

**WYDZIAŁ LEKARSKI
UNIwersYTETU MEDYCZNEGO
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU**

**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**

lek. Elżbieta Wawrzyniak-Dzierżek

promotor: dr hab. Marek Ussowicz, prof. UMW

Wrocław, 2021

*Głęboko w ludzkiej podświadomości tkwi przemożna potrzeba logicznego,
mającego sens wszechświata. Ale rzeczywisty wszechświat jest zawsze o krok poza logiką.*

Frank Herbert

Składam serdeczne podziękowania

***dr hab. Markowi Ussowiczowi, prof. UMW, promotorowi pracy
za opiekę, inspiracje, cierpliwość i motywację***

oraz

***Koleżankom i Kolegom z Oddziału Przeszczepowego
i Laboratorium Przylądka Nadziei
za wsparcie i pomoc***

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	5
SPIS TABEL	6
SPIS RYCIN	7
I WSTĘP	9
1. Przeszczepienie hematopoetycznych komórek macierzystych jako metoda leczenia.....	9
2. Strategia doboru dawcy do transplantacji szpiku kostnego.....	10
3. Zagadnienie alloreaktywności po przeszczepieniu szpiku.....	11
4. Odnowa immunologiczna po przeszczepieniu szpiku.....	11
5. Komórki NK.....	12
6. Budowa i funkcja immunoglobulinopodobnych receptorów komórek cytotoksycznych... 13	
7. Rola immunoglobulinopodobnych receptorów komórek cytotoksycznych w przeszczepieniach szpiku.....	17
8. Licencjonowanie komórek NK.....	19
9. Monitorowanie chimeryzmu u pacjentów po przeszczepie szpiku kostnego.....	20
II CEL PRACY	23
III MATERIAŁ I METODY	24
1. Charakterystyka grupy badanej.....	24
2. Analiza retrospektywna.....	24
3. Ocena odnowy limfocytarnej.....	25
4. Monitorowanie chimeryzmu.....	25
5. Genotypowanie KIR.....	27
6. Metody statystyczne.....	28
IV WYNIKI	29
1. Analiza danych dotyczących pacjenta.....	29
2. Analiza danych dotyczących przeszczepu.....	31
3. Występowanie genotypów KIR i określonych układów receptor KIR – ligand KIR w badanej populacji.....	32
4. Wpływ wybranych parametrów na prawdopodobieństwo 2-letniego i 5-letniego przeżycia.....	35
5. Analiza przeżycia wolnego od zdarzeń (EFS – <i>event free survival</i>).....	43
6. Analiza zgonów związanych i nie związanych z transplantacją.....	51
7. Ocena mechanizmów licencjonowania komórek NK.....	56
8. Wpływ wybranych parametrów na odnowę limfocytarną.....	57

1) Wpływ zgodności w antygenach HLA na odnowę limfocytarną	58
2) Wpływ parametrów dotyczących receptorów KIR i układu ligand-receptor KIR na odnowę limfocytarną	60
3) Wpływ innych parametrów na odnowę limfocytarną	66
9. Wpływ wybranych parametrów na chimeryzm	69
V Dyskusja	72
1. Wpływ choroby podstawowej na wyniki leczenia i występowanie niekorzystnych zdarzeń po allo-HSCT	72
2. Wpływ zgodności w HLA między dawcą i biorcą na wyniki leczenia i występowanie niekorzystnych zdarzeń oraz odnowę limfocytarną	73
3. Wpływ genotypu KIR i układów receptor KIR – ligand na wyniki leczenia i występowanie niekorzystnych zdarzeń oraz odnowę limfocytarną	74
4. Wpływ rodzaju kondycjonowania na wyniki leczenia i występowanie niekorzystnych zdarzeń oraz odnowę limfocytarną	79
5. Wpływ innych parametrów na wyniki leczenia i występowanie niekorzystnych zdarzeń oraz odnowę limfocytarną	80
6. Wpływ zmiennych na dynamikę zmian chimeryzmu hematopoetycznego	81
7. Podsumowanie	82
VI Wnioski	84
VII Streszczenie	85
VIII Summary	88
IX Literatura	91

WYKAZ SKRÓTÓW

aGvHD – *acute graft versus host disease* (ostra choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi)

ALL - *acute lymphoblastic leukemia* (ostra białaczka limfoblastyczna)

allo-HSCT – *allogeneic hematopoietic stem cell transplantation* (allogeniczne przeszczepienie hematopoetycznych komórek macierzystych)

AML – *acute myeloid leukemia* (ostra białaczka szpikowa)

ATG - *anti-human T-lymphocyte globulin* (globulina antytymocytarna)

cGvHD – *chronic graft versus host disease* (przewlekła choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi)

CML – *chronic myeloid leukemia* (przewlekła białaczka szpikowa)

CMV – *cytomegalovirus* (wirus cytomegalii)

EFS - *event-free survival* (czas przeżycia wolnego od zdarzeń)

GvHD - *graft versus host disease* (choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi)

GvL – *graft versus leukemia* (przeszczep przeciwko białaczce)

HLA – *human leukocyte antigens* (ludzkie antygeny leukocytarne)

IR - *immune reconstitution* (odnowa immunologiczna)

ITIM - immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (immunoreceptorowy motyw hamujący oparty o tyrozynę)

KIR – *killer immunoglobulin-like receptors* (immunoglobulinopodobne receptory komórek cytotoksycznych)

NCR - *natural cytotoxicity receptors* (immunoglobulinowe receptory naturalnej cytotoksyczności)

NK cells - *natural killer cells* (komórki NK)

OS - *overall survival* (czas całkowitego przeżycia)

PCR - *polymerase chain reaction* (reakcja łańcuchowa polimerazy)

STR – *short tandem repeats* (krótkich tandemowe powtórzenia)

TRM - *transplant-related mortality* (zgon związany z transplantacją)

VNTR - *variable number of tandem repeats* (zmienna liczba tandemowych powtórzeń)

SPIS TABEL

Tabela 1. Specyficzność receptorów KIR wobec ligandów	15
Tabela 2. Wykaz parametrów zależnych od pacjenta.....	30
Tabela 3. Wykaz parametrów charakteryzujących przeszczep.....	31
Tabela 4. Częstość występowania receptorów KIR u dawcy w badanej populacji	33
Tabela 5. Częstość występowania układów receptor KIR dawcy – ligand biorcy w badanej populacji.....	34
Tabela 6. Analiza przeżyć 2-letnich i 5-letnich.....	35
Tabela 7. Analiza EFS	43
Tabela 8. Analiza TRM.....	51
Tabela 9. Zjawisko licencjonowania w poszczególnych układach KIR-ligand HLA.	56
Tabela 10. Wpływ zgodności w antygenach HLA na odnowę limfocytarną.....	58
Tabela 11. Mediana liczby wybranych subpopulacji limfocytów u pacjentów zgodnych i niezgodnych w poszczególnych antygenach HLA.....	59
Tabela 12. Związek genotypu receptora KIR z odnową limfocytarną.....	62
Tabela 13. Wpływ obecności układu ligand-receptor KIR na odnowę limfocytarną.....	63
Tabela 14. Mediana liczby wybranych subpopulacji limfocytów u pacjentów z ekspresją lub brakiem ekspresji określonego receptora KIR	65
Tabela 15. Mediana liczby wybranych subpopulacji limfocytów u pacjentów z ekspresją lub brakiem ekspresji określonego układu ligand-receptor KIR	66
Tabela 16. Wpływ innych parametrów na odnowę limfocytarną	66
Tabela 17. Mediana liczby wybranych subpopulacji limfocytów u pacjentów z różnym źródłem komórek macierzystych	68
Tabela 18. Mediana liczby wybranych subpopulacji limfocytów u pacjentów z różnym rodzajem profilaktyki GvHD	68
Tabela 19. Analiza chimeryzmu	69
Tabela 20. Odsetek populacji z chimeryzmem całkowitym i mieszanym wobec wybranych parametrów (istotnych statystycznie).....	71
Tabela 21. Zbiornicze zestawienie wyników istotnych statystycznie dotyczących receptora KIR i układów receptor KIR – ligand	83

SPIS RYCIN

Rycina 1. Budowa immunoglobulinopodobnych receptorów komórek cytotoksycznych	14
Rycina 2. Sposób nazewnictwa immunoglobulinopodobnych receptorów komórek cytotoksycznych	14
Rycina 3. Klaster chromosomu 19 kodujący geny dla receptorów KIR.....	16
Rycina 4. Genotypowanie KIR – przykładowy wynik badania	27
Rycina 5. Struktura wieku badanej populacji.....	29
Rycina 6. Częstość występowania receptorów KIR u dawców w badanej populacji.....	34
Rycina 7. Krzywe przeżycia OS dla grup pacjentów zgodnych i niezgodnych w układzie HLA.....	38
Rycina 8. Krzywe przeżycia OS dla grup pacjentów zgodnych i niezgodnych w układzie HLA A.	39
Rycina 9. Krzywe przeżycia OS dla grup pacjentów zgodnych i niezgodnych w układzie HLA B	39
Rycina 10. Krzywe przeżycia OS dla grup pacjentów zgodnych i niezgodnych w układzie HLA C	40
Rycina 11. Krzywe przeżycia OS dla grup pacjentów zgodnych i niezgodnych w układzie HLA DRB1	40
Rycina 12. Krzywe przeżycia OS dla grup pacjentów z podziałem na wskazanie do przeszczepu: choroba nowotworowa i choroba nienowotworowa.	41
Rycina 13. Krzywe przeżycia OS dla grup pacjentów z ekspresją układu HLA z gr. C2/KIR 2DL1 i brakiem ekspresji układu HLA z gr. C2/KIR 2DL1	42
Rycina 14. Krzywe przeżycia OS dla grup pacjentów z ekspresją układu HLA z gr. Bw4/KIR 3DS1 i brakiem ekspresji układu HLA z gr. Bw4/KIR 3DS1	42
Rycina 15. Krzywe przeżycia EFS dla grup pacjentów zgodnych i niezgodnych w układzie HLA.....	46
Rycina 16. Krzywe przeżycia EFS dla grup pacjentów zgodnych i niezgodnych w układzie HLA A.	47
Rycina 17. Krzywe przeżycia EFS dla grup pacjentów zgodnych i niezgodnych w układzie HLA B.	47
Rycina 18. Krzywe przeżycia EFS dla grup pacjentów zgodnych i niezgodnych w układzie HLA C	48
Rycina 19. Krzywe przeżycia EFS dla grup pacjentów zgodnych i niezgodnych w układzie HLA DRB1	48
Rycina 20. Krzywe przeżycia EFS dla grup pacjentów z podziałem na wskazanie do przeszczepu: choroba nowotworowa i choroba nienowotworowa.	49

Rycina 21. Krzywe przeżycia EFS dla grup pacjentów z ekspresją układu HLA z gr. C2/KIR 2DL1 i brakiem ekspresji układu HLA z gr. C2/KIR 2DL1	50
Rycina 22. Krzywe przeżycia EFS dla grup pacjentów z ekspresją układu HLA z gr. Bw4/KIR 3DS1 i brakiem ekspresji układu HLA z gr. Bw4/KIR 3DS1	50
Rycina 23. Krzywe przedstawiające odsetek pacjentów, u których stwierdzono zgon związany z powikłaniami po transplantacji dla pacjentów zgodnych i niezgodnych w HLA B	54
Rycina 24. Krzywe przedstawiające odsetek pacjentów, u których stwierdzono zgon związany z powikłaniami po transplantacji dla pacjentów z ekspresją i brakiem ekspresji receptora 2DL5.....	55
Rycina 25. Krzywe przedstawiające odsetek pacjentów, u których stwierdzono zgon związany z powikłaniami po transplantacji dla pacjentów z ekspresją i brakiem ekspresji receptora 2DL5B	55
Rycina 26. Wykres Venna prezentujący rozkład przypadków licencjonowania komórek NK w badanej grupie.....	57

I WSTĘP

1. Przeszczepienie hematopoetycznych komórek macierzystych jako metoda leczenia

Allogeniczne przeszczepienie hematopoetycznych komórek macierzystych (allo-HSCT – *allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*) jest obecnie rutynową metodą leczenia wielu chorób nowotworowych i nienowotworowych. Procedura ta polega na infuzji macierzystych komórek hematopoetycznych po uprzednim przygotowaniu pacjenta za pomocą kondycjonowania opartego na chemioterapii i/lub radioterapii¹. U pacjentów poddawanych procedurze przeszczepienia szpiku kostnego autologiczna hematopoeza jest eliminowana przed przeszczepieniem poprzez przygotowanie mieloablacyjne (chemioterapia i/lub radioterapia), a także poprzez zjawiska immunologiczne, które mają miejsce po wszczepieniu nowego szpiku.

Większość wskazań do przeszczepienia u dzieci stanowią choroby rozrostowe szpiku kostnego, rzadziej przeszczepienie znajduje zastosowanie w przypadku nowotworów niehematologicznych czy chorób nienowotworowych, jak np. wrodzone niedobory odporności, ciężka anemia aplastyczna, wrodzone wady metabolizmu, wrodzone nieprawidłowości hematopoezy^{1,2}.

Istnieją różne rodzaje allogenicznej transplantacji, np. ze względu na stopień pokrewieństwa dawcy i biorcy lub ze względu na źródło komórek macierzystych. Źródło komórek macierzystych może stanowić aferezat z krwi obwodowej, krew szpikowa i krew pępowinowa. Afereza krwi obwodowej jest obecnie najpopularniejszą metodą uzyskania materiału przeszczepowego³.

Już w 2015 roku łączna liczba przeszczepień przekroczyła ponad 1 milion, a obecnie wykonuje się transplantacje u 50 do 100 tys. pacjentów rocznie⁴. Przeszczep szpiku kostnego wciąż pozostaje metodą związaną z wysoką liczbą powikłań, niekiedy skutkujących śmiertelnością związaną z toksycznością terapii. Ponadto w przypadku chorób nowotworowych istotny problem stanowią nawroty choroby podstawowej po przeszczepieniu^{5,6}.

2. Strategia doboru dawcy do transplantacji szpiku kostnego

Kwestia doboru optymalnego dawcy szpiku stanowi od początku rozwoju transplantologii kluczowe zagadnienie, które doprowadziło do odkrycia mechanizmów leżących u podłoża prezentacji antygenów i rozpoznawania ich przez układ odpornościowy, a w następstwie umożliwiło dostęp do terapii dla większości potrzebujących pacjentów. Na podstawie obecnego stanu wiedzy najważniejszym kryterium decydującym o doborze pary dawca-biorca przy przeszczepieniu szpiku kostnego jest zgodność w układzie HLA (HLA – *human leukocyte antigens*) klasy I i II. Najlepszy dawca szpiku powinien wykazywać się maksymalną zgodnością w zakresie alleli kodujących antygeny HLA-A, -B, -C, -DR- i -DQ. Stan zgodności we wszystkich allelach tego układu jest określany jako zgodność 10/10. Dodatkowo na powodzenie transplantacji mają wpływ także inne czynniki zależne od dawcy, jak np.:

- stopień pokrewieństwa z biorcą, odpowiadający za wielkość wspólnej puli genów,
- podobieństwo w zakresie repertuaru mniejszych antygenów zgodności tkankowej i innych białek i ich wpływu na aktywację układu odpornościowego,
- płeć, w tym niezgodność płci między dawcą i biorcą,
- wiek,
- status serologiczny związany z przebyciem infekcji cytomegalowirusowej (CMV – *cytomegalovirus*)⁷.

Ryzyko ciężkich powikłań poprzyszczepowych jest minimalizowane poprzez odpowiedni dobór dawcy w układzie zgodności tkankowej oraz unikanie doboru dawcy z niekorzystnymi czynnikami^{8,9}.

W przypadku pacjentów nie posiadających zgodnego dawcy spokrewnionego i niespokrewnionego możliwe jest przeszczepienie od dawców częściowo zgodnych w HLA lub haploidentycznych (niezgodnych w jednym haplotypie). Przeszczepy te obarczone są dużo większym odsetkiem powikłań, w tym ryzykiem odrzucenia i choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD - *graft versus host disease*). Częstość przeszczepień od dawców częściowo zgodnych rośnie wraz ze wzrostem zachorowań na choroby nowotworowe. Dla części pacjentów przeszczepienie haploidentyczne jest jedyną szansą na wyleczenie choroby zasadniczej¹⁰.

Istnieją przesłanki i doświadczenie kliniczne, które pokazują, że wykorzystanie częściowo zgodnych w HLA dawców jest możliwe i niekiedy nawet zwiększa szansę

powodzenia transplantacji. Należy wspomnieć, że po uwzględnieniu powszechnie uznawanych czynników odpowiadających za dobór dawcy, wiele mechanizmów odpowiadających za reaktywność układu odpornościowego nie jest branych pod uwagę przy poszukiwaniu optymalnego dawcy szpiku.

3. Zagadnienie alloreaktywności po przeszczepieniu szpiku

Zdolność do rozpoznawania i eliminowania komórek pacjenta przez przeszczepiony szpik można określić mianem alloreaktywności, którą rozumiemy jako interakcję pomiędzy antygenami HLA a przeciwciałami lub komórkami efektorowymi dawcy, co może skutkować zniszczeniem komórek i tkanek, a w konsekwencji chorobą przeszczep przeciwko gospodarzowi¹¹. Mechanizmy odpowiadające za alloreaktywność są tylko częściowo poznane. W zjawisku alloreaktywności biorą udział przede wszystkim limfocyty T i komórki NK, ale także przeciwciała. Po przeszczepie szpiku allogeniczne limfocyty T i komórki NK pacjenta stanowiące nowy układ odpornościowy rozpoznają autologiczne komórki gospodarza jako obce i dlatego zyskują miano alloreaktywnych limfocytów T i alloreaktywnych komórek NK. Skutkiem alloreaktywności jest w przypadku limfocytów T atak na komórki różnych tkanek gospodarza, co może skutkować chorobą przeszczep przeciwko gospodarzowi, a w przypadku komórek NK może to być eliminacja komórek hematopoetycznych, dzięki czemu może dojść do eliminacji przetrwałych komórek autologicznych, co jest potencjalnie korzystne jako mechanizm przeciwdziałający nawrotowi choroby podstawowej będącej wskazaniem do przeszczepienia szpiku^{12,13}.

4. Odnowa immunologiczna po przeszczepieniu szpiku

Odnowa immunologiczna (IR - *immune reconstitution*) po przeszczepieniu szpiku kostnego ma decydujące znaczenie w powodzeniu procedury przeszczepowej. Leukocyty, a szczególnie limfocyty odgrywają kluczową rolę w ochronie przeciwinfekcyjnej, a także w eliminacji autologicznego szpiku kostnego i komórek nowotworowych w organizmie pacjenta^{14,15}. Udowodniono, że liczba białych krwinek wpływa na przeżywalność pacjentów szczególnie w ciągu 3 pierwszych miesięcy od przeszczepu. Pacjenci, którzy w ciągu 3 miesięcy od przeszczepu nie uzyskają pełnej

odbudowy leukocytarnej mają wyższe ryzyko zgonu z powodu ciężkich zakażeń grzybiczych, wirusowych i bakteryjnych. Komórki odpornościowe odpowiadają także za powodzenie transplantacji poprzez eliminację komórek nowotworowych, które przetrwały kondycjonowanie^{14,15}. Opóźnioną odnowę leukocytarną stwierdza się częściej po przeszczepach od dawców częściowo zgodnych, a także po przeszczepieniach, w których użyto niskiej liczby komórek macierzystych CD34+. Czynnikiem wpływającym spowalniająco na odbudowę układu białokrwinkowego jest także użycie krwi szpikowej jako źródła komórek CD34+, a także zastosowanie globuliny antytymocytarnej (ATG - *anti-human T-lymphocyte globulin*) w ramach profilaktyki GvHD¹⁶. W procesie rekonstrukcji immunologicznej jako pierwsze pojawiają się komórki NK, monocyty i granulocyty, następnie odnawiają się limfocyty T, a w ostatniej kolejności limfocyty B. Ponieważ limfocyty pełnią główną rolę w obronie przeciwwirusowej, a także w zapobieganiu wystąpienia nawrotu choroby nowotworowej, czy też wystąpienia drugiego nowotworu, ich odnowa po allo-HSCT jest kluczowa dla powodzenia procedury¹⁷. Oznaczanie liczby poszczególnych subpopulacji limfocytów we wczesnym okresie poprzyszczepowym jest standardową procedurą diagnostyczną i może być traktowane jako czynnik prognostyczny dla ciężkich infekcji oportunistycznych oraz dla nawrotu nowotworu po przeszczepie¹⁵⁻¹⁸.

5. Komórki NK

Naturalne komórki cytotoksyczne (NK cells - *natural killer cells*) należą do układu immunologicznego człowieka - stanowią część wrodzonej, nieswoistej odpowiedzi odpornościowej¹⁹. Komórki NK rozpoznają ludzkie antygeny HLA klasy I (HLA A, B i C), które ulegają ekspresji na powierzchni wszystkich komórek ciała. W ten sposób komórki NK odróżniają własne prawidłowe komórki od komórek zakażonych wirusem lub komórek nowotworowych. Komórki zakażone wirusem lub komórki nowotworowe obniżają ekspresję antygenów HLA I na swojej powierzchni w celu uniknięcia rozpoznania i zniszczenia ze strony układu immunologicznego. Brak ekspresji antygenów zgodności tkankowej klasy I na powierzchni komórki aktywuje komórki NK do funkcji cytotoksycznej, co powoduje lizę zakażonej lub nowotworowej komórki²⁰.

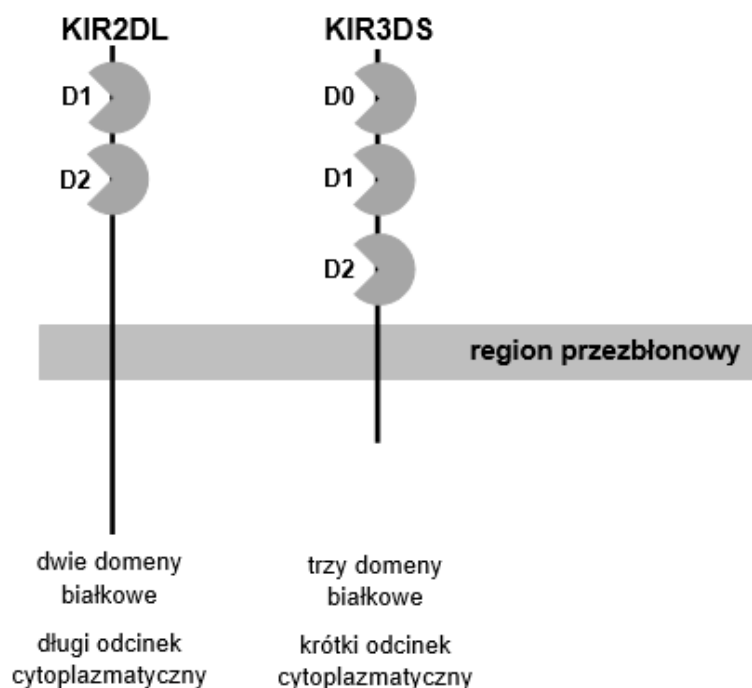
Komórki NK mają zdolność rozpoznawania antygenów HLA klasy I na powierzchni komórek przez różne receptory²¹. Do receptorów komórek NK należą m.in.: immunoglobulinowe receptory naturalnej cytotoxyczności (NCR - *natural cytotoxicity receptors*), immunoglobulinopodobne receptory komórek cytotoksycznych (KIR – *killer immunoglobulin-like receptors*), receptory lektynowe typu C i inne^{22,23}. Obecnie szeroko badany, uzupełniającym kryterium doboru dawcy staje się oznaczanie ekspresji receptorów KIR. W ostatnich latach w transplantologii postawiono hipotezę, że lepsze wyniki przeszczepiania szpiku można uzyskać przy korzystniejszych układach receptorów KIR występujących u dawców szpiku, co zwróciło uwagę na skomplikowane mechanizmy biologiczne związane z funkcją tych receptorów.

6. Budowa i funkcja immunoglobulinopodobnych receptorów komórek cytotoksycznych

Immunoglobulinopodobne receptory komórek cytotoksycznych są receptorami zlokalizowanymi na powierzchni naturalnych komórek cytotoksycznych (komórek NK). Ich budowa molekularna wygląda następująco:

- w strefie zewnątrzkomórkowej posiadają dwie (KIR2D) lub trzy (KIR3D) globularne domeny białkowe (immunoglobulinopodobne) odpowiedzialne za wiązanie ligandu,
- region przezbłonowy,
- odcinek cytoplazmatyczny (długi – L *long* lub krótki – S *short*).

Budowę immunoglobulinopodobnych receptorów komórek cytotoksycznych przedstawiono na Rycinie 1.



Rycina 1. Budowa immunoglobulinopodobnych receptorów komórek cytotoksycznych

Sposób nazewnictwa receptorów KIR przedstawiono na Rycinie 2. Pierwsza część nazwy (np. 2D) określa liczbę domen immunoglobulinopodobnych, następny człon (L lub S) zależy od długości odcinka cytoplazmatycznego i informuje o funkcji aktywującej lub inhibującej, ostatnia cyfra (np. 1) nadana jest receptorowi zgodnie z kolejnością odkrycia.

<u>KIR</u>	<u>2D</u>	<u>L</u>	<u>1</u>
↓	↓	↓	↓
nazwa receptora	liczba domen immunoglobulinopodobnych (dwie lub trzy)	rodzaj odcinka cytoplazmatycznego (długi lub krótki)	numer nadawany zgodnie z kolejnością odkrycia receptora

Rycina 2. Sposób nazewnictwa immunoglobulinopodobnych receptorów komórek cytotoksycznych

Ligandami dla receptorów KIR są cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej klasy I (HLA-A, HLA-B, HLA-C), przy czym różne KIR wiążą się tylko z określonymi podtypami antygenów HLA. Powinowactwo poszczególnych receptorów do określonych ligandów przedstawiono w Tabeli 1.

Komórki NK po związaniu się receptora KIR z ligandem HLA na komórce docelowej otrzymują sygnał aktywujący jeśli receptor KIR posiada krótki region cytoplazmatyczny (DS) pozbawiony 2 domen białkowych ITIM (ITIM - *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) o właściwościach hamujących, które natomiast występują w receptorach DL²⁴.

Cząsteczki KIR wykazują różną swoistość wobec ligandów HLA. Ponadto, wiązanie tych samych ligandów przez różne receptory KIR może wywoływać przeciwny efekt w komórce NK (hamujący lub aktywujący)²⁵.

Tabela 1. Specyficzność receptorów KIR wobec ligandów (na podstawie²⁵)

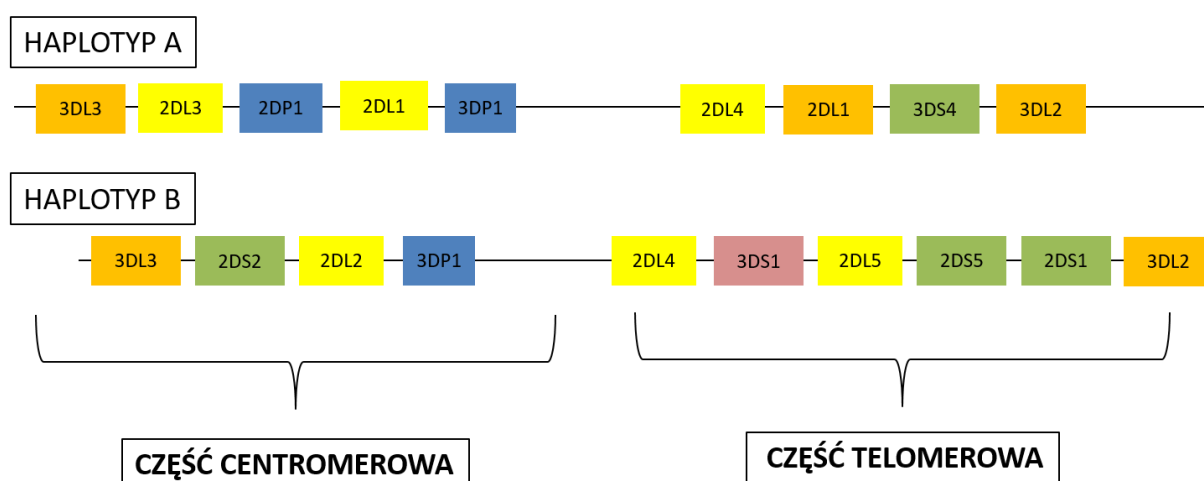
Receptor KIR	Ligand
2DL2 2DL3 2DS2	HLA-C grupa 1 C*01 C*03 C*07 C*08
2DL1 2DS1	HLA-C grupa 2 C*02 C*04 C*05 C*06
3DL1 3DS1	HLA-B Bw4 B*08 B*52 B*13 B*53 B*27 B*57 B*44 B*58 B*51
3DL2	HLA-A A*03 A*11
2DL4	HLA-G
2DL5 2DS3 2DS4 2DS5 3DL3	nieznany

Geny kodujące białka KIR zlokalizowane są na chromosomie 19 w regionie 19q13.4. Większość genów KIR jest kodowana przez kilka do kilkunastu alleli, co warunkuje polimorfizm alleliczny. Obecnie znanych jest co najmniej 17 genów KIR. 9 spośród znanych genów KIR koduje receptory hamujące (KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3), 6 genów

koduje receptory aktywujące (KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DS1) a dwa pozostałe to pseudogeny KIR2DP1 i KIR3DP1^{26,27}.

Skład genów kodujących receptory KIR na obu kopiach chromosomu 19 może się różnić liczbą i rodzajem receptorów (hamujące vs. aktywujące). Zestaw genów KIR na pojedynczym chromosomie tworzy haplotyp, a różnice w kombinacjach genów odpowiadają za polimorfizm haplotypowy.

Wyróżniono dwa haplotypy nazwane A i B, które różnią się repertuarem genów kodujących hamujące i aktywujące receptory KIR. Geny 2DL4, 3DP1, 3DL2 i 3DL3 są obecne w niemal wszystkich haplotypach. Haplotyp A zawiera następujące geny: 2DL1, 2DL3, 2DS4, 3DL1, 3DL2, 3DL3, spośród których tylko jeden (2DS4) pełni funkcję pobudzającą, a pozostałe hamującą. Natomiast haplotyp B składa się z różnych kombinacji genów przejawiających zdolności aktywujące: 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5 i 3DS1^{25,26,28,29}. W związku z polimorfizmem haplotypowym można opisać genotyp danej jednostki jako A/A (homozygota posiadająca dwa haplotypy A) lub B/x (genotyp o przynajmniej jednym haplocyple B). Ze względu na polimorfizm alleliczny i haplotypowy genów KIR geny te występują u ludzi w różnych proporcjach jeśli chodzi o ich funkcję aktywującą i hamującą. Polimorfizm genów KIR wpływa na odmienną osobniczo zdolność do odpowiedzi odpornościowej i podatność na różne choroby kontrolowane przez komórki posiadające receptory KIR²⁸. Na Rycinie 3. przedstawiono przykładowy region chromosomu 19 kodujący geny dla receptorów KIR.



Rycina 3. Klaster chromosomu 19 kodujący geny dla receptorów KIR (na podstawie³⁰)

Wpływ receptorów KIR na aktywność komórek NK był opisywany w wielu sytuacjach klinicznych. Geny KIR mają wpływ na podatność na niektóre zakażenia wirusowe, występowanie pewnych chorób nowotworowych, zapadalność na choroby autoimmunologiczne, np. reumatoidalne zapalenie stawów, zapalenie naczyń, łuszczycę, podtrzymanie prawidłowej ciąży i występowanie niektórych stanów patologicznych w ciąży, mają również istotne znaczenie w przeszczepach szpiku²⁸.

7. Rola immunoglobulinopodobnych receptorów komórek cytotoksycznych w przeszczepieniach szpiku

Geny HLA i geny KIR są dziedziczone i rozdzielane pomiędzy potomstwo w sposób losowy i niezależny od siebie, stąd zwykle para dawca-biorca dobrana jako zgodna w układzie HLA jest niezgodna w układzie KIR-ligand KIR. Tylko 25% zgodnego w HLA rodzeństwa jest również zgodna w genach KIR, a w przypadku dawców niespokrewnionych prawdopodobieństwo zgodności jest jeszcze mniejsze. Sytuacja ta umożliwia wystąpienie czynników modyfikujących aktywność układu odpornościowego po wprowadzeniu go do organizmu biorcy i zachęca do poznania roli komórek NK i receptorów KIR w transplantacji szpiku^{29,31}. Wobec wzrastającej popularności przeszczepień szpiku od dawców częściowo zgodnych w HLA istnieje potrzeba dogłębnej analizy mechanizmów regulujących odpowiedź immunologiczną zależnych i niezależnych od HLA. Poznanie mechanizmów związanych z układem KIR u dzieci, a także roli komórek NK w patogenezie niekorzystnych zdarzeń po przeszczepie szpiku może być w przyszłości wykorzystane w opracowaniu lepszych strategii postępowania w przypadku przeszczepień od dawców częściowo zgodnych, które obciążone są wyższym odsetkiem powikłań^{32,33}.

W szczególności alloreaktywność komórek NK podlega regulacji przez układ receptor KIR – ligand KIR³⁴. Zbadanie interakcji receptor KIR – ligand wymaga poznania wyników HLA oraz składu receptorów KIR u dawców. Genotypowanie KIR umożliwia ustalenie występowania poszczególnych genów KIR u dawców, określenie danego haplotypu (A/A lub B/x) oraz stanowi podstawę do badań kombinacji układu KIR-ligand KIR^{35,36}.

U pacjentów poddanych allogenicznemu przeszczepieniu szpiku kostnego zaobserwowano korzystne efekty, jeśli istnieją niezgodności pomiędzy genami KIR

dawcy i biorcy. Brak ekspresji ligandu KIR na komórkach allogenicznych dla hamującego receptora KIR pobudza alloreaktywność komórek NK³⁷. W konsekwencji wzrasta szansa przyjęcia się przeszczepu i wzmocnienia efektu przeszczep przeciwko białaczce (GvL – *graft versus leukemia*)^{23,38}.

Zjawisko GvL po przeszczepie szpiku jest indukowane w dwojaki sposób: po pierwsze komórki NK niszczą komórki nowotworowe, które utraciły zdolność do prezentacji HLA I, a po drugie komórki NK dawcy rozpoznają te komórki białaczkowe, które mają prawidłową ekspresję antygenów HLA klasy I, ale były niewidoczne dla receptorów KIR komórek NK biorcy^{28,39,40}. Giebel i współpracownicy udowodnili związek niezgodności w genach KIR między dawcą a biorcą z przeżyciem po przeszczepie. W grupie 130 pacjentów chorujących na nowotwory hematologiczne przeszczepianych od dawców niespokrewnionych zaobserwowali znacząco lepsze odsetki przeżycia w 4,5-letniej obserwacji (87% przy stwierdzeniu niezgodności, a 48% przy braku niezgodności)⁴¹. Zhou i współpracownicy z Chin przebadali 219 pacjentów - biorców przeszczepów od zgodnego w układzie HLA rodzeństwa. Po porównaniu genotypów KIR u par dawca-biorca okazało się, że niezgodności w układzie receptor KIR – ligand KIR odpowiadają za znacząco lepsze wyniki 5-letniego przeżycia po przeszczepie (87,3% przy stwierdzeniu niezgodności versus 69,3% przy braku niezgodności). Efekt ten został zaobserwowany u chorych na ostrą białaczkę szpikową (AML – *acute myeloid leukemia*), natomiast nie udowodniono korzyści wynikającej z niezgodności u pacjentów chorujących na ostrą (ALL - *acute lymphoblastic leukemia*) i przewlekłą białaczkę szpikową (CML – *chronic myeloid leukemia*)³⁹.

Dla alloreaktywnych komórek NK cel stanowią komórki hematopoetyczne, nie atakują one natomiast komórek innych tkanek gospodarza, w odróżnieniu od limfocytów T odpowiedzialnych za GvHD. Co za tym idzie, niezgodności w układzie KIR – ligand KIR nie wywołują choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi, a wręcz chronią przed nią. Ochrona ta wynika prawdopodobnie z faktu, że alloreaktywne komórki NK atakują komórki prezentujące antygen biorcy, co eliminuje prezentację antygenów biorcy limfocytom T dawcy^{28,42}. Ruggeri i współpracownicy dla udowodnienia znaczenia niezgodności w układzie KIR – ligand KIR przeprowadzili na modelu mysim eksperyment, w którym myszy poddane transplantacji szpiku z powodu AML otrzymały bardzo dużą dawkę komórek NK nie wykazujących alloreaktywności (brak niezgodności w układzie KIR – ligand KIR) i w ten sposób nie osiągnięto ochronnego zjawiska przed GvHD⁴². Giebel i współpracownicy oszacowali

prawdopodobieństwo wystąpienia ostrej choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (aGvHD – *acute graft versus host disease*) na 30% u pacjentów niezgodnych w układzie KIR-ligand z dawcami oraz 43% u pacjentów zgodnych w układzie KIR-ligand z dawcami. Nie zaobserwowano jednak ochronnego efektu niezgodności genów KIR w przypadku wystąpienia przewlekłej choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (cGvHD – *chronic graft versus host disease*)⁴¹.

Okazuje się, że na efekt transplantacji wpływają nie tylko niezgodności w układzie KIR-ligand, ale znaczenie ma także obecność określonego haplotypu KIR u dawcy. Cooley i współpracownicy wykazali, że ryzyko nawrotu u pacjentów chorujących na AML jest istotnie mniejsze, jeśli dawca prezentuje obecność haplotypów B niż w przypadku dawców genotypowanych jako A/A. Według tych samych badań haplotyp B odpowiada za dłuższe przeżycie po przeszczepie. Podobne wyniki uzyskano w grupie pacjentów przeszczepianych od dawców zgodnych w HLA i niezgodnych w HLA. Nie wykazano natomiast wpływu poszczególnego haplotypu na wyniki leczenia pacjentów z ALL³¹. Ci sami autorzy 10 lat później udowodnili korzystny efekt haplotypu B dawcy w przypadku przeszczepień pacjentów z AML przy zastosowaniu protokołów kondycjonowania o zredukowanej intensywności⁴³. Natomiast Oevermann i współpracownikom udało się wykazać, że dzieci chorujące na ALL i przeszczepione od dawców z haplotypem B mają istotnie większe prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od zdarzeń po przeszczepie haploidentycznym niż pacjenci przeszczepieni od dawców z haplotypem A (50,6% vs. 29,5%)⁴⁴.

8. Licencjonowanie komórek NK

Jednym z postulowanych mechanizmów regulujących alloreaktywność komórek NK jest licencjonowanie opierające się o interakcje pomiędzy hamującymi receptorami KIR a ich ligandami HLA tworzącymi następujące grupy:

- KIR2DL2/3 – ligandy z grupy HLA C1,
- KIR2DL1 – ligandy z grupy HLA C2,
- KIR3DL1 – ligandy z grupy HLA Bw4,
- KIR3DL2 – ligandy z grupy HLA A3/11.

Proces licencjonowania polega na tym, że w organizmie wykazującym koekspresję hamującego receptora KIR i odpowiedniego liganda HLA, komórki NK wykazujące ekspresję jednego z tych receptorów hamujących mogą nabyć gotowość funkcjonalną do pełnej aktywacji po pobudzeniu receptorów aktywujących⁴⁵.

W przypadku przeszczepienia hematopoetycznych komórek macierzystych, w zależności od układu HLA u dawcy i biorcy, może zajść jedna z 3 poniższych sytuacji wpływająca na alloreaktywność komórek NK wykazujących ekspresję receptora KIR:

- obecność liganda HLA u dawcy (D+) i brak odpowiedniego liganda u biorcy (R-), co jest określane jako delicensjonowanie (downward licensing),
- identyczny status liganda HLA u dawcy i biorcy,
- brak liganda HLA u dawcy (D-) i obecność odpowiedniego liganda u biorcy (R+), co jest określane jako licencjonowanie wzrastające (upward licensing).

Mechanizm ten został zaobserwowany w modelu mysim, gdzie transfer dojrzałych komórek NK pomiędzy osobnikami o odmiennych układach HLA mógł się wiązać ze zmianą reaktywności komórkowej⁴⁶. Znaczenie licencjonowania komórek NK było przedmiotem badań i w analizach klinicznych zaobserwowano podobny efekt u pacjentów przeszczepianych z powodu chorób nowotworowych. Sytuacja pierwsza (downward licensing) wiązała się ze znacznie gorszym przeżyciem pacjentów i wyższym ryzykiem nawrotu nowotworu^{47,48}.

9. Monitorowanie chimeryzmu u pacjentów po przeszczepie szpiku kostnego

W medycynie termin chimeryzm jest stosowany, gdy w obrębie jednego organizmu koegzystują populacje komórek o różnych genotypach. Fenomen ten występuje spontanicznie w czasie ciąży, a w sposób celowy powstaje w medycynie transplantacyjnej. Zjawisko chimeryzmu hematopoetycznego jest charakterystyczne dla biorców po allogenicznym przeszczepieniu szpiku kostnego i polega na wykrywaniu różnych genotypów komórek we krwi i szpiku pochodzących od dawcy i/lub biorcy. Wyróżniamy: pełny chimeryzm dawcy (obecność wyłącznie komórek dawcy), mieszany chimeryzm (współwystępowanie zarówno komórek dawcy i biorcy), a także odnowę autologiczną (obecność wyłącznie komórek biorcy).

Autologiczna hematopoeza u pacjentów poddawanych procedurze przeszczepienia szpiku kostnego jest eliminowana poprzez przygotowanie

mieloablacyjne przed przeszczepem szpiku (chemioterapia i/lub radioterapia), a także poprzez zjawiska immunologiczne, które mają miejsce po wszczepieniu nowego szpiku, np. w postaci efektu GvL. Mieszany chimeryzm świadczy o przetrwaniu pewnego odsetka autologicznych komórek (hematopoetycznych, nowotworowych lub prawidłowych limfocytów) biorcy i najczęściej może mieć miejsce w przypadku przeszczepień wykorzystujących protokoły kondycjonowania o zredukowanej intensywności lub niemieloablacyjne dawki chemioterapii. Takie postępowanie jest praktykowane w hematologicznych chorobach nienowotworowych, jak np. niedobory odporności, ciężka anemia aplastyczna, wrodzone wady metabolizmu i hemoglobinopatie. W chorobach tych osiągnięcie pełnego chimeryzmu dawcy nie jest niezbędne do sukcesu terapeutycznego w postaci korekty wadliwej hematopoezy, naprawy dysfunkcji układu immunologicznego lub wyrównania niedoboru enzymatycznego^{49,50}.

Rutynowe monitorowanie chimeryzmu hematopoetycznego u pacjentów po przeszczepie szpiku jest ważnym elementem standardowego nadzoru nad pacjentem poprzyszczepowym, informuje o sposobie odnowy hematologicznej i przyjęciu przeszczepu. Wynik chimeryzmu umożliwia także wczesne wykrycie wznowy choroby nowotworowej, niewydolności lub odrzucenia przeszczepu, co pozwala na szybkie wdrożenie różnych opcji terapeutycznych. Oznaczenie chimeryzmu jest wykonywane rutynowo z krwi żyłnej obwodowej lub w przypadku wskazań także ze szpiku kostnego pobranego metodą biopsji aspiracyjnej. W przypadku monitorowania chimeryzmu z krwi obwodowej oznaczenie dotyczy całej populacji limfocytów lub, w celu zwiększenia czułości, poszczególnych subpopulacji^{51,52}.

Potransplantacyjny chimeryzm może spontanicznie i dynamicznie się zmieniać, szczególnie w ciągu pierwszych 100 dni po przeszczepie. Odbudowa układu immunologicznego i proces zastąpienia hematopoezy pacjenta przez komórki dawcy trwa od kilku miesięcy do kilku lat, ale może też wystąpić trwały mieszany chimeryzm. Zmiany w chimeryzmie mogą następować w obu kierunkach, tzn. biorca, który pierwotnie uzyskał pełne wszczepienie może z czasem rozwinąć mieszany chimeryzm i odwrotnie – pacjent, który początkowo wykazuje mieszany chimeryzm może całkowicie wyeliminować przetrwałą hematopoezę autologiczną. Na zmiany chimeryzmu wpływa bezpośrednio rekonstrukcja układu odpornościowego, która zależy od wielu czynników, m.in. wieku pacjenta, rodzaju zastosowanego

kondycjonowania, liczby limfocytów T w materiale przeszczepowym, a także stężenia cytokin stymulujących produkcję limfocytów⁵³.

Metody ilościowej oceny chimeryzmu bazują na różnicach w polimorficznych genach lub ich produktach pomiędzy dawcą a biorcą. Wykrywanie tych różnic odbywa się technikami biologii molekularnej i ewoluowało przez lata. Obecnie dominującą metodą oznaczania chimeryzmu jest metoda STR/VNTR: krótkich tandemowych powtórzeń (STR – *short tandem repeats*) / zmiennej liczby tandemowych powtórzeń (VNTR - *variable number of tandem repeats*), która wykorzystuje różnice w sekwencji DNA pomiędzy dawcą a biorcą. Metoda ta polega na analizie minisatelitarnych VNTR (składających się z 15-50 nukleotydów) i mikrosatelitarnych STR (składających się z 2-6 nukleotydów) fragmentów DNA poddanych amplifikacji dzięki reakcji łańcuchowej polimerazy DNA (PCR - *polymerase chain reaction*). Loci STR/VNTR charakteryzują się dużym poziomem zmienności w populacji. Polimorfizm wymienionych sekwencji DNA polega na tym, że sekwencja STR czy VNTR jest stała, ale liczba jej powtórzeń jest cechą osobniczą. Próbkę krwi dawcy i biorcy przed przeszczepieniem są poddane badaniom określającym różnice w ich regionach STR/VNTR, co ma na celu określenie markerów informatywnych dla danej pary^{49,54,55}. Metody oparte na analizie STR/VNTR są wykorzystywane w innych dziedzinach, gdzie niezbędne jest przeprowadzenie identyfikacji osobniczej, np. w medycynie sądowej czy do ustalenia ojcostwa.

II CEL PRACY

Celem pracy jest analiza roli immunoglobulinopodobnych receptorów komórek cytotoksycznych (KIR) u dzieci po allogenicznym przeszczepieniu szpiku kostnego oraz określenie wpływu układu receptorów KIR na komórkach dawcy i ich ligandów HLA na komórkach biorcy na:

- 1) wyniki przeżycia i występowanie niekorzystnych zdarzeń,
- 2) odnowę limfocytarną limfocytów T, B i komórek NK,
- 3) wartość chimeryzmu hematopoetycznego.

III MATERIAŁ I METODY

1. Charakterystyka grupy badanej

Grupę badaną stanowiło 202 pacjentów poddanych procedurze allogenicznego przeszczepienia szpiku kostnego w Klinice Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej we Wrocławiu w latach 2003-2018. Grupa składała się z 71 pacjentów płci żeńskiej (35,15%) oraz 131 pacjentów płci męskiej (64,85%). Zakres wieku badanej populacji wynosił od 0,2 do 29 lat, mediana 6,8 lat. Pacjenci obserwowani byli od dnia transplantacji do dnia 31.07.2019.

2. Analiza retrospektywna

Na podstawie elektronicznej dokumentacji medycznej przeanalizowano:

- wskazania do przeszczepienia szpiku kostnego z podziałem na choroby nowotworowe i nienowotworowe,
- rodzaj dawcy przeszczepu z podziałem na dawców zgodnych i niezgodnych w układzie HLA,
- rodzaj zastosowanego kondycjonowania przed przeszczepem z wyszczególnieniem, czy chemioterapia mieloablacyjna zawierała busulfan lub treosulfan,
- źródło komórek macierzystych CD 34⁺ (aferezat z krwi obwodowej lub szpik kostny),
- rodzaj stosowanej profilaktyki GvHD z wyszczególnieniem, czy stosowano króliczą immunoglobulinę przeciwko ludzkim limfocytom T (ATG),
- czas całkowitego przeżycia (OS - *overall survival*) zdefiniowany jako czas od przeszczepu szpiku kostnego do zgonu z dowolnej przyczyny lub utraty pacjenta z obserwacji,
- czas przeżycia wolnego od zdarzeń (EFS - *event-free survival*) określony jako czas od przeszczepu szpiku kostnego do wystąpienia nawrotu choroby zasadniczej lub zgonu,

- przyczyny zgonu z podziałem na zgon związany z transplantacją, rozumiany jako śmierć pacjenta związana z powikłaniami po transplantacji (*TRM - transplant-related mortality*) i zgon z innego powodu.

W związku z tym, że mediana czasu obserwacji grupy badanej wynosiła 34,3 miesiące, co stanowi niespełna 3 lata, postanowiono przedstawić wyniki OS w postaci prawdopodobieństwa 2-letniego i 5-letniego przeżycia.

3. Ocena odnowy limfocytarnej

Podczas rutynowych badań w Klinice Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej we Wrocławiu od pacjentów pobierano próbki krwi żyłnej, z których izolowano komórki jednojądrzaste przy użyciu techniki wirowania w gradiencie stężeń. Część próbki komórek jednojądrzastych została wykorzystana do badań subpopulacji limfocytarnych metodą cytofluorymetryczną. Oznaczono liczebność limfocytów z podziałem na subpopulacje: T (CD3⁺ CD4⁺/ CD3⁺ CD8⁺), B (CD19⁺), NK (CD56⁺). Do identyfikacji populacji badanych komórek używano odczynnika BD Multitest™ 6-Color TBNK (BD Biosciences, San Jose, CA). Oceny limfocytów dokonywano przy użyciu cytofluorymetru FACSCanto (BD Biosciences, San Jose, CA). Liczbę limfocytów oceniono w punktach czasowych +30, +60, +90, +180, +270, +365 dni od transplantacji.

4. Monitorowanie chimeryzmu

Badanie chimeryzmu zostało wykonane w Pracowni Polimorfizmów i Genów Fuzyjnych w laboratorium przy Klinice Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej we Wrocławiu. Do oznaczenia chimeryzmu pobierano od pacjentów próbkę krwi żyłnej o objętości 2-3 ml na antykoagulant EDTA. Przy użyciu techniki wirowania w gradiencie stężeń izolowano frakcję komórek jednojądrzastych. Kolejnym krokiem była izolacja materiału genetycznego DNA przeprowadzona na aparacie QiaCube (Qiagen, Venlo, Holandia) z wykorzystaniem zestawu do izolacji Syngen DNA Mini Kit. Po wyizolowaniu DNA amplifikowano materiał genetyczny przeprowadzając reakcję PCR w aparacie SimpliAmp Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) z wykorzystaniem NGM® Kit PCR (ThermoFisher Scientific,

Waltham, Massachusetts, USA). Produkt reakcji PCR po rozcieńczeniu na 96 dołkowej płytce w formamidzie poddawany był elektroforezie kapilarnej w sekwenatorze Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Po skończonej elektroforezie kapilarnej dane analizowane były w programie Gene Mapper V4.1.

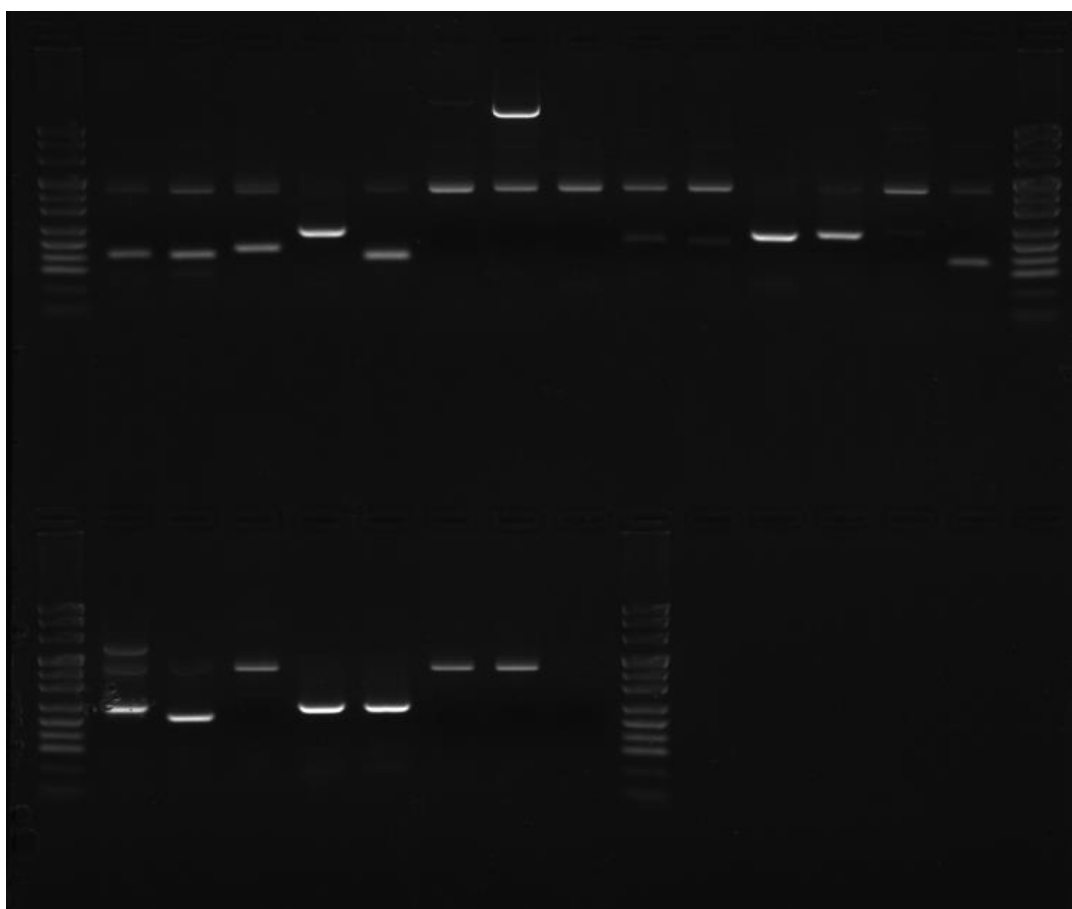
Wyjściowa analiza profili genetycznych wykonywana była jednorazowo na materiale przed przeszczepem zarówno u dawcy jaki i u biorcy przeszczepu przy wykorzystaniu metody STR/VNTR. Analizowanych było 16 loci genów oznaczonych jako: D10S1248, vWA, D16S539, D2S1338, Amelogenina, D8S1179, D21S11, D18S51, D22S1045, D19S433, TH01, FGA, D2S441, D3S1358, D1s1656, D12S391. Następnie materiał od pacjentów po przeszczepie był wielokrotnie analizowany pod kątem poszukiwania alleli allogenicznych (dawcy) i autologicznych (biorcy). Wyniki przedstawione zostały w formie procentu sygnału autologicznego w badanym materiale, co zostało oparte na porównaniu pola pod krzywymi sygnałów autologicznych i allogenicznych.

Do analizy wykorzystano wyniki chimeryzmu oznaczone w następujących punktach czasowych:

- chimeryzm wstępny oznaczony dzień po uzyskaniu odnowy granulocytarnej (liczba granulocytów > 500 / μ l)
- minimalny i maksymalny chimeryzm kontrolny w przedziale czasowym 0-30 dni od dnia przeszczepu,
- minimalny i maksymalny chimeryzm kontrolny w przedziale czasowym 31-60 dni od dnia przeszczepu,
- minimalny i maksymalny chimeryzm kontrolny w przedziale czasowym 61-90 dni od dnia przeszczepu,
- minimalny i maksymalny chimeryzm kontrolny w przedziale czasowym 91-180 dni od dnia przeszczepu,
- minimalny i maksymalny chimeryzm kontrolny w przedziale czasowym 181-270 dni od dnia przeszczepu,
- minimalny i maksymalny chimeryzm kontrolny w przedziale czasowym 271-365 dni od dnia przeszczepu.

5. Genotypowanie KIR

Badanie genotypu KIR zostało wykonane w laboratorium przy Klinice Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej we Wrocławiu. Do typowania wykorzystano pozostałości próbek DNA do oznaczenia wstępnego wzorca chimeryzmu hematopoetycznego dawcy. Genotypowanie KIR było wykonane za pomocą zestawu do typowania KIR Typing Kit (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Niemcy) z wykorzystaniem sprzętu do amplifikacji kwasów nukleinowych i elektroforezy żelowej. Przykładowy wynik badania zaprezentowano poniżej.



Rycina 4. Genotypowanie KIR – przykładowy wynik badania

GÓRA numer ścieżki. nazwa genu/długość amplikonu: 1. Marker wielkości 2. 2DL1/148 3. 2DL2/145 4. 2DL3/161 5. 2DL4/221 6. 2DL5all: 2DL5A; 2DL5B/136 7. 2DL5A/1820 8. 2DL5B/1805 9. 2DS1/148 10. 2DS2/177 11. 2DS3/172 12. 2DS4del/204 13. 2DS4ins/209 14. 2DS5/179 15. 3DL1/131 16. Marker wielkości

DÓŁ numer ścieżki. nazwa genu/długość amplikonu: 1. Marker wielkości 2. 3DL2/232 3. 3DL3/204 4. 3DS1/149 5. 2DP1/240 6. 3DP1/237 7. Genomowe DNA jako kontrola kontaminacji/260 8. β -aktyna (kontrola pozytywna)/400 9. kontrola negatywna 10. Marker wielkości

Genotypowanie KIR było wykonane z grantu dla młodych naukowców STM.C200.17.046. Projekt badawczy pt.: „Dynamika zmian chimeryzmu i występowanie niekorzystnych zdarzeń w zależności od zgodności w HLA i układu KIR – ligand KIR u dzieci po allogenicznym przeszczepieniu szpiku” uzyskał pozytywną opinię Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu (nr KB – 35/2019).

Analiza układu receptorów KIR była wykonana z użyciem publicznie dostępnego oprogramowania:

- a) Do określenia grup ligandowych u dawcy i biorcy wykorzystano kalkulator dostępny w Internecie: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/ligand.html>⁵⁶
- b) Do określenia składu haplotypowego (B-content) wykorzystano kalkulator dostępny w Internecie: https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/donor_b_content.html⁵⁷

Na podstawie klasyfikacji zaproponowanej przez Cooley, B-content był klasyfikowany jako neutralny (neutral), lepszy (better) lub najlepszy (best)⁵⁸.

6. Metody statystyczne

Analiza statystyczna wyników została przeprowadzona z zastosowaniem programu „R” wersja 4.0. Za próg istotności statystycznej przyjęto wartość $p < 0,05$.

Stosowano następujące testy statystyczne:

- krzywe OS i EFS wytyczono metodą Kaplana-Meiera, a następnie porównano za pomocą testu log-rank,

- analizę TRM ze zgonami z innych powodów przeprowadzono metodą konkurujących ryzyk (*competing risk analysis*), wytyczone w ten sposób krzywe przeżycia porównano za pomocą testu Graya,

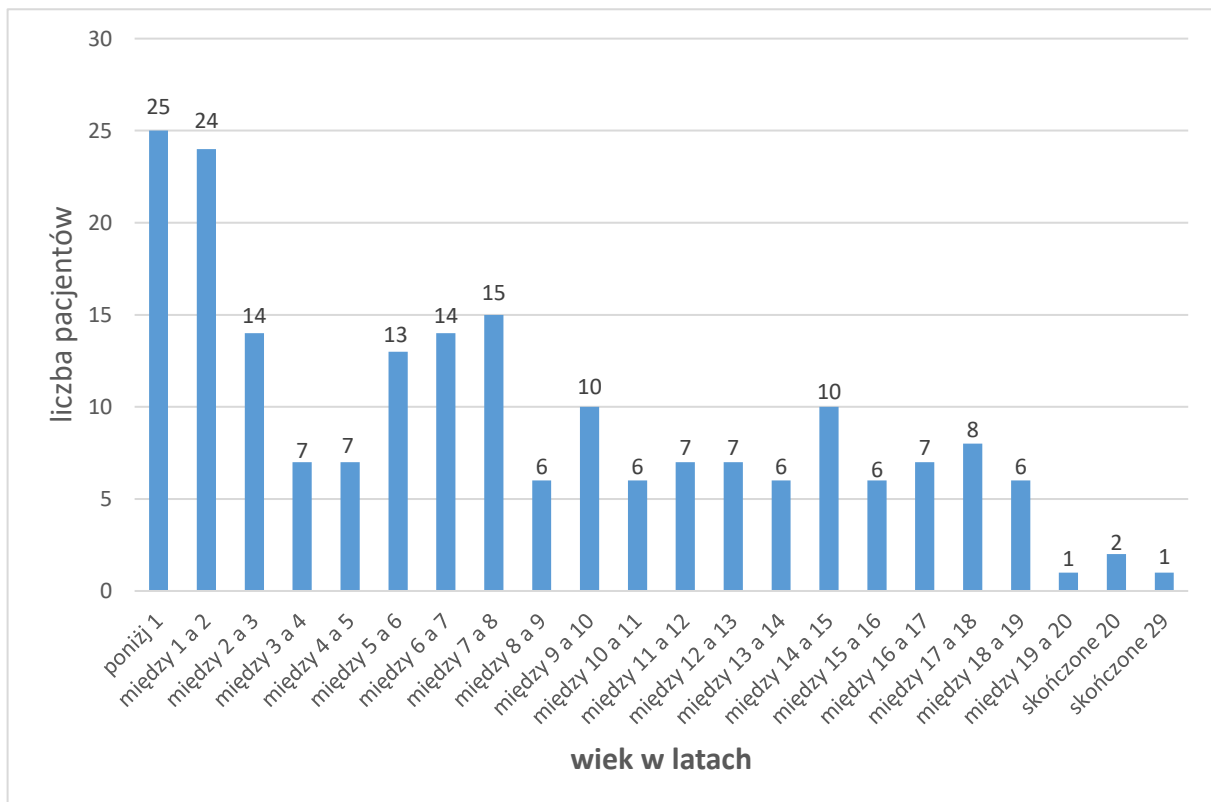
- ocenę wpływu parametrów na odnowę limfocytarną przeprowadzono metodami Manna–Whitney’a (dla czynników z dwoma poziomami wartości) oraz Kruskala-Wallisa (dla czynników z więcej niż dwoma poziomami wartości),

- zależność pomiędzy wartością chimeryzmu a wpływem różnych czynników badano za pomocą testu chi-2.

IV WYNIKI

1. Analiza danych dotyczących pacjenta

Grupa licząca łącznie 202 biorców allogenicznych przeszczepów szpiku składała się z 71 pacjentów płci żeńskiej (35,15%) oraz 131 pacjentów płci męskiej (64,85%). Zakres wieku badanej populacji wynosił od 0,2 do 29 lat, mediana 6,8 lat. Struktura wieku populacji została zaprezentowana na Rycinie 5. Mediana czasu obserwacji w badanej grupie (*median follow-up time*) wynosiła 34,3 miesiące licząc od dnia przeszczepu, dla pacjentów żyjących -38,9 miesięcy, a dla pacjentów zmarłych - 7,47 miesiąca.



Rycina 5. Struktura wieku badanej populacji

89 chorych (44,06%) zostało poddanych procedurze przeszczepowej z powodu choroby nowotworowej, a 113 pacjentów (55,94%) z powodu choroby nienowotworowej. Jedna z pacjentek chorowała jednocześnie na anemię Fanconiego

i AML, w niniejszej analizie została uwzględniona w grupie pacjentów z chorobą nowotworową.

W Tabeli 2. przedstawiono parametry zależne od pacjenta: płeć i szczegółowo rodzaj wskazania do przeszczepu szpiku kostnego z podziałem na choroby nowotworowe i nienowotworowe. Kolumna N oznacza liczbę pacjentów, a kolumna % odsetkowy udział grupy pacjentów w całej badanej populacji.

Tabela 2. Wykaz parametrów zależnych od pacjenta

Parametr	N	%
płeć pacjenta		
żeńską	71	35,15
męską	131	64,85
wskazanie do przeszczepu		
choroba nowotworowa	89	44,06
ALL	22	10,89
MDS	19	9,41
AML	15	7,43
Neuroblastoma	11	5,45
Wtórna AML	8	3,96
CML	5	2,48
inne ¹⁾	5	2,48
JMML	4	1,98
choroba nienowotworowa	113	55,94
ciężka anemia aplastyczna	33	16,34
SCID	13	6,44
BDA	9	4,46
zespół Wiskotta-Aldricha	8	3,96
inne niedobory odporności	8	3,96
anemia Fanconiego	5	2,48
inne choroby metaboliczne	6	2,97
zespół hemofagocytarny	5	2,48
CGD	4	1,98
zespół Omenna	4	1,98
nocna napadowa hemoglobinuria	3	1,49
X-ALD	3	1,49
XLP	3	1,49
zespół Hurler	3	1,49
leukodystrofia metachromatyczna	3	1,49
inne ¹⁾	3	1,49

BDA (Blackfan-Diamond Anemia) – anemia Blackfana-Diamonda, CGD (Chronic Granulomatous Disease) – przewlekła choroba ziarniniakowa, JMML (Juvenile Myelomonocytic Leukemia) – młodzieńcza białaczka mielomonocytowa, MDS (Myelodysplastic Syndrome) – zespół mielodysplastyczny, SCID (Severe Combined Immunodeficiency) – ciężki złożony niedobór odporności, X-ALD (X-linked

Adrenoleukodystrophy) – adrenoleukodystrofia sprzężona z płcią, XLP (X-linked Lymphoproliferative Disease) – choroba limfoproliferacyjna sprzężona z płcią

¹⁾ inne: Essential Thrombocythemia – nadpłytkowość samoistna, Large Cell Anaplastic Lymphoma – chłoniak wielkokomórkowy anaplastyczny, Nephroblastoma – nerczak, Primitive Neuroectodermal Tumor – prymitywny guz neuroektodermalny.

2. Analiza danych dotyczących przeszczepu

Biorcy, ze względu na zgodność z dawcami w układzie HLA, zostali podzieleni na 2 grupy: zgodni (w przypadku dopasowania antygenowego 10/10, 8/8 lub 6/6) i częściowo zgodni (z co najmniej jedną niezgodnością HLA w tym dawcy haploidentyczni). Grupa pacjentów zgodnych liczyła 113 osób (55,94%), a grupa pacjentów częściowo zgodnych liczyła 89 osób (44,06%). Zgodność dawcy i biorcy dodatkowo została przeanalizowana w poszczególnych loci (HLA A, B, C, DRB1, DQB1) – dane te zostały zawarte w Tabeli 3. Liczba badanych w procesie typowania antygenów była zgodna z obowiązującymi standardami ośrodka przeszczepowego.

Pacjenci zostali podzieleni na 3 grupy w zależności od rodzaju kondycjonowania przed przeszczepem: grupa licząca 72 osoby (35,64%) otrzymywała chemioterapię mieloablacyjną zawierającą busulfan, grupa licząca 67 osób (33,17%) otrzymywała chemioterapię mieloablacyjną o zredukowanej toksyczności lub intensywności zawierającą treosulfan, a pozostałych 63 pacjentów (31,19%) otrzymało inny rodzaj kondycjonowania. Źródło komórek macierzystych CD 34⁺ stanowił aferezat z krwi obwodowej u 157 pacjentów (81,35%) i krew szpikowa u 36 pacjentów (18,65%). W profilaktyce GvHD zastosowano ATG u 151 pacjentów (74,75%), a pozostałych 51 pacjentów (25,25%) nie otrzymywało ATG.

W Tabeli 3. zawarto szczegółowo wykaz parametrów charakteryzujących przeszczep. Kolumna N oznacza liczbę pacjentów, a kolumna % odsetkowy udział grupy pacjentów w całej badanej populacji.

Tabela 3. Wykaz parametrów charakteryzujących przeszczep

Parametr	N	%
zgodność dawcy i biorcy w układzie HLA		
zgodny (10/10, 8/8, 6/6)	113	55,94
częściowo zgodny	89	44,06
1 niezgodność (9/10)	50	24,75
2 niezgodności (8/10, 6/8, 4/6)	13	6,44
3 niezgodności (7/10, 5/8)	3	1,49

przeszczep haploidentyczny	13	6,44
brak danych	10	4,95
zgodność dawcy i biorcy w HLA A		
zgodny	149	77,60
niezgodny	43	22,40
razem	192¹⁾	100
zgodność dawcy i biorcy w HLA B		
zgodny	159	82,81
niezgodny	33	17,19
razem	192¹⁾	100
zgodność dawcy i biorcy w HLA C		
zgodny	123	82,81
niezgodny	48	17,19
razem	171¹⁾	100
zgodność dawcy i biorcy w HLA DRB1		
zgodny	165	82,81
niezgodny	26	17,19
razem	191¹⁾	100
zgodność dawcy i biorcy w HLA DQB1		
zgodny	139	90,85
niezgodny	14	9,15
razem	191¹⁾	100
rodzaj kondycjonowania		
chemioterapia mieloablacyjna z busulfanem	72	35,64
chemioterapia mieloablacyjna z treosulfanem	67	33,17
inny rodzaj kondycjonowania	63	31,19
źródło komórek macierzystych CD 34⁺		
aferezat z krwi obwodowej	157	90,85
krew szpikowa	36	9,15
razem	193¹⁾	100
rodzaj stosowanej profilaktyki GvHD		
z ATG	151	74,75
bez ATG	51	25,25

¹⁾ Brak danych dotyczących szczegółowego wyniku HLA u pozostałych pacjentów.

3. Występowanie genotypów KIR i określonych układów receptor KIR – ligand KIR w badanej populacji

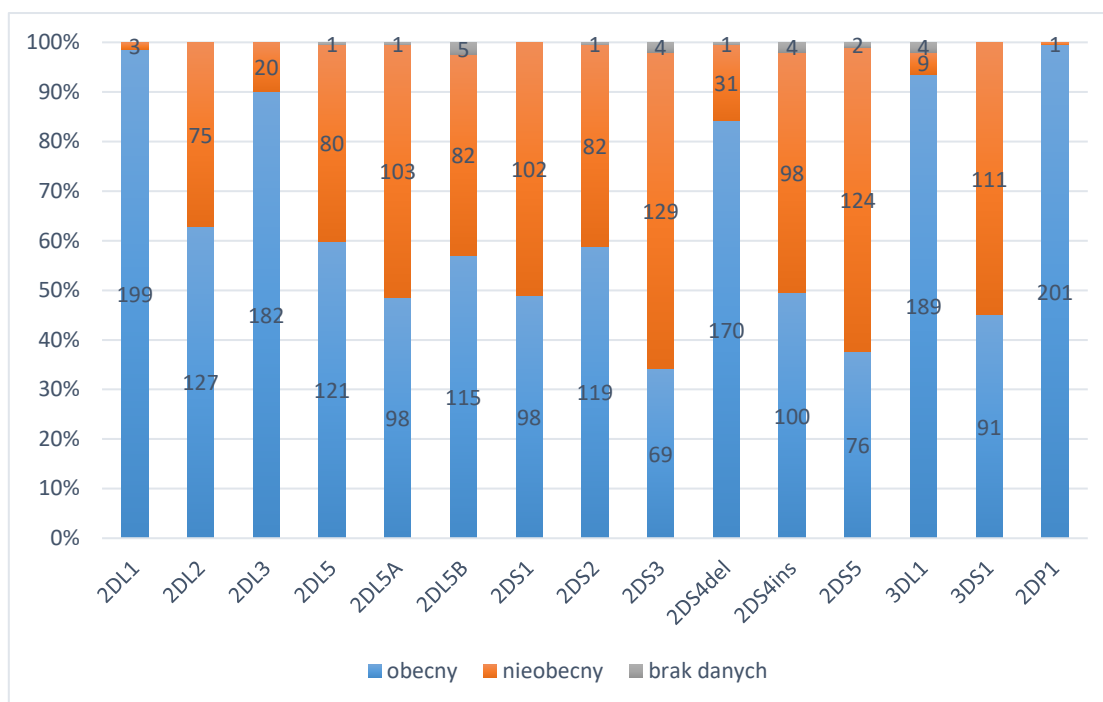
Przeanalizowano częstość występowania genotypów KIR u dawców. Dane te zostały szczegółowo przedstawione w Tabeli 4., gdzie kolumna N oznacza liczbę pacjentów, u której stwierdzono obecność receptora, a kolumna % odsetkowy udział grupy pacjentów w całej badanej populacji. Na Rycinie 6. zaprezentowano w formie wykresu odsetkowy udział receptorów KIR w całej grupie pacjentów. Wyniki dowodzą, że najczęściej stwierdzanymi receptorami, obecnymi w prawie całej populacji, są

receptory: 2DL1, 3DL1, 2DP1 (jest to kolejno 98,51%, 93,56%, 99,5% populacji), najrzadziej natomiast została stwierdzona obecność receptorów: 2DS3 i 2DS5 (odpowiednio 34,16% i 37,62% populacji).

Co najmniej jeden haplotyp B był obecny u 79% dawców szpiku. Badania składu haplotypowego (B-content) wykazały obecność haplotypu neutralnego u 91, lepszego u 87 i najlepszego u 21 dawców.

Tabela 4. Częstość występowania receptorów KIR u dawcy w badanej populacji

receptory KIR u dawcy	N	%
2DL1	199	98,51
2DL2	127	62,87
2DL3	182	90,1
2DL5	121	59,9
2DL5A	98	48,51
2DL5B	115	56,93
2DS1	98	48,91
2DS2	119	58,91
2DS3	69	34,16
2DS4del	170	84,16
2DS4ins	100	49,5
2DS5	76	37,62
3DL1	189	93,56
3DS1	91	45,05
2DP1	201	99,5
KIR B/x	160	79,21



Rycina 6. Częstość występowania receptorów KIR u dawców w badanej populacji

Następnie przeanalizowano częstość występowania układów receptor KIR dawcy – ligand biorcy w badanej populacji. Dane te zostały szczegółowo przedstawione w Tabeli 5., gdzie kolumna N oznacza liczbę pacjentów, u której stwierdzono obecność układu receptor-ligand, a kolumna % odsetkowy udział grupy pacjentów w całej badanej populacji. Ze względu na rozbudowane nazwy poszczególnych układów nadano im kody literowe A-I, co wyszczególniono w Tabeli 5.

Tabela 5. Częstość występowania układów receptor KIR dawcy – ligand biorcy w badanej populacji

współwystępowanie u biorcy wybranych ligandów dla receptora KIR u dawcy	kod ¹⁾	N	%
HLA C04 lub A11 u biorcy KIR 2DS4 u dawcy	A	22	10,89
HLA A3 lub A11 u biorcy KIR 3DL2 u dawcy	B	73	36,14
haplotyp KIR B/x + KIR 2DS2 u dawcy	C	119	58,91

HLA z gr. C1 u biorcy KIR 2DL2 lub KIR 2DL3 u dawcy	D	122	60,4
HLA z gr. C1 u biorcy KIR 2DS2 u dawcy	E	74	36,63
HLA z gr. C2 u biorcy KIR 2DL1 u dawcy	F	104	51,49
HLA z gr. C2 u biorcy KIR 2DS1 u dawcy	G	54	26,73
HLA z gr. Bw4 u biorcy KIR 3DL1 u dawcy	H	126	62,38
HLA z gr. Bw4 u biorcy KIR 3DS1 u dawcy	I	65	32,18

¹⁾ Dla parametrów z kolumny **współwystępowanie u biorcy wybranych ligandów dla receptora KIR u dawcy** przyjęto kod literowy A-I.

4. Wpływ wybranych parametrów na prawdopodobieństwo 2-letniego i 5-letniego przeżycia

U badanych pacjentów oszacowano prawdopodobieństwo 2-letniego przeżycia (2-year pOS – *2-years overall survival probability*) i prawdopodobieństwo 5-letniego przeżycia (5-year pOS – *5-years overall survival probability*). W Tabeli 6. przedstawiono wyniki analizy w tym: wykaz porównywanych parametrów, prawdopodobieństwo 2-letniego i 5-letniego przeżycia, wartość p stanowiącą o istotności statystycznej obu okresów.

Tabela 6. Analiza przeżyć 2-letnich i 5-letnich.

Wykaz porównywanych parametrów	2-year pOS	5-year pOS	p
Płeć pacjenta			
kobieta	0,75	0,74	0,22
mężczyzna	0,82	0,77	
zgodność dawcy i biorcy w układzie HLA			
zgodny	0,89	0,89	0,0001**
częściowo zgodny	0,68	0,62	
zgodność dawcy i biorcy w układzie HLA-A			
zgodny	0,84	0,82	0,0011**
niezgodny	0,63	0,53	
zgodność dawcy i biorcy w układzie HLA-B			
zgodny	0,85	0,83	<0,0001**
niezgodny	0,53	0,39	
zgodność dawcy i biorcy w układzie HLA-C			
zgodny	0,84	0,84	<0,0002**
niezgodny	0,64	0,55	

zgodność dawcy i biorcy w układzie HLA-DRB1			
zgodny	0,84	0,83	<0,0001**
niezgodny	0,48	0,35	
zgodność dawcy i biorcy w układzie HLA-DQB1			
zgodny	0,81	0,77	0,31
niezgodny	0,64	0,64	
wskazanie do przeszczepu			
choroba nowotworowa	0,73	0,63	0,0023**
choroba nienowotworowa	0,85	0,85	
źródło komórek macierzystych CD 34+			
aferezat z krwi obwodowej	0,79	0,74	0,2
krew szpikowa	0,85	0,85	
rodzaj kondycjonowania			
chemioterapia mieloablacyjna z busulfanem	0,76	0,76	0,092
chemioterapia mieloablacyjna z treosulfanem	0,76	0,65	
inny rodzaj kondycjonowania	0,87	0,85	
rodzaj stosowanej profilaktyki GvHD			
z ATG	0,78	0,73	0,099
bez ATG	0,85	0,85	
receptor KIR			
2DL1	nie badano ¹⁾		
obecny			
nieobecny			
2DL2	0,82	0,77	0,47
obecny			
nieobecny	0,75	0,75	
2DL3	0,79	0,75	0,33
obecny			
nieobecny	0,85	0,85	
2DL5	0,78	0,73	0,31
obecny			
nieobecny	0,82	0,80	
2DL5A	0,78	0,74	0,64
obecny			
nieobecny	0,81	0,78	
2DL5B	0,80	0,75	0,54
obecny			
nieobecny	0,81	0,79	
2DS1	0,79	0,76	0,96
obecny			
nieobecny	0,80	0,76	
2DS2	0,80	0,77	0,69
obecny			
nieobecny	0,78	0,74	
2DS3	0,84	0,76	0,88
obecny			
nieobecny	0,78	0,78	
2DS4del	0,79	0,75	0,56
obecny			
nieobecny	0,81	0,81	
2DS4ins	0,82	0,79	0,38
obecny			
nieobecny	0,79	0,74	

2DS5 obecny nieobecny	0,77 0,81	0,77 0,75	0,94
3DL1 obecny nieobecny	nie badano ¹⁾		
3DS1 obecny nieobecny	0,80 0,79	0,76 0,76	0,83
2DP1 obecny nieobecny	nie badano ¹⁾		
KIR B/x obecny nieobecny	0,81 0,75	0,76 0,75	0,8
układ receptor KIR – ligand HLA²⁾			
układ A obecny nieobecny	0,86 0,81	0,86 0,78	0,43
układ B obecny nieobecny	0,81 0,79	0,75 0,77	0,84
układ C obecny nieobecny	0,80 0,81	0,77 0,73	0,72
układ D obecny nieobecny	0,81 0,77	0,76 0,73	0,84
układ E obecny nieobecny	0,79 0,84	0,76 0,84	0,34
układ F obecny nieobecny	0,84 0,70	0,79 0,67	0,05*
układ G obecny nieobecny	0,85 0,76	0,80 0,76	0,65
układ H obecny nieobecny	0,84 0,76	0,79 0,74	0,27
układ I obecny nieobecny	0,88 0,65	0,84 0,65	0,041*
B-content			
neutralny	0,81	0,77	0,68
lepszy	0,77	0,73	
najlepszy	0,85	0,85	

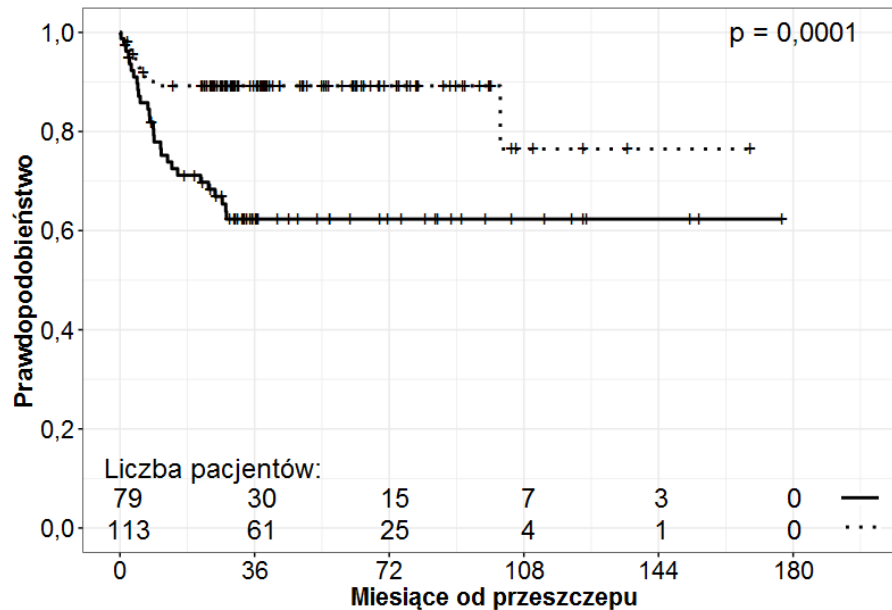
¹⁾ W analizach pominięto oznaczone zmienne ze względu na małą liczbę pacjentów reprezentujących daną cechę.

²⁾ Przyjęto kody literowe A-I jak w Tabeli 5.

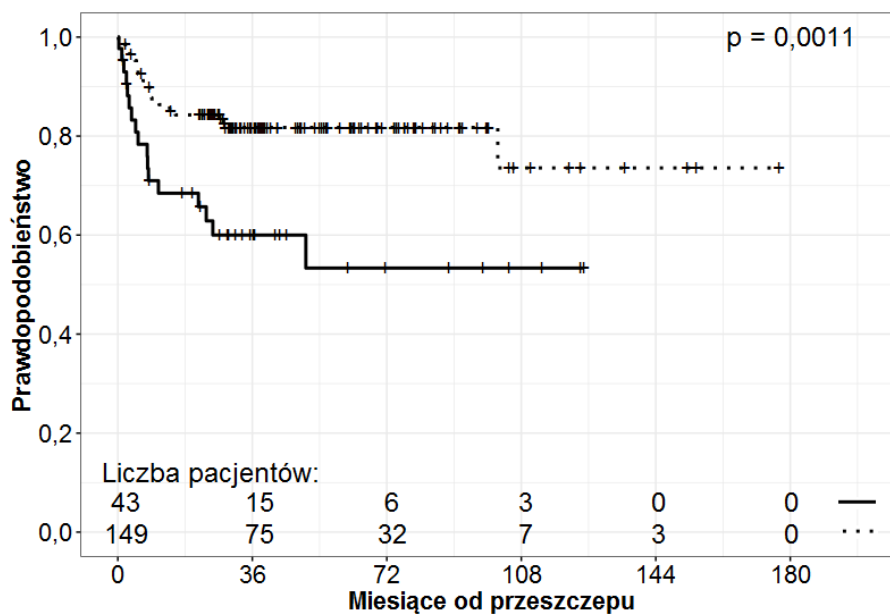
Spośród porównywanych parametrów część wykazała istotność statystyczną, co zaznaczono w zamieszczonej powyżej Tabeli 6. poprzez zacielenie wartości p.

Krzywe przeżycia różniące się ze sobą w sposób istotny zaprezentowano na Rycinach 7-14.

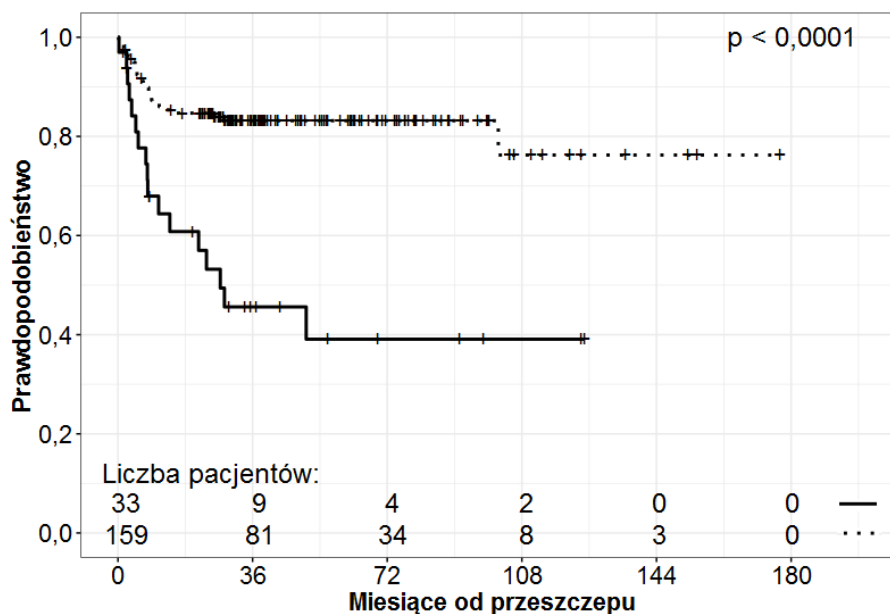
Wykazano, że stopień zgodności między dawcą i biorcą w układzie HLA wpływa na przeżycie pacjentów (Ryciny 7.-11.). W przypadku całkowitej zgodności w HLA pomiędzy dawcą i biorcą prawdopodobieństwo 2- i 5- letniego OS wyniosło 89% i 89%, natomiast w przypadkach częściowej zgodności odpowiednio 68% i 62% (Rycina 7.).



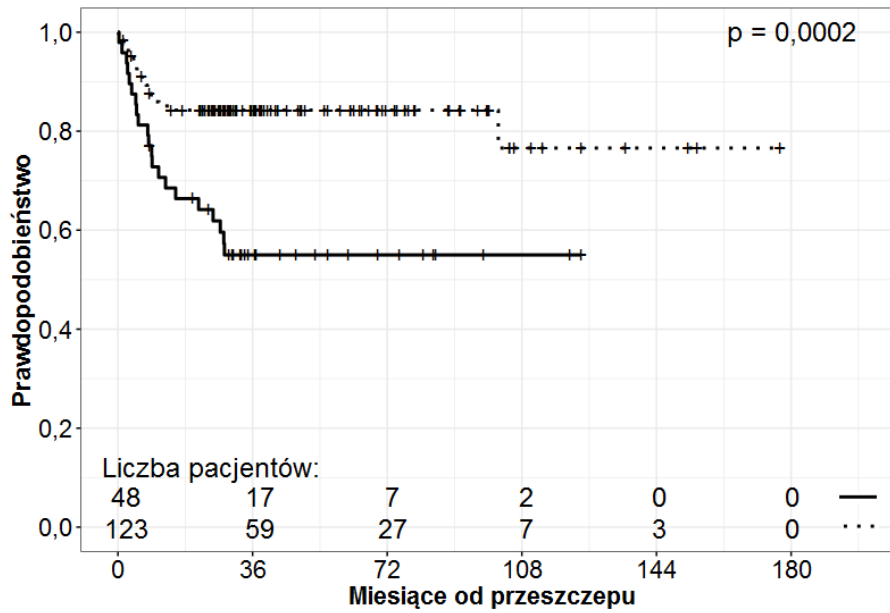
Rycina 7. Krzywe przeżycia OS dla grup pacjentów zgodnych (krzywa przerywana) i niezgodnych (krzywa ciągła) w układzie HLA. Liczby zaprezentowane nad osią X oznaczają ilość pacjentów objętych obserwacją w danym punkcie czasu.



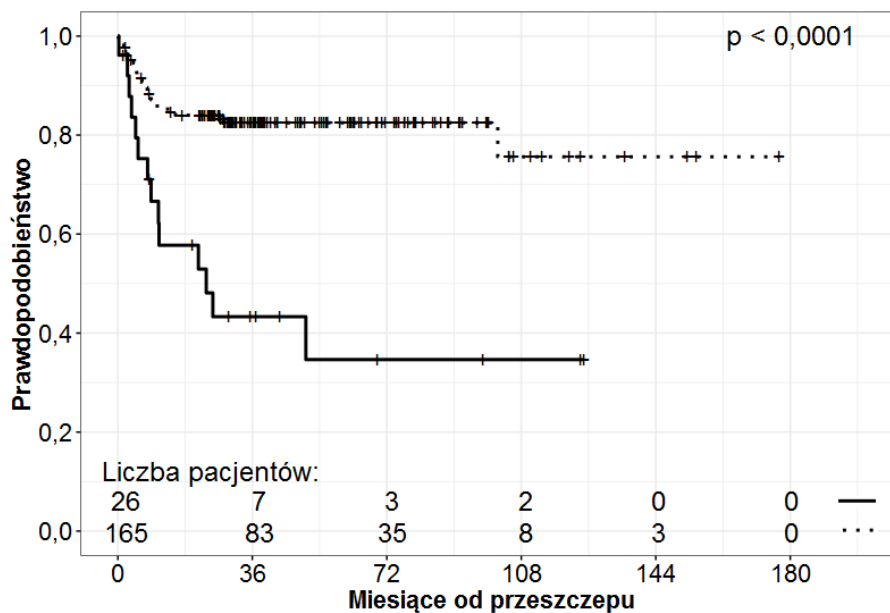
Rycina 8. Krzywe przeżycia OS dla grup pacjentów zgodnych (krzywa przerywana) i niezgodnych (krzywa ciągła) w układzie HLA A. Liczby zaprezentowane nad osią X oznaczają ilość pacjentów objętych obserwacją w danym punkcie czasu.



Rycina 9. Krzywe przeżycia OS dla grup pacjentów zgodnych (krzywa przerywana) i niezgodnych (krzywa ciągła) w układzie HLA B. Liczby zaprezentowane nad osią X oznaczają ilość pacjentów objętych obserwacją w danym punkcie czasu.



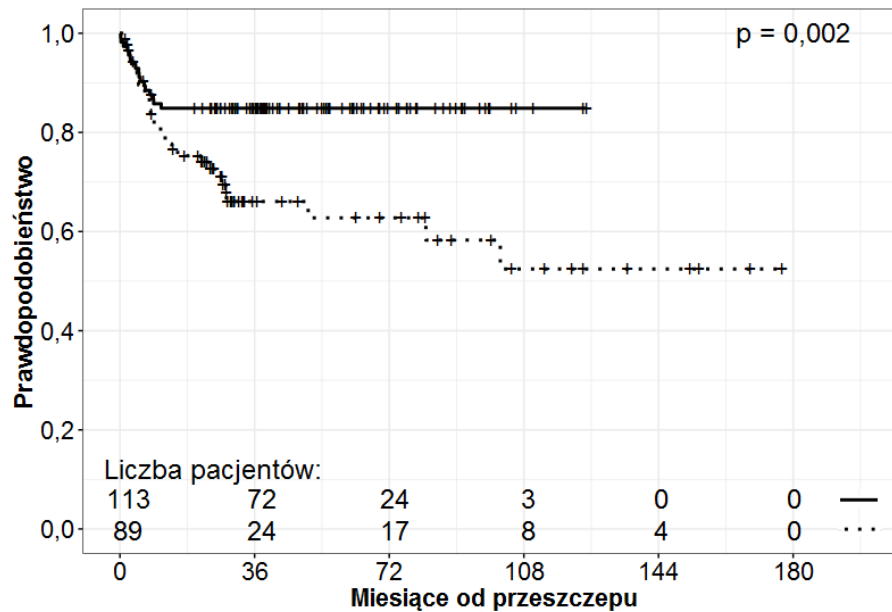
Rycina 10. Krzywe przeżycia OS dla grup pacjentów zgodnych (krzywa przerywana) i niezgodnych (krzywa ciągła) w układzie HLA C. Liczby zaprezentowane nad osią X oznaczają ilość pacjentów objętych obserwacją w danym punkcie czasu.



Rycina 11. Krzywe przeżycia OS dla grup pacjentów zgodnych (krzywa przerywana) i niezgodnych (krzywa ciągła) w układzie HLA DRB1. Liczby zaprezentowane nad osią X oznaczają ilość pacjentów objętych obserwacją w danym punkcie czasu.

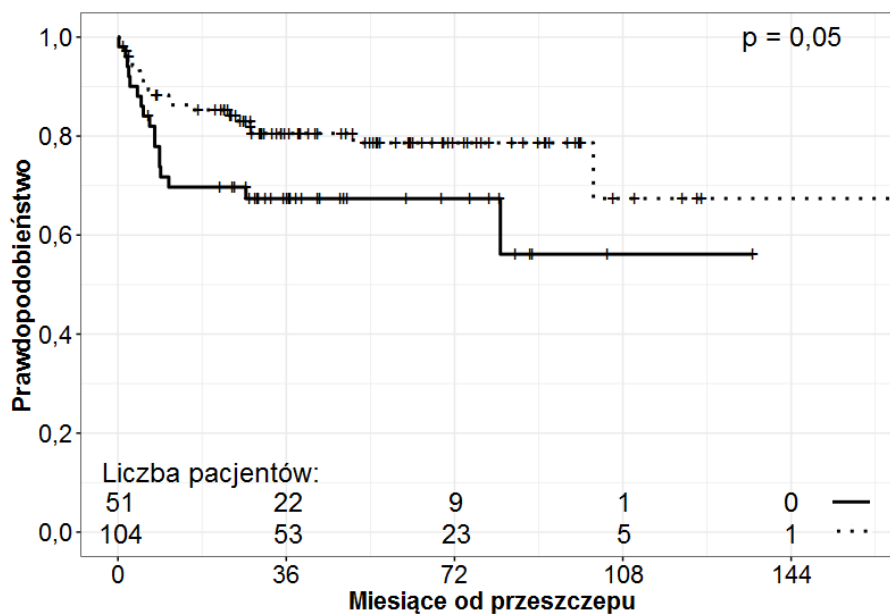
Wykazano, że na przeżywalność znamienne korzystny wpływ ma wskazanie do przeszczepu szpiku z powodu choroby nienowotworowej: 2-year pOS 73% dla

chorób nowotworowych i 85% dla chorób nienowotworowych oraz 5-year pOS 63% dla chorób nowotworowych i 85% dla chorób nienowotworowych (Rycina 12.).

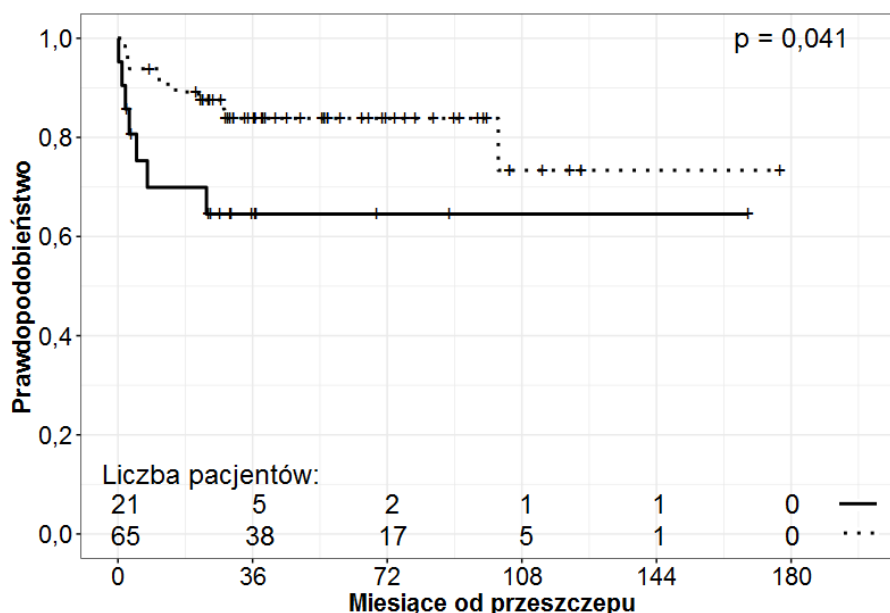


Rycina 12. Krzywe przeżycia OS dla grup pacjentów z podziałem na wskazanie do przeszczepu: choroba nowotworowa (krzywa przerywana) i choroba nienowotworowa (krzywa ciągła). Liczby zaprezentowane nad osią X oznaczają ilość pacjentów objętych obserwacją w danym punkcie czasu.

W dalszej kolejności poddano analizie wpływ genotypu KIR i określonych układów receptor KIR – ligand KIR na przeżywalność pacjentów. Stwierdzono istotny statystycznie wpływ układów: HLA z gr. C2/KIR 2DL1 (układ F, Rycina 13.) oraz HLA z gr. Bw4/KIR 3DS1 (układ I, Rycina 14.) na przeżycia 2-letnie i 5-letnie, nie stwierdzono natomiast znamionnego związku pomiędzy poszczególnymi genotypami KIR i pozostałymi układami receptor KIR-ligand a OS dzieci po allo-HSCT.



Rycina 13. Krzywe przeżycia OS dla grup pacjentów z ekspresją układu HLA z gr. C2/KIR 2DL1 (krzywa przerywana) i brakiem ekspresji układu HLA z gr. C2/KIR 2DL1 (krzywa ciągła). Liczby zaprezentowane nad osią X oznaczają ilość pacjentów objętych obserwacją w danym punkcie czasu.



Rycina 14. Krzywe przeżycia OS dla grup pacjentów z ekspresją układu HLA z gr. Bw4/KIR 3DS1 (krzywa przerywana) i brakiem ekspresji układu HLA z gr. Bw4/KIR 3DS1 (krzywa ciągła). Liczby zaprezentowane nad osią X oznaczają ilość pacjentów objętych obserwacją w danym punkcie czasu.

5. Analiza przeżycia wolnego od zdarzeń (EFS – event free survival)

W Tabeli 7. przedstawiono wyniki analizy EFS w tym: wykaz porównywanych parametrów, w kolumnie EFS podano prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od zdarzeń, a w ostatniej kolumnie wartość p stanowiącą o istotności statystycznej.

Tabela 7. Analiza EFS

Wykaz porównywanych parametrów	EFS	p
Płeć pacjenta		
kobieta	0,53	0,45
mężczyzna	0,75	
zgodność dawcy i biorcy w układzie HLA		
zgodny	0,74	0,00038**
częściowo zgodny	0,62	
zgodność dawcy i biorcy w układzie HLA-A		
zgodny	0,73	0,00019**
niezgodny	0,53	
zgodność dawcy i biorcy w układzie HLA-B		
zgodny	0,75	<0,0001**
niezgodny	0,37	
zgodność dawcy i biorcy w układzie HLA-C		
zgodny	0,75	<0,0001**
niezgodny	0,52	
zgodność dawcy i biorcy w układzie HLA-DRB1		
zgodny	0,75	<0,0001**
niezgodny	0,33	
zgodność dawcy i biorcy w układzie HLA-DQB1		
zgodny	0,68	0,34
niezgodny	0,64	
wskazanie do przeszczepu		
choroba nowotworowa	0,53	0,00067**
choroba nienowotworowa	0,85	
źródło komórek macierzystych CD 34⁺		
aferezat z krwi obwodowej	0,67	0,47
krew szpikowa	0,79	
rodzaj kondycjonowania		
chemioterapia mieloablacyjna z busulfanem	0,62	0,055
chemioterapia mieloablacyjna z treosulfanem	0,61	
inny rodzaj kondycjonowania	0,85	
rodzaj stosowanej profilaktyki GvHD		
z ATG	0,65	0,23
bez ATG	0,81	
receptor KIR		
2DL1	nie badano ¹⁾	
obecny		
nieobecny		

2DL2 obecny nieobecny	0,69 0,68	0,62
2DL3 obecny nieobecny	0,66 0,85	0,25
2DL5 obecny nieobecny	0,62 0,78	0,35
2DL5A obecny nieobecny	0,71 0,66	0,89
2DL5B obecny nieobecny	0,66 0,76	0,86
2DS1 obecny nieobecny	0,73 0,64	0,53
2DS2 obecny nieobecny	0,68 0,69	0,65
2DS3 obecny nieobecny	0,63 0,72	0,95
2DS4del obecny nieobecny	0,65 0,81	0,43
2DS4ins obecny nieobecny	0,76 0,62	0,58
2DS5 obecny nieobecny	0,71 0,67	0,95
3DL1 obecny nieobecny	nie badano ¹⁾	
3DS1 obecny nieobecny	0,73 0,66	0,7
2DP1 obecny nieobecny	nie badano ¹⁾	
KIR B/x obecny nieobecny	0,67 0,73	0,8
układ receptor KIR – ligand HLA²⁾		
układ A obecny nieobecny	0,82 0,75	0,51

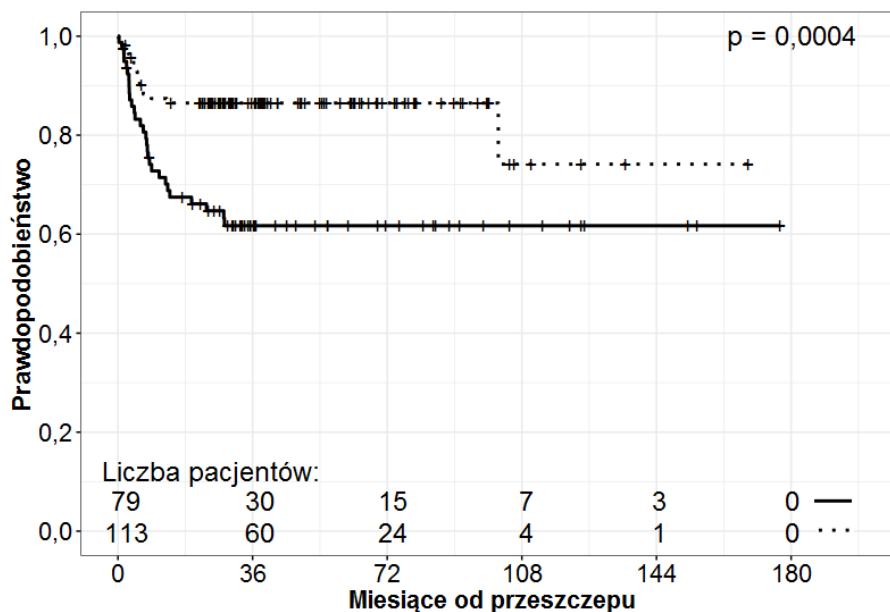
układ B obecny nieobecny	0,74 0,67	0,92
układ C obecny nieobecny	0,68 0,65	0,67
układ D obecny nieobecny	0,62 0,71	0,76
układ E obecny nieobecny	0,47 0,83	0,28
układ F obecny nieobecny	0,67 0,57	0,037*
układ G obecny nieobecny	0,63 0,76	0,76
układ H obecny nieobecny	0,69 0,66	0,3
układ I obecny nieobecny	0,73 0,65	0,042*
B-content		
neutralny	0,64	
lepszy	0,68	0,64
najlepszy	0,85	

¹⁾ W analizach pominięto oznaczone zmienne ze względu na małą liczbę pacjentów reprezentujących daną cechę.

²⁾ Przyjęto kody literowe A-I jak w Tabeli 5.

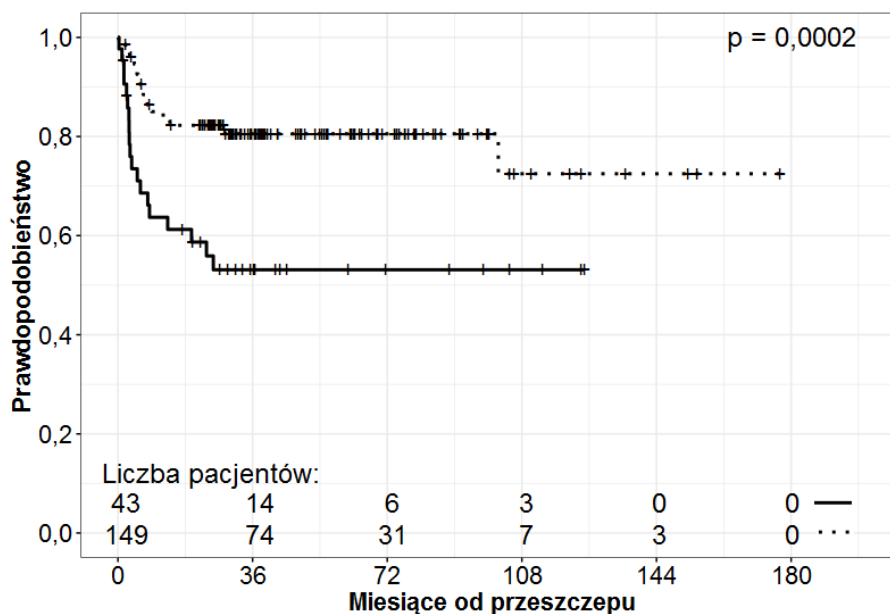
Spośród porównywanych parametrów część wykazała istotność statystyczną, co zaznaczono w zamieszczonej powyżej Tabeli 7. poprzez zacinienie pola wartości p. Analiza EFS zidentyfikowała czynniki znamienne statystycznie podobne jak analiza OS. Krzywe przeżycia EFS różniące się ze sobą w sposób istotny zaprezentowano na Rycinach 15.-22.

Oszacowano EFS dla pacjentów zgodnych w HLA z dawcami na 74%, a dla pacjentów tylko częściowo zgodnych na 62% (Rycina 15.).

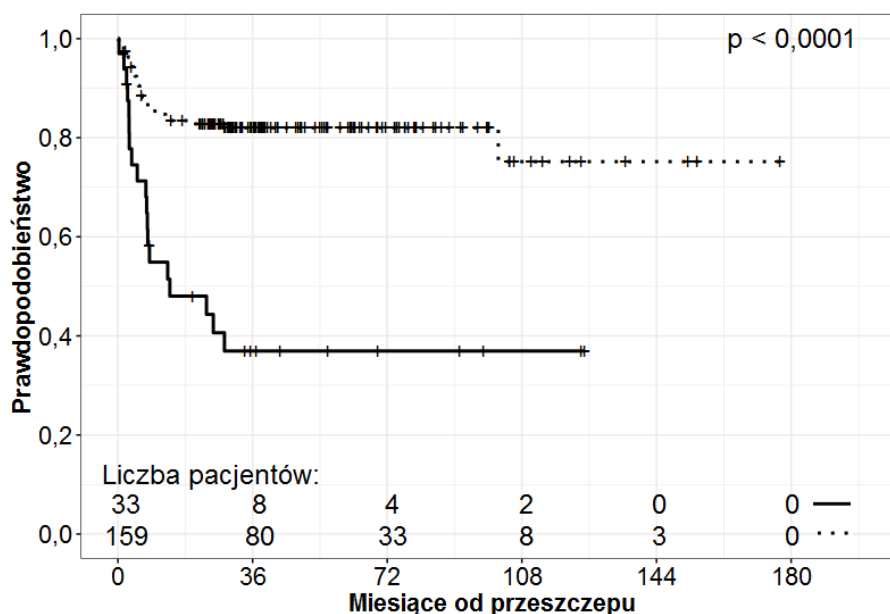


Rycina 15. Krzywe przeżycia EFS dla grup pacjentów zgodnych (krzywa przerywana) i niezgodnych (krzywa ciągła) w układzie HLA. Liczby zaprezentowane nad osią X oznaczają ilość pacjentów objętych obserwacją w danym punkcie czasu.

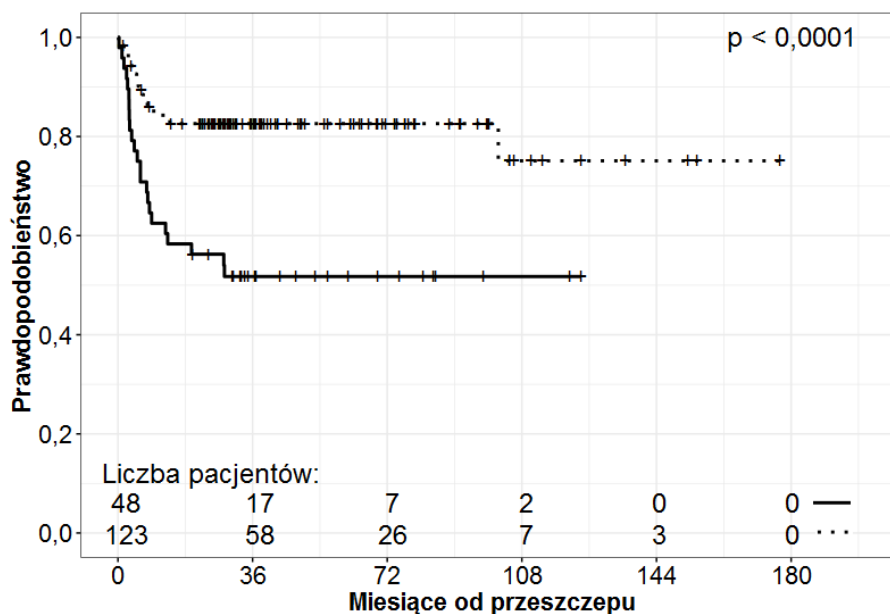
Analizując prawdopodobieństwo EFS dla poszczególnych loci HLA dla pacjentów zgodnych i niezgodnych przedstawia się następująco: dla HLA A 73% vs. 53% (Rycina 16.), dla HLA B 75% vs. 37% (Rycina 17.), dla HLA C 75% vs. 52% (Rycina 18.), dla HLA DRB1 75% vs. 33% (Rycina 19.), nie stwierdzono natomiast związku pomiędzy zgodnościami w loci DQB1 a przeżyciem wolnym od zdarzeń.



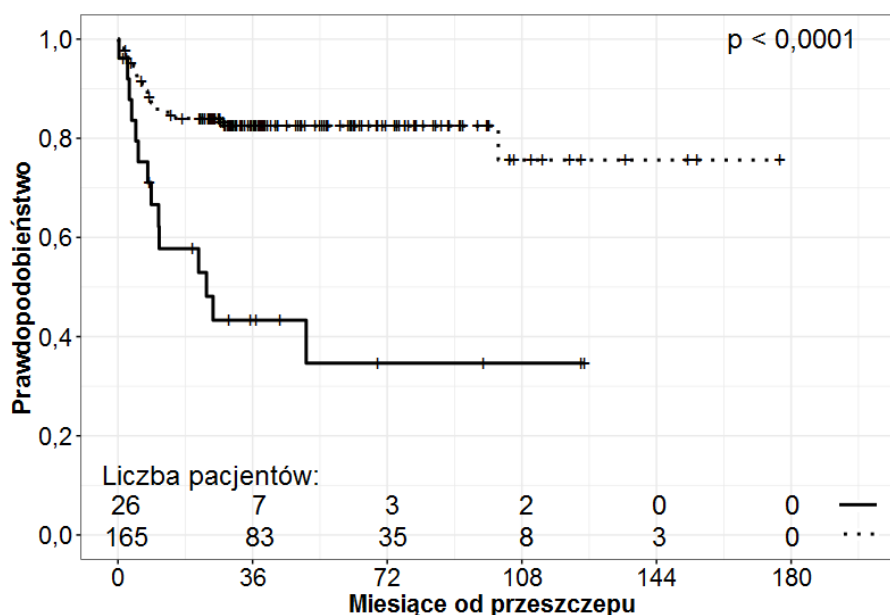
Rycina 16. Krzywe przeżycia EFS dla grup pacjentów zgodnych (krzywa przerywana) i niezgodnych (krzywa ciągła) w układzie HLA A. Liczby zaprezentowane nad osią X oznaczają ilość pacjentów objętych obserwacją w danym punkcie czasu.



Rycina 17. Krzywe przeżycia EFS dla grup pacjentów zgodnych (krzywa przerywana) i niezgodnych (krzywa ciągła) w układzie HLA B. Liczby zaprezentowane nad osią X oznaczają ilość pacjentów objętych obserwacją w danym punkcie czasu.

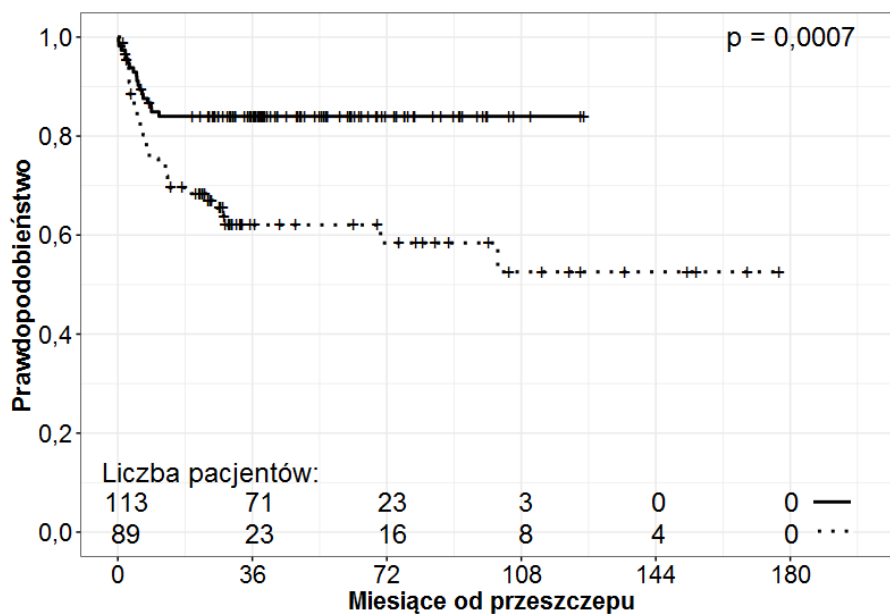


Rycina 18. Krzywe przeżycia EFS dla grup pacjentów zgodnych (krzywa przerywana) i niezgodnych (krzywa ciągła) w układzie HLA C. Liczby zaprezentowane nad osią X oznaczają ilość pacjentów objętych obserwacją w danym punkcie czasu.



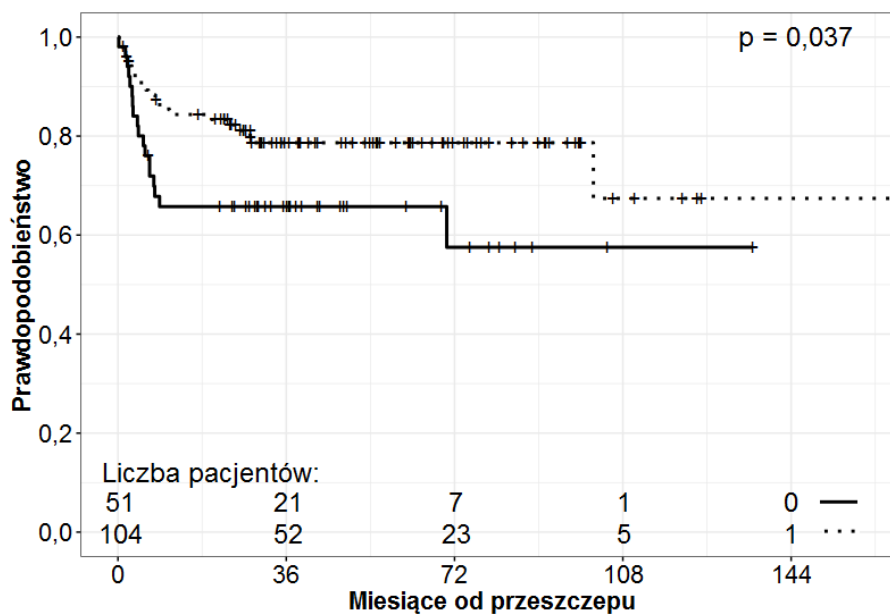
Rycina 19. Krzywe przeżycia EFS dla grup pacjentów zgodnych (krzywa przerywana) i niezgodnych (krzywa ciągła) w układzie HLA DRB1. Liczby zaprezentowane nad osią X oznaczają ilość pacjentów objętych obserwacją w danym punkcie czasu.

Prawdopodobieństwo EFS u pacjentów z chorobą nienowotworową było znacząco wyższe niż z chorobą nowotworową (85% vs 53%, Rycina 20.).

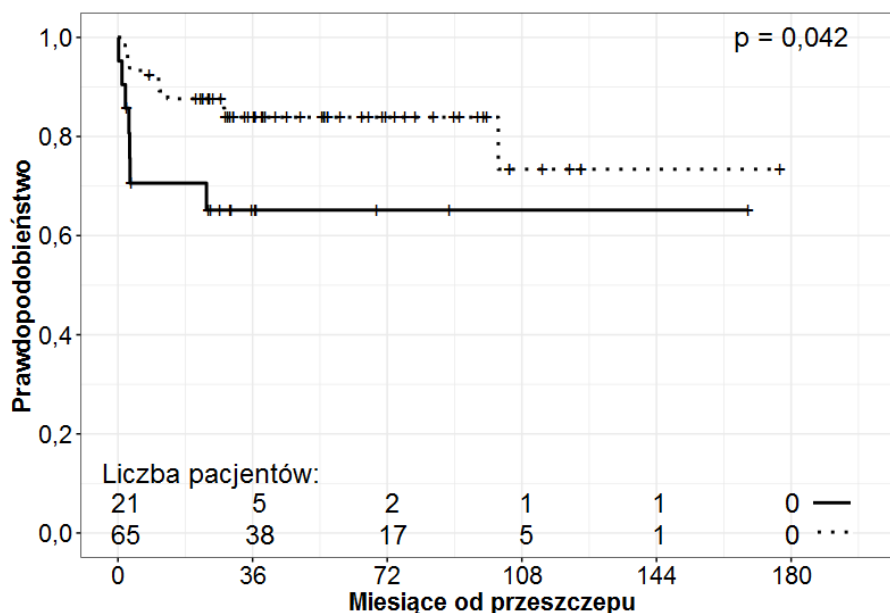


Rycina 20. Krzywe przeżycia EFS dla grup pacjentów z podziałem na wskazanie do przeszczepu: choroba nowotworowa (krzywa przerywana) i choroba nienowotworowa (krzywa ciągła). Liczby zaprezentowane nad osią X oznaczają ilość pacjentów objętych obserwacją w danym punkcie czasu.

Prawdopodobieństwo EFS przy obecności układu F wynosi 67%, a przy braku tego układu 57% (Rycina 21.), natomiast przy obecności układu I EFS wynosi 73%, a przy braku tego układu 65% (Rycina 22.). Nie stwierdzono znamiennej zależności pomiędzy poszczególnymi genotypami KIR i pozostałymi układami receptor KIR-ligand a EFS dzieci po allo-HSCT.



Rycina 21. Krzywe przeżycia EFS dla grup pacjentów z ekspresją układu HLA z gr. C2/KIR 2DL1 (krzywa przerywana) i brakiem ekspresji układu HLA z gr. C2/KIR 2DL1 (krzywa ciągła). Liczby zaprezentowane nad osią X oznaczają ilość pacjentów objętych obserwacją w danym punkcie czasu.



Rycina 22. Krzywe przeżycia EFS dla grup pacjentów z ekspresją układu HLA z gr. Bw4/KIR 3DS1 (krzywa przerywana) i brakiem ekspresji układu HLA z gr. Bw4/KIR 3DS1 (krzywa ciągła). Liczby zaprezentowane nad osią X oznaczają ilość pacjentów objętych obserwacją w danym punkcie czasu.

6. Analiza zgonów związanych i nie związanych z transplantacją

W poniższej analizie zestawiono śmierć pacjenta związaną z powikłaniami po transplantacji (TRM *transplant related mortality*) ze zgonami z innych powodów. W Tabeli 8. przedstawiono wyniki analizy w tym: wykaz porównywanych parametrów, w kolumnie TRM wpisano prawdopodobieństwo zgonu z powodu powikłań po procedurze transplantacji, a w ostatniej kolumnie wartość p stanowiącą o istotności statystycznej.

Tabela 8. Analiza TRM

Wykaz porównywanych parametrów	TRM	p
pleć pacjenta		
kobieta	0,33	0,603
mężczyzna	0,16	
zgodność dawcy i biorcy w układzie HLA		
zgodny	0,24	0,124
częściowo zgodny	0,22	
zgodność dawcy i biorcy w układzie HLA-A		
zgodny	0,22	0,404
niezgodny	0,2	
zgodność dawcy i biorcy w układzie HLA-B		
zgodny	0,19	0,027*
niezgodny	0,3	
zgodność dawcy i biorcy w układzie HLA-C		
zgodny	0,2	0,136
niezgodny	0,24	
zgodność dawcy i biorcy w układzie HLA-DRB1		
zgodny	0,2	0,179
niezgodny	0,26	
zgodność dawcy i biorcy w układzie HLA-DQB1		
zgodny	0,24	0,703
niezgodny	0,21	
wskazanie do przeszczepu		
choroba nowotworowa	0,23	0,909
choroba nienowotworowa	0,15	
źródło komórek macierzystych CD 34⁺		
aferezat z krwi obwodowej	0,21	0,286
krew szpikowa	0,09	
rodzaj kondycjonowania		
chemioterapia mieloablacyjna z busulfanem	0,27	0,303
chemioterapia mieloablacyjna z treosulfanem	0,2	
inny rodzaj kondycjonowania	0,1	

rodzaj stosowanej profilaktyki GvHD		
z ATG	0,22	0,273
bez ATG	0,1	
receptor KIR		
2DL1 obecny nieobecny	nie badano ¹⁾	
2DL2 obecny nieobecny	0,24 0,12	0,378
2DL3 obecny nieobecny	0,21 0,15	0,916
2DL5 obecny nieobecny	0,27 0,09	0,046*
2DL5A obecny nieobecny	0,18 0,23	0,526
2DL5B obecny nieobecny	0,28 0,09	0,038*
2DS1 obecny nieobecny	0,17 0,24	0,729
2DS2 obecny nieobecny	0,27 0,1	0,089
2DS3 obecny nieobecny	0,31 0,13	0,197
2DS4del obecny nieobecny	0,21 0,16	0,916
2DS4ins obecny nieobecny	0,16 0,23	0,741
2DS5 obecny nieobecny	0,17 0,21	0,588
3DL1 obecny nieobecny	nie badano ¹⁾	
3DS1 obecny nieobecny	0,15 0,25	0,683
2DP1 obecny nieobecny	nie badano ¹⁾	

KIR B/x		
obecny	0,22	0,538
nieobecny	0,12	
układ receptor KIR – ligand HLA²⁾		
układ A		
obecny	0,14	0,758
nieobecny	0,17	
układ B		
obecny	0,19	0,379
nieobecny	0,21	
układ C		
obecny	0,27	0,108
nieobecny	0,08	
układ D		
obecny	0,27	0,668
nieobecny	0,21	
układ E		
obecny	0,43	0,296
nieobecny	0,11	
układ F		
obecny	0,27	0,308
nieobecny	0,22	
układ G		
obecny	0,34	0,736
nieobecny	0,14	
układ H		
obecny	0,21	0,417
nieobecny	0,18	
układ I		
obecny	0,23	0,410
nieobecny	0,20	
B-content		
neutralny	0,25	
lepszy	0,17	0,938
najlepszy	0,15	

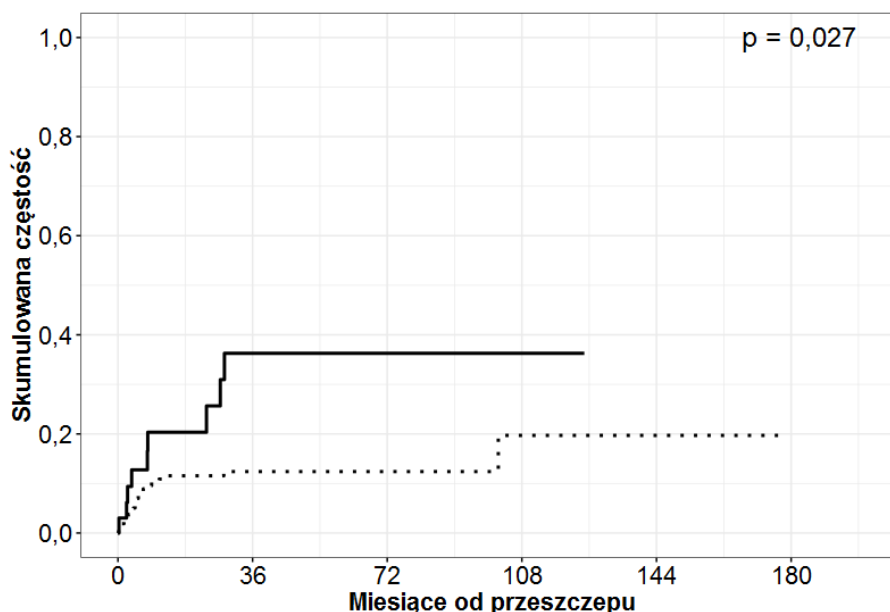
¹⁾ W analizach pominięto oznaczone zmienne ze względu na małą liczbę pacjentów reprezentujących daną cechę.

²⁾ Przyjęto kody literowe A-I jak w Tabeli 5.

Spośród porównywanych parametrów część wykazała istotność statystyczną, co zaznaczono w zamieszczonej powyżej Tabeli 8. poprzez zacielenie pola wartości p. Krzywe przeżycia różniące się ze sobą w sposób istotny zaprezentowano na Rycinach 23.-25.

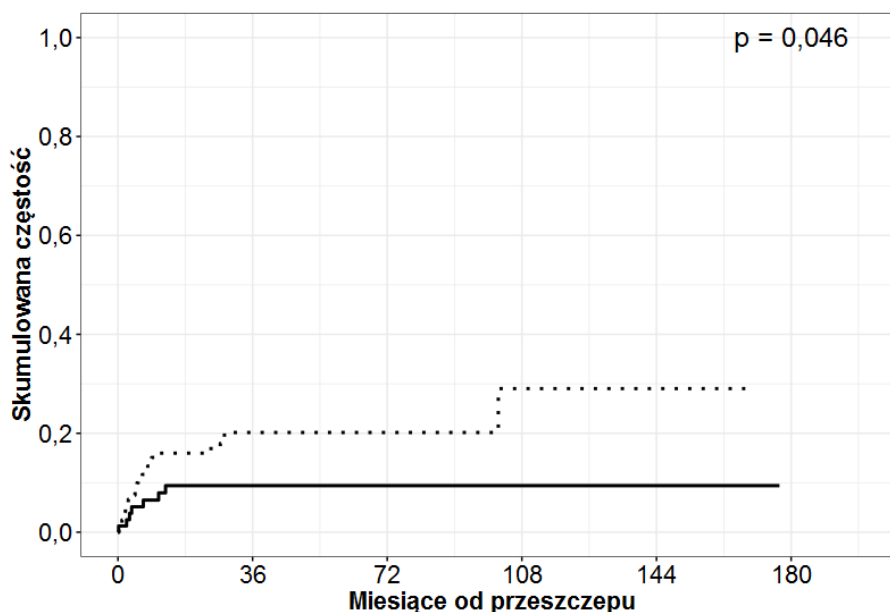
Uzyskane wyniki TRM pokazują, że prawdopodobieństwo zgonu związanego z transplantacją jest istotnie większe w przypadku pacjentów niezgodnych w HLA-B

(19% jeśli HLA-B zgodne vs. 30% jeśli HLA-B niezgodne, Rycina 23.). Pozostałe niezgodności w analizowanych loci HLA nie wykazały istotności statystycznej.

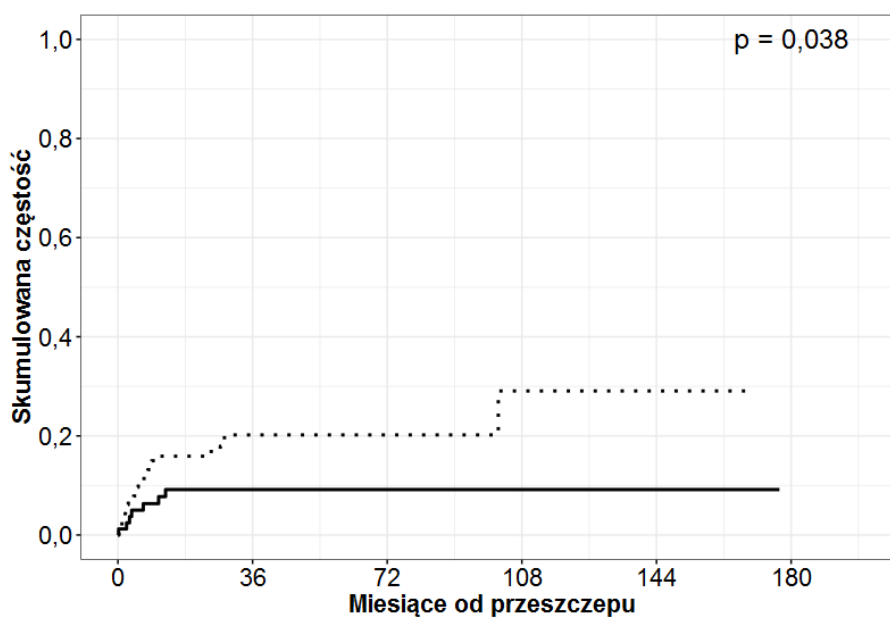


Rycina 23. Krzywe przedstawiające odsetek pacjentów, u których stwierdzono zgon związany z powikłaniami po transplantacji: linia przerywana dla pacjentów zgodnych w HLA B, a linia ciągła dla pacjentów niezgodnych w HLA B.

Spośród poddanych analizie genotypów KIR i układów receptor KIR-ligand jedynie występowanie receptora 2DL5 oraz receptora 2DL5B wiązały się z większym ryzykiem TRM. Prawdopodobieństwo TRM dla pacjentów z receptorem 2DL5 oszacowano na 27%, a bez tego receptora na 9% (Rycina 24.), a prawdopodobieństwo TRM dla pacjentów z receptorem 2DL5B oszacowano na 28%, a bez tego receptora na 9% (Rycina 25.).



Rycina 24. Krzywe przedstawiające odsetek pacjentów, u których stwierdzono zgon związany z powikłaniami po transplantacji: linia przerywana dla pacjentów z ekspresją receptora 2DL5, a linia ciągła dla pacjentów z brakiem ekspresji receptora 2DL5.



Rycina 25. Krzywe przedstawiające odsetek pacjentów, u których stwierdzono zgon związany z powikłaniami po transplantacji: linia przerywana dla pacjentów z ekspresją receptora 2DL5B, a linia ciągła dla pacjentów z brakiem ekspresji receptora 2DL5B.

7. Ocena mechanizmów licencjonowania komórek NK

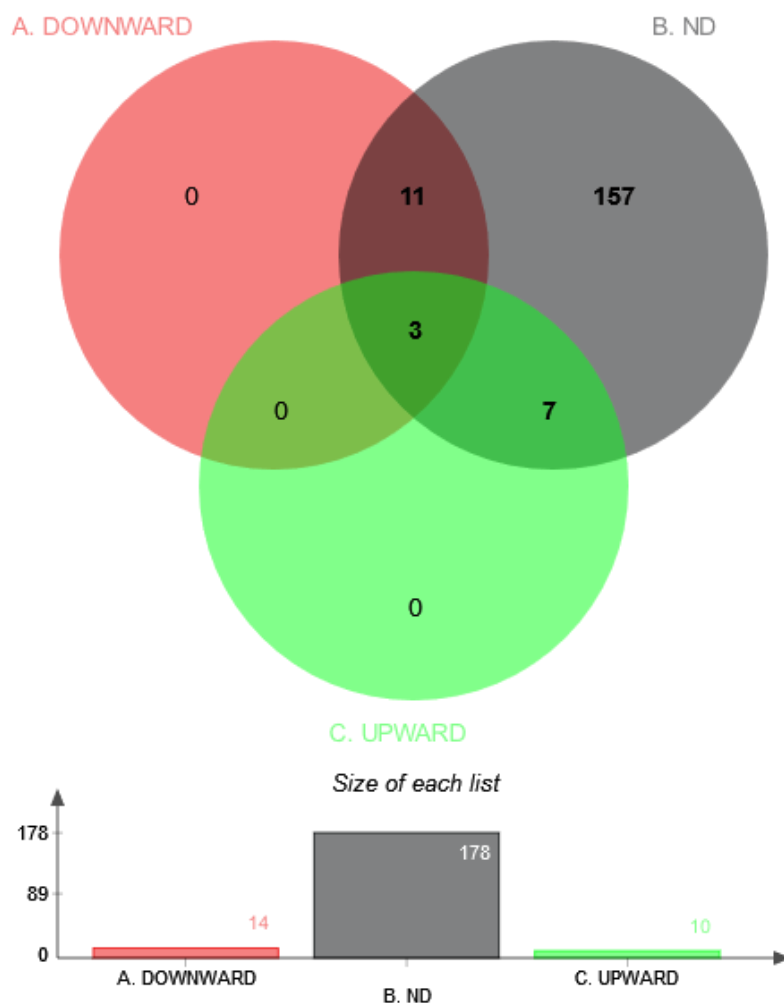
W badanej grupie przeanalizowano przypadki, u których była możliwość oceny genotypu KIR i ligandów HLA w kierunku licencjonowania. Wyniki przedstawiono w Tabeli 9.

Tabela 9. Zjawisko licencjonowania w poszczególnych układach KIR-ligand HLA.

Układ KIR:ligand HLA	Delicencjonowanie (Downward resetting)	Licencjonowanie bez zmian	Licencjonowanie wzrastające (Upward licensing)
KIR2DL2/3:C1	3	130	4
KIR2DL1:C2	7	143	2
KIR3DL1:Bw4	6	158	1
KIR3DL2:A3/11	0	170	3

W badanej grupie zaobserwowano w 16 przypadkach zjawisko delicencjonowania, a w 10 wzrastającego licencjonowania. W pozostałych przypadkach stwierdzono brak ekspresji receptorów KIR lub brak różnic w ekspresji ligandów HLA pomiędzy dawcą i biorcą, w tym w 30 przypadkach braki wyników typowania HLA uniemożliwiały szczegółową analizę. Niska liczba przypadków wykazujących zmianę licencjonowania w poszczególnych grupach i różnorodność grupy nie pozwoliły na analizę przeżycia w zależności od kategoryzacji grup dla pojedynczych układów.

W kolejnym etapie przeprowadzono ocenę współwystępowania poszczególnych układów licencjonowania, co przedstawia na następnej stronie wykres Venna na Rycinie 26.⁵⁹



Rycina 26. Wykres Venna prezentujący rozkład przypadków licencjonowania komórek NK w badanej grupie.

Pole A zawiera przypadki delicencjonowania (downward licensing), pole B przypadki, w których nie obserwowano zmian, a pole C przypadki licencjonowania wzrastającego.

Na podstawie rozkładu współwystępowania wyników, stwierdzono w każdym z badanych wypadków łączne pojawianie się efektów obniżających lub zwiększających licencjonowanie dla jednego z układów z wynikami neutralnymi dla innych układów, a w 3 przypadkach współistnienie dodatkowo efektów przeciwstawnych.

8. Wpływ wybranych parametrów na odnowę limfocytarną

Przeanalizowano, czy liczebność poszczególnych subpopulacji limfocytów zależy w sposób istotny od badanych parametrów.

1) Wpływ zgodności w antygenach HLA na odnowę limfocytarną

W Tabeli 10. zaprezentowano wartości p stanowiące o istotności statystycznej dla poszczególnych subpopulacji limfocytów w wybranych dniach. Porównywano, czy zgodności w antygenach HLA mają wpływ na odnowę limfocytarną. Punkty, w których wykazano istotność statystyczną zacytowano w Tabeli 10.

Tabela 10. Wpływ zgodności w antygenach HLA na odnowę limfocytarną

	zgodne / niezgodne	HLA	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DRB1	HLA-DQB1
30 dni po przeszczepie							
Subpopulacje limfocytów	T	0,0056**	0,0317*	0,072	0,522	0,0447*	0,107
	T CD4+	0,0095**	0,0321*	0,0096**	0,228	0,0085**	0,097
	T CD8+	0,0135*	0,0933	0,423	0,789	0,215	0,082
	B	0,0067**	0,0003**	0,0005**	0,019*	0,0001**	0,055
	NK	0,202	0,694	0,461	0,894	0,662	0,715
60 dni po przeszczepie							
Subpopulacje limfocytów	T	0,0014**	0,0271*	0,0122*	0,0005**	0,025*	0,267
	T CD4+	0,0092**	0,0426*	0,028*	0,011*	0,023*	0,471
	T CD8+	0,0024**	0,0558	0,02*	0,004**	0,068	0,304
	B	0,01*	0,0342*	0,0118*	0,115	0,004**	0,2
	NK	0,53	0,143	0,9029	0,266	0,639	0,498
90 dni po przeszczepie							
Subpopulacje limfocytów	T	0,495	0,417	0,222	0,156	0,136	0,655
	T CD4+	0,927	0,919	0,51	0,618	0,383	0,865
	T CD8+	0,445	0,292	0,222	0,136	0,152	0,777
	B	0,415	0,953	0,173	0,584	0,168	0,102
	NK	0,115	0,1215	0,444	0,411	0,273	0,914
180 dni po przeszczepie							
Subpopulacje limfocytów	T	0,297	0,235	0,792	0,702	0,274	0,253
	T CD4+	0,148	0,27	0,863	0,653	0,446	0,211
	T CD8+	0,485	0,387	0,547	0,718	0,334	0,446
	B	0,819	0,769	0,561	0,643	0,596	0,377
	NK	0,629	0,441	0,763	0,974	0,719	0,196
270 dni po przeszczepie							
Subpopulacje limfocytów	T	0,95	0,67	0,098	0,777	0,078	0,406
	T CD4+	0,456	0,767	0,1128	0,293	0,156	0,669
	T CD8+	0,903	0,87	0,126	0,525	0,108	0,556
	B	0,218	0,731	0,0447*	0,076	0,0101*	0,646
	NK	0,567	0,157	0,217	0,92	0,363	0,884

		365 dni po przeszczepie					
Subpopulacje limfocytów	T	0,411	0,461	0,833	0,959	0,478	0,7388
	T CD4+	0,982	0,273	0,383	0,427	0,295	0,98
	T CD8+	0,356	0,528	0,646	0,933	0,545	0,902
	B	0,513	0,313	0,236	0,543	0,185	0,439
	NK	0,948	0,108	0,588	0,62	0,77	0,807

Jak zaprezentowano w Tabeli 10., zgodności w antygenach HLA mają wpływ na odnowę limfocytarną, szczególnie w pierwszych 60 dniach od przeszczepu, natomiast w późniejszych punktach oceny nie wykazano istotnego związku. Wykazano, że u pacjentów z brakiem zgodności w poszczególnych antygenach HLA występuje istotnie statystycznie niższa liczebność wybranych subpopulacji limfocytów w określonych dniach, co przedstawiono szczegółowo w Tabeli 11. Najsilniej istotne okazały się zgodności w HLA-A, -B, -DRB1, słabiej HLA-C, natomiast w przypadku zgodności w HLA-DQB1 wychwycono tylko tendencję do wyższej liczby limfocytów T i B, ale uzyskane wartości p nie przejawiały istotności statystycznej. W odniesieniu do subpopulacji komórek NK wykazano, że zgodności w układzie HLA nie mają wpływu na ich rekonstrukcję.

Tabela 11. Mediana liczby wybranych subpopulacji limfocytów u pacjentów zgodnych i niezgodnych w poszczególnych antygenach HLA

analizowane antygeny	subpopulacja limfocytów	mediana jeśli dawca i biorca zgodny ¹⁾	mediana jeśli dawca i biorca niezgodny ¹⁾	dzień po przeszczepie
HLA	T	138	67	+30
	T CD4+	39	22	
	T CD8+	66	22	
	B	4	1	
	T	481	225	+60
	T CD4+	90	44	
	T CD8+	351	166	
	B	36	6	

HLA-A	T	121	63	+30
	T CD4+	36	23	
	B	3	0,5	
	T	389,5	109	+60
	T CD4+	76	44	
	B	25	6	
HLA-B	T CD4+	35	10,5	+30
	B	3	0	+60
	T	391	112,5	
	T CD4+	74	30,5	
	T CD8+	294	40	
	B	26	2	+270
	B	225	113	
HLA-C	B	3	1,5	+30
	T	456	196	+60
	T CD4+	82	44,5	
	T CD8+	310	115	
HLA-DRB1	T	113,5	62,5	+30
	T CD4+	34,5	8,5	
	B	3	0	
	T	389,5	104,5	+60
	T CD4+	74	35	
	B	25	2	
	B	252	96	+270

¹⁾ Mediana liczby limfocytów została wyrażona w: liczba komórek/ μ l.

2) Wpływ parametrów dotyczących receptorów KIR i układu ligand-receptor KIR na odnowę limfocytarną

Kolejnym etapem badań była analiza odnowy limfocytarnej w zależności od obecności w genotypie poszczególnych genów kodujących receptory KIR. W Tabeli 12. zaprezentowano wartości p stanowiące o istotności statystycznej dla poszczególnych subpopulacji limfocytów w wybranych dniach. Porównywano, czy stwierdzenie obecności określonego receptora KIR ma wpływ na odnowę

limfocytarną. Analogicznie w Tabeli 13. zaprezentowano wyniki porównania, czy stwierdzenie obecności określonego układu ligand-receptor KIR ma wpływ na odnowę limfocytarną. Punkty, w których wykazano istotność statystyczną zacytowano w Tabeli 12. i 13.

Tabela 12. Związek genotypu receptora KIR z odnową limfocytarną

	KIR	2DL1	2DL2	2DL3	2DL5	2DL5A	2DL5B	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4 del	2DS4 ins	2DS5	3DL1	3DS1	2DP1
30 dni po przeszczepie																
Subpopulacje limfocytów	T	0,6533	0,9818	0,3826	0,4399	0,3457	0,482	0,3787	0,6635	0,7954	0,9057	0,2948	0,1807	0,775	0,5228	0,3921
	T CD4+	0,4385	0,6832	0,3186	0,5143	0,5904	0,558	0,655	0,2538	0,9361	0,9946	0,5199	0,2732	0,9839	0,5936	0,585
	T CD8+	0,8025	0,8331	0,4369	0,3907	0,2483	0,4221	0,2899	0,9016	0,7685	0,7104	0,5997	0,2624	0,588	0,6165	0,431
	B	0,8749	0,1896	0,2184	0,4003	0,4374	0,4423	0,8738	0,4227	0,6229	0,168	0,4156	0,4219	0,4826	0,7682	0,3701
	NK	0,3627	0,2803	0,6155	0,6428	0,8552	0,576	0,4293	0,4362	0,9325	0,0872	0,2315	0,6749	0,5516	0,9403	0,3752
60 dni po przeszczepie																
Subpopulacje limfocytów	T	0,9902	0,8894	0,7097	0,6735	0,7635	0,5041	0,9436	0,693	0,6026	0,2074	0,1055	0,998	0,2547	0,5943	0,6271
	T CD4+	0,3849	0,9043	0,224	0,9931	0,4978	0,8869	0,3801	0,4485	0,8433	0,0800	0,2091	0,4656	0,6365	0,4549	0,7306
	T CD8+	0,8463	0,9569	0,9715	0,6465	0,6481	0,5068	0,9649	0,6109	0,5461	0,214	0,223	0,8213	0,2326	0,4488	0,6906
	B	0,4527	0,2877	0,7108	0,8181	0,7982	0,9523	0,9487	0,1471	0,8102	0,6225	0,2074	0,5292	0,6014	0,356	0,7993
	NK	0,8204	0,3872	0,9162	0,2524	0,2476	0,3105	0,8191	0,4928	0,823	0,0875	0,683	0,2274	0,3391	0,6622	0,2368
90 dni po przeszczepie																
Subpopulacje limfocytów	T	0,9271	0,7115	0,655	0,4535	0,9538	0,5463	0,287	0,6987	0,4375	0,1641	0,0730	0,6401	0,5595	0,5542	0,77
	T CD4+	0,2693	0,7535	0,1718	0,9956	0,7378	0,845	0,4214	0,6363	0,743	0,1625	0,024*	0,5538	0,8372	0,4236	0,7528
	T CD8+	0,8394	0,7129	0,9701	0,2616	0,9164	0,3255	0,3167	0,828	0,3495	0,1232	0,109	0,901	0,5785	0,7099	0,6366
	B	0,4911	0,4915	0,1191	0,3723	0,6883	0,3033	0,3074	0,0543	0,9188	0,2407	0,049*	0,8278	0,2711	0,3764	0,4565
	NK	0,8445	0,5521	0,9425	0,5467	0,6883	0,523	0,6008	0,8238	0,4196	0,7469	0,3067	0,4621	0,4984	0,3166	0,3008
180 dni po przeszczepie																
Subpopulacje limfocytów	T	0,7546	0,3372	0,8946	0,485	0,7425	0,3758	0,6623	0,5717	0,4084	0,6474	0,6173	0,7276	0,6529	0,9794	0,2012
	T CD4+	0,2433	0,1497	0,3978	0,1764	0,8586	0,0839	0,7735	0,483	0,0533	0,5796	0,84	0,9294	0,4514	0,8846	0,2987
	T CD8+	0,9391	0,3978	0,9849	0,971	0,8961	0,9088	0,7841	0,6401	0,7387	0,5721	0,3579	0,9146	0,6726	0,7175	0,1771
	B	0,8458	0,6657	0,6069	0,9052	0,2403	0,7903	0,2818	0,1238	0,1368	0,572	0,2174	0,2781	0,7698	0,5859	0,5908
	NK	0,8295	0,6613	0,6655	0,7868	0,4997	0,8959	0,8707	0,3168	0,1579	0,2371	0,7101	0,954	0,383	0,8409	0,1622

270 dni po przeszczepie																
Subpopulacje limfocytów	T	0,8026	0,2241	0,8985	0,0928	0,6706	0,2721	0,4549	0,3019	0,1883	0,4791	0,884	0,423	0,4655	0,475	0,3197
	T CD4+	0,663	0,0652	0,5602	0,016*	0,8235	0,039*	0,5575	0,1811	0,0573	0,6824	0,7483	0,5547	0,4352	0,5089	0,4838
	T CD8+	0,9715	0,2981	0,5602	0,4374	0,912	0,8373	0,6733	0,4068	0,3926	0,2724	0,4594	0,7038	0,5369	0,6956	0,2743
	B	0,1245	0,8075	0,82	0,3946	0,8105	0,5434	0,98	0,3857	0,146	0,3778	0,9021	0,4192	0,9731	0,8946	0,912
	NK	0,602	0,5727	0,7225	0,3338	0,7356	0,5948	0,6267	0,2735	0,0849	0,7443	0,3526	0,7424	0,5005	0,411	0,3569
365 dni po przeszczepie																
Subpopulacje limfocytów	T	0,763	0,2822	0,8674	0,3016	0,8566	0,552	0,9444	0,6639	0,364	0,1106	0,6258	0,8514	0,32	0,5968	0,1531
	T CD4+	0,9707	0,2724	0,4862	0,1152	0,9531	0,1866	0,8702	0,9426	0,1707	0,1987	0,915	0,9281	0,4249	0,669	0,3303
	T CD8+	0,7518	0,4366	0,8451	0,8443	0,8875	0,8281	0,8685	0,6592	0,6212	0,0683	0,9133	0,8674	0,3858	0,8375	0,1391
	B	0,2574	0,6087	0,8758	0,3026	0,7227	0,2119	0,5845	0,4055	0,048*	0,3038	0,998	0,2273	0,9815	0,6486	0,8894
	NK	0,7743	0,1791	0,9972	0,6716	0,7721	0,9064	0,7472	0,2517	0,6212	0,4637	0,4698	0,8567	0,4878	0,5968	0,5867

Tabela 13. Wpływ obecności układu ligand-receptor KIR na odnowę limfocytarną

		kody literowe A-I jak w Tabeli 5. dla układów ligand-receptor KIR ¹⁾	A	B	C	D	E	F	G	H	I
30 dni po przeszczepie											
Subpopulacje limfocytów	T		0,875	0,0548	0,0623	0,45	0,393	0,269	0,454	0,45	0,421
	T CD4+		0,517	0,0389*	0,0411*	0,313	0,194	0,155	0,167	0,583	0,735
	T CD8+		0,494	0,0855	0,0657	0,226	0,306	0,512	0,431	0,765	0,503
	B		0,285	0,476	0,613	0,768	0,548	0,507	0,351	0,714	0,861
	NK		0,226	0,611	0,509	0,245	0,576	0,691	0,215	0,569	0,532
60 dni po przeszczepie											
Subpopulacje limfocytów	T		0,48	0,784	0,885	0,243	0,101	0,864	0,727	0,485	0,601
	T CD4+		0,25	0,558	0,344	0,532	0,491	0,943	0,683	0,892	0,685
	T CD8+		0,614	0,636	0,963	0,382	0,191	0,566	0,643	0,549	0,818
	B		0,584	0,24	0,113	0,232	0,097	0,238	0,383	0,097	0,428
	NK		0,396	0,929	0,83	0,355	0,059	0,612	0,741	0,58	0,975

90 dni po przeszczepie										
Subpopulacje limfocytów	T	0,977	0,261	0,791	0,545	0,305	0,801	0,374	0,505	0,942
	T CD4+	0,246	0,711	0,866	0,545	0,397	0,557	0,486	0,358	0,646
	T CD8+	0,889	0,187	0,705	0,651	0,256	0,877	0,325	0,598	0,784
	B	0,933	0,353	0,024*	0,198	0,0624	0,95	0,861	0,271	0,339
	NK	0,36	0,928	0,696	0,348	0,315	0,501	0,698	0,422	0,935
180 dni po przeszczepie										
Subpopulacje limfocytów	T	0,284	0,337	0,543	0,37	0,71	0,26	0,643	0,819	0,799
	T CD4+	0,49	0,678	0,54	0,36	0,819	0,653	0,998	0,658	0,221
	T CD8+	0,213	0,299	0,623	0,646	0,912	0,244	0,63	0,632	0,756
	B	0,6	0,718	0,129	0,511	0,918	0,57	0,774	0,516	0,618
	NK	0,1313	0,639	0,237	0,212	0,571	0,694	0,322	0,739	0,435
270 dni po przeszczepie										
Subpopulacje limfocytów	T	0,257	0,479	0,494	0,869	0,462	0,677	0,632	0,456	0,0667
	T CD4+	0,977	0,846	0,378	0,369	0,188	0,647	0,313	0,304	0,01*
	T CD8+	0,181	0,407	0,56	0,956	0,673	0,964	0,992	0,599	0,204
	B	0,547	0,675	0,287	0,671	0,902	0,339	0,6	0,605	0,0367*
	NK	0,37	0,616	0,419	0,568	0,777	0,118	0,016*	0,382	0,998
365 dni po przeszczepie										
Subpopulacje limfocytów	T	0,142	0,162	0,851	0,9	0,494	0,428	0,294	0,185	0,024*
	T CD4+	0,828	0,176	0,578	0,761	0,451	0,313	0,084	0,111	0,013*
	T CD8+	0,107	0,339	0,769	0,818	0,416	0,754	0,762	0,395	0,203
	B	0,132	0,285	0,165	0,903	0,723	0,146	0,333	0,908	0,0128*
	NK	0,187	0,21	0,348	0,95	0,755	0,256	0,029*	0,906	0,863

¹⁾ Przyjęto kody literowe A-I jak w Tabeli 5.

W Tabeli 14. przedstawiono szczegółowo, że u pacjentów, u których występuje receptor 2DL5 stwierdzono istotnie statystycznie mniejszą liczbę limfocytów T CD4+ w dniu +270, u pacjentów, u których występuje receptor 2DL5B stwierdzono istotnie statystycznie mniejszą liczbę limfocytów T CD4+ w dniu +270, u pacjentów, u których występuje receptor 2DS3 stwierdzono istotnie statystycznie mniejszą liczbę limfocytów B w dniu +365, u pacjentów, u których występuje receptor 2DS4ins stwierdzono istotnie statystycznie większą liczbę limfocytów T CD4+ oraz B w dniu +90. Mediana liczby limfocytów dla wymienionych zmiennych znajduje się w Tabeli 14. poniżej.

Tabela 14. Mediana liczby wybranych subpopulacji limfocytów u pacjentów z ekspresją lub brakiem ekspresji określonego receptora KIR

analizowany receptor	subpopulacja limfocytów	mediana jeśli receptor nieobecny ¹⁾	mediana jeśli receptor obecny ¹⁾	dzień po przeszczepie
2DL5	T CD4+	449	267	+270
2DL5B	T CD4+	417	267	+270
2DS3	B	381	255	+365
2DS4ins	T CD4+	86	129	+90
	B	10	59	+90

¹⁾ Mediana liczby limfocytów została wyrażona w: liczba komórek/ μ l.

W Tabeli 15. przedstawiono szczegółowo, że u pacjentów, u których występuje układ HLA A3 lub A11 KIR / 3DL2 (kod B) stwierdzono istotnie statystycznie wyższą liczbę limfocytów T w dniu +30, u pacjentów, u których występuje układ haplotyp KIR B/x / KIR 2DS2 (kod C) stwierdzono istotnie statystycznie wyższą liczbę limfocytów TCD4+ w dniu +30 oraz B w dniu +90, u pacjentów, u których występuje układ HLA z gr. C2 / KIR 2DS1 (kod G) stwierdzono istotnie statystycznie niższą liczbę komórek NK w dniu +270 oraz +365, u pacjentów, u których występuje układ HLA z gr. Bw4 / KIR 3DS1 (kod I) stwierdzono istotnie statystycznie niższą liczbę limfocytów T i B w dniu +270 oraz +365. Mediana liczby limfocytów dla wymienionych zmiennych znajduje się w Tabeli 15. na następnej stronie.

Tabela 15. Mediana liczby wybranych subpopulacji limfocytów u pacjentów z ekspresją lub brakiem ekspresji określonego układu ligand-receptor KIR

kod literowy dla analizowanego układu ¹⁾	subpopulacja limfocytów	mediana jeśli układ nieobecny ²⁾	mediana jeśli układ obecny ²⁾	dzień po przeszczepie
B	T	68	144	+30
	T CD4+	24	47	+30
C	T CD4+	15	36	+30
	B	5	48	+90
G	NK	330	157	+270
	NK	209	160	+365
I	T CD4+	695,5	286	+270
	B	433	172	
	T	2160	1272	+365
	T CD4+	1087	489	
	B	532	272	

¹⁾ Przyjęto kody literowe A-I jak w Tabeli 5.

²⁾ Mediana liczby limfocytów została wyrażona w: liczba komórek/ μ l.

3) Wpływ innych parametrów na odnowę limfocytarną

W Tabeli 16. zaprezentowano wartości p stanowiące o istotności statystycznej dla poszczególnych subpopulacji limfocytów w wybranych dniach. Porównywano, czy źródło komórek macierzystych, rodzaj kondycjonowania oraz zastosowanie ATG mają wpływ na odnowę limfocytarną. Punkty, w których wykazano istotność statystyczną zacieniono w Tabeli 16.

Tabela 16. Wpływ innych parametrów na odnowę limfocytarną

	porównywane parametry	źródło komórek macierzystych (aferezat/krew szpikowa)	rodzaj kondycjonowania (busulfan/treosulfan/inne)	zastosowanie ATG (tak/nie)
30 dni po przeszczepie				
Subpopulacje limfocytów	T	0,456	0,281	0,0398*
	T CD4+	0,741	0,131	0,0292*
	T CD8+	0,339	0,316	0,302
	B	0,0108*	0,147	0,0066**
	NK	0,0393*	0,074	0,0019**

60 dni po przeszczepie				
Subpopulacje limfocytów	T	0,668	0,778	0,4422
	T CD4+	0,838	0,618	0,975
	T CD8+	0,744	0,649	0,202
	B	0,888	0,197	0,595
	NK	0,016*	0,117	0,041*
90 dni po przeszczepie				
Subpopulacje limfocytów	T	0,837	0,392	0,654
	T CD4+	0,769	0,395	0,191
	T CD8+	0,943	0,438	0,303
	B	0,344	0,495	0,093
	NK	0,08	0,523	0,555
180 dni po przeszczepie				
Subpopulacje limfocytów	T	0,506	0,352	0,99
	T CD4+	0,515	0,365	0,177
	T CD8+	0,473	0,474	0,778
	B	0,477	0,334	0,126
	NK	0,644	0,188	0,658
270 dni po przeszczepie				
Subpopulacje limfocytów	T	0,226	0,849	0,955
	T CD4+	0,127	0,908	0,29
	T CD8+	0,348	0,687	0,898
	B	0,605	0,657	0,906
	NK	0,308	0,322	0,54
365 dni po przeszczepie				
Subpopulacje limfocytów	T	0,338	0,755	0,876
	T CD4+	0,048*	0,724	0,361
	T CD8+	0,528	0,839	0,602
	B	0,622	0,137	0,291
	NK	0,408	0,523	0,803

Jak zaprezentowano w Tabeli 16. źródło komórek macierzystych ma wpływ na odnowę limfocytarną w wybranych punktach czasu od przeszczepu i dla wybranych subpopulacji (istotnie statystycznie różnice w medianach liczby limfocytów podano szczegółowo w Tabeli 17.). Rodzaj kondycjonowania nie wpływa natomiast na rekonstytucję limfocytów. Najsilniej natomiast prezentuje się związek pomiędzy zastosowaniem ATG a odnową.

Tabela 17. Mediana liczby wybranych subpopulacji limfocytów u pacjentów z różnym źródłem komórek macierzystych

subpopulacja limfocytów	mediana jeśli aferezat z krwi obwodowej ¹⁾	mediana jeśli krew szpikowa ¹⁾	dzień po przeszczepie
B	3	1	+30
NK	170	113	
NK	205	148	+60
T CD4+	541	322	+365

¹⁾ Mediana liczby limfocytów została wyrażona w: liczba komórek/ μ l.

Jak przedstawiono w Tabeli 17. powyżej u pacjentów, u których zastosowano krew szpikową jako źródło komórek macierzystych stwierdzono istotnie statystycznie mniejszą liczbę limfocytów B i komórek NK w dniu +30, komórek NK w dniu +60 i limfocytów T CD4+ w dniu +365.

Tabela 18. Mediana liczby wybranych subpopulacji limfocytów u pacjentów z różnym rodzajem profilaktyki GvHD

subpopulacja limfocytów	mediana jeśli stosowano ATG ¹⁾	mediana jeśli nie stosowano ATG ¹⁾	dzień po przeszczepie
T	75	118	+30
T CD 4+	28	52	
B	3	1	
NK	171	82	
NK	205	157	+60

¹⁾ Mediana liczby limfocytów została wyrażona w: liczba komórek/ μ l.

Jak przedstawiono w Tabeli 18. powyżej u pacjentów, u których zastosowano ATG w profilaktyce GvHD stwierdzono istotnie statystycznie mniejszą liczbę limfocytów T i T CD4+, a istotnie wyższą liczbę limfocytów B i komórek NK w dniu +30 oraz istotnie wyższą liczbę komórek NK w dniu +60.

9. Wpływ wybranych parametrów na chimeryzm

Do celów niniejszej pracy doktorskiej przeanalizowano wyniki minimalnego i maksymalnego chimeryzmu oznaczone w okresie od dnia odnowy granulocytarnej do +30 dnia od transplantacji. Następnie za pomocą testu chi-2 sprawdzono, czy wystąpienie maksymalnego mieszanego chimeryzmu w wymienionym okresie jest zależne czy niezależne od poszczególnych analizowanych czynników. Porównywane parametry umieszczono w Tabeli 19., a w kolumnie p wpisano liczbę p stanowiącą o istotności statystycznej.

Tabela 19. Analiza chimeryzmu

Wykaz porównywanych parametrów	p
płeć pacjenta	
kobieta vs. mężczyzna	0,8778
zgodność dawcy i biorcy w układzie HLA	
zgodny vs. częściowo zgodny	0,0017**
zgodność dawcy i biorcy w układzie HLA-A	
zgodny vs. niezgodny	0,3081
zgodność dawcy i biorcy w układzie HLA-B	
zgodny vs. niezgodny	0,9999
zgodność dawcy i biorcy w układzie HLA-C	
zgodny vs. niezgodny	0,0848
zgodność dawcy i biorcy w układzie HLA-DRB1	
zgodny vs. niezgodny	0,4463
zgodność dawcy i biorcy w układzie HLA-DQB1	
zgodny vs. niezgodny	0,6813
wskazanie do przeszczepu	
choroba nowotworowa vs. nienowotworowa	0,0001**
źródło komórek macierzystych CD 34+	
aferezat z krwi obwodowej vs. krew szpikowa	0,1295
rodzaj kondycjonowania	
chemioterapia mieloablacyjna z busulfanem vs. chemioterapia mieloablacyjna z treosulfanem vs. inny rodzaj kondycjonowania	0,0003**
rodzaj stosowanej profilaktyki GvHD	
z ATG vs. bez ATG	0,1525

receptor KIR	
2DL1 obecny vs. nieobecny	nie badano ¹⁾
2DL2 obecny vs. nieobecny	0,1391
2DL3 obecny vs. nieobecny	0,5236
2DL5 obecny vs. nieobecny	0,9461
2DL5A obecny vs. nieobecny	0,1611
2DL5B obecny vs. nieobecny	0,6946
2DS1 obecny vs. nieobecny	0,0488*
2DS2 obecny vs. nieobecny	0,1835
2DS3 obecny vs. nieobecny	0,1351
2DS4del obecny vs. nieobecny	0,9999
2DS4ins obecny vs. nieobecny	0,2933
2DS5 obecny vs. nieobecny	0,7529
3DL1 obecny vs. nieobecny	nie badano ¹⁾
3DS1 obecny vs. nieobecny	0,1429
2DP1 obecny vs. nieobecny	nie badano ¹⁾
KIR B/x obecny vs. nieobecny	0,2266
układ receptor KIR – ligand HLA	
układ A obecny vs. nieobecny	0,0314*
układ B obecny vs. nieobecny	0,3787
układ C obecny vs. nieobecny	0,5322
układ D obecny vs. nieobecny	0,6433
układ E obecny vs. nieobecny	0,4442
układ F obecny vs. nieobecny	0,5930
układ G obecny vs. nieobecny	0,8799
układ H obecny vs. nieobecny	0,9999
układ I obecny vs. nieobecny	0,7020

¹⁾ W analizach pominięto oznaczone zmienne ze względu na małą liczbę pacjentów reprezentujących daną cechę.

²⁾ Przyjęto kody literowe A-I jak w Tabeli 5.

Wykazano, że wyniki chimeryzmu (całkowity vs. mieszany) zależą znamienne od choroby zasadniczej, która stanowi wskazanie do przeszczepu i zgodności w HLA, przy czym żaden z poszczególnych loci HLA nie wykazał w tym zakresie istotności statystycznej. Następnie wykazano, że uzyskanie wyniku chimeryzmu zależy istotnie od rodzaju kondycjonowania, obecności receptora 2DS1 oraz obecności układu A (HLA C04 lub A11 / KIR 2DS4). Pozostałe analizowane parametry nie wykazały istotności statystycznej.

W Tabeli 20. przedstawiono szczegółowo odsetek populacji z chimeryzmem całkowitym i mieszanym wraz z parametrami, których analiza wykazała istotność statystyczną. Wykazano, że w grupie pacjentów z mieszanym chimeryzmem istotnie więcej pacjentów miało zgodność w układzie HLA. Analizując grupy z różnym rodzajem kondycjonowania wykazano, że wśród pacjentów poddanych kondycjonowaniu z treosulfanem istotnie więcej uzyskało pełny chimeryzm dawcy niż w pozostałych rodzajach kondycjonowania. Następnie w grupie pacjentów z mieszanym chimeryzmem istotnie więcej było pacjentów przeszczepionych od dawcy posiadającego ekspresję receptora 2DS1. Wreszcie w grupie pacjentów z mieszanym chimeryzmem istotnie więcej pacjentów nie posiadało ekspresji układu A (HLA C04 lub A11 / KIR 2DS4).

Tabela 20. Odsetek populacji z chimeryzmem całkowitym i mieszanym wobec wybranych parametrów (istotnych statystycznie)

porównywany parametr	chimeryzm całkowity	chimeryzm mieszany
zgodność w HLA		
tak	50,9%	75,4%
nie	49,1%	24,6%
wskazanie do przeszczepu		
ch. nowotworowa	58,4%	21,1%
ch. nienowotworowa	41,6%	78,9%
rodzaj kondycjonowania		
z busulfanem	39,8%	30,3%
z treosulfanem	39,8%	22,4%
inne	20,4%	47,3%
receptor 2DS1		
obecny	42,9%	58,7%
nieobecny	57,1%	41,3%
układ A		
obecny	31,2%	10%
nieobecny	68,7%	90%

V DYSKUSJA

Analiza czynników wpływających na wyniki przeżycia, odnowę limfocytarną była konieczna w celu potwierdzenia typowego charakteru grupy badanej. Ponadto rozpatrywanie wpływu układu receptorów KIR i w konsekwencji aktywności komórek NK na efekty kliniczne, chimeryzm i odnowę immunologiczną po przeszczepieniu szpiku nie jest możliwe przy pominięciu znanych czynników modyfikujących badane parametry.

1. Wpływ choroby podstawowej na wyniki leczenia i występowanie niekorzystnych zdarzeń po allo-HSCT

W przypadku pacjentów z chorobami nienowotworowymi prawdopodobieństwo 2- i 5-letniego całkowitego przeżycia jest identyczne. Za ten wynik może odpowiadać fakt, że ryzyko zgonu jest największe w ciągu pierwszych 2 lat po przeszczepie, gdyż wtedy istnieje największe obciążenie wynikające z toksyczności leczenia, a także największe ryzyko poważnych infekcji i wystąpienia GvHD⁶⁰. Według zaprezentowanych tu wyników prawdopodobieństwo OS po 5 latach u pacjentów z rozpoznaniem onkologicznym jest o 10 punktów procentowych niższe niż po 2 latach, co przede wszystkim wynika z ryzyka nawrotu choroby nowotworowej, który jest uznany za główną przyczynę niepowodzenia leczenia u pacjentów po allogenicznym przeszczepieniu szpiku. Moje wyniki potwierdzają informację, że brak nawrotu choroby nowotworowej w ciągu 2-4 lat po przeszczepieniu szpiku jest głównym warunkiem długotrwałego przeżycia⁶¹. Ograniczenie analizy przeżycia do okresu 5 lat nie pozwala na wykrycie skutków późnych powikłań (np. łagodna postać cGvHD, powikłania sercowo-naczyniowe, nowotwory indukowane przez leczenie), które mogą wywierać wpływ na przeżycie w późniejszym okresie.

Analogiczne wyniki uzyskano w badaniach EFS, które było wyższe w przypadku rozpoznania nienowotworowych, co wynika z braku niekorzystnego efektu nawrotu choroby nowotworowej. Analiza TRM nie wykazała istotnej statystycznie różnicy pomiędzy dziećmi z rozpoznaniem nowotworowym a nienowotworowym. Ta obserwacja sugeruje, że występowanie śmiertelnych powikłań jest przede wszystkim

związane z czynnikami zależnymi od procedury, jak rodzaj przeszczepu lub protokół kondycjonowania, a w mniejszym stopniu z rozpoznaniem.

2. Wpływ zgodności w HLA między dawcą i biorcą na wyniki leczenia i występowanie niekorzystnych zdarzeń oraz odnowę limfocytarną

Najsilniejszy wpływ na przeżycie pacjentów wywierał stopień zgodności między dawcą i biorcą w układzie HLA. Obserwacja ta podkreśla, jak istotne są czynniki związane z doбором optymalnego dawcy. Związek prawdopodobieństwa OS i EFS ze zgodnością w HLA-A, -B, -C i -DRB1 potwierdza obecną strategię doboru dawcy, nie wykazano natomiast takiej roli dla locus -DQB1. Z kolei w analizie TRM zaobserwowano efekt tylko dla HLA-B. Efekt zgodności w HLA pomiędzy dawcą i biorcą ma dominujący wpływ na wyniki allogenicznego przeszczepienia. Niezgodności w HLA-A, -B, -C, -DRB1 stanowią istotny czynnik ryzyka poprzyszczepowych komplikacji (wystąpienia GvHD, wzrostu śmiertelności), natomiast niezgodności w HLA-DQB1 wydają się być lepiej tolerowane, co jest zgodne z obserwacjami literaturowymi⁶².

Kolejnym czynnikiem analizowanym w aspekcie wyników przeżycia i ryzyka nawrotów nowotworów była odnowa immunologiczna, która jest wieloetapowym procesem i może trwać do 2 lat od przeszczepienia^{63,64}. Według danych literaturowych najważniejsze czynniki o udowodnionym wpływie na odnowę hematologiczną, w tym rekonstrukcję układu białokrwinkowego stanowią: źródło komórek macierzystych, sposób kondycjonowania, wiek biorcy i rodzaj leczenia immunosupresyjnego⁶⁵.

Wyniki mojej pracy ukazały wpływ zgodności w HLA na odnowę limfocytarną, który jest wyraźnie istotny w pierwszych 2 miesiącach po transplantacji i dotyczy wszystkich subpopulacji limfocytarnych, poza komórkami NK. Odnowa odporności nieswoistej, której elementem są komórki NK, jest mniej zależna od zgodności w HLA niż odnowa odporności specyficznej. Na podstawie tej obserwacji można wnioskować, że aktywność komórek NK i czynniki modyfikujące ich reaktywność mogą się manifestować w bardziej przewidywalny sposób po każdym rodzaju allo-HSCT i z powodu tej uniwersalności zasługują na uwagę.

3. Wpływ genotypu KIR i układów receptor KIR – ligand na wyniki leczenia i występowanie niekorzystnych zdarzeń oraz odnowę limfocytarną

Ochrona ze strony układu odpornościowego przed zakażeniami oportunistycznymi i nawrotami choroby nowotworowej oraz z drugiej strony jego udział w wywoływaniu nieinfekcyjnych powikłań tworzą skomplikowany model, w którym liczebność komórek efektorowych i ich reaktywność przekładają się na wyniki przeżycia. W tym aspekcie zaobserwowałam kliniczny wpływ zarówno ekspresji pojedynczych genów, jak i wpływu interakcji receptor KIR – ligand HLA.

Analiza OS wykazała korzystny, istotny statystycznie wpływ układów: HLA z gr. C2/KIR 2DL1 (układ F) oraz HLA z gr. Bw4/KIR 3DS1 (układ I). Obecność układu F potwierdzono u ponad 50% badanej populacji, a obecność układu I u niemal jednej trzeciej badanej populacji, wobec czego wyniki te warte są szczegółowej analizy. Receptor 2DL1 jest receptorem hamującym i oddziałuje z ligandem w postaci HLA należącym do grupy C2. Obecność ligandu C2 u biorcy dla receptora 2DL1 u dawcy mogła wpłynąć na obniżenie alloreaktywności komórek NK dawcy. Skutkiem obecności układu F były lepsze wyniki OS i EFS po 2 i 5 latach, ale nie obserwowano wpływu na TRM, ani na odnowę limfocytarną. Z kolei receptor 3DS1 jest receptorem aktywującym i oddziałuje z ligandem w postaci HLA z grupy Bw4. Efektem obecności u biorcy liganda Bw4 dla receptorów KIR 3DS1 u dawcy powinna być wyższa alloreaktywność komórek NK. Skutkiem obecności układu I były lepsze wyniki OS i EFS po 2 i 5 latach, a także lepsza odnowa limfocytarna w +270 i +365 dobie po przeszczepie, ale nie obserwowano wpływu na TRM. Interesująca jest obserwacja, że obydwa układy (F i I) mają przeciwstawny wpływ na mechanizmy aktywacji komórek NK, natomiast oba wiążą się z poprawą przeżycia po alloHSCT.

W analizie ekspresji poszczególnych receptorów KIR wykazano związek pomiędzy obecnością receptora 2DL5 oraz 2DL5B a wyższym prawdopodobieństwem TRM. Częstość występowania wymienionych receptorów w badanej populacji wynosi prawie 60% dla receptora 2DL5 oraz ponad 56% dla receptora 2DL5B. Receptory 2DL5 i 2DL5B są receptorami hamującymi, a odpowiedni dla nich ligand HLA nie jest znany. Obecność wymienionych receptorów 2DL5 i 2DL5B wiązała się z gorszą IR w zakresie limfocytów T CD4+ w +270 dobie od przeszczepu.

Kolejnymi czynnikami, które zaobserwowałam w badaniach, o potencjalnej roli modyfikującej odpowiedź odpornościową były różnice odnowy immunologicznej w zależności od składu receptorów KIR i interakcji receptor-ligand.

Analizując związek genotypu receptorów KIR z odnową limfocytarną obserwowałam, że statystycznie istotne niższe wartości liczby limfocytów występowały, gdy dawcy wykazywali ekspresję następujących receptorów KIR: 2DL5 i 2DL5B, a także 2DS3, a z kolei w przypadku ekspresji receptora 2DS4ins widoczna była lepsza odnowa limfocytarna. W przypadku układów ligand-receptor KIR wykazano korzystny istotny statystycznie wpływ układów HLA A3 lub A11/KIR 3DL2 (układ B) i haplotyp KIR B/x/KIR 2DS2 (układ C), gdzie zaobserwowano wyższą liczbę komórek odpornościowych, a niekorzystny istotny statystycznie wpływ układów HLA z gr. C2/KIR 2DS1 (układ G) oraz HLA z gr. Bw4/KIR 3DS1 (układ I), gdzie IR charakteryzowała się mniejszą liczebnością wybranych subpopulacji limfocytów.

W dostępnych danych literaturowych powtarzalna jest klasyczna obserwacja, że niezgodności między receptorami KIR dawców a ligandami biorców odpowiadają za alloreaktywność komórek NK, co wiąże się z ochroną przed wznową choroby nowotworowej i wydłuża przeżycie chorych^{39,41,66}. Przytoczone wyniki zostały uzyskane u dorosłych pacjentów po allo-HSCT, ale nie potwierdziły się w przypadku populacji pediatrycznej⁶⁷.

Brak ligandu KIR na powierzchni komórki docelowej pobudza cytotoksyczność komórek NK, co jest określane jako „missing self hypothesis”, ale rola pojedynczych receptorów KIR i wynikających z nich efektów aktywacji lub hamowania jest słabo poznana. Próba oszacowania udziału genów KIR w przeszczepach szpiku wymaga nie tylko analizy genotypu i określenia repertuaru receptorów KIR u dawcy przeszczepu, ale konieczne jest zestawienie tych informacji z danymi o obecności lub braku ligandu dla danego receptora. Autorzy takich analiz określają je „teorią brakującego ligandu”^{68,69}. Co ciekawe, Katharine Hsu wraz ze współpracownikami oraz Ugur Sahin i wsp. udowodnili, że niezgodności w układach receptor KIR dawcy – ligand biorcy mają pozytywny wpływ także na wyniki leczenia w przypadku biorców, gdzie dawcą jest zgodne w HLA rodzeństwo^{70,71}.

Wiele z opublikowanych prac przedstawiających rolę receptorów KIR po przeszczepieniu szpiku prezentuje sprzeczne rezultaty, co zostało zebrane w przeglądzie systematycznym Gao i współpracowników⁷². Przynajmniej kilka z ujętych w tym przeglądzie prac prezentuje wyniki grup pacjentów o liczebności

podobnej do mojego badania (od 50 do 220 pacjentów) i bardzo podobnej charakterystyce klinicznej (grupy różnorodne pod względem rozpoznań). Przykładowo, Cook i wsp. wykazali niższe OS przy HLA z gr. C2/KIR 2DS2⁷³. Z kolei, Verheyden i wsp. badali 65 biorców przeszczepów od zgodnych dawców rodzinnych i wykazali niższe ryzyko wznowy przy koekspresji dwóch aktywnujących receptorów KIR: 2DS1 i 2DS2 u dawcy komórek ($p=0.03$)⁷⁴. Należy podkreślić, że praca analizowała zarówno dzieci jak i dorosłych, a badana kohorta pacjentów składała się z pacjentów z rozpoznaniem ALL (10), AML (22) i CML (27). Duży odsetek pacjentów z CML mógł odpowiadać za ujawnienie się efektu immunoterapeutycznego, który jest szczególnie silny w przypadku tego rozpoznania. Dodatkowo w 34 procedurach zastosowano T-deplecję, która przez zahamowanie rekonstytucji limfocytów T mogła uwidocznić efekty zależne od komórek NK. Wyniki moich badań nie wykazały wpływu ekspresji receptorów 2DS1 i 2DS2 na przeżycie chorych.

Schellekens i wsp. przeanalizowali wyniki przeszczepień od rodzeństwa u 83 dorosłych z różnymi nowotworami hematologicznymi⁷⁵. W badaniu wykazano lepsze wyniki OS u pacjentów przeszczepionych od dawcy wykazującego ekspresję KIR 2DS1, w przypadku braku ekspresji rozpoznawanych przez ten receptor ligandów C2 u biorcy. Przeciwnie wyniki opublikowali Neuchel i wsp., który wykazał mniejsze ryzyko wznowy nowotworu linii mieloidalnej u pacjentów HLA-C1 ujemnych przeszczepionych od dawców wykazującego ekspresję KIR 2DS1⁷⁶ oraz Tordai i wsp., który udowodnił pozytywny wpływ na OS receptora KIR 2DS1 u biorców HLA-C2 dodatnich⁷⁷. Natomiast moje wyniki udowadniają niekorzystny efekt ekspresji receptora 2DS1 wraz z ligandami z grupy HLA C2 (układ G) na rekonstytucję immunologiczną, ale nie na wyniki przeżycia. Ponadto cytowane badania wykazały, że ekspresja receptora 2DS5 u biorcy lub zarówno dawcy i biorcy była związana z wyższym ryzykiem wznowy białaczki, moje wyniki jednak nie potwierdzają tej obserwacji.

Wu i wsp. wykazali większe ryzyko wznowy i niższe OS przy ekspresji receptora 2DS3, ale w badanej przeze mnie grupie nie zaobserwowałam tego efektu⁷⁸. W moich obserwacjach obecność KIR 2DS3 wiązała się natomiast z gorszą IR w +365 dobie w zakresie limfocytów B.

Impola i wsp. wykazali mniejsze ryzyko nawrotu AML u dorosłych przeszczepianych od zgodnego rodzeństwa wykazującego ekspresję receptorów 2DL2 lub 2DS2, ta obserwacja nie powtarza się w moich analizach⁷⁹. Podobnie Heatley i wsp. wykazali lepsze OS przy ekspresji receptora 2DS2⁸⁰. W odróżnieniu od

poprzedników Cardazo i wsp. wykazali niższe OS i EFS przy ekspresji receptora 2DS2⁸¹.

Wiele z przytoczonych prac analizowało rolę układu KIR i ligandów w nowotworach hematologicznych, szczególnie linii mieloidalnej u dorosłych, co może odpowiadać za brak efektu w badanej przeze mnie grupie. Zdecydowanie mniej jest badań potwierdzających rolę genów KIR w populacji pediatrycznej, przy czym odmienności biologiczne białaczek dziecięcych nie pozwalają na proste przenoszenie wniosków z populacji dorosłych⁸².

Powtarzalne w wielu źródłach obserwacje dotyczą jedynie korzystnego znaczenia rokowniczego haplotypu B/x, co zostało udowodnione na grupach pacjentów chorujących na różne nowotwory hematologiczne^{44,58,83}. Chociaż w mojej pracy obecność haplotypu B/x została potwierdzona u prawie 80% dawców, to uzyskane wyniki nie potwierdziły zależności pomiędzy wymienionym haplotypem a wyższym prawdopodobieństwem przeżycia. Za wyjaśnienie różnicy może odpowiadać fakt opisanego efektu głównie w homogenych grupach pacjentów z nowotworami hematologicznymi, gdzie haplotyp B/x wykazywał działanie ochronne przed nawrotem choroby nowotworowej. W badanej przeze mnie grupie, populacja dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną lub szpikową nie była wystarczająco reprezentowana do ujawnienia się efektu ochronnego.

W związku z brakiem danych charakteryzujących siłę efektów biologicznych zależnych od poszczególnych receptorów KIR, nie można przewidzieć wpływu ekspresji poszczególnych receptorów KIR i ich skomplikowanych interakcji z ligandami komórek biorcy na ostateczny efekt kliniczny. Co interesujące, Krieger i wsp. próbowali opracować formuły do przewidywania efektów współwystępowania par receptor KIR – ligand. Autorzy zaproponowali model matematyczny, za pomocą którego można by prognozować efekty wynikające z interakcji receptor KIR-ligand. Za pomocą genotypowania KIR, po poznaniu repertuaru receptorów dawcy należało by wskazać receptory hamujące i aktywujące, a następnie sprawdzić, czy biorca posiada swoiste dla receptora ligandy HLA. Autorzy proponują wzory matematyczne i własną skalę, za pomocą której szacuje się siłę efektu GvL komórek NK jako: negatywna, neutralna, pozytywna⁸⁴.

Kolejnym elementem modyfikującym aktywność komórek NK jest dynamika zmian ekspresji receptorów KIR w okresie rekonstrukcji immunologicznej. Giebel

i współpracownicy odkryli, że rekonstytucja komórek NK i ulegających na nich ekspresji receptorów KIR następuje sekwencyjnie i jest rozłożona w czasie⁸⁵. Oznacza to, że ekspresja określonego receptora KIR na komórkach NK może nie następować od razu po przeszczepie, ale może być opóźniona. Potwierdzenie obecności poszczególnych receptorów KIR u dawcy pozwala oczekiwać ich ekspresji u pacjenta po allo-HSCT, ale na podstawie przytoczonej publikacji, efekt występowania aktywności komórek NK nie jest przewidywalny w czasie. Fakt ten może wyjaśniać, dlaczego efekty zależne od komórek NK obserwowane są później (np. zależności między KIR a IR w +90, +270 i +365 dobie od transplantacji jak w Tabelach 12.-13.) niż efekty wynikające ze zgodności w układzie HLA, które zaznaczają się głównie w pierwszych 2 miesiącach od HSCT.

Następnie należy wspomnieć, że aktywność układu odpornościowego i reakcja na czynniki zakaźne może także wykazywać związek z występowaniem powikłań nieinfekcyjnych. W publikacjach jest postulowany związek alloreaktywności komórek NK i występowania GvHD u pacjentów po allo-HSCT oraz zapadalności na infekcje w tym reaktywację CMV po przeszczepie^{66,86-87}. Ja nie prowadziłam takiej analizy, ze względu na skomplikowany model indukcji choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi przez czynniki zależne od dawcy i przebieg kliniczny po przeszczepieniu w tym dominujący wpływ istotnych modyfikacji leczenia immunosupresyjnego⁸⁸.

Licencjonowanie komórek NK jest rzadko występującym zjawiskiem w badanych grupach pacjentów poddawanych przeszczepieniu szpiku ze względu na konieczność współwystępowania niezgodności w HLA pomiędzy dawcą i biorcą oraz obecność genu dla receptora KIR u dawcy szpiku. W badanej przeze mnie grupie, warunki odpowiedzialne za wystąpienie licencjonowania wystąpiły w zbyt niskiej liczbie przypadków, co nie pozwoliło na ich szczegółową analizę. Ocena roli licencjonowania komórek NK wymaga badań obejmujących duże populacje, które są możliwe w obecnych czasach w oparciu o dane rejestrów dawców lub przeszczepianych pacjentów, zwłaszcza jeżeli równocześnie są dostępne coraz powszechniejsze badania genotypu receptorów KIR.

W podsumowaniu należy podkreślić, że występowanie korzystnych efektów klinicznych w powiązaniu z różnymi, niekiedy przeciwstawnymi efektami aktywacji i hamowania komórek NK wskazują na skomplikowane i niezbyt przewidywalne mechanizmy regulujące układ odpornościowy. Zależności między genotypem KIR i aktywacją lub hamowaniem komórek NK mogą być dodatkowo modyfikowane przez

wpływ genotypu na rekonstytucję immunologiczną. Temat jest słabo zbadany i nie odnalazłam publikacji na temat związku profilu genotypowego KIR z odnową limfocytarną, co zasługuje na dalsze badania.

4. Wpływ rodzaju kondycjonowania na wyniki leczenia i występowanie niekorzystnych zdarzeń oraz odnowę limfocytarną

Uzyskane przeze mnie wyniki nie pokazują przewagi żadnego z protokołów kondycjonowania na przeżycie dzieci poddawanych allo-HSCT. Na podstawie randomizowanych wieloośrodkowych badań porównujących różne rodzaje kondycjonowania przed allo-HSCT istnieje wiele obserwacji dotyczących wpływu rodzaju megaterapii na wyniki przeszczepienia, ale większość pochodzi z populacji dorosłych pacjentów. Część badań prezentuje przewagę treosulfanu nad busulfanem ze względu na mniejszą toksycność, a wobec tego mniejsze ryzyko TRM i lepsze OS⁸⁹. Ten rodzaj kondycjonowania jest rekomendowany u pacjentów obciążonych wcześniejszym leczeniem przeciwnowotworowym, którzy odniosą korzyść w przypadku redukcji intensywności megaterapii⁹⁰. Inni autorzy zwracają uwagę na to, że skuteczność obu rodzajów chemioterapii w zakresie eliminacji komórek białaczkowych jest zbliżona, co skutkuje podobnym prawdopodobieństwem przeżycia wolnego od zdarzeń⁹¹. Podobnie w badanej populacji nie zaobserwowano związku pomiędzy sposobem kondycjonowania a prawdopodobieństwem wystąpienia nawrotu choroby. Brak różnic w zakresie OS, EFS i TRM pomiędzy podgrupami z różnymi rodzajami kondycjonowania może wynikać ze stosunkowo dużej różnorodności rozpoznań.

Moje analizy nie wykazały związku pomiędzy rodzajem chemioterapii zastosowanej w kondycjonowaniu a rekonstytucją immunologiczną. Według niektórych autorów rodzaj chemioterapii przed transplantacją może mieć toksyczny wpływ na grasnicę, a w konsekwencji opóźnia odbudowę dojrzewających tam komórek: limfocytów T CD4+ i T CD8+⁹². Wśród rodzajów kondycjonowania wywołujących ostre uszkodzenie grasicy wymieniono chemioterapię z użyciem cyklofosfamidu oraz radioterapię, natomiast w mojej pracy porównywałam przede wszystkim wpływ zastosowania busulfanu i treosulfanu na odnowę immunologiczną.

5. Wpływ innych parametrów na wyniki leczenia i występowanie niekorzystnych zdarzeń oraz odnowę limfocytarną

W przeprowadzonych w niniejszej pracy analizach nie wykazano istotnego statystycznie wpływu na przeżycie dla wymienionych parametrów: płeć pacjenta (kobieta vs. mężczyzna), źródło komórek macierzystych CD 34+ (aferezat z krwi obwodowej vs. krew szpikowa), rodzaj stosowanej profilaktyki GvHD (z ATG vs. bez ATG). Analiza mojej grupy potwierdziła, że źródło komórek macierzystych (aferezat z krwi obwodowej vs. krew szpikowa) oraz zastosowanie ATG mają wpływ na odnowę limfocytarną.

Szybsza rekonstrukcja immunologiczna, a więc wcześniejsza odnowa komórek odpornościowych ma miejsce po transplantacjach wykorzystujących aferezat krwi obwodowej, natomiast przeszczepienia szpiku kostnego charakteryzują się dłuższym okresem neutropenii, podczas którego może dojść do zagrażających życiu powikłań infekcyjnych, jednak wyniki mojej pracy nie pokazały takiej zależności^{93,94}. W literaturze podaje się określone czynniki ryzyka procedury allo-HSCT i tak na przykład według polskich autorów, przeszczepianie komórek macierzystych z krwi obwodowej w chorobach nienowotworowych wiąże się z wyższym ryzykiem TRM niż przy zastosowaniu komórek szpiku kostnego⁹⁵.

Jak zaprezentowałam w opracowanych przeze mnie wynikach, rekonstrukcja immunologiczna następuje wcześniej, jeśli źródłem komórek macierzystych jest aferezat z krwi obwodowej. Aferezat jest źródłem nie tylko komórek macierzystych CD 34+, ale zawiera także limfocyty T i B w ilości nawet 10-krotnie większej niż krew szpikowa, co może być przyczyną wcześniejszej odbudowy układu odpornościowego. Moje analizy dotyczące przeszczepień z wykorzystaniem aferezatu krwi obwodowej wykazały wyższą liczbę limfocytów B i komórek NK w 1 miesiącu od transplantacji, komórek NK w 2 miesiącu od transplantacji oraz limfocytów T CD4+ około 1 rok po transplantacji. Według innych autorów komórki NK odnawiają się niezależnie od zastosowanego źródła komórek macierzystych⁹².

Zastosowanie globuliny antytymocytarnej opóźnia rekonstrukcję komórek dojrzewających w grasicy⁹⁶, co znajduje odzwierciedlenie w moich badaniach. Wpływ ten jest wyraźny w ciągu 1. miesiąca po przeszczepie i dotyczy liczby limfocytów T. U pacjentów, u których nie stosowano seroterapii z ATG liczba limfocytów B i komórek NK, a więc komórek nie dojrzewających w grasicy była istotnie statystycznie wyższa

w +30 i +60 dobie od przeszczepu, co podkreśla rolę alloreaktywności komórek NK w tym okresie odnowy.

Podsumowując problematykę odnowy immunologicznej, czynniki modyfikujące liczbę komórek efektorowych, w tym szczególnie NK, w bezpośredni sposób będą wpływać na efekty których mediatorem są komórki NK. Stwarza to problem przy wykorzystaniu mechanizmów zależnych od alloreaktywności NK zależnej od receptorów KIR ze względu na efekt supresji odnowy układu komórek NK.

6. Wpływ zmiennych na dynamikę zmian chimeryzmu hematopoetycznego

Wyniki moich badań wykazały, że rodzaj kondycjonowania przed przeszczepem ma związek z prawdopodobieństwem uzyskania chimeryzmu allogenicznego, co jest zgodne z obserwacjami innych autorów. Ekspresja receptora 2DS1 wiązała się z niższym oraz układu HLA C04 lub A11 / KIR 2DS4 (A) z wyższym prawdopodobieństwem pełnego chimeryzmu dawcy, co można wytłumaczyć udziałem komórek NK w eliminacji przetrwałych komórek autologicznych. Wyższe prawdopodobieństwo uzyskania allogenicznego chimeryzmu w wypadku braku pełnej zgodności w HLA może z kolei wskazywać na silniej wyrażony efekt eliminacji autologicznej hematopoezy przez limfocyty T.

Spośród dostępnych danych literaturowych warta zacytowania wydaje się praca Faraci i wsp., która opiera się o analizę 85 pacjentów pediatrycznych z rozpoznaniem nienowotworowym⁵⁰. Analizy chimeryzmu wstępnego oraz 12 miesięcy po przeszczepieniu wykazały, że czynnikami wpływającymi na chimeryzm były rodzaj kondycjonowania i płeć pacjenta. Kondycjonowanie o zredukowanej intensywności (w stosunku do kondycjonowania mieloablacyjnego) oraz płeć żeńska wiązały się z niższym odsetkiem allogenicznego chimeryzmu.

Mohr i wsp. przeanalizowali dynamikę zmian chimeryzmu w dniach 0-30 od przeszczepu u 184 biorców przeszczepów allogenicznych⁹⁷. Badana populacja zawierała choroby nowotworowe i nienowotworowe i obejmowała zarówno dzieci, jak i dorosłych. Według autorów na niższy wynik chimeryzmu wpływa: mniejsza liczba komórek CD34+ w materiale przeszczepowym i kondycjonowanie o zredukowanej intensywności oparte na fludarabinie, natomiast wcześniejsza chemioterapia

stosowana przed kondycjonowaniem i użycie ATG wiązały się z wyższymi wynikami chimeryzmu od dawcy.

Warto zwrócić uwagę, że badania aktywności komórek NK w mechanizmach eliminacji autologicznej hematopoezy nie znajdują się w centrum uwagi transplantologii. Częściowo można to wytłumaczyć silnym wpływem zależnych od limfocytów T mechanizmów odporności swoistej, ale można odnieść wrażenie niedocenienia roli komórek NK.

7. Podsumowanie

Zaobserwowane przeze mnie wielokierunkowe efekty towarzyszące różnicom w układzie HLA pomiędzy dawcą i biorcą oraz zależności wynikające z ekspresji receptorów KIR lub różnych układów receptor KIR – ligand HLA stanowią przykład skomplikowanych efektów zachodzących w odpowiedzi odpornościowej po przeszczepieniu szpiku (Tabela 21.). Podsumowując, zaobserwowałam korzystne efekty wynikających z obecności układu F oraz I, lepszą odnowę immunologiczną przy obecności receptora 2DS4ins oraz układów B i C, gorszą IR w przypadku ekspresji receptorów 2DS3, 2DL5, 2DL5B i układów G lub I, a także współwystępowanie wyższej śmiertelności okołoprzeszczepowej przy ekspresji receptorów 2DL5 i 2DL5B. Istnienie efektów zależnych od receptorów KIR w rekonstytucji immunologicznej jest interesującą obserwacją, wymagającą dalszych badań.

Zależne od HLA mechanizmy inicjujące odpowiedź odpornościową dotyczą w głównej mierze limfocytów T, które po przeszczepieniu szpiku odpowiadają w dominującym stopniu za alloreaktywność. W przeciwieństwie do komórek NK, stanowiących część odporności nieswoistej o mniej restrykcyjnej regulacji, limfocyty T wchodzi w bezpośrednią interakcję z tkankami gospodarza, są odpowiedzialne za odporność przeciwwzakaźną i wywołanie GvHD. Wyniki mojej pracy ukazują zdecydowanie mniejszą rolę układu komórek NK niż odporności specyficznej w procesach immunologicznych po allo-HSCT. Alloreaktywność komórek NK odpowiada w pewnym stopniu za zjawisko GvL oraz eliminację przetrwałych hematopoetycznych komórek autologicznych, jednak efekty związane z receptorami KIR komórek NK nie przełożyły się znacząco silnie na poprawę przeżycia pacjentów w badanej przeze mnie grupie. Wobec tego dobór dawcy przeszczepu szpiku powinien w pierwszej kolejności utrzymać restrykcyjny dobór HLA, a genotypowanie KIR może

pozostać pomocniczym kryterium doboru dawcy w przypadku dostępności kilku potencjalnych dawców.

Tabela 21. Zbiorcze zestawienie wyników istotnych statystycznie dotyczących receptora KIR i układów receptor KIR – ligand

Istotny parametr KIR lub układ receptor KIR - ligand	Efekt kliniczny			Efekt kliniczny szczegółowo	Rodzaj receptora
	1	2	3		
2DL5	☒	☒		Większe ryzyko TRM; Gorsza IR w +270 dobie (T CD4+)	hamujący
2DL5B	☒	☒		Większe ryzyko TRM; Gorsza IR w +270 dobie (T CD4+)	hamujący
2DS1			☒	niższe wartości chimeryzmu dawcy	aktywujący
2DS3		☒		Gorsza IR w +365 dobie (limf. B)	aktywujący
2DS4ins		☒		Lepsza IR w +90 dobie (T CD4+, limf. B)	aktywujący
HLA C04 lub A11/KIR 2DS4 (układ A)			☒	wyższe wartości chimeryzmu dawcy	aktywujący
HLA A3 lub A11/KIR 3DL2 (układ B)		☒		Lepsza IR w +30 dobie (T CD4+)	hamujący
haplotyp KIR B/x/KIR 2DS2 (układ C)		☒		Lepsza IR w +30 dobie (T CD4+) w +90 dobie (limf. B)	aktywujący
HLA z gr. C2/KIR 2DL1 (układ F)	☒			Lepsze OS i EFS	hamujący
HLA z gr. C2/KIR 2DS1 (układ G)		☒		Gorsza IR w +270 dobie (kom. NK) w +365 dobie (kom. NK)	aktywujący
HLA z gr. Bw4/KIR 3DS1 (układ I)	☒	☒		Lepsze OS i EFS; Gorsza IR w +270 dobie (T CD4+, limf. B) w +365 dobie (T, T CD4+, limf. B)	aktywujący

Efekt kliniczny 1 = istotne statystycznie wyniki w zakresie OS, EFS, TRM

Efekt kliniczny 2 = istotne statystycznie wyniki w zakresie IR

Efekt kliniczny 3 = istotne statystycznie wyniki w zakresie chimeryzmu hematopoetycznego

symbol ☒ jeśli stwierdzono istotną statystycznie korelację

VI WNIOSKI

1. Stopień zgodności między dawcą i biorcą w układzie HLA wywierał najsilniejszy wpływ na przeżycie pacjentów i odnowę limfocytarną w pierwszych 2 miesiącach po transplantacji, ale tylko w niewielkim stopniu na wysokość chimeryzmu po przeszczepieniu.
2. Układ F (HLA z gr. C2/ KIR 2DL1) i układ I (HLA z gr. Bw4/ KIR 3DS1) wiążą się z poprawą przeżycia po allo-HSCT, ale poza tym mechanizmy zależne od KIR tylko w ograniczonym zakresie wpływają na wyniki leczenia.
3. Ekspresji receptorów KIR lub różnych układów receptor KIR – ligand HLA towarzyszą złożone efekty modyfikujące przebieg rekonstytucji immunologicznej lub wyniki chimeryzmu hematopoetycznego.
4. Ekspresja receptora 2DS4ins oraz układów B (HLA-A3 lub -A11/KIR 3DL2) i C (haplotyp KIR B/x/ KIR 2DS2) wiąże się z lepszą, a receptorów 2DL5, 2DL5B, 2DS3 oraz układów G (HLA z gr. C2/ KIR 2DS1) i I (HLA z gr. Bw4/ KIR 3DS1) z gorszą rekonstytucją immunologiczną.
5. Ekspresja receptorów 2DL5 i 2DL5B jest związana z wyższą śmiertelnością okołoprzeszczepową.
6. Ekspresja układu A (HLA-C04 lub -A11/ KIR 2DS4) jest związana z wyższym, a receptora 2DS1 z niższym prawdopodobieństwem uzyskania pełnego allogenicznego chimeryzmu.

VII 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 poprzszczepowym 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 HLA C04/A11/KIR 2DS4, 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.

VIII 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.

IX LITERATURA

1. Ho AD, Haas R, Champlin RE. Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Hematop Stem Cell Transplant*. July 2021;1-604. doi:10.5339/qmj.2007.2.7
2. Kato S, Yabe H, Takakura H, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for inborn errors of metabolism: A report from the Research Committee on Transplantation for Inborn Errors of Metabolism of the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare and the Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Pediatr Transplant*. 2016;20(2):203-214. doi:10.1111/PETR.12672
3. Barriga F, Ramírez P, Wietstruck A, et al. Hematopoietic stem cell transplantation: clinical use and perspectives. *Biol Res*. 2012;45(3):307-316. doi:10.4067/S0716-97602012000300012
4. Gratwohl A, Pasquini MC, Aljurf M, et al. One million haemopoietic stem-cell transplants: a retrospective observational study. *Lancet Haematol*. 2015;2(3):e91-e100. doi:10.1016/S2352-3026(15)00028-9
5. Bazinet A, Popradi G. HEMATOPOIETIC STEM-CELL TRANSPLANTATION, Bazinet and Popradi A general practitioner's guide to hematopoietic stem-cell transplantation. *Curr Oncol*. 2019;26(3):187-191. doi:10.3747/co.26.5033
6. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40 000 transplants annually. *Bone Marrow Transplant*. 2016;51:786-792. doi:10.1038/bmt.2016.20
7. Kollman C, Howe CWS, Anasetti C, et al. Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. *Blood*. 2001;98(7):2043-2051. doi:10.1182/blood.V98.7.2043
8. Gratwohl A, Sureda A, Cornelissen J, et al. Alloreactivity: the Janus-face of hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2017;31:1752-1759. doi:10.1038/leu.2017.79
9. Geneugelijk K, Thus KA, Spierings E. Predicting Alloreactivity in Transplantation. 2014. doi:10.1155/2014/159479
10. Ciurea SO, Al Malki MM, Kongtim P, et al. The European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) consensus recommendations for donor selection in haploidentical hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. March 2019;1-13. doi:10.1038/s41409-019-0499-z
11. Nagy ZA. Alloreactivity: An Old Puzzle Revisited. *Scand J Immunol*. 2012;75(5):463-470. doi:10.1111/j.1365-3083.2012.02680.x
12. Velardi A. Natural killer cell alloreactivity 10 years later. *Curr Opin Hematol*. 2012;19(6):421-426. doi:10.1097/MOH.0b013e3283590395

13. Stringaris K, Barrett AJ. The importance of natural killer cell killer immunoglobulin-like receptor-mismatch in transplant outcomes. *Curr Opin Hematol.* 2017;24(6):489-495. doi:10.1097/MOH.0000000000000384
14. Pavletic ZS, Joshi SS, Pirruccello SJ, et al. Lymphocyte reconstitution after allogeneic blood stem cell transplantation for hematologic malignancies. *Bone Marrow Transplant.* 1998;21(1):33-41. doi:10.1038/sj.bmt.1701037
15. Kim DH, Kim JG, Sohn SK, et al. Clinical impact of early absolute lymphocyte count after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2004;125(2):217-224. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.04891.x
16. Kim HT, Armand P, Frederick D, et al. Absolute lymphocyte count recovery after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts clinical outcome. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21(5). doi:10.1016/j.bbmt.2015.01.019
17. Mehta RS, Rezvani K. Immune reconstitution post allogeneic transplant and the impact of immune recovery on the risk of infection. *Virulence.* 2016;7(8):901-916. doi:10.1080/21505594.2016.1208866
18. Thoma MD, Huneke TJ, DeCook LJ, et al. Peripheral blood lymphocyte and monocyte recovery and survival in acute leukemia postmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18(4):600-607. doi:10.1016/j.bbmt.2011.08.007
19. G. Del Zetto, E M, P V, et al. Markers and function of human NK cells in normal and pathological conditions. *Cytometry B Clin Cytom.* 2017;92(2):100-114. doi:10.1002/CYTO.B.21508
20. Mandal A, Viswanathan C. Natural killer cells: In health and disease. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2015;8(2):47-55. doi:10.1016/j.hemonc.2014.11.006
21. Moretta L, Pietra G, Vacca P, et al. Human NK cells: From surface receptors to clinical applications. *Immunol Lett.* 2016;178:15-19. doi:10.1016/J.IMLET.2016.05.007
22. Sivori S, P V, G DZ, et al. Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. *Cell Mol Immunol.* 2019;16(5):430-441. doi:10.1038/S41423-019-0206-4
23. Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, et al. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood.* 2002;100(6):1935-1947. doi:10.1182/blood-2002-02-0350
24. Kuśnierczyk P. Budowa i funkcja immunoglobulinopodobnych receptorów naturalnych komórek cytotoksycznych u człowieka. *Chem Environ Biotechnol.* 2010:165-174.
25. Carrington M, Norman P. The KIR Gene Cluster. *Clin Transplant.* 2003;(4):1-48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10134/>.

26. Biassoni R, Vanni I, Ugolotti E. Killer Immunoglobulin-Like Receptors and Their Ligands. 2011.
27. Passweg JR, Huard B, Tiercy J-M, et al. HLA and KIR polymorphisms affect NK-cell anti-tumor activity. *Trends Immunol.* 2007;28(10):437-441. doi:10.1016/J.IT.2007.07.008
28. Kuśnierczyk P. Rola immunoglobulinopodobnych receptorów komórek cytotoksycznych (KIR) w chorobach człowieka Role of killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) in human diseases. 2004:259-263.
29. De Smith AJ, Wiemels JL, Walsh KM, et al. The role of KIR genes and their cognate HLA class I ligands in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2014;123(16):2497-2503. doi:10.1182/blood-2013-11-540625
30. Carrington M, Norman P. The KIR Gene Cluster. May 2003. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10135/>. Accessed January 3, 2022.
31. Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA, et al. Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood.* 2010;116(14):2411-2419. doi:10.1182/blood-2010-05-283051
32. Mehta RS, Rezvani K. Can we make a better match or mismatch with KIR genotyping? *Hematology.* 2016;2016(1):106-118. doi:10.1182/ASHEDUCATION-2016.1.106
33. Wright PA. Killer-cell immunoglobulin-like receptor assessment algorithms in haemopoietic progenitor cell transplantation: current perspectives and future opportunities. *HLA.* 2020;95(5):435-448. doi:10.1111/TAN.13817
34. Babor F, Fischer JC, Uhrberg M. The role of KIR genes and ligands in leukemia surveillance. *Front Immunol.* 2013;4:27. doi:10.3389/fimmu.2013.00027
35. Venstrom JM, Pittari G, Gooley TA, et al. HLA-C-dependent prevention of leukemia relapse by donor activating KIR2DS1. *N Engl J Med.* 2012;367(9):805-816. doi:10.1056/NEJMOA1200503
36. Park S, Kim K, Jang JH, et al. KIR alloreactivity based on the receptor-ligand model is associated with improved clinical outcomes of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Result of single center prospective study. *Hum Immunol.* 2015;76(9):636-643. doi:10.1016/J.HUMIMM.2015.09.009
37. Shaffer BC, Hsu KC. How important is NK alloreactivity and KIR in allogeneic transplantation? *Best Pract Res Clin Haematol.* 2016;29(4):351-358. doi:10.1016/j.beha.2016.10.010
38. Cichocki F, Verneris MR, Cooley S, et al. The Past, Present, and Future of NK Cells in Hematopoietic Cell Transplantation and Adoptive Transfer. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2016;395:225-243. doi:10.1007/82_2015_445

39. Zhou H, Bao X, Wu X, et al. Donor Selection for Killer Immunoglobulin-like Receptors B Haplotype of the Centromeric Motifs Can Improve the Outcome after HLA-Identical Sibling Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20(1):98-105. doi:10.1016/j.bbmt.2013.10.017
40. Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(5):371-380. doi:10.1038/nrc1365
41. Giebel S, Locatelli F, Lamparelli T, et al. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood.* 2003;102(3):814-819. doi:10.1182/blood-2003-01-0091
42. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science (80-).* 2002;295(5562):2097-2100. doi:10.1126/science.1068440
43. Daniel Weisdorf, Sarah Cooley, Tao Wang, et al. KIR B donors improve the outcome for AML patients given reduced intensity conditioning and unrelated donor transplantation. *Blood Adv.* 2020;4(4):740-754. doi:10.1182/BLOODADVANCES.2019001053
44. Oevermann L, Michaelis SU, Mezger M, et al. KIR B haplotype donors confer a reduced risk for relapse after haploidentical transplantation in children with all. *Blood.* 2014;124(17):2744-2747. doi:10.1182/blood-2014-03-565069
45. Jonsson AH, Yokoyama WM. Natural killer cell tolerance licensing and other mechanisms. *Adv Immunol.* 2009;101(C):27-79. doi:10.1016/S0065-2776(08)01002-X
46. Joncker NT, Shifrin N, Delebecque F, Raulet DH. Mature natural killer cells reset their responsiveness when exposed to an altered MHC environment. *J Exp Med.* 2010;207(10):2065-2072. doi:10.1084/JEM.20100570
47. Nowak J, Kościńska K, Mika-Witkowska R, et al. Donor NK cell licensing in control of malignancy in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Am J Hematol.* 2014;89(10):E176-E183. doi:10.1002/ajh.23802
48. Nowak J, Kościńska K, Mika-Witkowska R, et al. Role of donor activating KIR-HLA ligand-mediated NK Cell education status in control of malignancy in hematopoietic cell transplant recipients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21(5):829-839. doi:10.1016/j.bbmt.2015.01.018
49. Khan F, Agarwal A, Agrawal S. Significance of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation: new variations on an old theme. *Bone Marrow Transplant.* 2004;34(1):1-12. doi:10.1038/sj.bmt.1704525
50. Faraci M, Bagnasco F, Leoni M, et al. Evaluation of Chimerism Dynamics after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Children with Nonmalignant Diseases. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2018;24(5):1088-1093. doi:10.1016/j.bbmt.2017.12.801

51. Bach C, Steffen M, Roesler W, et al. Systematic comparison of donor chimerism in peripheral blood and bone marrow after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Cancer J.* 2017;7(6):e566-e566. doi:10.1038/bcj.2017.42
52. Martin PJ. Documentation of Engraftment and Characterization of Chimerism After Hematopoietic Cell Transplantation. In: *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation.* Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2016:272-282. doi:10.1002/9781118416426.ch24
53. Lukanov T, Ivanova-Shivarova M, Naumova E. Monitoring of Chimerism Following Hematopoietic Stem Cell Transplantation. In: *Stem Cells in Clinical Practice and Tissue Engineering.* InTech; 2018. doi:10.5772/67383
54. Clark JR, Scott SD, Jack AL, et al. Monitoring of chimerism following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT): Technical recommendations for the use of Short Tandem Repeat (STR) based techniques, on behalf of the United Kingdom National External Quality Assessment Service. *Br J Haematol.* 2015;168(1):26-37. doi:10.1111/bjh.13073
55. Tilanus MGJ. Short tandem repeat markers in diagnostics: what's in a repeat? *Leukemia.* 2006;20(8):1353-1355. doi:10.1038/sj.leu.2404273
56. Robinson J, Mistry K, McWilliam H, Lopez R, Marsh SGE. Ipd-the immuno polymorphism database. *Nucleic Acids Res.* 2009;38(SUPPL.1):D863. doi:10.1093/nar/gkp879
57. Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Marsh SGE. IPD - The Immuno Polymorphism Database. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(D1):D1234-D1240. doi:10.1093/nar/gks1140
58. Cooley S, Trachtenberg E, Bergemann TL, et al. Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood.* 2009;113(3):726-732. doi:10.1182/blood-2008-07-171926
59. Bardou P, Mariette J, Escudié F, et al. An interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics.* 2014;15(1):1-7. doi:10.1186/1471-2105-15-293/FIGURES/3
60. Wingard JR, Majhail NS, Brazauskas R, et al. Long-term survival and late deaths after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol.* 2011;29(16):2230-2239. doi:10.1200/JCO.2010.33.7212
61. Majhail NS. Long-term complications after hematopoietic cell transplantation. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2017;10(4):220-227. doi:10.1016/j.hemonc.2017.05.009
62. Tiercy JM. How to select the best available related or unrelated donor of hematopoietic stem cells? *Haematologica.* 2016;101(6):680-687. doi:10.3324/haematol.2015.141119

63. Parra-Ortega I, Nájera-Martínez N, Gaytán-Morales F, et al. Natural killer cell reconstitution after hematopoietic stem-cell transplantation in children. *Gac Med Mex.* 2020;156(3):187-193. doi:10.24875/GMM.M20000385
64. J Ogonek, M KJ, S G, et al. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol.* 2016;7. doi:10.3389/FIMMU.2016.00507
65. Bae KW, Kim BE, Koh KN, Im HJ, Seo JJ. Factors influencing lymphocyte reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children. *Korean J Hematol.* 2012;47(1):44. doi:10.5045/KJH.2012.47.1.44
66. Mansouri M, Villard J, Ramzi M, Alavianmehr A, Farjadian S. Impact of donor KIRs and recipient KIR/HLA class I combinations on GVHD in patients with acute leukemia after HLA-matched sibling HSCT. *Hum Immunol.* 2020;81(6):285-292. doi:10.1016/J.HUMIMM.2020.03.004
67. Verneris MR, Miller JS, Hsu KC, et al. Investigation of donor KIR content and matching in children undergoing hematopoietic cell transplantation for acute leukemia. *Blood Adv.* 2020;4(7):1350-1356. doi:10.1182/BLOODADVANCES.2019001284
68. Khanuntong S, Kuptawintu P, Upaisilpsathaporn K, et al. The effect of missing KIR ligands, activating KIR genotype and haplotype on the outcome of T-cell-replete hematopoietic stem cell transplantation from HLA-identical siblings in Thai patients. *HLA.* 2016;87(6):422-431. doi:10.1111/tan.12829
69. Miller JS, Cooley S, Parham P, et al. Missing KIR ligands are associated with less relapse and increased graft-versus-host disease (GVHD) following unrelated donor allogeneic HCT. *Blood.* 2007;109(11):5058-5061. doi:10.1182/blood-2007-01-065383
70. Hsu KC, Keever-Taylor CA, Wilton A, et al. Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood.* 2005;105(12):4878-4884. doi:10.1182/blood-2004-12-4825
71. Sahin U, Dalva K, Gungor F, et al. Donor-recipient killer immunoglobulin like receptor (KIR) genotype matching has a protective effect on chronic graft versus host disease and relapse incidence following HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Hematol.* 2018;97(6):1027-1039. doi:10.1007/s00277-018-3274-0
72. Gao F, Ye Y, Gao Y, et al. Influence of KIR and NK Cell Reconstitution in the Outcomes of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol.* 2020;11. doi:10.3389/FIMMU.2020.02022
73. Cook MA, Milligan DW, Fegan CD, et al. The impact of donor KIR and patient HLA-C genotypes on outcome following HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for myeloid leukemia. 2004. doi:10.1182/blood

74. S Verheyden, R Schots, W Duquet, et al. A defined donor activating natural killer cell receptor genotype protects against leukemic relapse after related HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2005;19(8):1446-1451. doi:10.1038/SJ.LEU.2403839
75. Jennifer Schellekens, E H Rozemuller, E J Petersen, et al. Activating KIRs exert a crucial role on relapse and overall survival after HLA-identical sibling transplantation. *Mol Immunol*. 2008;45(8):2255-2261. doi:10.1016/J.MOLIMM.2007.11.014
76. Neuchel C, Fürst D, Niederwieser D, et al. Impact of Donor Activating KIR Genes on HSCT Outcome in C1-Ligand Negative Myeloid Disease Patients Transplanted with Unrelated Donors—A Retrospective Study. Ahlenstiel G, ed. *PLoS One*. 2017;12(1):e0169512. doi:10.1371/journal.pone.0169512
77. Tordai A, Bors A, Kiss KP, et al. Donor KIR2DS1 reduces the risk of transplant related mortality in HLA-C2 positive young recipients with hematological malignancies treated by myeloablative conditioning. *PLoS One*. 2019;14(6):e0218945. doi:10.1371/journal.pone.0218945
78. GQ Wu, YM Z, XY L, et al. The beneficial impact of missing KIR ligands and absence of donor KIR2DS3 gene on outcome following unrelated hematopoietic SCT for myeloid leukemia in the Chinese population. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45(10):1514-1521. doi:10.1038/BMT.2010.3
79. U Impola, H T, N A, et al. Donor Haplotype B of NK KIR Receptor Reduces the Relapse Risk in HLA-Identical Sibling Hematopoietic Stem Cell Transplantation of AML Patients. *Front Immunol*. 2014;5(AUG). doi:10.3389/FIMMU.2014.00405
80. S L Heatley, C G Mullighan, K Doherty, et al. Activating KIR Haplotype Influences Clinical Outcome Following HLA-Matched Sibling Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *HLA*. 2018;92(2):74-82. doi:10.1111/TAN.13327
81. D M Cardozo, A Vansan Marangon, Rodrigo Fernandes da Silva, et al. Synergistic effect of KIR ligands missing and cytomegalovirus reactivation in improving outcomes of haematopoietic stem cell transplantation from HLA-matched sibling donor for treatment of myeloid malignancies. *Hum Immunol*. 2016;77(10):861-868. doi:10.1016/J.HUMIMM.2016.07.003
82. Michael R Verneris, Jeffrey S Miller KIR B or not to be?...that is the question for ALL. *Blood*. 2014;124(17):2623-2624. doi:10.1182/BLOOD-2014-09-596395
83. Bachanova V, Weisdorf DJ, Wang T, et al. Donor KIR B Genotype Improves Progression-Free Survival of Non-Hodgkin Lymphoma Patients Receiving Unrelated Donor Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(9):1602-1607. doi:10.1016/j.bbmt.2016.05.016
84. Krieger E, Sabo R, Moezzi S, et al. Killer Immunoglobulin-Like Receptor-Ligand Interactions Predict Clinical Outcomes following Unrelated Donor Transplantations. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2020;26(4):672-682. doi:10.1016/J.BBMT.2019.10.016

85. Giebel S, Dziaczkowska J, Czerw T, et al. Sequential recovery of NK cell receptor repertoire after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2010 456. 2010;45(6):1022-1030. doi:10.1038/bmt.2009.384
86. Xiang-Yu Zhao, Xue-Yi Luo, Xing-Xing Yu, et al. Recipient-donor KIR ligand matching prevents CMV reactivation post-haploidentical T cell-replete transplantation. *Br J Haematol*. 2017;177(5):766-781. doi:10.1111/BJH.14622
87. Gaafar A, Sheereen A, Almohareb F, et al. Prognostic role of KIR genes and HLA-C after hematopoietic stem cell transplantation in a patient cohort with acute myeloid leukemia from a consanguineous community. *Bone Marrow Transplant* 2018 539. 2018;53(9):1170-1179. doi:10.1038/s41409-018-0123-7
88. Szmit Z, Kałwak K, Król A, et al. Premature cyclosporine cessation and TBI-containing conditioning regimen increase the risk of acute GvHD in children undergoing unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. *Adv Clin Exp Med*. 2019;28(9):1185-1192. doi:10.17219/acem/103069
89. Beelen DW, Trenschele R, Stelljes M, et al. Treosulfan or busulfan plus fludarabine as conditioning treatment before allogeneic haemopoietic stem cell transplantation for older patients with acute myeloid leukaemia or myelodysplastic syndrome (MC-FludT.14/L): a randomised, non-inferiority, phase 3 trial. *Lancet Haematol*. 2020;7(1):e28-e39. doi:10.1016/S2352-3026(19)30157-7
90. Ussowicz M. Treosulfan in combination with fludarabine as part of conditioning treatment prior to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Drugs of Today*. 2020;56(6):389-403. doi:10.1358/dot.2020.56.6.3135200
91. Zhu S, Liu G, Liu J, Chen Q, Wang Z. Long-Term Outcomes of Treosulfan- vs. Busulfan-Based Conditioning Regimen for Patients With Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia Before Hematopoietic Cell Transplantation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Oncol*. 2020;10:2359. doi:10.3389/fonc.2020.591363
92. Bhatt ST, Bednarski JJ. Immune Reconstitution in Pediatric Patients Following Hematopoietic Cell Transplant for Non-malignant Disorders. *Front Immunol*. 2020;0:1988. doi:10.3389/FIMMU.2020.01988
93. Roy L Kao, Shernan G Holtan Host and Graft Factors Impacting Infection Risk in Hematopoietic Cell Transplantation. *Infect Dis Clin North Am*. 2019;33(2):311-329. doi:10.1016/J.IDC.2019.02.001
94. Elfeky R, Lazareva A, Qasim W, et al. Immune reconstitution following hematopoietic stem cell transplantation using different stem cell sources. <https://doi.org/10.1080/1744666X20191612746>. 2019;15(7):735-751. doi:10.1080/1744666X.2019.1612746
95. Zaucha-Prażmo BDE A, Sadurska BDE E, Pieczonka AB, et al. Risk Factors for Transplant Outcomes in Children and Adolescents with Non-Malignant Diseases Following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. doi:10.12659/AOT.915330

96. Bosch M, Dhadda M, Hoegh-Petersen M, et al. Immune reconstitution after anti-thymocyte globulin-conditioned hematopoietic cell transplantation. *Cytotherapy*. 2012;14(10):1258-1275. doi:10.3109/14653249.2012.715243
97. Mohr B, Koch R, Thiede C, et al. CD34+ cell dose, conditioning regimen and prior chemotherapy: factors with significant impact on the early kinetics of donor chimerism after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2004 3411. 2004;34(11):949-954. doi:10.1038/sj.bmt.1704710