzema grupami odpowiedzi na rHBsAg.

Uważa się bowiem, że zaburzenia równowagi między Th1 a Th2 mogą wpływać na jakość odpowiedzi immunologicznej na szczepienia ochronne, przy czym doniesienia są często przeciwstawne. W badaniu Larsen i wsp. oraz Kardar i wsp. analiza profilu cytokin wydzielanych po ponownej ekspozycji 'in vitro' na Ag szczepionek przez specyficzne limfocyty CD4+ ujawniła mieszany profil Th1/Th2 u osób dobrze odpowiadających na immunizację, podczas gdy limfocyty osób, które nie wytworzyły niskiego ochronnego miana przeciwciał, nie proliferowały w obecności Ag i nie wydzielały cytokin, podobnie jak u osób wcześniej nieimmunizowanych (133;134). Inne badanie potwierdziło mieszany profil cytokinowy grupy dobrze odpowiadającej na rHBsAg, lecz wobec uzyskania proliferacji swoistych limfocytów CD4 w warunkach 'in vitro', brak odpowiedzi na immunizację tłumaczono tam niemożnością polaryzacji specyficznych komórek Th w kierunku Th1 lub Th2 (135). W przeprowadzonym doświadczeniu, badając ekspresję cytokin u pacjentów po przeszczepieniu allogenicznym stosowano jednak stymulację niespecyficzną, sprawdzając ogólną polaryzację czynnościową limfocytów CD4 w kierunku profilu Th1 lub Th2. Parametr Th1/Th2 miał więc z założenia odzwierciedlać trend odpowiedzi immunologicznej w stronę odpowiedzi humoralnej lub komórkowej. Wynik tego parametru nie wpłynął jednak bezpośrednio na jakość odpowiedzi humoralnej na specyficzny antygen szczepionki, ponieważ nie wykazano statystycznie znamiennej różnicy w stosunku Th1/Th2 określonym przed immunizacją między grupą słabo (SO), dobrze (DO) i bardzo dobrze odpowiadającą (BDO) na szczepienie rHBsAg.

Ciekawą obserwacją była również zmiana profilu cytokin pod wpływem stosowanego programu szczepień ochronnych. Pierwszy pomiar ekspresji cytokin wykonywano przed rozpoczęciem szczepień, drugi w trakcie realizowania programu (w grupie DO i BDO pokrywało się to najczęściej z okresem pojawienia się odpowiedzi humoralnej na rHBsAg), trzecie badanie przypadało po zakończeniu podstawowego kalendarza szczepień (wówczas u pacjentów z grupy SO obserwowano już cechy odpowiedzi humoralnej na rHBsAg). Wykazano statystycznie znamienny wzrost odsetka limfocytów CD8- wykazujących ekspresję IL4 w kolejnych pomiarach ($p=0,005$) i obniżenie się odsetka komórek CD8-IL2+ w pomiarze wykonanym po zakończeniu programu szczepień w porównaniu do wyjściowych wartości ($p=0,035$). Odsetek komórek CD8-INF γ + nie wykazywał istotnych zmian w trakcie realizowania programu szczepień. Zmiana odsetka komórek wykazujących ekspresję IL2 i IL4 znalazła odzwierciedlenie w obniżaniu

się wartości parametru Th1/Th2 w trakcie realizowania programu szczepień. Pod wpływem tej obserwacji nasunęło się pytanie: czy zmiany w równowadze między profilem Th1 i Th2 były odzwierciedleniem różnego stopnia odpowiedzi humoralnej na antygen szczepionki (np. rHBsAg), czy może generalnym efektem działania immunomodulującego podawanych szczepionek? Sprawdzone zmiany stosunku Th1/Th2 w trzech grupach odpowiedzi na rHBsAg i zaobserwowano, że grupa DO i BDO wykazywały zbliżone średnie wartości Th1/Th2, obniżające się na kolejnych etapach realizowania programu szczepień. Natomiast grupa pacjentów SO, u których reakcję na rHBsAg uzyskano po wielu dawkach szczepionki i miano przeciwciał ochronnych było stosunkowo niskie w porównaniu do grup DO i BDO, jako jedyna wykazywała wzrost stosunku Th1/Th2 w drugim pomiarze. Mogłoby to świadczyć o silniejszej aktywacji na tym etapie układu immunologicznego w kierunku odpowiedzi typu komórkowego. W ostatnim pomiarze wykonanym po zakończeniu programu szczepień, kiedy doszło już do serokonwersji w zakresie odpowiedzi na rHBsAg w grupie SO, parametr Th1/Th2 osiągnął średnie wartości porównywalne do grupy DO i BDO. Nie wykazano jednak znamienności statystycznej tego trendu.

Przewlekła choroba przeszczep przeciw gospodarzowi

Zaburzenia rekonstrukcji immunologicznej związane z wystąpieniem cGvHD i z immunosupresyjnym leczeniem choroby decydują o znacznie obniżonej odpowiedzi na szczepienia ochronne lub nawet jej braku. W związku z tym nie zaleca się immunizacji czynnej w aktywnej fazie choroby i program szczepień ochronnych należy rozpocząć po odstawieniu leczenia immunosupresyjnego. Do tego czasu wskazane jest stosowanie profilaktycznej antybiotykoterapii (18;67;68).

U 63,3% pacjentów z badanej grupy w okresie potransplantacyjnym rozpoznano cGvHD, z czego u 38,7% w stopniu ciężkim. Całkowity odsetek rozpoznań był wysoki w porównaniu z raportowaną częstością rozpoznań cGvHD w innych ośrodkach transplantacyjnych (43;45;49). Należy jednak pamiętać, że postawienie diagnozy według samych kryteriów klinicznych, szczególnie jeśli mamy do czynienia z postacią łagodną (ograniczoną) i tylko jeden narząd jest zajęty, może być dość subiektywna. Odsetek rozpoznań choroby w stopniu ciężkim jest zbliżony do danych literaturowych.

Przewaga częstości rozpoznania cGvHD u pacjentów w grupie późnej ($p=0,06$) wynika z tego, że właśnie w większości przypadków wystąpienie choroby było powodem odroczenia momentu rozpoczęcia immunizacji czynnej. Potwierdza to także różnica w rozkładzie poszczególnych stopni zaawansowania cGvHD między grupami. W grupie późnej przeważają rozpoznania ciężkiej postaci, która wymaga stosowania 2-lub 3-lekowej terapii immunosupresyjnej, natomiast w grupie wczesnej dominuje rozpoznanie postaci łagodnej, która zazwyczaj nie jest przeszkodą w przeprowadzeniu immunizacji, bo rzadko wymaga długotrwałego leczenia immunosupresyjnego. Opisana różnica byłaby bardziej znamienna statystycznie, gdyby w przeszłości program rewakynacji był rutynowym postępowaniem. U części osób przynależność do grupy późnej wynikała bowiem z tego, że szczepienia ochronne nie zostały u nich przeprowadzone we wczesnym okresie po HCT, pomimo braku przeciwwskazań.

W momencie rozpoczęcia cyklu szczepień, zgodnie z przyjętymi zaleceniami, pacjenci nie wykazywali cech zaostrenia choroby. Porównując jednak wyniki immunizacji rHBsAg wykazano, że 75% pacjentów, którzy leczeni byli po HCT z powodu ciężkiej postaci cGvHD, słabo odpowiedziało na to szczepienie ($p=0,057$). Obserwacja ta jest zgodna z doniesieniami literaturowymi, według których część zaburzeń jakościowych układu immunologicznego może utrzymywać się pomimo wygaśnięcia ostrej fazy cGvHD, a w rezultacie immunizacja u tych osób może być mniej efektywna niż u zdrowych pacjentów po HCT (65;115;136).

Immunizacja dawców

Znaczenie immunizacji czynnej dawców przed donacją przeanalizowano w badanej grupie pod kątem utrzymywania stanu odporności przeciwko WZW B u chorych po HCT. Pierwszym istotnym aspektem jest zabezpieczenie pacjenta w okresie bezpośrednio po transplantacji, kiedy ryzyko powikłań związanych z zakażeniem jest największe (137;138). Próby szczepienia pacjentów leczonych z powodu nowotworów hematologicznych są często nieskuteczne, co potwierdziły również wyniki uzyskane w badanej grupie: u 16% pacjentów immunizowanych czynnie rHBsAg nie doszło do serokonwersji, a tylko 35,5% chorych odpowiedziało optymalnie wytwarzając miano antyHBs >100 mUI/ml. U pozostałych osób miano przeciwciał utrzymywało się w niższym zakresie. Aby zabezpieczyć biorców, którzy nie byli wcześniej immunizowani lub u których szczepienie nie było wystarczająco skuteczne, użyto immunizacji biernej gammaglobuliną antyHBs. Dzięki takiemu

postępowaniu znaczna większość pacjentów była dobrze chroniona przed kontaktem z wirusem HBV w dobie +100 po HCT, co potwierdziła analiza miana przeciwciał antyHBs. Jednak w dobie +180 immunizacja bierna nie zabezpieczała już chorych. W tym okresie ochronne miano przeciwciał antyHBs pacjenci zawdzięczali wcześniejszej immunizacji czynnej ($p=0,025$) lub szczepieniu dawcy ($p=0,006$). Także po roku od transplantacji wykrywano przeciwciała antyHBs w szczególności u pacjentów po HCT od immunizowanych dawców, którzy przed donacją wytworzyli przynajmniej niskie ochronne miano przeciwciał ($p=0,006$).

W sumie u 10 pacjentów obserwowano zjawisko adoptywnego transferu odporności przeciwko WZW B od dawcy, dzięki któremu chorzy przez dłuższy okres po transplantacji chronieni byli na wypadek kontaktu z wirusem. Znaczenie transferu odporności przeciwko WZW B wykazano w wielu badaniach, w tym także pojedyncze przykłady eliminacji nosicielstwa wirusa HBV u biorcy po HCT od antyHBs(+) dawcy. Z doniesień literaturowych wynika, że przeciwciała antyHBs w mianie $>10\text{mUI/ml}$ obserwowano przez okres około 4 lat u 50% biorców po przeszczepieniu od dawców, którzy wyeliminowali wirusa HBV (antyHBs+, antyHBc+) oraz przez około 25 miesięcy po HCT od dawców immunizowanych czynnie przed donacją (138-142).

Uważa się, że adoptywny transfer odporności ma również duże znaczenie w odpowiedzi na reimmunizację po transplantacji. Brak wcześniejszego kontaktu dawcy z określonym patogenem/antygenem szczepionki może prowadzić do następowej nieobecności swoistych komórek odpowiedzialnych za odpowiedź wtórną u biorcy. Wówczas należy 'na nowo nauczyć' rozpoznawania danego antygeny, oczywiście pod warunkiem wytworzenia przez biorcę po HCT komórek naiwnych o określonej swoistości, które odpowiadałyby na podany antygen. W przypadku immunizacji dawcy i przekazania komórek pamięci biorcy teoretycznie wystarczyłoby 'przypomnieć znany antygen' w celu wywołania reakcji układu immunologicznego zbliżonej do odpowiedzi wtórnej, czego odzwierciedleniem byłoby szybkie wytworzenie ochronnego miana przeciwciał. Założenia te potwierdzono w badanej grupie, ponieważ znamienna większość pacjentów (90,9%), którzy bardzo dobrze odpowiedzieli na szczepienie przeciwko WZW B, otrzymało przeszczep od dawców immunizowanych rHBsAg przed donacją ($p=0,018$). Większość pacjentów z tej grupy odpowiadała wzrostem miana przeciwciał antyHBs do poziomu ochronnego już po pierwszej dawce szczepionki, więc odpowiedź ta przypominała typ odpowiedzi wtórnej. Dodatkowo analizując fakt serokonwersji

po pierwszej dawce szczepionki, to znamiennie częściej obserwowana ona była u pacjentów po przeszczepieniu od immunizowanych dawców ($p=0,022$).

Ze względu na małą liczebność grupy biorców HCT, u których możliwe było wykazanie adoptywnego transferu odporności, do przedstawienia wpływu tego zjawiska na efektywność immunizacji czynnej zastosowano metodę statystyczną Kaplana-Meiera. W analizie tej udowodniono wyższe prawdopodobieństwo optymalnej odpowiedzi na szczepienie rHBsAg po mniejszej liczbie dawek szczepionki w grupie osób, u których doszło do transferu odporności od dawcy ($p=0,014$). Dla porównania należy dodać, że nie wykazano pozytywnego wpływu szczepienia pacjentów przed transplantacją na wynik późniejszej immunizacji po HCT.

Wyniki dotyczące istotnego znaczenia adoptywnego transferu odporności od dawcy w aspekcie odpowiedzi na szczepienie biorcy po HCT przeciwko WZW B, które uzyskano w badanej grupie, zgodne są z obserwacjami badaczy z innych ośrodków. Wykazano między innymi wpływ immunizacji dawcy na efektywniejszą odpowiedź na szczepionkę przeciwko błonicy i tężcowi (100), polio (100), *Haemophilus influenzae* (98;100), *Streptococcus pneumoniae* (99) u pacjentów po transplantacji komórek hematopoetycznych.

5.2.2 Propozycja nowego kalendarza szczepień ochronnych po HCT

Doświadczenie praktyczne, dane z innych ośrodków transplantacyjnych oraz wyniki immunizacji u pacjentów zakwalifikowanych do programu szczepień w gdańskim ośrodku posłużyły do opracowania zmodyfikowanego kalendarza szczepień, dostosowanego zarówno do statusu immunologicznego pacjenta, jak i do organizacji wizyt w Poradni dla Chorych po Przeszczepie Szpiku.

Podstawowe warunki włączenia pacjenta po HCT do programu szczepień ochronnych nie zmieniły się w znaczącym stopniu. Immunizację czynną należy rozpocząć 4-6 tygodni po zakończeniu leczenia immunosupresyjnego przy braku objawów infekcji (obowiązują generalne zasady prowadzenia szczepień ochronnych). Uwzględniając fakt, że większość pacjentów bez cech cGvHD ma ostatecznie odstawiane leczenie immunosupresyjne w dobie +180 (6 miesięcy po HCT), włączenie ich do programu szczepień możliwe jest około 7 miesiąca po przeszczepieniu. Podczas wizyty poprzedzającej rozpoczęcie szczepień konieczna jest ocena stopnia zabezpieczenia chorego przeciwko WZW B

(oznaczenie miana antyHBs), aby w zależności od potrzeby podania rHBsAg zindywidualizować plan szczepień. Dodatkowo należy oszacować, czy pacjent osiągnął stopień rekonstrukcji limfocytów T zwiększający prawdopodobieństwo skutecznej immunizacji (ilość bezwzględna limfocytów $CD3CD4 > 0,2 G/l$ oraz $CD4CD45RA+RO- > 0,03 G/l$). Wartość kliniczną tych parametrów potwierdzono na podstawie wyników szczepienia rHBsAg w badanej grupie. W przypadku pacjentów, u których stwierdza się niewystarczającą ilość komórek $CD3+CD4+$ i $CD4CD45RA+RO-$, zaleca się odroczenie programu szczepień i powtórzenie immunofenotypizacji po 2-3 miesiącach.

Poniżej przedstawiono szczegółowe zalecenia dotyczące realizowania kalendarza szczepień z uzasadnieniem modyfikacji. Propozycję nowego formularza 'kalendarz szczepień ochronnych' przedstawiono w tabeli (Tabela 15).

Tolerancja szczepień ochronnych była bardzo dobra, a jednoczesne podawanie trzech szczepionek w odrębne części ciała uznano za bezpieczne, ponieważ za wyjątkiem niewielkich odczynów miejscowych nie zaobserwowano żadnych działań niepożądanych. W związku z tym szczepionkę przeciwko tężcowi i błonicy (Td), polio (IPV) oraz rHBsAg (WZW B) można podawać w tym samym czasie w trzy odległe części ciała, a odstępy między kolejnymi dawkami tej samej szczepionki powinny wynosić około 4 - 6 tygodni (planowo podanie przypada na 7, 8 i 9/10 miesiąc po HCT).

Szczepienie przeciwko grypie wykonuje się każdego roku (w okresie jesiennym) począwszy od 6 miesiąca po przeszczepieniu, także u osób z bezpośredniego otoczenia chorego, aby uchronić go przed wtórnymi powikłaniami bakteryjnymi (143).

Immunizacja czynna przeciwko *Haemophilus influenzae* typu b (Hib) budzi pewne kontrowersje. Ze względu na zagrożenie związane z zakażeniem tą bakterią i dobrą immunogennością szczepionki skoniugowanej, według niektórych autorów oraz EBMT należy podjąć próbę pierwszej immunizacji już po 4 miesiącach od HCT (113;144;145). W większość ośrodków pierwszą dawkę szczepionki Hib (Hib I) podaje się po 6 miesiącach od transplantacji. Kolejną dawkę Hib w celu zwiększenia immunogenności zaleca się podawać łącznie z pierwszą dawką Pneumo w odległe części ciała (143).

Szczepienie przeciwko *Streptococcus pneumoniae* (Pneumo) powinno się wykonać 12 i 24 miesiące po HCT. Przy dostępności 7-walentnej szczepionki

koniugowanej (Pneumo7), którą uważa się za bardziej immunogenną, optymalnie byłoby podać ją jako pierwszą dawkę, a drugą dawkę 23-walentną (Pneumo23), aby poszerzyć spektrum antygenów (146).

W przypadku immunizacji rHBsAg (WZW B) odsetek zdrowych osób, którzy nie odpowiadają na podstawowy cykl immunizacji szacuje się na około 1-10% (134;147;148). W badaniu Jaffe i wsp (115) po 3 dawkach szczepienia rHBsAg serokonwersję zaobserwowano u 64% pacjentów po HCT i wykazano negatywny wpływ wieku >18 lat oraz przebytej GvHD na odpowiedź poszczepienną. W badanej grupie pacjentów z gdańskiego ośrodka uzyskano wyższy odsetek odpowiedzi na 3 dawki rHBsAg: w sumie do grupy DO i BDO zaliczono 30 z 42 immunizowanych pacjentów (71,4%). W analizie Jaffe i wsp. nie określono wielkości stosowanej dawki rHBsAg, a szczepionkę podawano według cyklu 0-1-6, podczas gdy w gdańskim ośrodku transplantacyjnym stosowano u znacznej większości pacjentów podwójne dawki rHBsAg (40μg) w cyklu 0-1-(2). W zależności od poszczepiennego miana antyHBs pozostali pacjenci otrzymywali dodatkowe dawki szczepionki i ostatecznie u wszystkich uzyskano serokonwersję, co potwierdza doniesienia literaturowe, że część osób słabo odpowiadających na immunizację dobrze reaguje na kolejne próby podania rHBsAg (149).

Podobnie jak analiza Jaffe i wsp., również wyniki immunizacji pacjentów w gdańskim ośrodku potwierdziły negatywny wpływ ciężkiej postaci GvHD na odpowiedź poszczepienną. W związku z tym osoby bez ochrony przeciwko WZW B lub z niskim ochronnym mianem, u których przewiduje się słabą reakcję na antygen szczepionki z powodu ciężkiej postaci GvHD w wywiadzie, należy immunizować podwójną dawką rHBsAg (40μg) do czasu uzyskania odpowiedzi na szczepienie (antyHBs>100mUI/ml). Stężenie przeciwciał powinno się u tych chorych kontrolować przy każdej wizycie w celu reimmunizacji przy obniżeniu się ich miana poniżej ochronnego. U pacjentów bez cech cGvHD w wywiadzie pierwsza dawka rHBsAg powinna być podwójna, natomiast kolejne dawki można uzależnić od stopnia odpowiedzi na pierwszą dawkę. W przypadku serokonwersji po pierwszej dawce, szczególnie jeśli miano antyHBs przekroczy 100mUI/ml, możemy mieć do czynienia z odpowiedzią typu wtórnego. Z doświadczeń uzyskanych przy realizowania programu szczepień w gdańskim ośrodku wynika, że w tej sytuacji wystarczy podanie kolejnej dawki pojedynczej i zawieszenie dalszego immunizowania rHBsAg do czasu obniżenia się miana<100mUI/ml.

W kalendarzu szczepień obowiązuje także podawanie dawek przypominających: dla IPV i Td podanie przypada 12 miesięcy po ostatniej dawce, dla WZW B reimmunizację zaleca się, jeśli miano antyHBs obniży się <100mUI/ml (143).

Tabela 15 Kalendarz szczepień ochronnych dla pacjentów po HCT (projekt nowego formularza)

MIESIĄC po HCT	DATA	PIECZĄTKA LEKARZA	SZCZEPIENIE
4 (6)			Hib (I)
od 6			GRYPA
7			WZW B (0)
			Td + IPV (I)
8			WZW B (1)
			Td + IPV (II)
9/10			(WZW B) (2)
			Td + IPV (III)
12			Pneumo 7 (I) + Hib (II)
13			(WZW B) (6)
19			(WZW B) (12)
24			Pneumo 23 (II)
1 rok po III dawce			Td + IPV dawki przypominające
co roku			GRYPA

6 WNIOSKI

1a Obniżona liczba bezwzględna neutrocytów i limfocytów normalizuje się do doby+180, podczas gdy zaburzenia w obrębie gammaglobulin (hipo- lub hipergammaglobulinemia oraz niskie stężenie IgA) mogą się utrzymywać 3 lata po HCT.

1b W obrębie limfocytów B u pacjentów zarówno w okresie wczesnym, jak i późnym po transplantacji wyraźna jest dominacja komórek o naiwnym immunofenotypie (CD19+CD27-) z ekspresją receptora immunoglobulinowego IgD i/lub IgM.

1c W populacji limfocytów T metodą cytometrii przepływowej wykazano opóźnioną regenerację komórek CD3+CD4+ w stosunku do komórek CD3+CD8+, czego efektem był odwrócony stosunek CD4/CD8 utrzymujący się u pacjentów >24 miesięcy po HCT. W obrębie limfocytów CD4 pacjentów z grupy wczesnej i późnej dominowała subpopulacja komórek pamięci immunologicznej (CD45RA-RO+) nad komórkami naiwnymi (CD45RA+RO-), czego nie stwierdzono w obrębie limfocytów CD8. Potwierdzałoby to grasiczozależny tor powstawania naiwnych komórek CD4 i pozagrasicy naiwnych komórek CD8.

1d W obrębie limfocytów CD4 i CD8 charakterystyczny był wysoki odsetek komórek wykazujących ekspresję cytokin z profilu Th1 (IL2, IFN γ) w porównaniu do cytokin Th2 (IL4, IL5, IL10) po stymulacji niespecyficznej za pomocą estrów forbolu i jonomycyny w obecności brefeldyny. Zaobserwowany znamiennie wyższy odsetek limfocytów CD8+INF γ + u pacjentów w okresie <24 miesięcy w porównaniu do okresu późnego po przeszczepieniu może świadczyć o silniejszej aktywności mechanizmów odporności komórkowej w okresie wczesnym po HCT.

2a Osiągnięcie przez pacjenta odpowiedniego stopnia rekonstrukcji limfocytów T ($CD4+ > 0,2 G/l$ oraz $CD4+CD45RA+RO- > 0,03 G/l$) zwiększa szansę na optymalną odpowiedź na immunizację czynną.

2b Wykazane różnice w ekspresji poszczególnych cytokin profilu Th1/Th2 po HCT uzyskane po stymulacji niespecyficznej nie wpływają bezpośrednio na stopień odpowiedzi na immunizację specyficznym antygenem.

2c Ciężka postać cGvHD jest czynnikiem potencjalnie obniżającym efektywność immunizacji czynnej. Planując program szczepień u pacjenta po HCT należy to uwzględnić w wyborze optymalnego momentu na rozpoczęcie programu i stosować podwójne dawki rHBsAg do czasu uzyskania ochronnego miana przeciwciał antyHBs oraz monitorować miano w celu reimmunizacji.

2d Korzystny wpływ immunizacji dawcy przed donacją zarówno na utrzymywanie się ochronnych przeciwciał u biorcy w okresie po transplantacji, jak i efektywniejszą odpowiedź na szczepienie biorcy po HCT zachęca do rutynowego szczepienia dawców szpiku.

7 STRESZCZENIE

Rozwój wiedzy i doświadczenia związanego z procedurą przeszczepienia allogenicznego komórek hematopoetycznych dał szansę wielu pacjentom ze schorzeniami hematologicznymi na długotrwałe przeżycie wolne od choroby. Jednym z problemów dotyczących opieki w okresie po transplantacji pozostają w dalszym ciągu powikłania infekcyjne, których podłożem są zaburzenia rekonstrukcji immunologicznej. Dodatkowo po HCT zanika nabyta przez pacjenta odporność poszczepienna i zwiększa się ryzyko zakażeń bakteriami otoczkowymi. W wielu ośrodkach transplantacyjnych wprowadzono programy szczepień ochronnych obejmujące powszechne patogeny wirusowe i bakteryjne. W trakcie ich realizacji stwierdzono obniżoną reakcję w porównaniu z populacją ludzi zdrowych. Uważa się, że odpowiedzialne za to mogą być niedobory w zakresie odporności humoralnej i komórkowej oraz mechanizmów regulujących odpowiedź immunologiczną.

Metoda cytometrii przepływowej umożliwia dokładną ocenę immunofenotypową subpopulacji limfocytów oraz wewnątrzcytoplazmatycznej ekspresji cytokin Th1/Th2 po stymulacji limfocytów 'in vitro' w obecności PMA, jonomycyny i brefeldyny. Z użyciem tej techniki u 49 pacjentów po HCT zakwalifikowanych do szczepień ochronnych oceniono subpopulacje limfocytów B i T, które porównano między grupą wczesną (6 miesięcy – 24 miesiące) oraz grupą późną (>24 miesięcy po transplantacji).

We krwi obwodowej obu grup wykazano dominację limfocytów B naiwnych (CD19+CD27-) z receptorami IgD i/lub IgM nad komórkami pamięci immunologicznej (CD19+CD27+). W obrębie limfocytów T wyraźna była opóźniona regeneracja komórek CD3+CD4+ w stosunku do komórek CD3+CD8+, a w efekcie odwrócony stosunek CD4/CD8, znamienne niższy u pacjentów w okresie wczesnym ($p=0,008$) i utrzymujący się nadal u biorców >24 miesięcy po HCT. W obrębie limfocytów CD4 u pacjentów z grupy wczesnej i późnej dominowała subpopulacja komórek pamięci immunologicznej (CD45RA-RO+) nad komórkami naiwnymi (CD45RA+RO-), czego nie stwierdzono w obrębie limfocytów CD8. Potwierdzałoby to zależny od grasicy tor rekonsytucji dziewiczych komórek CD4 przy pozagrasicznym powstawaniu naiwnych komórek CD8.

W kolejnym etapie części badawczej wykazano wysoki odsetek komórek wykazujących ekspresję cytokin z profilu Th1 (IL2, IFN γ) w porównaniu do cytokin Th2 (IL4, IL5, IL10) po stymulacji niespecyficznej w obrębie limfocytów CD4 i CD8 u pacjentów obu grup. Charakterystyczny był również znamienne wyższy odsetek limfocytów CD8+IFN γ + u biorców HCT <24 miesięcy po przeszczepieniu w porównaniu do grupy późnej, co mogłoby świadczyć o silniejszej aktywności mechanizmów odporności komórkowej w okresie wczesnym po transplantacji.

U wszystkich pacjentów program immunizacji przeprowadzono bez powikłań, zgodnie z protokołem. Monitorowano miano przeciwciał antyHBs po szczepieniu rHBsAg, uzyskując u wszystkich chorych serokonwersję. Porównanie zróżnicowanej odpowiedzi na szczepienie rHBsAg z parametrami rekonstrukcji immunologicznej oraz uwarunkowaniami zależnych od dawcy i biorcy pozwoliło na ustalenie czynników wpływających na efektywność immunizacji.

Wykazano, że osiągnięcie przez pacjenta odpowiedniego stopnia rekonstrukcji limfocytów T (CD4+>0,2G/l, CD4+CD45RA+RO->0,03G/l) zwiększa szansę na optymalną odpowiedź na immunizację czynną. Nie potwierdzono, aby różnice w ekspresji poszczególnych cytokin profilu Th1/Th2 po HCT, uzyskane po stymulacji niespecyficznej, wpływały bezpośrednio na stopień odpowiedzi na immunizację specyficznym antygenem. Udowodniono natomiast, że ciężka postać cGvHD jest czynnikiem potencjalnie obniżającym efektywność immunizacji czynnej. W związku z tym, planując program szczepień po HCT należy uwzględnić cGvHD w wyborze optymalnego momentu na rozpoczęcie programu, stosować podwójne dawki rHBsAg (40 μ g) do czasu uzyskania ochronnego miana przeciwciał antyHBs oraz monitorować miano w celu reimmunizacji. Kolejnym istotnym klinicznie wynikiem było wykazanie korzystnego wpływ immunizacji dawcy zarówno na utrzymywanie się ochronnych przeciwciał u biorcy w okresie potransplantacyjnym ($p=0,006$), jak i efektywniejszą odpowiedź na późniejsze szczepienie biorcy HCT ($p=0,018$). Zachęcałoby to do rutynowego szczepienia dawców szpiku przed pobraniem komórek hematopoetycznych.

Wnioski z części doświadczalnej i klinicznej posłużyły do optymalizacji stosowanego kalendarza szczepień ochronnych dla pacjentów po HCT.

8 SUMMARY

The procedure of allogeneic hematopoietic cell transplantation (HCT), due to developing knowledge and experience, gave many patients the opportunity for prolonged disease free survival. Among the complex problems in posttransplantation care, infectious complications due to dysfunctional immune system still remain an important issue. Moreover, following HCT a gradual loss of specific post vaccination immunity and an increased risk of infections with capsular bacteria is observed. Realization of different vaccination protocols targeting common bacteria and viruses that were introduced in other transplant centres, revealed a poor response rate comparing to healthy people. It is suggested that various deficiencies in humoral and cellular immunity, as well as altered mechanisms regulating immune responses might be responsible.

Flow cytometry is an accurate method to assess lymphocyte subtypes and intracytoplasmic Th1/Th2 cytokine expression following in vitro activation with PMA and ionomycin in the presence of brefeldin. With this technique lymphocytes B and T of 49 patients qualified to active immunization after transplantation were immunophenotyped and lymphocyte subtypes were compared between the early group (6 -24 months after HCT) and the late group (>24 months after HCT).

Naïve B lymphocytes (CD19+CD27-) with IgD and/or IgM receptors occurred to be dominant comparing to memory B cells (CD19+CD27+) in peripheral blood equally in both groups. Between lymphocytes T, delayed reconstitution of CD3+CD4+ cells in relation to CD3+CD8+ was a predominant feature leading to the inverse CD4/CD8 ratio. Inverse CD4/CD8 ratio was still present in patients >24 months after HCT but was significantly lower in patients from the early group ($p=0,008$). In the early and late group CD4 memory cells (CD45RA-RO+) were more numerous than CD4 naïve cells (CD45RA+RO-). This difference was not found among CD8 lymphocytes and it could confirm a thymus-dependant pathway of CD4 naïve lymphocyte reconstitution and extrathymic CD8 naïve cells generation.

In the next step of research the high frequency of Th1 cytokine (IL2, IFN γ) producing cells comparing to Th2 (IL4, IL5, IL10) after non-specific stimulation was revealed among CD4 and CD8 lymphocytes in both groups of patients.

Characteristic higher level of CD8+INF γ + lymphocytes in the patients <24 months after HCT than in the late group might suggest predominant activation of cellular immune mechanisms in the early posttransplantation period.

Active immunization of HCT recipients was realized without complications according to the prepared protocol. Titre of antiHBs antibodies after vaccination with rHBsAg was monitored and seroconversion was achieved in the whole group. Comparison of varied responses to vaccination with rHBsAg to the parameters of immune reconstitution as well as donor- and recipient-dependant conditions enabled to complete factors affecting the efficacy of immunization.

It is essential to achieve the certain level of T lymphocyte reconstitution (CD4+>0,2G/l, CD4+CD45RA+RO->0,03G/l) to increase the probability of optimal immune response to vaccination. Cytokine Th1/Th2 profile of lymphocytes assessed after non-specific stimulation seemed to have no direct influence on the grade of response to immunization with the specific antigen. It was proved that severe cGvHD is the factor weakening efficacy of the active immunization. Therefore, it should be taken into consideration to choose the right moment of immunization and to use the double dose of rHBsAg (40 μ g) until the protective level of antiHBs antibodies is achieved, as well as to monitor the antiHBs titre as reimmunization might be necessary. Since the positive influence of donor's immunization on maintenance of protective antibodies in patients after HCT ($p=0,006$) and on efficacy of recipient response to vaccination ($p=0,018$) were evident, routine donors' vaccination prior haematopoietic cell harvest would be strongly recommended.

Conclusions from the experimental and clinical part of research served to optimise the vaccination schedule for HCT recipients.

9 PIŚMIENICTWO

- (1) Gratwohl A, Baldomero H, Passweg J, Frassoni F, Niederwieser D, Schmitz N et al. Hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies in Europe. *Leukemia* 2003; 17(5):941-959.
- (2) Baron F, Storb R, Little MT. Hematopoietic cell transplantation: five decades of progress. *Arch Med Res* 2003; 34(6):528-544.
- (3) Ringden O. Allogeneic bone marrow transplantation for hematological malignancies--controversies and recent advances. *Acta Oncol* 1997; 36(6):549-564.
- (4) Ringden O, Remberger M, Svahn BM, Barkholt L, Mattsson J, Aschan J et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for inherited disorders: experience in a single center. *Transplantation* 2006; 81(5):718-725.
- (5) Hoffmann P, Ermann J, Edinger M. CD4+CD25+ regulatory T cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 293:265-285.
- (6) Barkholt L, Hentschke P, Zetterquist H, Mattsson J, Uzunel M, Wersall P et al. An allogeneic anti-cancer effect after hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant Proc* 2001; 33(1-2):1862-1864.
- (7) Baron F, Storb R. Allogeneic hematopoietic cell transplantation as treatment for hematological malignancies: a review. *Springer Semin Immunopathol* 2004; 26(1-2):71-94.
- (8) Remberger M, Mattsson J, Hentschke P, Aschan J, Barkholt L, Svennilson J et al. The graft-versus-leukaemia effect in haematopoietic stem cell transplantation using unrelated donors. *Bone Marrow Transplant* 2002; 30(11):761-768.
- (9) Antin JH, Childs R, Filipovich AH, Giralt S, Mackinnon S, Spitzer T et al. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem Meetings of the International Bone Marrow Transplant Registry and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7(9):473-485.
- (10) Slavin S. Graft-versus-host disease, the graft-versus-leukemia effect, and mixed chimerism following nonmyeloablative stem cell transplantation. *Int J Hematol* 2003; 78(3):195-207.
- (11) Le Blanc K, Remberger M, Uzunel M, Mattsson J, Barkholt L, Ringden O. A comparison of nonmyeloablative and reduced-intensity conditioning for allogeneic stem-cell transplantation. *Transplantation* 2004; 78(7):1014-1020.
- (12) Baron F, Storb R. Current roles for allogeneic hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative or reduced-intensity conditioning. *Clin Adv Hematol Oncol* 2005; 3(10):799-819.
- (13) Willems E, Baron F, Vanstraelen G, Frere P, Fillet G, Beguin Y. [Nonmyeloablative stem cell transplantation as cancer immunotherapy]. *Rev Med Suisse* 2005; 1(30):1973-1977.

- (14) Benito AI, Diaz MA, Gonzalez-Vicent M, Sevilla J, Madero L. Hematopoietic stem cell transplantation using umbilical cord blood progenitors: review of current clinical results. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33(7):675-690.
- (15) Klein AK, Patel DD, Gooding ME, Sempowski GD, Chen BJ, Liu C et al. T-Cell recovery in adults and children following umbilical cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7(8):454-466.
- (16) Nevill TJ, Barnett MJ, Klingemann HG, Reece DE, Shepherd JD, Phillips GL. Regimen-related toxicity of a busulfan-cyclophosphamide conditioning regimen in 70 patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1991; 9(7):1224-1232.
- (17) Duell T, Van Lint MT, Ljungman P, Tichelli A, Socie G, Apperley JF et al. Health and functional status of long-term survivors of bone marrow transplantation. EBMT Working Party on Late Effects and EULEP Study Group on Late Effects. European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Ann Intern Med* 1997; 126(3):184-192.
- (18) Guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients. Recommendations of CDC, the Infectious Disease Society of America, and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Cytotherapy* 2001; 3(1):41-54.
- (19) Gratwohl A, Brand R, Frasson F, Rocha V, Niederwieser D, Reusser P et al. Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time. *Bone Marrow Transplant* 2005; 36(9):757-769.
- (20) Glas AM, van Montfort EH, Storek J, Green EG, Drissen RP, Bechtold VJ et al. B-cell-autonomous somatic mutation deficit following bone marrow transplant. *Blood* 2000; 96(3):1064-1069.
- (21) Suzuki I, Milner EC, Glas AM, Hufnagle WO, Rao SP, Pfister L et al. Immunoglobulin heavy chain variable region gene usage in bone marrow transplant recipients: lack of somatic mutation indicates a maturational arrest. *Blood* 1996; 87(5):1873-1880.
- (22) Bjork IN, Brissac C, Remberger M, Mattsson J, Klaesson S, Ringden O et al. Long-term persistence of oligoclonal serum IgM repertoires in patients treated with allogeneic bone marrow transplantation (BMT). *Clin Exp Immunol* 2000; 119(1):240-249.
- (23) Kagan JM, Champlin RE, Saxon A. B-cell dysfunction following human bone marrow transplantation: functional-phenotypic dissociation in the early posttransplant period. *Blood* 1989; 74(2):777-785.
- (24) Matsue K, Lum LG, Witherspoon RP, Storb R. Proliferative and differentiative responses of B cells from human marrow graft recipients to T cell-derived factors. *Blood* 1987; 69(1):308-315.
- (25) Sheridan JF, Tutschka PJ, Sedmak DD, Copelan EA. Immunoglobulin G subclass deficiency and pneumococcal infection after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1990; 75(7):1583-1586.
- (26) Lausen BF, Hougs L, Schejbel L, Heilmann C, Barington T. Human memory B cells transferred by allogeneic bone marrow transplantation contribute significantly to the antibody repertoire of the recipient. *J Immunol* 2004; 172(5):3305-3318.
- (27) Lum LG. The kinetics of immune reconstitution after human marrow transplantation. *Blood* 1987; 69(2):369-380.

- (28) Storek J, Viganego F, Dawson MA, Herremans MM, Boeckh M, Flowers ME et al. Factors affecting antibody levels after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2003; 101(8):3319-3324.
- (29) Korholz D, Kunst D, Hempel L, Sohngen D, Heyll A, Mauz-Korholz C et al. Humoral immunodeficiency in patients after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18(6):1123-1130.
- (30) Dilly SA, Sloane JP, Psalti IS. The cellular composition of human lymph nodes after allogeneic bone marrow transplantation: an immunohistological study. *J Pathol* 1986; 150(3):213-221.
- (31) Horny HP, Horst HA, Ehninger G, Kaiserling E. Lymph node morphology after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: a histological and immunohistological study focusing on the phenotype of the recovering lymphoid cells. *Blut* 1988; 57(1):31-40.
- (32) Lum LG. Recapitulation of immune ontogeny: a vital component for the success of bone marrow transplantation. *Cancer Treat Res* 1990; 50:27-54.
- (33) Storek J, Witherspoon RP, Storb R. T cell reconstitution after bone marrow transplantation into adult patients does not resemble T cell development in early life. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16(3):413-425.
- (34) Maury S, Mary JY, Rabian C, Schwarzing M, Toubert A, Scieux C et al. Prolonged immune deficiency following allogeneic stem cell transplantation: risk factors and complications in adult patients. *Br J Haematol* 2001; 115(3):630-641.
- (35) Ottinger HD, Beelen DW, Scheulen B, Schaefer UW, Grosse-Wilde H. Improved immune reconstitution after allotransplantation of peripheral blood stem cells instead of bone marrow. *Blood* 1996; 88(7):2775-2779.
- (36) Tayebi H, Tiberghien P, Ferrand C, Lienard A, Duperrier A, Cahn JY et al. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation results in less alteration of early T cell compartment homeostasis than bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27(2):167-175.
- (37) Storek J, Dawson MA, Storer B, Stevens-Ayers T, Maloney DG, Marr KA et al. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood* 2001; 97(11):3380-3389.
- (38) Weinberg K, Annett G, Kashyap A, Lenarsky C, Forman SJ, Parkman R. The effect of thymic function on immunocompetence following bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 1995; 1(1):18-23.
- (39) Heitger A, Neu N, Kern H, Panzer-Grumayer ER, Greinix H, Nachbaur D et al. Essential role of the thymus to reconstitute naive (CD45RA+) T-helper cells after human allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1997; 90(2):850-857.
- (40) Heitger A, Greinix H, Mannhalter C, Mayerl D, Kern H, Eder J et al. Requirement of residual thymus to restore normal T-cell subsets after human allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 2000; 69(11):2366-2373.
- (41) Uher F, Puskas E, Torbagyi E, Barta A, Kormos L, Paloczi K. [Regeneration of the immune system after bone marrow transplantation]. *Orv Hetil* 2001; 142(2):59-65.

- (42) Storek J, Joseph A, Dawson MA, Douek DC, Storer B, Maloney DG. Factors influencing T-lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Transplantation* 2002; 73(7):1154-1158.
- (43) Socie G, Stone JV, Wingard JR, Weisdorf D, Henslee-Downey PJ, Bredeson C et al. Long-term survival and late deaths after allogeneic bone marrow transplantation. Late Effects Working Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. *N Engl J Med* 1999; 341(1):14-21.
- (44) Svegliati S, Olivieri A, Campelli N, Luchetti M, Poloni A, Trappolini S et al. Stimulatory autoantibodies to PDGF receptor in patients with extensive chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2007; 110(1):237-241.
- (45) Sanders JE. Chronic graft-versus-host disease and late effects after hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol* 2002; 76 Suppl 2:15-28.
- (46) Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11(12):945-956.
- (47) Kansu E. The pathophysiology of chronic graft-versus-host disease. *Int J Hematol* 2004; 79(3):209-215.
- (48) Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, McDonald GB, Striker GE, Sale GE et al. Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med* 1980; 69(2):204-217.
- (49) Sullivan KM, Shulman HM, Storb R, Weiden PL, Witherspoon RP, McDonald GB et al. Chronic graft-versus-host disease in 52 patients: adverse natural course and successful treatment with combination immunosuppression. *Blood* 1981; 57(2):267-276.
- (50) Perez-Simon JA, Sanchez-Abarca I, Diez-Campelo M, Caballero D, San Miguel J. Chronic graft-versus-host disease: Pathogenesis and clinical management. *Drugs* 2006; 66(8):1041-1057.
- (51) Gleichmann E, Gleichmann H. Pathogenesis of graft-versus-host reactions (GVHR) and GVH-like diseases. *J Invest Dermatol* 1985; 85(1 Suppl):115s-120s.
- (52) De Wit D, Van Mechelen M, Zanin C, Doutrelepont JM, Velu T, Gerard C et al. Preferential activation of Th2 cells in chronic graft-versus-host reaction. *J Immunol* 1993; 150(2):361-366.
- (53) Rus V, Svetic A, Nguyen P, Gause WC, Via CS. Kinetics of Th1 and Th2 cytokine production during the early course of acute and chronic murine graft-versus-host disease. Regulatory role of donor CD8+ T cells. *J Immunol* 1995; 155(5):2396-2406.
- (54) Kataoka Y, Iwasaki T, Kuroiwa T, Seto Y, Iwata N, Hashimoto N et al. The role of donor T cells for target organ injuries in acute and chronic graft-versus-host disease. *Immunology* 2001; 103(3):310-318.
- (55) Lum LG, Seigneuret MC, Storb RF, Witherspoon RP, Thomas ED. In vitro regulation of immunoglobulin synthesis after marrow transplantation. I. T-cell and B-cell deficiencies in patients with and without chronic graft-versus-host disease. *Blood* 1981; 58(3):431-439.

- (56) Bell SA, Faust H, Mittermuller J, Kolb HJ, Meurer M. Specificity of antinuclear antibodies in scleroderma-like chronic graft-versus-host disease: clinical correlation and histocompatibility locus antigen association. *Br J Dermatol* 1996; 134(5):848-854.
- (57) Lister J, Messner H, Keystone E, Miller R, Fritzler MJ. Autoantibody analysis of patients with graft versus host disease. *J Clin Lab Immunol* 1987; 24(1):19-23.
- (58) Rouquette-Gally AM, Boyeldieu D, Prost AC, Gluckman E. Autoimmunity after allogeneic bone marrow transplantation. A study of 53 long-term-surviving patients. *Transplantation* 1988; 46(2):238-240.
- (59) Saxon A, McIntyre RE, Stevens RH, Gale RP. Lymphocyte dysfunction in chronic graft-versus-host disease. *Blood* 1981; 58(4):746-751.
- (60) Akpek G, Chinratanalab W, Lee LA, Torbenson M, Hallick JP, Anders V et al. Gastrointestinal involvement in chronic graft-versus-host disease: a clinicopathologic study. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; 9(1):46-51.
- (61) Soares AB, Faria PR, Magna LA, Correa ME, de Sousa CA, Almeida OP et al. Chronic GVHD in minor salivary glands and oral mucosa: histopathological and immunohistochemical evaluation of 25 patients. *J Oral Pathol Med* 2005; 34(6):368-373.
- (62) Anderson D, DeFor T, Burns L, McGlave P, Miller J, Wagner J et al. A comparison of related donor peripheral blood and bone marrow transplants: importance of late-onset chronic graft-versus-host disease and infections. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; 9(1):52-59.
- (63) Lacerda JF. [Immunologic reconstitution after allogeneic stem cell transplant]. *Acta Med Port* 2004; 17(6):471-480.
- (64) Hazenberg MD, Otto SA, de Pauw ES, Roelofs H, Fibbe WE, Hamann D et al. T-cell receptor excision circle and T-cell dynamics after allogeneic stem cell transplantation are related to clinical events. *Blood* 2002; 99(9):3449-3453.
- (65) Witherspoon RP, Storb R, Ochs HD, Fluornoy N, Kopecky KJ, Sullivan KM et al. Recovery of antibody production in human allogeneic marrow graft recipients: influence of time posttransplantation, the presence or absence of chronic graft-versus-host disease, and antithymocyte globulin treatment. *Blood* 1981; 58(2):360-368.
- (66) Cuthbert RJ, Iqbal A, Gates A, Toghil PJ, Russell NH. Functional hyposplenism following allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Pathol* 1995; 48(3):257-259.
- (67) Elias M, Bisharat N, Goldstein LH, Raz R, Saliba W. Pneumococcal sepsis due to functional hyposplenism in a bone marrow transplant patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23(3):212-214.
- (68) Picardi M, Selleri C, Rotoli B. Spleen sizing by ultrasound scan and risk of pneumococcal infection in patients with chronic GVHD: preliminary observations. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24(2):173-177.
- (69) Lum LG, Orcutt-Thordarson N, Seigneuret MC, Storb R. The regulation of Ig synthesis after marrow transplantation. IV. T4 and T8 subset function in patients with chronic graft-vs-host disease. *J Immunol* 1982; 129(1):113-119.
- (70) Lum LG, Seigneuret MC, Orcutt-Thordarson N, Noges JE, Storb R. The regulation of immunoglobulin synthesis after HLA-identical bone marrow transplantation: VI. Differential rates of maturation of distinct functional groups within lymphoid subpopulations in patients after human marrow grafting. *Blood* 1985; 65(6):1422-1433.

- (71) Stewart BL, Storer B, Storek J, Deeg HJ, Storb R, Hansen JA et al. Duration of immunosuppressive treatment for chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2004; 104(12):3501-3506.
- (72) Cutler C, Antin JH. Chronic graft-versus-host disease. *Curr Opin Oncol* 2006; 18(2):126-131.
- (73) Lee SJ, Vogelsang G, Gilman A, Weisdorf DJ, Pavletic S, Antin JH et al. A survey of diagnosis, management, and grading of chronic GVHD. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; 8(1):32-39.
- (74) Ochsenbein AF, Pinschewer DD, Sierro S, Horvath E, Hengartner H, Zinkernagel RM. Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help-dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(24):13263-13268.
- (75) Fearon DT, Manders P, Wagner SD. Arrested differentiation, the self-renewing memory lymphocyte, and vaccination. *Science* 2001; 293(5528):248-250.
- (76) Paramithiotis E, Cooper MD. Memory B lymphocytes migrate to bone marrow in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(1):208-212.
- (77) Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(4):251-262.
- (78) Klein U, Rajewsky K, Kuppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 1998; 188(9):1679-1689.
- (79) Fecteau JF, Neron S. CD40 stimulation of human peripheral B lymphocytes: distinct response from naive and memory cells. *J Immunol* 2003; 171(9):4621-4629.
- (80) Nagumo H, Agematsu K, Kobayashi N, Shinozaki K, Hokibara S, Nagase H et al. The different process of class switching and somatic hypermutation; a novel analysis by CD27(-) naive B cells. *Blood* 2002; 99(2):567-575.
- (81) Tangye SG, Good KL. Human IgM+CD27+ B Cells: Memory B Cells or "Memory" B Cells? *J Immunol* 2007; 179(1):13-19.
- (82) Shi Y, Agematsu K, Ochs HD, Sugane K. Functional analysis of human memory B-cell subpopulations: IgD+CD27+ B cells are crucial in secondary immune response by producing high affinity IgM. *Clin Immunol* 2003; 108(2):128-137.
- (83) Marotta G, Bucalossi A, Galieni P, Bigazzi C, Nuti S, Valenzin PE et al. CD4+/CD45RA+ 'naive' T cells and immunological response to influenza virus vaccine in B-cell chronic lymphocytic leukaemia patients. *Acta Haematol* 1998; 99(1):18-21.
- (84) Young JL, Ramage JM, Gaston JS, Beverley PC. In vitro responses of human CD45R0brightRA- and CD45R0-RAbright T cell subsets and their relationship to memory and naive T cells. *Eur J Immunol* 1997; 27(9):2383-2390.
- (85) McElhaney JE, Pinkoski MJ, Meneilly GS. Changes in CD45 isoform expression vary according to the duration of T-cell memory after vaccination. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2(1):73-81.
- (86) Pilling D, Akbar AN, Bacon PA, Salmon M. CD4+ CD45RA+ T cells from adults respond to recall antigens after CD28 ligation. *Int Immunol* 1996; 8(11):1737-1742.

- (87) Esser MT, Marchese RD, Kierstead LS, Tussey LG, Wang F, Chirmule N et al. Memory T cells and vaccines. *Vaccine* 2003; 21(5-6):419-430.
- (88) Shouval D, Adler R, Ilan Y. Adoptive transfer of immunity to hepatitis B virus in mice by bone marrow transplantation from immune donors. *Hepatology* 1993; 17(6):955-959.
- (89) Kodo H, Gale RP, Saxon A. Antibody synthesis by bone marrow cells in vitro following primary and booster tetanus toxoid immunization in humans. *J Clin Invest* 1984; 73(5):1377-1384.
- (90) Saxon A, Mitsuyasu R, Stevens R, Champlin RE, Kimata H, Gale RP. Designed transfer of specific immune responses with bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 1986; 78(4):959-967.
- (91) Labadie J, van Tol MJ, Dijkstra NH, van der KM, Jol-van der Zijde CM, de Lange GG et al. Transfer of specific immunity from donor to recipient of an allogeneic bone marrow graft: evidence for donor origin of the antibody producing cells. *Br J Haematol* 1992; 82(2):437-444.
- (92) Vavassori M, Maccario R, Moretta A, Comoli P, Wack A, Locatelli F et al. Restricted TCR repertoire and long-term persistence of donor-derived antigen-experienced CD4+ T cells in allogeneic bone marrow transplantation recipients. *J Immunol* 1996; 157(12):5739-5747.
- (93) Lum LG, Seigneuret MC, Storb R. The transfer of antigen-specific humoral immunity from marrow donors to marrow recipients. *J Clin Immunol* 1986; 6(5):389-396.
- (94) Wimperis JZ, Gottlieb D, Duncombe AS, Heslop HE, Prentice HG, Brenner MK. Requirements for the adoptive transfer of antibody responses to a priming antigen in man. *J Immunol* 1990; 144(2):541-547.
- (95) Manz RA, Arce S, Cassese G, Hauser AE, Hiepe F, Radbruch A. Humoral immunity and long-lived plasma cells. *Curr Opin Immunol* 2002; 14(4):517-521.
- (96) Zinkernagel RM. On differences between immunity and immunological memory. *Curr Opin Immunol* 2002; 14(4):523-536.
- (97) Gottlieb DJ, Cryz SJ, Jr., Furer E, Que JU, Prentice HG, Duncombe AS et al. Immunity against *Pseudomonas aeruginosa* adoptively transferred to bone marrow transplant recipients. *Blood* 1990; 76(12):2470-2475.
- (98) Molrine DC, Guinan EC, Antin JH, Parsons SK, Weinstein HJ, Wheeler C et al. Donor immunization with *Haemophilus influenzae* type b (HIB)-conjugate vaccine in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1996; 87(7):3012-3018.
- (99) Molrine DC, Antin JH, Guinan EC, Soiffer RJ, MacDonald K, Malley R et al. Donor immunization with pneumococcal conjugate vaccine and early protective antibody responses following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2003; 101(3):831-836.
- (100) Parkkali T, Kayhty H, Hovi T, Olander RM, Roivainen M, Volin L et al. A randomized study on donor immunization with tetanus-diphtheria, *Haemophilus influenzae* type b and inactivated poliovirus vaccines to improve the recipient responses to the same vaccines after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39(3):179-188.
- (101) Gołab J, Jakóbisiak M, Lasek W. *Immunologia*. 2002.

- (102) Nakamura T, Kamogawa Y, Bottomly K, Flavell RA. Polarization of IL-4- and IFN- γ -producing CD4+ T cells following activation of naive CD4+ T cells. *J Immunol* 1997; 158(3):1085-1094.
- (103) Tkaczuk J. Cytokines: Physiologie et implications diagnostiques et therapeutiques. *Revue Francaise des Laboratoires* 2000; 327:39-46.
- (104) Ferrara JL, Cooke KR, Pan L, Krenger W. The immunopathophysiology of acute graft-versus-host-disease. *Stem Cells* 1996; 14(5):473-489.
- (105) Ferrara JL. Pathogenesis of acute graft-versus-host disease: cytokines and cellular effectors. *J Hematother Stem Cell Res* 2000; 9(3):299-306.
- (106) Krenger W, Cooke KR, Crawford JM, Sonis ST, Simmons R, Pan L et al. Transplantation of polarized type 2 donor T cells reduces mortality caused by experimental graft-versus-host disease. *Transplantation* 1996; 62(9):1278-1285.
- (107) Krenger W, Ferrara JL. Graft-versus-host disease and the Th1/Th2 paradigm. *Immunol Res* 1996; 15(1):50-73.
- (108) Reddy P, Ferrara JL. Immunobiology of acute graft-versus-host disease. *Blood Rev* 2003; 17(4):187-194.
- (109) Ljungman P, Lewensohn-Fuchs I, Hammarstrom V, Aschan J, Brandt L, Bolme P et al. Long-term immunity to measles, mumps, and rubella after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1994; 84(2):657-663.
- (110) Parkkali T, Ruutu T, Stenvik M, Kuronen T, Kayhty H, Hovi T et al. Loss of protective immunity to polio, diphtheria and Haemophilus influenzae type b after allogeneic bone marrow transplantation. *APMIS* 1996; 104(5):383-388.
- (111) Kapoor N. Immunological recovery post-hematopoietic stem cell transplantation: role of prophylactic prevention of infection in post-transplant period. *Pediatr Transplant* 1999; 3 Suppl 1:14-18.
- (112) Avigan D, Pirofski LA, Lazarus HM. Vaccination against infectious disease following hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7(3):171-183.
- (113) Singhal S, Mehta J. Reimmunization after blood or marrow stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23(7):637-646.
- (114) Machado CM, Cardoso MR, da Rocha IF, Boas LS, Duley FL, Pannuti CS. The benefit of influenza vaccination after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2005; 36(10):897-900.
- (115) Jaffe D, Papadopoulos EB, Young JW, O'reilly RJ, Prockop S, Kernan NA et al. Immunogenicity of recombinant hepatitis B vaccine (rHBV) in recipients of unrelated or related allogeneic hematopoietic cell (HC) transplants. *Blood* 2006; 108(7):2470-2475.
- (116) Galimberti M, Polchi P, Lucarelli G, Angelucci E, Baronciani D, Giardini C et al. Allogeneic marrow transplantation in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase following preparation with busulfan and cyclophosphamide. *Bone Marrow Transplant* 1994; 13(2):197-201.
- (117) McCune JS, Batchelder A, Deeg HJ, Gooley T, Cole S, Phillips B et al. Cyclophosphamide following targeted oral busulfan as conditioning for hematopoietic

cell transplantation: pharmacokinetics, liver toxicity, and mortality. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13(7):853-862.

- (118) Granados E, de la CR, Madero L, Diaz MA, Martin-Regueira P, Steegmann JL et al. Hematopoietic cell transplantation in acute lymphoblastic leukemia: better long term event-free survival with conditioning regimens containing total body irradiation. *Haematologica* 2000; 85(10):1060-1067.
- (119) Sorror ML, Leisenring W, Deeg HJ, Martin PJ, Storb R. Twenty-year follow-up of a controlled trial comparing a combination of methotrexate plus cyclosporine with cyclosporine alone for prophylaxis of graft-versus-host disease in patients administered HLA-identical marrow grafts for leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11(10):814-815.
- (120) Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15(6):825-828.
- (121) Lee SJ, Vogelsang G, Flowers ME. Chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; 9(4):215-233.
- (122) Dykewicz CA. Summary of the Guidelines for Preventing Opportunistic Infections among Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Clin Infect Dis* 2001; 33(2):139-144.
- (123) Gerritsen EJ, van Tol MJ, 't Veer MB, Wels JM, Khouw IM, Touw CR et al. Clonal dysregulation of the antibody response to tetanus-toxoid after bone marrow transplantation. *Blood* 1994; 84(12):4374-4382.
- (124) Storek J, Joseph A, Espino G, Dawson MA, Douek DC, Sullivan KM et al. Immunity of patients surviving 20 to 30 years after allogeneic or syngeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2001; 98(13):3505-3512.
- (125) Parkman R, Weinberg KI. Immunological reconstitution following bone marrow transplantation
19. *Immunol Rev* 1997; 157:73-78.
- (126) Atkinson K, Hansen JA, Storb R, Goehle S, Goldstein G, Thomas ED. T-cell subpopulations identified by monoclonal antibodies after human marrow transplantation. I. Helper-inducer and cytotoxic-suppressor subsets. *Blood* 1982; 59(6):1292-1298.
- (127) Storek J, Ferrara S, Rodriguez C, Saxon A. Recovery of mononuclear cell subsets after bone marrow transplantation: overabundance of CD4+CD8+ dual-positive T cells reminiscent of ontogeny. *J Hematother* 1992; 1(4):303-316.
- (128) Arlettaz L, Barbey C, Dumont-Girard F, Helg C, Chapuis B, Roux E et al. CD45 isoform phenotypes of human T cells: CD4(+)CD45RA(-)RO(+) memory T cells re-acquire CD45RA without losing CD45RO. *Eur J Immunol* 1999; 29(12):3987-3994.
- (129) Dumont-Girard F, Roux E, van Lier RA, Hale G, Helg C, Chapuis B et al. Reconstitution of the T-cell compartment after bone marrow transplantation: restoration of the repertoire by thymic emigrants. *Blood* 1998; 92(11):4464-4471.
- (130) Roux E, Dumont-Girard F, Starobinski M, Siegrist CA, Helg C, Chapuis B et al. Recovery of immune reactivity after T-cell-depleted bone marrow transplantation depends on thymic activity. *Blood* 2000; 96(6):2299-2303.

- (131) Picker LJ, Singh MK, Zdraveski Z, Treer JR, Waldrop SL, Bergstresser PR et al. Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry. *Blood* 1995; 86(4):1408-1419.
- (132) Rostaing L, Tkaczuk J, Durand M, Peres C, Durand D, de Preval C et al. Kinetics of intracytoplasmic Th1 and Th2 cytokine production assessed by flow cytometry following in vitro activation of peripheral blood mononuclear cells. *Cytometry* 1999; 35(4):318-328.
- (133) Larsen CE, Xu J, Lee S, Dubey DP, Uko G, Yunis EJ et al. Complex cytokine responses to hepatitis B surface antigen and tetanus toxoid in responders, nonresponders and subjects naive to hepatitis B surface antigen. *Vaccine* 2000; 18(26):3021-3030.
- (134) Kardar GA, Jeddi-Tehrani M, Shokri F. Diminished Th1 and Th2 cytokine production in healthy adult nonresponders to recombinant hepatitis B vaccine. *Scand J Immunol* 2002; 55(3):311-314.
- (135) Avanzini MA, Belloni C, De Silvestri A, Castellazzi AM, Marconi M, Moretta A et al. Antigen-specific T cell response in infants after recombinant hepatitis B virus vaccination at birth: evaluation of T helper lymphocyte diversity. *Clin Immunol* 2003; 107(2):122-128.
- (136) Hammarstrom V, Pauksen K, Azinge J, Oberg G, Ljungman P. Pneumococcal immunity and response to immunization with pneumococcal vaccine in bone marrow transplant patients: the influence of graft versus host reaction. *Support Care Cancer* 1993; 1(4):195-199.
- (137) Locasciulli A, Testa M, Valsecchi MG, Bacigalupo A, Solinas S, Tomas JF et al. The role of hepatitis C and B virus infections as risk factors for severe liver complications following allogeneic BMT: a prospective study by the Infectious Disease Working Party of the European Blood and Marrow Transplantation Group. *Transplantation* 1999; 68(10):1486-1491.
- (138) Strasser SI, McDonald GB. Hepatitis viruses and hematopoietic cell transplantation: A guide to patient and donor management. *Blood* 1999; 93(4):1127-1136.
- (139) Lau GK, Liang R, Lee CK, Lim WL. Is vaccination of donor adequate for clearance of hepatitis B virus after bone-marrow transplantation? *Lancet* 1997; 349(9065):1626-1627.
- (140) Lau GK, Lok AS, Liang RH, Lai CL, Chiu EK, Lau YL et al. Clearance of hepatitis B surface antigen after bone marrow transplantation: role of adoptive immunity transfer. *Hepatology* 1997; 25(6):1497-1501.
- (141) Ilan Y, Nagler A, Adler R, Tur-Kaspa R, Slavin S, Shouval D. Ablation of persistent hepatitis B by bone marrow transplantation from a hepatitis B-immune donor. *Gastroenterology* 1993; 104(6):1818-1821.
- (142) Ilan Y, Nagler A, Zeira E, Adler R, Slavin S, Shouval D. Maintenance of immune memory to the hepatitis B envelope protein following adoptive transfer of immunity in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26(6):633-638.
- (143) Bernatowska E. Profilaktyka zakażeń w stanach zaburzonej odporności. 2004.
- (144) Vance E, George S, Guinan EC, Wheeler C, Antin JH, Ambrosino DM et al. Comparison of multiple immunization schedules for *Haemophilus influenzae* type b-conjugate and tetanus toxoid vaccines following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22(8):735-741.

- (145) Machado CM. Reimmunization after bone marrow transplantation--current recommendations and perspectives. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37(1):151-158.
- (146) Mikołuc B, Motkowski R, Bernatowska E. Szczepienia przeciwko *Streptococcus pneumoniae* w populacji osób dorosłych. *Zakażenia* 2008; 2/2008:16-19.
- (147) Gabbuti A, Romano L, Blanc P, Meacci F, Amendola A, Mele A et al. Long-term immunogenicity of hepatitis B vaccination in a cohort of Italian healthy adolescents. *Vaccine* 2007; 25(16):3129-3132.
- (148) Zanetti AR, Mariano A, Romano L, D'Amelio R, Chironna M, Coppola RC et al. Long-term immunogenicity of hepatitis B vaccination and policy for booster: an Italian multicentre study. *Lancet* 2005; 366(9494):1379-1384.
- (149) Belloni C, Tinelli C, Orsolini P, Pistorio A, Avanzini A, Moretta A et al. Revaccination against hepatitis B virus of non-responding and low-responding infants immunised at birth. A parallel evaluation of rubella and tetanus vaccine. *Vaccine* 1998; 16(4):399-402.