

Wstęp

Allogeniczne przeszczepienie hematopoetycznych komórek macierzystych (HSCT) jest metodą skutecznego leczenia wielu schorzeń hematologicznych i hematologicznych. Postęp w doborze dawców, nowe leki i nowoczesne protokoły megachemioterapii poprawiają wyniki wyleczalności biorców HSCT. Rekonstrukcja immunologiczna po HSCT jest ważnym czynnikiem warunkującym przeżycie, ponieważ odpowiada za ochronę przed zakażeniami stanowiącymi przyczynę śmiertelności. Dodatkowo zapobieganie chorobie przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD) wymaga stosowania immunosupresji, co się wiąże z opóźnieniem odnowy immunologicznej i przedłużającym się zagrożeniu ze strony infekcji oportunistycznych, jak zakażeń ADV, CMV lub EBV. Wiele czynników wpływa na odnowę immunologiczną i ryzyko powikłań poprzyszczepowych i należy je uwzględnić w ocenie ryzyka powikłań.

Cel pracy

Celem pracy było:

1. Oznaczenie reaktywności obecnych w materiale przeszczepowym limfocytów wobec antygenów wirusów CMV, ADV i EBV.
2. Ocena związku między reaktywnością przeciwwirusową dawcy i zapadalnością na infekcje wirusowe biorcy po transplantacji hematopoetycznych komórek macierzystych.
3. Zbadanie wpływu czynników modyfikujących ze strony dawcy i biorcy na zapadalność na infekcje wirusowe po przeszczepieniu szpiku.

Materiały i metody

Stymulację limfocytów dawcy względem specyficznych antygenów wirusa CMV, ADV i EBV prowadzono w próbkach materiału przeszczepowego służących do oceny jakości. Testy wykonano w latach 2017-2019 w 78 próbkach materiału pochodzącego od dawców allogenicznych. Z próbek izolowano mononukleary metodą wirowania w gradiencie ciężkości. Wyizolowane mononukleary stymulowano mieszaniną syntetycznych oligopeptydów odpowiadających sekwencji antygenów odpowiednich wirusów, a następnie za pomocą cytometryi przepływowej zidentyfikowano zaktywowane limfocyty CD3+CD4+ oraz CD3+CD8+ wydzielające interferon- γ . Parametry odbudowy immunologicznej w postaci liczby limfocytów T, B i komórek NK oraz wyniki rutynowych badań diagnostycznych w

kierunku replikacji wirusów w kolejnych 90 dniach po HSCT stanowiły dane do analizy rekonstrukcji immunologicznej i zapadalności na infekcje w zależności od czynników modyfikujących ze strony dawcy i biorcy (zastosowanego kondycjonowania, immunosupresji, występowania GvHD oraz rodzaju choroby podstawowej) oraz liczby limfocytów VST.

Wyniki

W badanej grupie pierwotne rozpoznanie choroby nowotworowej lub nienowotworowej nie wpływało na występowanie odnowy immunologicznej i powikłań. Intensywność protokołów kondycjonowania (mieloablacyjny – MAC, o zredukowanej intensywności RIC lub niemieloablacyjnych – NMA) przed HSCT, miała wpływ na tempo odbudowy poszczególnych populacji limfocytów. Terapia limfodeplecyjna opóźniała tempo odnawiania się układu immunologicznego pacjentów, a niewielkie różnice występowały na w poszczególnych subpopulacjach limfocytów. Przeszczepienie komórek krwi obwodowej skutkowało szybszą odnową limfocytów B w porównaniu do przeszczepień komórek szpiku kostnego.

W okresie obserwacji od przeszczepienia do 90 dnia po HSCT u 72 (88%) z 82 badanych odnotowano wystąpienie infekcji wirusowej wywołanej przez CMV, ADV lub EBV. Wiremia EBV wystąpiła u 54 (65%) pacjentów, CMV u 33 (40%), a ADV u 20 (24%).

Dane dotyczące statusu serologicznego dawcy i biorcy wobec CMV wykazały wysokie ryzyko reaktywacji wirusa cytomegalii w sytuacji, kiedy dawca i biorca nie są zgodni pod względem statusu serologicznego przed HSCT.

Wirus cytomegalii najrzadziej był wykrywany w grupie pacjentów otrzymujących kondycjonowanie MAC, a najczęściej w grupie NMA. ADV wykryto w osoczu pacjentów najrzadziej po zastosowaniu protokołu RIC, a najczęściej po NMA. EBV występował niezależnie od zastosowanego kondycjonowania.

Rodzaj terapii limfodeplecyjnej nie miał wpływu na częstość zakażeń CMV i EBV. W grupie pacjentów, która nie otrzymała leków immunosupresyjnych, nie wykryto replikacji ADV, a ryzyko było większe u chorych dostających Thymoglobulinę, w porównaniu z grupą otrzymującą Grafalon.

Ostra postać GvHD (aGvHD) wystąpiła u 53 pacjentów (65%) a przewlekła (cGvHD) u 7 (9%).

Większa liczba limfocytów CD3+ oraz CD3+CD4+ i CD3+CD8+ obecnych w materiale przeszczepowym w przeliczeniu na kg masy ciała biorcy, zwiększała ryzyko wystąpienia aGvHD. Ostra postać GvHD wystąpiła częściej u pacjentów poddanych kondycjonowaniu

MAC i RIC niż po uprzednim kondycjonowaniu NMA. Nie wykazano wpływu powyższych czynników na późniejsze wystąpienie cGvHD. Limfodeplecja nie wpływała na częstość występowania aGvHD lub cGvHD.

Analiza grupy badanej pod względem wystąpienia aGvHD i zakażeń wirusowych wskazuje na zależność między aGvHD, a replikacją EBV. Z kolei pacjenci, u których wykryto replikację CMV, nie chorowali na cGvHD. W grupie pacjentów, u których wystąpiła cGvHD, odnotowano w okresie poprzyszczepowym wyższą częstość replikacji ADV. EBV nie wykazał zależności z ryzykiem cGvHD.

Źródło komórek macierzystych nie miało wpływu na wystąpienie ostrej lub przewlekłej postaci GvHD.

W 59/60/53 z 78 badanych preparatów znaleziono obecność komórek VST o aktywności odpowiednio przeciwko CMV/ADV/EBV. Porównano zapadalność na infekcje wirusowe w zależności od liczby podanych limfocytów zdolnych do pobudzenia względem antygenów wirusowych. Wykazano, że u pacjentów, którzy otrzymali preparaty limfocytów reaktywne wobec CMV o fenotypie CD3+CD8+ było niższe ryzyko wystąpienia CMV. Wyższa liczba limfocytów reaktywnych wobec ADV lub EBV w materiale przeszczepowych była związana z wyższą zapadalnością na infekcje po HSCT.

Wnioski

Większość preparatów przeszczepowych od dawcy niespokrewnionego zawiera limfocyty reaktywne wobec antygenów wirusów CMV, ADV i EBV. Obecne w materiale przeszczepowym limfocyty wykazujące reaktywność przeciwko CMV chronią biorcę przeszczepu przed replikacją tego wirusa. Obecność limfocytów reaktywnych wobec patogenów wirusowych w produkcie komórkowym nie oznacza potencjału do ochrony przeciwwzakaźnej u biorcy przeszczepu. Zapadalność na infekcje wirusowe w okresie po HSCT jest modyfikowana przez czynniki w postaci statusu serologicznego dawcy, rodzaju podanego preparatu, rodzaju kondycjonowania, terapii limfodeplecyjnej, wieku pacjenta oraz wystąpienia GvHD.

Wnioski

Większość preparatów przeszczepowych od dawcy niespokrewnionego zawiera limfocyty reaktywne wobec antygenów wirusów CMV, ADV i EBV. Obecne w materiale przeszczepowym limfocyty wykazujące reaktywność przeciwko CMV chronią biorcę przeszczepu przed replikacją tego wirusa. Obecność limfocytów reaktywnych wobec

patogenów wirusowych w produkcji komórkowym nie oznacza potencjału do ochrony przeciwwzakaźnej u biorcy przeszczepu. Zapadalność na infekcje wirusowe w okresie po HSCT jest modyfikowana przez czynniki w postaci statusu serologicznego dawcy, rodzaju podanego preparatu, rodzaju kondycjonowania, terapii limfodeplecyjnej, wieku pacjenta oraz wystąpienia GvHD.

Introduction

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is an effective treatment of many hematological and hemato-oncological diseases. Advances in donor selection, new drugs, and modern megachemotherapy protocols improved the outcome of HSCT recipients. Immune reconstitution after HSCT is an important determinant of survival as it is responsible for protection against infections. In addition, prevention of graft versus host disease (GvHD) requires the use of immunosuppression, which is associated with delayed immune recovery and a prolonged risk of opportunistic infections such as ADV, CMV or EBV. Multiple factors affect the immune recovery and the risk of posttransplant complications and should be considered in the complications' risk assessment.

Aims of the study

The aim of the work was:

1. Evaluation of lymphocyte reactivity against CMV, ADV and EBV antigens in the transplant material.
2. Assessment of the relationship between the donor's antiviral reactivity and the recipient's viral infection incidence following hematopoietic stem cell transplantation.
3. Investigation of the influence of modifying factors on the part of the donor and recipient on the incidence of viral infections after bone marrow transplantation.

Materials and methods

Stimulation of donor lymphocytes against specific CMV, ADV and EBV antigens was performed in samples of the graft material used for quality control. The tests were performed in 2017-2019 in 78 samples of material from allogeneic donors. Mononuclears were isolated from the sample by gravity gradient centrifugation. The isolated mononuclears were stimulated with a mixture of synthetic oligopeptides corresponding to the antigen sequence of the respective viruses, and then activated CD3+CD4+ and CD3+CD8+ lymphocytes secreting interferon- γ were identified by flow-cytometry. The reconstitution data (T- and B-lymphocyte and NK cell counts) as well as the results of routine diagnostic tests for virus replication during 90 days after HSCT were used for analysis of immune reconstitution. The effects of factors on the part of the donor and recipient (conditioning, lymphodepleting therapies, the presence of GvHD and the type of underlying disease, graft source and composition, and immune recovery) on posttransplant complications were analysed.

Results

In the studied group, the primary diagnosis of a malignant or non-malignant disease did not affect the occurrence of immune recovery and complications. The intensity of conditioning protocols (myeloablative - MAC, reduced intensity RIC or non-myeloablative - NMA) prior to HSCT had a limited impact on the rate of recovery of individual lymphocyte populations. Lymphodepleting therapy delayed the patients' immune recovery, with minimal effect on lymphocyte subpopulations. Transplantation of peripheral blood cells resulted in a faster renewal of B lymphocytes compared to bone marrow transplantation.

During the follow-up period from transplant to day 90 after HSCT, viral replication due to CMV, ADV or EBV was reported in 72 (88%) of 82 patients. EBV viremia occurred in 54 (65%) patients, CMV - in 33 (40%), and ADV - in 20 (24%).

Data on the serological status of the donor and recipient for CMV showed higher risk of CMV reactivation when the donor and recipient showed different serologic status before HSCT.

CMV was rarely detected in the group of patients receiving MAC conditioning, and most often in the NMA group. ADV was detected in the plasma of patients least frequently after the RIC protocol, and most frequently after the NMA. EBV occurred regardless of the administered conditioning type.

The type of lymphodepleting therapy had no effect on the frequency of CMV and EBV infections. ADV replication was not detected in the group of patients who did not receive immunosuppressants, and the risk was higher in those receiving Thymoglobulin compared to the Grafalon group.

Acute GvHD (aGvHD) occurred in 53 patients (65%) and chronic (cGvHD) in 7 (9%).

The greater number of CD3+ and CD3+CD4+ and CD3+CD8+ lymphocytes present in the graft material per kg of the recipient's body weight increased the risk of aGvHD. Acute GvHD occurred more frequently in patients undergoing MAC and RIC conditioning than after NMA conditioning. The above factors have not been shown to influence the later occurrence of cGvHD. Lymphodepletion did not affect the incidence of aGvHD or cGvHD.

The analysis of the study group in terms of aGvHD and viral infections shows a relationship between aGvHD and EBV replication. In contrast, patients showing CMV replication did not develop cGvHD. In the group of patients who developed cGvHD, a higher frequency of ADV replication was noted in the post-transplant period. EBV showed no correlation with cGvHD risk.

The source of stem cells had no effect on the development of acute or chronic GvHD.

In 59/60/53 out of 78 tested preparations the presence of VST cells with activity against CMV/ADV/EBV, respectively, was found. It has been shown that patients who received CMV-reactive CD3+CD8+ lymphocytes had lower risk of CMV. A higher number of ADV- or EBV-reactive lymphocytes in the graft material was associated with a higher incidence of infections after HSCT.

Conclusions

Most unrelated donor transplant stem cell products contain viral specific lymphocytes that are reactive with CMV, ADV, and EBV antigens. The lymphocytes present in the transplant material showing reactivity against CMV protect the recipient against replication of this virus. The presence of viral reactive lymphocytes in the cell product does not uniformly ensure the anti-infective mechanisms in the transplant recipient. The incidence of viral infections in the post-HSCT period is modified by factors such as the serological status of the donor, stem cell source and composition, the type of conditioning, lymphodepleting therapy, the patient's age and the occurrence of GvHD.

Introduction

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is an effective treatment of many hematological and hemato-oncological diseases. Advances in donor selection, new drugs, and modern megachemotherapy protocols improved the outcome of HSCT recipients. Immune reconstitution after HSCT is an important determinant of survival as it is responsible for protection against infections. In addition, prevention of graft versus host disease (GvHD) requires the use of immunosuppression, which is associated with delayed immune recovery and a prolonged risk of opportunistic infections such as ADV, CMV or EBV. Multiple factors affect the immune recovery and the risk of posttransplant complications and should be considered in the complications' risk assessment.

Aims of the study

The aim of the work was:

1. Evaluation of lymphocyte reactivity against CMV, ADV and EBV antigens in the transplant material.
2. Assessment of the relationship between the donor's antiviral reactivity and the recipient's viral infection incidence following hematopoietic stem cell transplantation.
3. Investigation of the influence of modifying factors on the part of the donor and recipient on the incidence of viral infections after bone marrow transplantation.

Materials and methods

Stimulation of donor lymphocytes against specific CMV, ADV and EBV antigens was performed in samples of the graft material used for quality control. The tests were performed in 2017-2019 in 78 samples of material from allogeneic donors. Mononuclears were isolated from the sample by gravity gradient centrifugation. The isolated mononuclears were stimulated with a mixture of synthetic oligopeptides corresponding to the antigen sequence of the respective viruses, and then activated CD3+CD4+ and CD3+CD8+ lymphocytes secreting interferon- γ were identified by flow-cytometry. The reconstitution data (T- and B-lymphocyte and NK cell counts) as well as the results of routine diagnostic tests for virus replication during 90 days after HSCT were used for analysis of immune reconstitution. The effects of factors on the part of the donor and recipient (conditioning,

lymphodepleting therapies, the presence of GvHD and the type of underlying disease, graft source and composition, and immune recovery) on posttransplant complications were analysed.

Results

In the studied group, the primary diagnosis of a malignant or non-malignant disease did not affect the occurrence of immune recovery and complications. The intensity of conditioning protocols (myeloablative - MAC, reduced intensity RIC or non-myeloablative - NMA) prior to HSCT had a limited impact on the rate of recovery of individual lymphocyte populations. Lymphodepleting therapy delayed the patients' immune recovery, with minimal effect on lymphocyte subpopulations. Transplantation of peripheral blood cells resulted in a faster renewal of B lymphocytes compared to bone marrow transplantation.

During the follow-up period from transplant to day 90 after HSCT, viral replication due to CMV, ADV or EBV was reported in 72 (88%) of 82 patients. EBV viremia occurred in 54 (65%) patients, CMV - in 33 (40%), and ADV - in 20 (24%).

Data on the serological status of the donor and recipient for CMV showed higher risk of CMV reactivation when the donor and recipient showed different serologic status before HSCT.

CMV was rarely detected in the group of patients receiving MAC conditioning, and most often in the NMA group. ADV was detected in the plasma of patients least frequently after the RIC protocol, and most frequently after the NMA. EBV occurred regardless of the administered conditioning type.

The type of lymphodepleting therapy had no effect on the frequency of CMV and EBV infections. ADV replication was not detected in the group of patients who did not receive immunosuppressants, and the risk was higher in those receiving Thymoglobulin compared to the Grafalon group.

Acute GvHD (aGvHD) occurred in 53 patients (65%) and chronic (cGvHD) in 7 (9%).

The greater number of CD3+ and CD3+CD4+ and CD3+CD8+ lymphocytes present in the graft material per kg of the recipient's body weight increased the risk of aGvHD. Acute GvHD occurred more frequently in patients undergoing MAC and RIC conditioning than after NMA conditioning. The above factors have not been shown to influence the later occurrence of cGvHD. Lymphodepletion did not affect the incidence of aGvHD or cGvHD.

The analysis of the study group in terms of aGvHD and viral infections shows a relationship between aGvHD and EBV replication. In contrast, patients showing CMV replication did not

develop cGvHD. In the group of patients who developed cGVHD, a higher frequency of ADV replication was noted in the post-transplant period. EBV showed no correlation with cGvHD risk.

The source of stem cells had no effect on the development of acute or chronic GvHD.

In 59/60/53 out of 78 tested preparations the presence of VST cells with activity against CMV/ADV/EBV, respectively, was found. It has been shown that patients who received CMV-reactive CD3+CD8+ lymphocytes had lower risk of CMV. A higher number of ADV- or EBV-reactive lymphocytes in the graft material was associated with a higher incidence of infections after HSCT.

Conclusions

Most unrelated donor transplant stem cell products contain viral specific lymphocytes that are reactive with CMV, ADV, and EBV antigens. The lymphocytes present in the transplant material showing reactivity against CMV protect the recipient against replication of this virus. The presence of viral reactive lymphocytes in the cell product does not uniformly ensure the anti-infective mechanisms in the transplant recipient. The incidence of viral infections in the post-HSCT period is modified by factors such as the serological status of the donor, stem cell source and composition, the type of conditioning, lymphodepleting therapy, the patient's age and the occurrence of GvHD.