

## **Elżbieta Wawrzyniak-Dzierżek**

Klinika Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej

Rozprawa doktorska: **Wpływ immunoglobulinopodobnych receptorów komórek cytotoksycznych (KIR) u dzieci po allogenicznym przeszczepieniu szpiku na wyniki leczenia i chimeryzm**

### **STRESZCZENIE**

Allogeniczne przeszczepienie hematopoetycznych (allo-HSCT) komórek macierzystych jest metodą leczenia chorób nowotworowych i nienowotworowych. Przeszczep szpiku kostnego wiąże się z ryzykiem powikłań, do których należą przede wszystkim toksyczności wynikające z zastosowanej chemioterapii, poważne infekcje związane z niewydolnością układu immunologicznego i choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi. Ponadto w przypadku chorób nowotworowych istotny problem stanowią nawroty choroby podstawowej po przeszczepieniu. Procedura przeszczepowa różni się w przypadku różnych rozpoznań np. sposobem kondycjonowania przed przeszczepieniem, a także oczekiwanymi rezultatami np. w zakresie wartości chimeryzmu hematopoetycznego. U pacjentów po allo-HSCT badanie chimeryzmu określa odsetek komórek pochodzących od dawcy i biorcy. Autologiczna hematopoeza u pacjentów poddawanych transplantacji szpiku jest eliminowana zarówno przed przeszczepem poprzez określony rodzaj kondycjonowania, jak i po przeszczepie poprzez złożone zjawiska immunologiczne.

Dobór odpowiedniego dawcy allo-HSCT opiera się przede wszystkim na ocenie zgodności w HLA między dawcą i biorcą. W przypadku pacjentów nie posiadających zgodnego dawcy wykonuje się transplantacje od dawców częściowo zgodnych lub haploidentycznych.

Odnowa immunologiczna po allo-HSCT jest rozłożona w czasie i ma dominujące znaczenie na powodzenie procedury. Po przeszczepieniu szpiku kostnego i odbudowie układu odpornościowego obserwuje się zjawisko alloreaktywności, w którym nowo zrekonstruowany układ immunologiczny ma zdolność do reagowania z komórkami gospodarza, czego skutki mogą być zróżnicowane.

Immunoglobulinopodobne receptory komórek cytotoksycznych (KIR) rozpoznające antygeny HLA występują w różnych kombinacjach u ludzi i mają wpływ

na aktywność komórek NK. Genotyp KIR wpływa na aktywność komórek NK po przeszczepieniu i warunkuje alloreaktywność. Dla alloreaktywnych komórek NK cel stanowią komórki hematopoetyczne, wobec czego mogą one odpowiadać za efekt przeciwnowotworowy oraz za eliminację przetrwałej hematopoezy autologicznej, a więc wyniki chimeryzmu.

Celem niniejszej pracy była analiza genotypu KIR pochodzenia od dawcy u dzieci po allogenicznym przeszczepieniu szpiku kostnego oraz określenie związku układu receptorów KIR na komórkach dawcy i ich ligandów HLA na komórkach biorcy z wynikami przeżycia i występowanie niekorzystnych zdarzeń, odnową limfocytów T, B i komórek NK i wartością chimeryzmu hematopoetycznego.

Grupę 202 pacjentów z diagnozą nowotworową (89) i nienowotworową (113) w wieku 0,2 – 29 lat stanowili pacjenci poddani procedurze allo-HSCT w latach 2003-2018. Badani pacjenci mieli wykonane jednorazowo genotypowanie KIR w materiale pochodzącym od dawcy przeszczepu, a także sekwencyjne oznaczenia liczby limfocytów i wartości chimeryzmu w okresie poprzyszczepowym w +30, +60, +90, +180, +270, +365 dobie od transplantacji. W badaniu przeprowadzono analizę wpływ obecności poszczególnych genów kodujących KIR i oddziaływań układu KIR-ligand HLA na wyniki przeżycia (czas całkowitego przeżycia OS, czas przeżycia wolnego od zdarzeń EFS, przyczyny zgonu w tym TRM), odnowy limfocytarnej i wartości chimeryzmu. Analizowano również zgodność w HLA między dawcą i biorcą, rodzaj kondycjonowania przed przeszczepem (busulfan vs. treosulfan vs. inne), źródło komórek macierzystych CD 34+ i zastosowanie ATG na wyniki przeżycia.

Badania wykazały, że repertuar receptorów KIR wynikający z ich genotypu, a także obecność określonych układów receptor KIR – ligand w niewielkim stopniu wpływały na wyniki przeżycia (OS, EFS, TRM), rekonstytucję immunologiczną i chimeryzm hematopoetyczny. Wykazano korzystne efekty przeżycia wynikające z obecności układów HLA z gr. C2/KIR 2DL1 i HLA z gr. Bw4/KIR 3DS1 oraz niekorzystne wynikające z obecności receptorów 2DL5 i 2DL5B, zaobserwowano lepszą rekonstytucję immunologiczną przy ekspresji receptora 2DS4ins oraz układów HLA A3 lub A11/KIR 3DL2 i haplotypu KIR B/x/ KIR 2DS2, a gorszą przy ekspresji receptorów 2DL5, 2DL5B, 2DS3 oraz układów HLA z gr. C2/KIR i HLA z gr. Bw4/KIR 3DS1, wykazano wyższe wartości chimeryzmu dawcy przy obecności układu A, a niższe w przypadku ekspresji receptora 2DS1.

Stwierdzono, że stopień zgodności w HLA między dawcą i biorcą wywierał znaczący wpływ na przeżycie pacjentów, ponadto na odnowę limfocytarną, szczególnie w pierwszych 2 miesiącach po transplantacji, ale w niewielkim stopniu na wartość chimeryzmu po przeszczepieniu. Stwierdzono, że rodzaj kondycjonowania przed allo-HSCT nie wpływał istotnie na wyniki przeżycia pacjentów (OS, EFS, TRM), ani na rekonstytucję immunologiczną. Zaobserwowano, że transplantacje aferezatu krwi obwodowej wiązały się z wcześniejszą odnową immunologiczną, a zastosowanie globuliny antytymocytarnej opóźniało rekonstytucję komórek odpornościowych.

Badania wykazały, że zjawiska immunologiczne po allo-HSCT są złożone i zależą od wielu czynników. Potwierdzono dominującą rolę mechanizmów odporności swoistej zależnych od HLA oraz stwierdzono mniejszy wpływ układu komórek NK na wyniki leczenia, rekonstytucję immunologiczną i chimeryzm. Wobec tego strategia doboru dawcy przeszczepu szpiku powinna być oparta o dopasowanie w HLA, a genotypowanie KIR może stanowić pomocnicze kryterium w przypadku dostępności kilku potencjalnych dawców.

## SUMMARY

Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is a method of treating malignant and non-malignant diseases. Bone marrow transplant is associated with the risk of complications, which mainly include chemotherapy-related toxicities, severe infections associated with immune system failure, and graft versus host disease. Moreover, in the case of malignant diseases, relapse of the primary disease may occur after transplantation. The transplant procedure varies in the case of different diagnoses, e.g. in the way of conditioning prior to transplantation, as well as in the expected results, e.g. target value of hematopoietic chimerism. In patients after allo-HSCT, testing of chimerism determines the percentage of donor and recipient cells. Autologous hematopoiesis in patients undergoing bone marrow transplantation is eliminated both before transplantation through a conditioning protocol, and after transplantation through complicated immunological mechanisms.

The selection of an appropriate allo-HSCT donor is based primarily on the assessment of HLA compatibility between the donor and recipient. In the case of patients who do not have a compatible donor, transplants are performed from partially matched or haploidentical donors.

Immune recovery after allo-HSCT is a process that changes over time and plays a major role in the success of the procedure. After bone marrow transplantation and the reconstitution of the immune system, the alloreactivity is observed where the newly reconstituted immune system has the ability to react with the host cells.

Killer immunoglobulin-like receptors (KIR) occur in various combinations in humans and recognize HLA antigens. The KIR genotype influences the activity of NK cells after transplantation and determines alloreactivity. Hematopoietic cells are the target for alloreactive NK cells, that's why NK cells are responsible for the anti-tumor effect and for the elimination of persistent autologous hematopoiesis, and thus may affect the chimerism results.

The aim of this study was to analyze the genotype of killer immunoglobulin-like receptors in children after allo-HSCT and to determine the relationship between the donor KIR receptors and their HLA ligands on the recipient cells with the survival results and the incidence of adverse events, reconstitution of T, B and NK lymphocytes and value of hematopoietic chimerism.

The group consisted of 202 patients: 89 with hematologic malignancy and 113 with non-malignant disease transplanted in years 2003-2018. Age range was 0,2 – 29 years. The studied patients had initial KIR genotyping and next sequential determinations of the number of lymphocytes and chimerism values in the post-transplant period at +30, +60, +90, +180, +270, +365 days after transplantation. The study analyzed the impact of the presence of individual genes encoding KIR and the interaction of the KIR-HLA ligand system on survival results (OS overall survival, EFS event-free survival, causes of death, including TRM), lymphocytic recovery and chimerism. The roles of HLA compatibility between donor and recipient, type of conditioning before transplant (busulfan vs. treosulfan vs. others), source of CD 34+ stem cells and use of ATG for survival results were also analyzed.

Studies have shown minor effect of the KIR receptors based genotype, as well as the presence of specific KIR receptor-ligand interactions on treatment outcomes (OS, EFS, TRM), immune reconstitution and hematopoietic chimerism. Improved survival was observed in the presence of HLA C2 / KIR 2DL1, HLA Bw4 / KIR 3DS1 interactions and better immune reconstitution was present with 3DS3, 2DS4ins receptors or with HLA A3 or A11 / KIR 3DL2, and the KIR B / x / KIR 2DS2 constellations. Presence of donor 2DL5 or 2DL5B receptors was associated with worse survival and immune recovery. The HLA match between the donor and the recipient had a significant impact on patient survival and, moreover, on lymphocytic reconstitution, especially in the first 2 months after transplantation, but only slightly influenced the value of post-transplant chimerism. It was found that the type of conditioning prior to allo-HSCT did not significantly affect patient outcomes (OS, EFS, TRM) or immune reconstitution. It was observed that peripheral blood apheresis product transplantations were associated with earlier immune recovery, and the use of anti-thymocytic globulin delayed the reconstitution of immune cells.

Studies have shown that the immune phenomena following allo-HSCT are complex and dependent on many factors. The dominant role of HLA-dependent mechanisms of specific immunity was confirmed, and minor influence of the KIR and NK cell mediated phenomena on treatment outcomes, immune reconstitution and chimerism was found. Therefore, the bone marrow transplant donor selection strategy should be based on matching in HLA, and KIR genotyping may be a supplementary criterion when several potential donors are available.