

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Wydział Lekarski

Katedra i Klinika Transplantacji Szpiku, Onkologii

i Hematologii Dziecięcej

Aleksandra Ślęzak

Ocena reaktywności przeciwwirusowej
materiału przeszczepowego
w odniesieniu do powikłań
po transplantacji komórek hematopoetycznych

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor:

Prof. dr hab. n. med. Marek Ussowicz

Praca została wykonana w ramach projektu naukowego finansowanego
z grantu nr FNRD.C200.19.001

Wrocław 2022

Serdecznie dziękuję mojemu Promotorowi,
Panu prof. dr hab. n. med. Markowi Ussowiczowi,
za nieopisane wsparcie, inspirację, cierpliwość i cenne wskazówki
na każdym etapie pracy.

Dziękuję Pani dr n. med. Blance Rybce, Pani mgr Renacie Ryczan-Krawczyk
i Pani dr n. med. Kornelii Gajek
za wszelką pomoc i dzielenie się doświadczeniem
przy realizacji badań naukowych.

Dziękuję Pani dr n. med. Małgorzacie Terpińskiej
i całemu zespołowi Działu Diagnostyki Laboratoryjnej USK,
za wielką cierpliwość i umożliwienie realizacji trudnych etapów pracy.

Dziękuję Pani dr n. farm. Benicie Wiatrak
za pomoc i poświęcony czas.

Dziękuję rodzicom za możliwość spełniania marzeń.

Spis treści

1.	Spis używanych skrótów	7
2.	Wstęp.....	9
2.1	Przeszczepienie hematopoetycznych komórek macierzystych	9
2.1.1	Definicja i zastosowanie	9
2.1.2	Etapy przygotowania i przeszczepienia komórek macierzystych	10
2.1.2.1	Procedura przygotowawcza.....	10
2.1.2.2	Kondycjonowanie biorcy i jego konsekwencje	10
2.1.3	Dostępne źródła hematopoetycznych komórek macierzystych i ich charakterystyka.....	13
2.1.4	Rodzaje transplantacji hematopoetycznych komórek macierzystych	14
2.1.5	Wymagania jakościowe materiału przeszczepowego.....	15
2.1.6	Rekonstytucja hematopoezy	16
2.1.7	Rekonstytucja immunologiczna	16
2.1.8	Powikłania występujące po przeszczepieniu hematopoetycznych komórek macierzystych	18
2.1.8.1	Choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi.....	18
2.1.8.2	Infekcje w okresie poprzyszczepowym	21
2.1.9	Terapia limfocytami T wirusowo-specyficznymi (VST)	26
2.2	Podsumowanie.....	28
3.	Cele pracy	29
4.	Materiały i metody	30
4.1	Charakterystyka grupy badanej	30
4.2	Ocena potencjału przeciwwirusowego limfocytów dawcy	33
4.3	Zestawienie odczynników i sprzętu wykorzystanego do przeprowadzenia badań.....	38
4.3.1	Wykaz aparatury wykorzystanej do prowadzonych badań	38

4.3.2 Wykaz odczynników wykorzystanych do przeprowadzenia badań	38
5. Analiza statystyczna uzyskanych wyników	39
6. Wyniki	40
6.1 Odnowa limfocytna po przeszczepieniu HSC	40
6.2 Częstość występowania infekcji wirusowych	41
6.3 Częstość występowania GvHD	42
6.3.1 Związek między wiekiem pacjenta a wystąpieniem GvHD	42
6.4 Wyniki rekonstrukcji immunologicznej	44
6.4.1 Związek rozpoznania z rekonstrukcją immunologiczną i powikłaniami poprzyszczepowymi.....	44
6.4.2 Efekty pochodzenia materiału przeszczepowego	45
6.4.2.1 Związek pochodzenia materiału przeszczepowego z rekonstrukcją immunologiczną	45
6.4.2.2 Związek pochodzenia materiału przeszczepowego z występowaniem zakażeń po przeszczepieniu hematopoetycznych komórek macierzystych	46
6.4.3 Efekty zależne od rodzaju kondycjonowania	47
6.4.3.1 Związek kondycjonowania z rekonstrukcją immunologiczną i powikłaniami poprzyszczepowymi.....	47
6.4.3.2 Wpływ kondycjonowania na występowanie GvHD.....	53
6.4.3.3 Wpływ rodzaju kondycjonowania na zakażenia poprzyszczepowe	54
6.4.4 Terapia limfodeplecyjna przed przeszczepieniem hematopoetycznych komórek macierzystych.....	55
6.4.4.1 Związek terapii limfodeplecyjnej z rekonstrukcją immunologiczną i powikłaniami poprzyszczepowymi.....	55
6.4.4.2 Wpływ terapii limfodeplecyjnej na występowanie GvHD.....	58
6.4.4.3 Wpływ terapii limfodeplecyjnej na zakażenia poprzyszczepowe	58
6.4.5 Czynniki ryzyka dla wystąpienia GvHD	59

6.4.5.1 Skład materiału przeszczepowego a występowanie GvHD	59
6.4.5.2 Źródło pochodzenia hematopoetycznych komórek macierzystych a występowanie GvHD.....	60
6.4.5.3 Związek między wystąpieniem GvHD a zakażeniami wirusowymi.....	60
6.4.6 Czynniki ryzyka dla zakażeń po przeszczepieniu	63
6.4.6.1 Wpływ statusu serologicznego dawca-biorca na zakażenia poprzyszczepowe.....	63
6.4.6.2 Związek między składem materiału przeszczepowego a wystąpieniem infekcji wirusowych	64
6.5 Badania reaktywności przeciwwirusowej i jej związek z powikłaniami poprzyszczepowymi.....	65
6.5.1 Częstość występowania limfocytów VST	65
6.5.2 Występowanie powikłań w zależności od obecności limfocytów VST	67
6.5.3 Związek między liczbą podanych limfocytów reaktywnych na kilogram a występowaniem zakażeń wirusowych.....	70
6.5.4 Związek między odsetkiem limfocytów reaktywnych a występowaniem zakażeń wirusowych.....	73
6.6 Immunoterapia za pomocą limfocytów VST – procedura CCS	77
7. Dyskusja	80
7.1 Odbudowa limfocytarna	80
7.2 Źródło hematopoetycznych komórek macierzystych	81
7.3 Pierwotne rozpoznanie	82
7.4 Kondycjonowanie.....	82
7.5 Rodzaj leczenia limfodeplecyjnego.....	83
7.6 Choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi.....	84
7.7 Częstość występowania replikacji wirusowych	85
7.8 Występowanie VST w materiale przeszczepowym.....	88

7.9	Terapia z wykorzystaniem VST	91
7.10	Podsumowanie.....	95
8.	Wnioski	96
9.	Streszczenie	97
10.	Abstract	100
11.	Spis tabel.....	103
12.	Spis rycin.....	104
13.	Bibliografia.....	107

1. Spis używanych skrótów

Skrót	Rozwinięcie w języku angielskim	Tłumaczenie na język polski
ADV	Adenovirus	adenowirus
APC	Antigen Presenting Cell	komórka prezentująca antygen
BMDW	Bone Marrow Donors Worldwide	Światowe Stowarzyszenie Dawców Szpiku
CD	Cluster of Differentiation	antygen różnicowania komórkowego
CMV	Cytomegalovirus	cytomegalowirus
DLI	Donor Lymphocyte Infusion	wlew limfocytów dawcy
DMSO	Dimethylsulfoxide	dimetylosulfotlenek
EBV	Epstein-Barr Virus	wirus Epsteina-Barr
EBV-PTLD	EBV-Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder	poprzeszczepowy zespół limfoproliferacyjny indukowany przez EBV
EBMT	European Group for Blood and Marrow Transplantation	Europejskie Stowarzyszenie Przeszczepiania Krwi i Szpiku
ECP	Extracorporeal Photopheresis	fotofereza pozaustrojowa
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor	czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów
GvHD	Graft versus Host Disease	choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi
GvL	Graft versus Leukemia	przeszczep przeciwko białaczce
HL	Hodgkin Lymphoma	chłoniak Hodgkina
HLA	Human Leukocyte Antigen	ludzki antygen leukocytarny
HSCT	Hematopoietic Stem Cell Transplantation	przeszczep hematopoetycznych komórek macierzystych
INF- γ	Interferon	interferon gamma
Ig	Immunoglobulin	immunoglobuliny
KIR	Killer immunoglobulin-like receptor	immunoglobulinopodobny receptor naturalnych komórek

		cytotoksycznych
MMF	Mycophenolate mofetil	mykofenolan mofetylu
MMRD	Mismatched Related Donor	dawca spokrewniony częściowo zgodny w układzie HLA
MSD	Matched sibling donor	zgodny w układzie HLA dawca będący rodzeństwem
MRD	Minimal Residual Disease	minimalna choroba resztkowa
MRD	Matched Related Donor	zgodny w układzie HLA dawca spokrewniony
MUD	Matched Unrelated Donor	zgodny w układzie HLA dawca niespokrewniony
NK	Natural killer cell	komórki naturalnej cytotoksyczności, „naturalni zabójcy”
NKTCL	NK/T cell lymphoma	chłoniak z komórek NK/T
PBSC	Peripheral Blood Stem Cells	komórki macierzyste krwi obwodowej
TCR	T-cell Receptor	receptor limfocytów T
Treg	T-regulatory lymphocytes	limfocyty regulatorowe T
TRM	Treatment-Related Mortality	śmiertelność związana z leczeniem
VST	Virus Specific T-lymphocyte	Limfocyt o specyficznej reaktywności przeciwwirusowej
UCBT	Umbilical Cord Blood Transplantation	przeszczepienie krwi pępowinowej

2. Wstęp

2.1 Przeszczepienie hematopoetycznych komórek macierzystych

Odkrycie niszczącego działania promieniowania na szpik kostny nastąpiło w latach 40 dwudziestego wieku po wypadkach przy pierwszych reaktorach jądrowych. Dalsze badania wykazały, że przeszczepienie komórek śledziony lub szpiku u napromienionych zwierząt odwraca stan pancytopenii. Odkrycie hematopoetycznej komórki macierzystej dało podstawy do badań jej zdolności do samoodnowy, proliferacji i różnicowania oraz wykorzystania tej wiedzy w medycynie. W latach 1960 wykonano pierwsze allogeniczne przeszczepienia hematopoetycznych komórek macierzystych (dalej allo-HSCT/HSCT, ang. Hematopoietic Stem Cell Transplantation)[1,2]. HSCT na przestrzeni lat stało się jednym z podstawowych elementów terapii hematologicznej[3]. W ciągu ostatnich 60 lat nastąpił olbrzymi postęp w zakresie wykorzystania terapii komórkowych w leczeniu ludzi[4]. Postęp typowania zgodności układu HLA (ang. Human Leukocyte Antigen) i lepszego doboru dawców znacząco wydłużył czas przeżycia biorców[1,3]. Innymi czynnikami poprawiającymi bezpieczeństwo HSCT są przeprowadzenie zabiegu w fazie remisji choroby oraz skuteczna profilaktyka choroby przeszczep-przeciwko-gospodarzowi[3,4].

2.1.1 Definicja i zastosowanie

Europejskie Towarzystwo Przeszczepiania Krwi i Szpiku (The European Group for Blood and Marrow Transplantation, EBMT) definiuje transplantacje hematopoetycznych komórek macierzystych jako procedurę przetoczenia krwiotwórczych komórek macierzystych, odpowiednio przygotowanemu biorcy, niezależnie od dawcy i źródła pozyskania komórek[5,6]. Procedura ta ma na celu wymianę lub odbudowę procesu krwiotworzenia biorcy[1].

2.1.2 Etapy przygotowania i przeszczepienia komórek macierzystych

2.1.2.1 Procedura przygotowawcza

Przed podjęciem decyzji o przeprowadzeniu procedury HSCT dokonuje się oceny choroby podstawowej oraz określa wydolność narządową[3]. Konieczne jest także wykluczenie zakażeń mogących ulec zaostreniu w wyniku procedury przeszczepowej: zakażeń wirusami wirusowego zapalenia wątroby typu B i C, Human Immunodeficiency Virus (HIV), cytomegalii, wirusem Epstein-Barr (EBV). U dawcy wykonywane są badania określające stan zdrowia, szczególnie w kierunku chorób nowotworowych i czynnych infekcji mogących ulec przeniesieniu z materiałem przeszczepowym[4]. Pobierając materiał przeszczepowy od dawcy-dziecka, należy wziąć pod uwagę wiele kwestii fizjologicznych, anatomicznych ale także psychologicznych i prawnych- związanych z koniecznością uzyskania zgody sądu rodzinnego[1,7,8]. Jeśli dawcą jest dziecko, należy wziąć pod uwagę niższą wagę pacjenta, a tym samym trudności z uzyskaniem odpowiedniej liczby komórek macierzystych, problem z założeniem wkłucia centralnego do leukaferazy lub konieczność substytucji preparatami krwi po pobraniu komórek[7].

2.1.2.2 Kondycjonowanie biorcy i jego konsekwencje

Przed podaniem preparatu krwiotwórczych komórek macierzystych należy przeprowadzić leczenie mające na celu zniszczenie nowotworu oraz przygotowania niszy dla nowo przeszczepionych komórek macierzystych[1,3]. W celu eradykacji choroby i profilaktyki odrzucenia przeszczepu przez układ immunologiczny biorcy, stosuje się protokoły złożone z radioterapii, chemioterapii i przeciwciał poli- i monoklonalnych. W ostatnich 20 latach nastąpił postęp w postaci opracowania protokołów kondycjonowania o zredukowanej intensywności i toksyczności, które pozwoliły na prowadzenie przeszczepów u ludzi starych i pacjentów z towarzyszącymi chorobami[4].

Głównym niebezpieczeństwem towarzyszącym przeszczepianiu szpiku jest występowanie powikłań związanych z toksycznościami, zakażeniami i chorobą przeszczep przeciwko gospodarzowi (ang. Graft versus Host Disease, GvHD). Do typowych, wczesnych powikłań leczenia mieloablacyjnego należą nudności, zapalenie śluzówek oraz utrata owłosienia. Do ciężkich powikłań występujących w okresie

okołoprzeszczepowym należą krwotoczne zapalenie pęcherza moczowego, zespoły niedrożności zatokowej wątroby (venoocclusive disease, VOD), przesiąkania naczyń włosowatych, rozsianego krwawienia do pęcherzyków płucnych i poprzyszczepowej mikroangiopatii zakrzepowej. W okresie od kilku miesięcy do nawet dekad po leczeniu obserwuje się późne następstwa tj. niepłodność, niewydolność tarczycy, wtórne nowotwory, schorzenia sercowo-naczyniowe i uszkodzenie płuc[1]. Ryzyko powikłań sprawia, że biorcy przeszczepień szpiku wymagają opieki specjalistycznej przez całe życie.

Podczas fazy pancytopenii pacjent staje się podatny na infekcje oportunistyczne, ponieważ brak komórek układu odpornościowego i uszkodzenie bariery śluzówkowej ułatwiają występowanie inwazji przez mikroorganizmy. Na czas odbudowy biorca wymaga hospitalizacji i przebywa w sterylnych, izolowanych pomieszczeniach, wyposażonych w filtry antybakteryjne i laminarny przepływ powietrza. Rutynowo stosowana jest profilaktyka przeciwbakteryjna, przeciwwirusowa oraz przeciwgrzybicza i przetoczenia preparatów krwi. Przyspieszenie odnowy granulocytów można osiągnąć przez podawanie G-CSF (ang. granulocyte colony- stimulating factor)[1].

Tabela 1. Wskazania do przeprowadzenia przeszczepienia hematopoetycznych komórek macierzystych

Choroby rozrostowe szpiku kostnego	
Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL)	<ul style="list-style-type: none"> • ALL wysokiego ryzyka • Nawrót ALL • Niemowlęca ALL
Ostra białaczka szpikowa (AML)	<ul style="list-style-type: none"> • AML z grupy wysokiego ryzyka • Brak remisji AML • AML jako nowotwór wtórny
Ostra białaczka wywodząca się z nieokreślonej linii komórkowej	<ul style="list-style-type: none"> • Ostra białaczka niezróżnicowanokomórkowa AUL • Ostra białaczka o mieszanym fenotypie MPAL
Przewlekła białaczka szpikowa (CML)	Oporna na leczenie inhibitorami kinaz i transformująca postać CML
Zespół mielodysplastyczny (MDS)	
Młodzięcza białaczka mielomonocytoza (JMML)	
Chłoniaki nieziarnicze (NHL)	<ul style="list-style-type: none"> • Oporne na leczenie NHL wywodzące się z

	<p>linii limfocytów B i T</p> <ul style="list-style-type: none"> NHL u pacjentów z zespołem Nijmegen
Chłoniak Hodgkina (HL)	Nawrotowy lub oporny na leczenie HL
Guzy lite	
Neuroblastoma	Neuroblastoma wysokiego ryzyka
Mięsak Ewinga	Mięsak Ewinga w postaci rozsianej, odpornej na leczenie
Nierozrostowe choroby szpiku kostnego	
Nabyta niewydolność szpiku kostnego	<ul style="list-style-type: none"> Ciężka nabyta niedokrwistość aplastyczna (SAA) Nocna napadowa hemoglobinuria (PNH)
Wrodzone zaburzenia hematopoezy	<ul style="list-style-type: none"> Wrodzona niedokrwistość aplastyczna typu Fanconiego (FA) Wrodzona niedokrwistość hipoplastyczna Blackfana-Diamonda (B-DA) Ciężka wrodzona neutropenia (SCN) Wrodzona amegakariocytowa trombocytopenia (CAMT) Zespół Shwachmana i Diamonda (SDS) Wrodzona dyskerstoza (DKC) β-talasemia Choroba sierpowato-krwinkowa
Wrodzone niedobory odporności	
Ciężki złożony niedobór odporności (SCID)	wszystkie podtypy
Zespół Wiskotta-Aldricha	
Zespół limfoproliferacyjny sprzężony z chromosomem X (XLP)	
Choroby autoimmunologiczne na podłożu monogenowym	<ul style="list-style-type: none"> IPEX Niedobór receptora dla interleukiny 10 Autoimmunologiczny zespół limfoproliferacyjny (ALPS)
Choroby spichrzeniowe i metaboliczne	
	<ul style="list-style-type: none"> Adrenoleukodystrofia sprzężona z chromosomem X (X-ALD) Mukopolisacharydoza typu I (MPS I) i II (MPS II) Leukodystrofia metachromatyczna (MLD) Choroba Krabbego(KD)

2.1.3 Dostępne źródła hematopoetycznych komórek macierzystych i ich charakterystyka

Komórki hematopoetyczne do przeszczepienia mogą pochodzić z trzech źródeł: krwi obwodowej (PBSC, ang. Peripheral Blood Stem Cells), szpiku kostnego (BM, ang. Bone Marrow) oraz z krwi pępowinowej (UCB, ang. Umbilical Cord Blood). Niska liczba komórek macierzystych krąży we krwi w warunkach fizjologicznych, ale nie wystarczy aby zapewnić skuteczne pobranie do przeszczepu. Pozyskanie PBSC poprzedza procedura mobilizacji, która polega na podaniu czynnika wzrostu kolonii granulocytów G-CSF lub leku pleryksaforu[2,7]. W czwartej-piątej dobie od rozpoczęcia mobilizacji, pobiera się komórki od dawcy metodą aferezy, która obecnie jest najczęściej stosowaną techniką pozyskiwania materiału przeszczepowego ze względu na dobrą tolerancję zabiegu dla dawcy, łatwość inżynierii przeszczepowej oraz wysoką liczbę komórek pozwalającą na szybką odnowę hematologiczną po przeszczepieniu[2,7]. Wadą PBSC jest wyższe ryzyko wystąpienia przewlekłej postaci GvHD, za którą odpowiedzialne są limfocyty T znajdujące się w materiale przeszczepowym[2]. Z drugiej strony, PBSC wykazuje silniejszą zdolność do wywoływania pożądanego efektu przeszczep przeciwko białaczce (GvL, ang. Graft versus Leukemia), czyli niszczenia komórek białaczkowych przez komórki dawcy.

Alternatywą dla PBSC jest pobranie szpiku kostnego metodą biopsji i wielokrotnej aspiracji[2,7]. Pobranie przeprowadza się w znieczuleniu ogólnym, w warunkach sali operacyjnej poprzez aspirację z obu kości biodrowych. Materiał ten charakteryzuje się krótszą datą przydatności (48 h), niższym odsetkiem komórek macierzystych niż PBSC i wolniejszą odnową hematopoezy po przeszczepie. Istotną różnicą na korzyść pobrania szpiku pozostaje mniejsze ryzyko wystąpienia GvHD, jednak obserwowany efekt GvL może być tym samym słabszy, niż w przypadku PBSC[2,7].

Odmiernym, obecnie nieco tracącym popularność, źródłem są komórki macierzyste krwi pępowinowej UCB, których zaletą jest szybka dostępność i możliwość przeszczepiania z dopuszczeniem niższego stopnia zgodności tkankowej. Wadą UCB ze względu na małą objętość materiału i niski odsetek komórek macierzystych, jest możliwość ich wykorzystania jedynie przy niskiej wadze biorcy (praktycznie do 25 kg)[9]. Inna wadą przeszczepień UCB jest słabsza odbudowa immunologiczna limfocytów T niż po transplantacji PBSC lub szpiku, co oznacza wyższe ryzyko ciężkich infekcji oportunistycznych.

2.1.4 Rodzaje transplantacji hematopoetycznych komórek macierzystych

Ze względu na pochodzenie hematopoetycznych komórek macierzystych, z praktycznego punktu widzenia przeszczepienia HSC można podzielić na autoprzeszczepienia, alloprzeszczepienia od zgodnych dawców i haploprzeszczepienia. Autoprzeszczepienie polega na pobraniu HSC od tej samej osoby, dla której materiał jest dedykowany. Komórki pobiera się i zabezpiecza poprzez zamrożenie w -80°C lub w parach ciekłego azotu na czas podania megaterapii[1]. Jako krioprotektora używa się dimetylosulfotlenku (DMSO), którego zadaniem jest ochrona struktury komórek przed zniszczeniem mechanicznym przez powstawanie kryształów lodu[2]. Najczęściej autoprzeszczepienia wykonuje się jako element terapii onkologicznej w chłoniakach i guzach litych[2–4].

Przy alloprzeszczepieniu wykorzystuje się materiał pozyskany od dawcy dla konkretnego biorcy[2]. W pierwszej kolejności poszukuje się dawcy rodzinnego, najlepiej wśród rodzeństwa o identycznych z biorcą haplotypach HLA (MSD, ang. Matched Sibling Donor). W przypadku posiadania bliźniaka jednojajowego mamy do czynienia ze szczególnym przypadkiem - przeszczepieniem syngenicznym[3,4]. Jest to najbezpieczniejszy typ przeszczepienia pod względem immunologicznym, niesie jednak za sobą wysokie (50-70%) ryzyko wznowy choroby podstawowej, z powodu braku ochronnego efektu GvL.

W przypadku braku zgodnego dawcy spokrewnionego, istnieje możliwość poszukiwania i dobrania niespokrewnionego, honorowego dawcy zgodnego w układzie HLA (MUD, ang. Matched Unrelated Donor) w międzynarodowym rejestrze (BMDW, ang. Bone Marrow Donors Worldwide). Częstość występowania haplotypów HLA chorego w populacji, przekłada się na większe prawdopodobieństwo znalezienia dawcy MUD. W pełni zgodny dawca powinien posiadać 10/10 alleli HLA-A, B, C, DR, DQ identycznych z biorcą[4]. W odniesieniu do dawców niespokrewnionych tolerancja braku zgodności przy kwalifikacji do pobrania komórek do przeszczepienia dotyczy zazwyczaj jednego *locus*.

2.1.5 Wymagania jakościowe materiału przeszczepowego

Minimalna liczba komórek macierzystych do autoprzeszczepu to 2×10^6 komórek CD34+/kg m.c. biorcy, natomiast przy alloprzeszczepieniach dąży się do uzyskania minimum 3×10^6 komórek CD34+/kg m.c. biorcy[7]. W przypadku szpiku kostnego, za materiał wystarczający do uzyskania wszczepu uznaje się szpik zawierający minimum 3×10^8 komórek jądrzastych/kg m.c. biorcy[7]. Materiał przeszczepowy nie może zawierać patogenów mogących ulec przeniesieniu z dawcy na biorcę, co jest warunkiem kwalifikacji do oddania komórek.

Przeszczepienie od spokrewnionego dawcy częściowo zgodnego w układzie HLA (MMRD, ang. Mismatched Related Donor), najczęściej jednego z rodziców, rodzeństwa lub dorosłego potomstwa podejmuje się w przypadku choroby, której HSCT daje jedyną szansę na wyleczenie i jednocześnie nie ma zgodnego dawcy [3,4]. W przypadku dawców rodzinnych wykonuje się przeszczepienia przy niezgodności całego haplotypu HLA, dlatego ten rodzaj przeszczepienia i dawcy określa się haploidentycznym. Przeszczep haploidentyczny wymaga procedury zwanej T-deplecją, polegającej na usunięciu limfocytów T wiążących się z ryzykiem wystąpienia ostrej postaci GvHD[10]. T-deplecja może zostać przeprowadzona *ex vivo* (z zastosowaniem specjalistycznej preparatyki) lub *in vivo* przez podanie cyklofosfamidu w 3 i 4 dobie po przeszczepieniu (PTCy)[3,11]. Preparatyka *ex vivo* polega na zatrzymaniu na kolumnach magnetycznych komórek zdolnych wywołać efekt GvHD, czyli populacji limfocytów posiadających receptory limfocyty T (TCR, ang. T-cell Receptor) zbudowane z podjednostek $\alpha\beta$ oraz limfocytów B, które zwiększają zagrożenie reaktywacji zakażenia wirusem Epstein-Barr i choroby limfoproliferacyjnej indukowanej przez EBV[12].

Deplecja limfocytów ogranicza zagrożenie GvHD ale jednocześnie osłabia efekt GvL. Biorca otrzymuje populacje komórek CD34+ po pozytywnej selekcji z niewielką ilością komórek NK (ang. Natural Killer) oraz limfocytów T posiadających receptory $TCR\gamma\delta^+$. Zarówno komórki NK jak i limfocyty $TCR\gamma\delta^+$ obecne w materiale przeszczepowym mogą działać ochronnie, hamując rozrost komórek nowotworowych oraz ograniczając wystąpienie zagrażających życiu infekcji[12].

2.1.6 Rekonstrukcja hematopoezy

Za przyjęcie przeszczepu uznajemy pierwszy z trzech kolejnych dni, kiedy poziom neutrofilów we krwi wynosi $0,5 \times 10^9/l$, a osiągnięcie tego stanu zajmuje około 10-20 dni[11]. Liczba przeszczepionych komórek macierzystych CD34+ ma odzwierciedlenie w tempie odnowy immunologicznej, podobnie jak wiek pacjenta, status serologiczny względem cytomegalowirusa u dawcy i biorcy lub schemat kondycjonowania.

Częścią oceny funkcji przeszczepu jest badanie chimeryzmu poprzyszczepowego określające czy komórki krwi i szpiku biorcy wykazują cechy genetyczne dawcy[13]. Do niedawna uważano, że do całkowitego przyjęcia allotransplantacji konieczne jest rozpoczęcie hematopoezy wykazującej kompletną zgodność z profilem genetycznym dawcy („complete donor chimerism”). Dalsze badania wykazały możliwość stabilnego współistnienia hematopoezy dawcy i biorcy, a stan taki nazwano chimeryzmem mieszanym („mixed chimerism”). Istnieje możliwość na wpływ na wysokość chimeryzmu przez zmiany dawek immunosupresji lub procedury wlewu limfocytów dawcy (DLI, ang. Donor Lymphocyte Infusion)[13].

W przeszczepieniach z powodu choroby nowotworowej, istotne jest monitorowanie pacjenta w kierunku możliwości wystąpienia choroby podstawowej. Wznowa choroby wykrywana jest na wczesnym etapie dzięki badaniom choroby resztkowej (MRD, ang. Minimal Residual Disease) oraz chimeryzmu poprzyszczepowego u biorcy[4,13]. Leczenie immunologiczne za pomocą modyfikacji leczenia immunosupresyjnego lub DLI mogą wspomóc efekt przeciwbiałaczkowy i ograniczyć ryzyka wystąpienia nawrotu[4,13].

2.1.7 Rekonstrukcja immunologiczna

Układ odpornościowy po HSCT ulega regeneracji, w trakcie której obserwuje się istotnie zaburzoną funkcję ochronną. Im dłużej trwa rekonstrukcja układu odpornościowego, tym większe jest narażenie pacjenta na wystąpienie zagrażających życiu zakażeń czy wznowy choroby podstawowej. Wpływ na tempo tego procesu mają źródło komórek macierzystych, procedury jakim materiał został poddany lub zastosowane leki (T-deplecja, seroterapia za pomocą globuliny antytymocytarnej, ATG), wiek biorcy i leki stosowane po HSCT[11].

Pierwszą populacją komórek pojawiających się od 10 do 20 dni po HSCT są neutrofile, a ich pojawienie się jest ważnym punktem czasowym regeneracji szpiku, natomiast stabilizacja ich liczby następuje w ciągu 2 miesięcy[11]. Drugą populacją komórek, pojawiającą się w okresie 3-4 tygodnia po przeszczepieniu są komórki NK, które po początkowej ekspansji osiągają normalną liczbę w ciągu czterech miesięcy po HSCT. Dzięki zdolności rozpoznawania patogenów bez udziału MHC, komórki NK jako pierwsze są odpowiedzialne za ograniczenie ryzyka wznowy i wystąpienia zakażeń poprzyszczepowych[14]. Dokładna analiza odbudowy poszczególnych subpopulacji komórek NK i czasu ich odnowy (CD56^{bright}, CD56^{intermediate}, CD56^{dim}) może dostarczać informacji rokowniczych na temat niepożądanych zdarzeń po HSCT (wystąpienie GvHD lub infekcji)[15]. Komórki NK działają poprzez bezpośrednie zniszczenie transformowanych lub zainfekowanych komórek oraz wydzielają cytokiny, modulując aktywność innych komórek efektorowych[16]. Ekspresja hamujących i aktywujących receptorów KIR (ang. killer immunoglobulin-like receptor) reguluje aktywność komórek NK i może prowadzić do większej reaktywności NK, zmniejszając ryzyko GvHD i wznowy białaczki[16].

W okresie 1 miesiąca po przeszczepie ma miejsce odnowa monocytów biorących udział w prezentacji antygenów, mechanizmach fagocytozy oraz produkcji cytokin[11].

Limfocyty T z receptorem TCR $\gamma\delta^+$ stanowią element odporności nieswoistej i pełnią funkcje zbliżone do komórek NK[11]. Niewielką populację komórek o działaniu protekcyjnym i przeciwnowotworowym są komórki NKT, charakteryzujące się obecnością na swojej powierzchni zarówno znacznika komórek T (CD3) jak i limfocytów NK (CD56), pełniące rolę w odpowiedzi pierwotnej i nabytej przez aktywację zarówno drogą antygenowo-zależną, jak i antygenowo-niezależną.

Kolejną populacją limfocytów ulegających odnowie po HSCT, są limfocyty T wykazujące na swojej powierzchni obecność receptora TCR $\alpha\beta$ (CD3 $\alpha\beta$), za pomocą którego rozpoznają białka MHC i prezentowane przez nie antygeny, i odbudowują się do 6 miesięcy po przeszczepieniu. Tempo odnowy zależy od funkcji grasicy i jej zdolności do tworzenia naiwnych limfocytów T (CD45RA⁺), której funkcja może się zmieniać w zależności od wieku lub leczenia systemowego. Na ekspansję obwodową limfocytów T będą wpływać seroterapia, stosowane leki immunosupresyjne lub deplecja limfocytów T przed przeszczepieniem[17]. Wśród limfocytów T CD3⁺ można wyodrębnić główne subpopulacje CD3⁺CD4⁺ o funkcji pomocniczej i regulatorowej oraz cytotoksyczne CD3⁺CD8⁺. Limfocyty CD4⁺ w zależności od profilu

cytokinowego mogą przyjmować jeden z wielu licznych podtypów różniących się funkcją (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22). Szybki i stały wzrost liczby limfocytów CD4+ po HSCT jest predyktorem większej szansy na przeżycie niezależnie od źródła komórek macierzystych[18]. Cytotoksyczne limfocyty CD8+ są zdolne do rozpoznawania i eliminacji komórek zakażonych przez wirusy i komórek nowotworowych, w oparciu o rozpoznawanie antygenów prezentowanych przez kompleks MHC klasy II[14]. Rekonstytucja limfocytów T CD3+ >1 x 10⁹/l po HSCT trwa od 7 do 12 miesięcy i jest bardzo wrażliwa na występowanie powikłań i leczenia immunosupresyjnego w okresie około- i poprzyszczepowym. Niezależnie od źródła komórek macierzystych limfocyty CD8+ odnawiają się szybciej (2-8 miesięcy) niż subpopulacja CD4+ (4-12 miesięcy). Ważną subpopulacją limfocytów CD4+ są limfocyty T regulatorowe (Treg) odpowiedzialne za homeostazę i tolerancję immunologiczną, zdolne zahamować proliferację i wydzielanie cytokin przez inne komórki układu odpornościowego. Najpóźniejsza odnowa ma miejsce w przypadku limfocytów B (CD19+; CD20+) odpowiadających za wytwarzanie immunoglobulin i odporność humoralną. Na tempo odbudowy komórek B wpływa rodzaj materiału przeszczepowego, zastosowanie rituksymabu, ATG i leczenia immunosupresyjnego[11]. Prawidłowa rekonstytucja immunologiczna po HSCT jest czynnikiem wpływającym na przeżycie, ponieważ większość zagrażających życiu powikłań wiąże się z zaburzeniami funkcji odpornościowej.

2.1.8 Powikłania występujące po przeszczepieniu hematopoetycznych komórek macierzystych

2.1.8.1 Choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi

GvHD jest najpowszechniejszym powikłaniem pojawiającym się po allotransplantacji HSC[19]. Mimo postępów w typowaniu HLA, schorzenie to występuje u 30%-50% biorców przeszczepów od MSD i u 40%-70% biorców MUD[20,21]. GvHD występuje w dwóch postaciach: ostrej (ang. Acute GvHD, aGvHD) i przewlekłej (ang. chronic GvHD, cGvHD)[1]. Obie postaci odpowiadają za śmiertelność i chorobowość związaną z HSCT[20]. Im niższy jest stopień zgodności w układzie HLA, tym wyższe jest ryzyko wystąpienia GvHD. Ostra postać GvHD w większości przypadków pojawia się do 100 dnia po HSCT, a powodem jej wystąpienia są alloreaktywne względem biorcy

limfocyty T, które w wyniku rozpoznania obcego antygeny u biorcy, pod wpływem uszkodzenia tkanek i uwalnianych cytokin ulegają aktywacji, ekspansji klonalnej i migracji do tkanek. Ostra postać GVHD manifestuje się objawami skórnymi (wysypka rumieniowo-grudkowa, pęcherze, złuszczenie), jelitowymi (biegunka, niedrożność, krwawienie) lub zajęciem wątroby (żółtaczka)[1,21]. Profilaktyka polegająca na podawaniu inhibitorów kalcyneuryny (cyklosporyna, takrolimus) w skojarzeniu z metotreksatem lub mykofenolanem mofetylu (MMF), pozwala na ograniczenie występowania aGvHD [3,4,21]. W razie wystąpienia, glukokortykosteroidy pozwalają na opanowanie objawów GvHD u 50-70% pacjentów[19,21]. Immunosupresja zwiększa ryzyko wystąpienia zagrażających życiu infekcji przez zahamowanie pracy układu immunologicznego. Ryzyko wystąpienia GvHD można zmniejszyć przez deplecję limfocytów T *ex vivo* lub za pomocą ATG *in vivo*[3,20].

W późniejszym okresie po przeszczepieniu można zaobserwować przewlekłą postać GvHD, która charakteryzuje się bardziej różnorodnym i złożonym przebiegiem klinicznym i przypomina manifestacje chorób autoimmunologicznych. Zmiany w obrębie skóry są twardzino-podobne, mogą wystąpić zaburzenia pigmentacji, zmiany przydatków skóry i liszaj płaski. Zaatakowane bywają też błony śluzowe (zespół suchości jamy ustnej), oczy (suche zapalenie spojówki i twardówki), przewód pokarmowy (zespół złego wchłaniania), wątroba (cholestaza), płuca (zarostowe zapalenie oskrzelików), powięzi i stawy[1]. Obecnie rezygnuje się z podziału postaci ostrej i przewlekłej GvHD pod względem czasu wystąpienia, a skupia się bardziej na rodzaju występujących objawów[22]. Leczenie GvHD opiera się na zastosowaniu immunosupresji w celu hamowania limfocytów T i komórek dendrytycznych, przy jednoczesnej aktywacji limfocytów regulatorowych[20]. Znaczny odsetek chorych po HSCT wymaga długotrwałej terapii immunosupresyjnej i w tej grupie jest wysokie zagrożenie powikłaniami infekcyjnymi.

Stopień ciężkości aGVHD mierzy się w skali 0-4. Tabela 2 przedstawia schemat oceny stopnia nasilenia objawów w poszczególnych narządach.

Tabela 2. Stopień nasilenia (stage) objawów ze strony poszczególnych narządów w ostrej GvHD u dzieci

Stopień nasilenia	Skóra	Wątroba Stężenie bilirubiny (mg/dl)	Przewód pokarmowy
0	brak wysypki	<2	< 4 stolców w ciągu dnia lub <10 ml/kg/d
1	plamisto-grudkowa wysypka zajmująca mniej niż 25% powierzchni ciała	2-3	4-6 stolców w ciągu dnia lub 10-19,9 ml/kg/d
2	plamisto-grudkowa wysypka zajmująca mniej niż 25-50% powierzchni ciała	3-6	7-10 stolców w ciągu dnia lub 20-30 ml/kg/d
3	uogólniona wysypka	6-15	>10 stolców w ciągu dnia lub powyżej 30 ml/kg/d
4	uogólniona wysypka z tworzeniem się pęcherzy na powierzchni powyżej 5% ciała	>15	Silny ból brzucha bez lub z niedrożnością jelit, krwista biegunka

W Tabeli 3 przedstawiono schemat całkowitej oceny (ang. grade) zaawansowania objawów klinicznych aGvHD, poprzez oparciu o 4-stopniową klasyfikację Glucksberg [23].

Tabela 3. Ocena całkowita (grade) ostrej postaci GvHD w oparciu o 4-stopniową skalę (stage) zajęcia poszczególnych narządów

Ocena całkowita (grade)	Skóra	Wątroba	Przewód pokarmowy
I - brak	1 lub 2	0	0
II - łagodny	3 lub	1	1
III - znaczny	-	2 lub 3, lub	2 lub 3
IV - ciężki	4 lub	4	4

Oceny zaawansowania cGvHD dokonuje się określając stopień nasilenia objawów i liczba dotkniętych organów jako łagodny, umiarkowany bądź ciężki[23].

Alloreaktywność układu odpornościowego po przeszczepieniu szpiku odpowiada zarówno za zagrożenia w postaci GvHD jak i korzystny efekt GvL, i tłumaczy to, dlaczego oba efekty występują łącznie[24]. Liczne obserwacje sugerują, że zmniejszone ryzyko nawrotu choroby u pacjentów z łagodną i umiarkowaną postacią GvHD oraz towarzyszący efekt GvL, zwiększają prawdopodobieństwo przeżycia, natomiast śmiertelność wywołana ciężką postacią ostrej lub przewlekłej GvHD przeważa nad potencjalnym efektem przeciwnowotworowym[24]. Odpowiedzialne za wystąpienie efektu GvL są także komórki NK obecne w przeszczepionym materiale[3,15]. Wzmocnienie efektu GvL można u biorcy osiągnąć poprzez DLI lub stosowanie cytokin [25].

2.1.8.2 Infekcje w okresie poprzyszczepowym

Pacjenci, którzy przeszli procedurę HSCT są obciążeni długotrwałym wtórnym niedoborem odporności[1]. Z badań wielośrodkowych wynika, że u dzieci poddanych HSCT obserwuje się większą zapadalność na infekcje w okresie poprzyszczepowym, jednocześnie odnotowując szybszy powrót funkcji odpornościowej w porównaniu z pacjentami dorosłymi[26]. Tabela 4 przedstawia odsetek śmiertelności i powikłań związanych z infekcjami po przeszczepieniu hematopoetycznych komórek macierzystych oraz zapadalność na choroby wirusowe[27].

Tabela 4. Zestawienie odsetka śmiertelności i powikłań związanych z infekcjami po przeszczepieniu hematopoetycznych komórek macierzystych oraz zapadalność na choroby wirusowe.

Śmiertelność związana z infekcjami w okresie poprzszczepowym u dzieci		
7%	Auto-HSCT	
11%	HSCT od zgodnego dawcy spokrewnionego MSD	
13%	HSCT od dawcy zgodnego niespokrewnionego MUD	
Wystąpienie powikłań po przeszczepieniu HSC związanych z infekcjami u dzieci		
21%	Auto-HSCT	
82%	Allo-HSCT	
Zapadalność na infekcje wirusowe po HSCT u dzieci		
11%	Auto-HSCT	średnio 11 dzień po HSCT
19,3%	Allo-HSCT	Pierwsze 30 dni po HSCT
18,5%	Allo-HSCT	31-100 dzień po HSCT
20%	Allo-HSCT	101 dni -2 lata po HSCT

Skróty: auto-HSCT – megachemioterapia i autologiczne przeszczepienie komórek macierzystych, allo-HSCT – megachemioterapia i autologiczne przeszczepienie komórek macierzystych,

W momencie regeneracji hematopoezy, odporność nieswoista podejmuje funkcję wraz ze wzrostem liczby granulocytów we krwi. Limfocyty T oraz B ze znacznym opóźnieniem uzyskują kompetencję immunologiczną. Limfopenia i hipogammaglobulinemia są kluczowym czynnikiem wpływającym na występowanie infekcji wirusowych, podczas gdy neutropenia przekłada się na możliwość pojawienia się infekcji grzybiczych[19]. Brak harmonijnej odnowy różnych elementów układu odpornościowego odpowiada za różnice w częstości zakażeń w poszczególnych okresach po HSCT[26]. W pierwszym okresie, do momentu uzyskania wszczepu, największym zagrożeniem są bakterie, zakażenia grzybicze (*Candida*, *Aspergillus*) oraz wirusy z rodziny Herpes[1,26,27]. W kolejnym stadium odbudowy układu immunologicznego dominują infekcje powodowane przez patogeny oportunistyczne (np. wirusy, grzyby *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis jiroveci* i bakterie otoczkowe)[1,26]. Z kolei profilaktyka wystąpienia GvHD lub eskalacja leczenia

immunosupresyjnego w razie wystąpienia GvHD, zwiększa ryzyko infekcji wirusowych[19]. Za szczególnie istotne uważa się wirusy wymienione w tabeli 5.

Wirus cytomegalii

Ludzki wirus cytomegalii (CMV) to β -herpeswirus o dwuniciowym DNA (dsDNA), który powszechnie występuje w populacji. Seropozytywność rośnie wraz z wiekiem i u dorosłych wynosi 90%. CMV jest zdolny infekować leukocyty, komórki nabłonkowe, komórki nerwowe, fibroblasty oraz komórki mięśni gładkich. Pierwotne zakażenie u osób immunokompetentnych przebiega bezobjawowo lub skąpoobjawowo. Po pierwotnej infekcji, wirus może przeżyć latami wewnątrz komórki w formie latentnej. W okresie utajenia CMV jest obecny w komórkach prekursorowych monocytów oraz w komórkach śródbłonna[28]. Do reaktywacji i replikacji może doprowadzić immunosupresja lub znaczne zaburzenia funkcji układu immunologicznego, np. w AIDS lub po przeszczepieniach szpiku lub narządów unaczynionych[29]. Replikacja CMV po HSCT opóźnia odbudowę immunologiczną[30]. Wirus CMV może wywołać wiele schorzeń, w tym zapalenie płuc, wątroby, okrężnicy lub zapalenie siatkówki[29]. Wystąpienie reaktywacji CMV w czasie immunosupresji po transplantacji niesie ze sobą ryzyko odrzucenia przeszczepu[31,32].

Przyczyny zakażenia CMV po HSCT stanowią reaktywacja latentnego wirusa u CMV seropozytywnego chorego lub transmisja CMV od seropozytywnego dawcy do seronegatywnego biorcy[29]. Szczególne zagrożenie CMV stanowi dla biorców, którzy otrzymali materiał przeszczepowy od dawcy niespokrewnionego, po T-deplecji i leczonych wysokimi dawkami glikokortykosterydów. Najniższe ryzyko replikacji CMV po HSCT występuje, gdy status serologiczny dawcy jest zgodny ze statusem biorcy. Reaktywacja wirusa wykrywana jest u 40-70% seropozytywnych pacjentów i pacjentów, którzy otrzymali przeszczep od seropozytywnego dawcy[33]. Monitorowanie pacjentów czułymi metodami biologii molekularnej przed wystąpieniem objawów ma za zadanie uchwycenie momentu replikacji wirusa na wczesnym etapie i podjęcie odpowiedniego leczenia.

Adenowirusy

Adenowirusy (ADV) nie posiadają otoczki lipidowej a ich materiał genetyczny stanowi dwuniciowe DNA. Znanych jest ponad 100 serotypów wirusa dzielonych na 7 gatunków (A-G). Poszczególne grupy charakteryzują się zdolnością do hemaglutynacji oraz właściwościami onkogennymi[34]. Kliniczne objawy zakażenia ADV w przypadku prawidłowo działającego układu immunologicznego obejmują choroby górnych dróg oddechowych, zapalenie żołądka i jelit, zapalenie spojówek i w większości przypadków są łagodne i samoograniczające się[35]. Sporadycznie odnotowuje się ciężkie przypadki zakażenia, w konsekwencji których rozwija się zapalenie opon mózgowych, zapalenie mięśnia sercowego czy zapalenie płuc. U pacjentów poddanych immunosupresji, zakażenie ADV może prowadzić do uszkodzenia narządów oraz zaburzeń ogólnoustrojowych a w efekcie do śmierci. Zachorowalność na ADV po HSCT u dzieci wynosi około 32%, u dorosłych 6%[36]. Do rozpoznania infekcji dochodzi najczęściej w pierwszych 100 dniach po transplantacji[36]. Czynnikiemami zwiększającymi ryzyko zachorowania na ADV są zaburzenia odporności w wyniku T-deplecji, wystąpienia GVHD i leczenia immunosupresyjnego, źródło komórek i pokrewieństwo z dawcą oraz wcześniejsze przejście infekcji adenowirusowej[36,37]. Zakażenia pierwotne u osób immunokompetentnych występują najczęściej tylko we wczesnym dzieciństwie bez objawów klinicznych, jednak forma latentna wirusa może utrzymywać się w węzłach chłonnych oraz błonie śluzowej komórek limfoidalnych przewodu pokarmowego[37]. Znaczna liczba kopii wirusa jest wykrywana w kale przed wystąpieniem objawów klinicznych, co potwierdza rolę rezerwuaru jaką pełni układ pokarmowy po pierwotnym kontakcie. Istotną część zakażeń ADV wydaje się mieć charakter reaktywacji latentnych form wirusa w czasie immunosupresji[36,37].

ADV ma zdolność przenikania do komórek gospodarza na drodze endocytozy. Wykorzystuje do tego obecny na komórkach nabłonkowych receptor CAR (ang. Coxsackievirus-adenovirus receptor) i receptor błonowy CD46. Receptor CAR umożliwia wnikanie serotypów B i D, natomiast CD46 ma powinowactwo do pozostałych typów wirusa[38,39].

Wirus Epstein-Barr

Wirus Epsteina-Barr (EBV) jest γ -herpeswirusem o dwuniciowym DNA i wyjątkowej zdolności do wywoływania utajonego zakażenia w ludzkich limfocytach B, a także do

ich transformacji do proliferujących limfoblastów, działając tym samym jako czynnik wywołujący nowotwory z komórek B[40]. Pierwotne zakażenie EBV jest występujące u większości ludzi w dzieciństwie i powoduje trwałe całe życie, utajone zakażenie u ponad 90% immunokompetentnych dorosłych[41]. Objawy pierwotnego zakażenia u ludzi z poprawnie pracującym układem immunologicznym są łagodne i samoograniczające się. Niekiedy zakażenie przeradza się w mononukleozę zakaźną z takimi objawami jak gorączką, powiększeniem wątroby, śledziony i węzłów chłonnych[41]. Po ustąpieniu wirerii, uśpiona forma wirusa pozostaje na stałe w niektórych limfocytach B i w przypadku obniżenia odporności, dochodzi do gwałtownego namnożenia komórek B zawierających EBV. Stan ten może prowadzić do poliklonalnego lub monoklonalnego potransplantacyjnego zespołu limfoproliferacyjnego indukowanego przez EBV (EBV-PTLD, ang. EBV-Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder), który występuje u 0,5-29% pacjentów po HSCT. Diagnozowany jest przeważnie w trzecim miesiącu po przeszczepie, rozpoczyna się objawami mononukleozowo-podobnymi lub powoduje powiększenie węzłów chłonnych i obraz kliniczny/zespół objawów przypominający chłoniaka, co stanowi stan zagrożenia życia. Przed wprowadzeniem terapii przeciwciałem anty-CD20+ (rituximab), reaktywacja EBV była wielkim zagrożeniem życia biorcy HSCT, ponieważ śmiertelność związana z PTLD wynosiła 50%-90%[42,43]. Czynnikiem zwiększonego ryzyka wystąpienia EBV-PTLD jest niepełna zgodność HLA, różnica statusu serologicznego dawcy i biorcy w kierunku EBV, kondycjonowanie o zredukowanej intensywności (RIC), wystąpienie ostrej postaci GvHD, zastosowanie ATG i asplenizm[43,44]. Poziom replikacji wirusa we krwi odzwierciedla skomplikowaną i złożoną równowagę między EBV, a gospodarzem, zdolność organizmu do odpowiedzi immunologicznej na wirusa, jak i na zakażone komórki. Swoiste wobec EBV limfocyty T kontrolują długoterminowo stan uśpienia, a brak tej kontroli prowadzi do wystąpienia limfoproliferacji u pacjentów z immunosupresją po transplantacjach lub w przebiegu AIDS u pacjentów HIV-dodatnich[43]. W leczeniu EBV-PTLD podejmowano próby niespecyficznego immunoterapii za pomocą DLI oraz terapii ukierunkowanej na komórki T swoiste wobec wirusa[45].

Tabela 5. Charakterystyka CMV, ADV i EBV oraz objawy infekcji oportunistycznych po HSCT.

	CMV	ADV	EBV
Genom	ok 235 kb dsDNA	24-46 kb dsDNA	120-240 kb dsDNA
Częstość replikacji po HSCT	45-65%	20-50%	1-40
Infekcje oportunistyczne po HSCT			
Objawy zakażenia	zapalenie wątroby	gorączka	zapalenie mózgu
	biegunka	biegunka	zapalenie wątroby, płuc
	zapalenie siatkówki	zapalenie mózgu	chłoniaki
	zapalenie płuc	zapalenie wątroby	EBV-PTLD
	zapalenie przełyku	krwotoczne zapalenie pęcherza	zespół hemofagocytarny HLH

2.1.9 Terapia limfocytami T wirusowo-specyficznymi (VST)

Leczenie zakażeń wirusowych obecnie opiera się na wczesnym wykrywaniu metodami molekularnymi replikacji wirusów ADV, EBV i CMV i wczesnej interwencji w celu redukcji ryzyka progresji do infekcji ogólnoustrojowej[46]. Farmakoterapia wiąże się z toksycznością terapii, kosztami leków i wydłużeniem hospitalizacji[47]. U pacjentów z niedoborem odporności, farmakoterapia może mieć niższą skuteczność i część pacjentów wymaga wielokrotnego leczenia[46]. Szansą leczenia dla pacjentów z opornymi lub nawrotowymi zakażeniami mogą być terapie komórkowe[48,49]. Adoptywna terapia limfocytami T pochodzącymi od dawcy jest bezpiecznym i skutecznym leczeniem infekcji wirusowych w okresie przeszczepowym[46,47,49–53]. Nowo opracowany proces wytwarzania limfocytów wykazujących specyficzną odpowiedź przeciwwirusową (ang. Virus Specific T-lymphocytes, VST) wykorzystuje pule nakładających się zsyntetyzowanych peptydów (peptamerów) stanowiących fragmenty antygenów wirusowych do stymulowania wydzielania cytokin w docelowej populacji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej[13–15]. Metoda ta jest niezależna od prezentacji antygenów wirusowych przez HLA i może być stosowana do stymulacji

i izolacji swoistych limfocytów T wszystkich podklas i dostosowana do dowolnego antygeny w celu wytworzenia wieloswoistych produktów komórkowych[16].

2.2 Podsumowanie

HSCT na przestrzeni lat stało się jedną z podstawowych części terapii chorób hematologicznych i hematoonkologicznych. Postępy w obszarze doboru dawców, rodzaju kondycjonowania przed przeszczepem, techniki monitorowania odnowy układu odpornościowego, ryzyka nawrotu choroby podstawowej i zakażeń po przeszczepieniach poprawiły wyniki leczenia.

Rekonstytucja immunologiczna po HSCT zależy od wielu czynników przed- i poprzyszczepowych, które mogą zwiększać ryzyko ciężkich i zagrażających życiu zakażeń. Ryzyko zakażeń wirusowych jest szczególnym problemem klinicznym ponieważ eliminacja infekcji wymaga funkcji limfocytów T i B, które osiągają swoją sprawność z dużym opóźnieniem. Istnieje możliwość opracowania i stosowania terapii komórkowych, które będą skuteczne w leczeniu pacjenta z ciężkimi zakażeniami wirusowymi.

3. Cele pracy

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

4. Materiały i metody

4.1 Charakterystyka grupy badanej

Tabela 6. Charakterystyka grupy badanej.

Liczba przypadków	n = 82	Odsetek
Płeć	n	%
męska	52	63
żeńską	30	37
Rodzaj dawcy	n	%
Zgodny dawca niespokrewniony (MUD)	58	71
Zgodny dawca rodzinny, rodzeństwo (MSD)	20	24
Dawca haploidentyczny	4	5
Zgon	12	15
Nawrót choroby podstawowej	9	11
Źródło komórek macierzystych	n	%
aferezat krwi obwodowej PBSC	70	85
szpik kostny BM	12	15
Rodzaj kondycjonowania	n	%
Mieloablacyjne (MAC)	24	29
O zredukowanej intensywności i toksyczności (RIC)	45	55
Niemieloablacyjne (NMA)	9	11
Inny protokół*	3	4
Bez kondycjonowania	1	1
Zastosowanie globuliny antytymocytarnej (ATG) w seroterapii	n	%
ATG +	69	84
ATG -	13	16
Rodzaj ATG	n	%
Grafalon	62	76
Thymoglobulina	6	24

Kondycjonowanie z zastosowaniem lub bez PTCy	n	%
PTCy +	3	4
PTCy -	79	96
Choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi GvHD	n	%
aGvHD +	53	65
aGvHD -	29	35
cGvHD+	7	9
cGvHD -	75	91
Status serologiczny CMV		
Dawca IgG(+)/Biorca IgG(+)	36	44
Dawca IgG(+)/Biorca IgG(-)	14	17
Dawca IgG(-)/Biorca IgG(+)	25	30
Dawca IgG(-)/Biorca IgG(-)	7	9
Status serologiczny EBV		
Dawca IgG(+)/Biorca IgG(+)	27	33
Dawca IgG(+)/Biorca IgG(-)	5	6
Dawca IgG(-)/Biorca IgG(+)	37	45
Dawca IgG(-)/Biorca IgG(-)	13	16
Występowanie replikacji wirusowych	n	%
ADV	20	24
EBV	54	66
CMV	33	40
Pierwotne rozpoznanie	n	%
Choroba nowotworowa	60	73
Schorzenie nienowotworowe	22	27
Rozpoznanie	n	%
Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL)	37	45
Ostra białaczka szpikowa (AML)	9	11
Ciężka anemia aplastyczna (SAA)	7	9
Zespół mielodysplastyczny (MDS)	6	7
Młodzięcza białaczka mielomonocytowa (JMML)	4	5

Wiskott Aldrich Syndrome (WAS)	3	4
Ciężki, złożony niedobór odporności (SCID)	3	4
Chłoniak nieziarniczny(NHL)	2	3
Zespół hemofagocytarny (HLH)	2	3
Przewlekła białaczka szpikowa (CML)	1	1
T-komórkowy chłoniak wątrobowo-śledzionowy	1	1
X-linked Lymphoproliferative Disease	1	1
Przewlekła choroba ziarniniakowa (CGD)	1	1
Anaplastyczny chłoniak wielkokomórkowy (LCAL)	1	1
Wrodzona neutropenia	1	1
Nocna napadowa hemoglobinuria (PNH)	1	1
Zespół Nijmegen (NBS)	1	1
Choroba mitochondrialna	1	1

*- „Inny protokół” – odnosi się do pacjentów z zespołami łamliwości chromosomów

Grupę badaną stanowiło 82 pacjentów Katedry i Kliniki Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu poddanych procedurze przeszczepienia hematopoetycznych komórek macierzystych w latach 2017-2019. Komórki VST oznaczone zostały u 78 pacjentów (4 pomiary zostały odrzucone ze względu na techniczny brak możliwości analizy). Biorcami było 30 dziewcząt i 52 chłopców w wieku od 4 miesięcy do 20 lat (mediana wieku wynosiła 10,2 roku) leczonych z powodu chorób nowotworowych lub nienowotworowych. Najczęściej przeprowadzaną procedurą było przeszczepienie hematopoetycznych komórek macierzystych krwi obwodowej (70 analizowanych przypadków) od dawcy niespokrewnionego (58 analizowanych przypadków). Szczegółowe informacje dotyczące grupy badanej zebrane zostały w tabeli 6.

W okresie obserwacji 12 pacjentów zmarło, u 11 wystąpiła wznowa choroby podstawowej. Obecność zakażeń wirusowych odnotowano u: CMV – 33; ADV – 20; EBV - 54, natomiast u 53 pacjentów stwierdzono wystąpienie aGvHD, a u 7 cGvHD. Na realizację badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej działającej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu (KB – 663/2018).

4.2 Ocena potencjału przeciwwirusowego limfocytów dawcy

Przedmiotem badań były limfocyty dawcy, uzyskane z próbki kontrolnej materiału przeszczepowego. Do każdego testu wykorzystywano 1 000 000 leukocytów zawieszonych w 100 μ l PBS. Z próbki BM izolowano mononukleary metodą wirowania w gradiencie ciężkości z wykorzystaniem FicollPaque. Hematopoetyczne komórki macierzyste krwi obwodowej płukano w PBS, a następnie zawieszano do uzyskania powyższego stężenia. Zawiesinę komórek umieszczano w komorze testowej opłaszczonej antygenami poszczególnych wirusów (PepTivator® CMV pp65 – HT, PepTivator® ADV pp65 – HT, PepTivator® EBV pp65 – HT) i inkubowano w warunkach 5% CO₂ w temperaturze 37° przez 2h. Po tym czasie do komór testowych dodawano 1 μ l brefeldyny A (Brefeldin A), odczynnika hamującego transport białka z retikulum endoplazmatycznego do kompleksu Golgiego i próbkę inkubowano przez kolejne 4h w 5% CO₂ w temperaturze 37°. Kontrolę ujemną stanowiły komórki dawcy inkubowane w tych samych warunkach w próbówce bez obecności antygenów wirusa. Jako kontrolę dodatnią testu użyto superantygenu – enterotoksyny gronkowca SEB (Staphylococcal enterotoxin B) w stężeniu 1% przy zachowaniu tych samych warunków reakcji. Po zakończeniu inkubacji do zawiesiny komórek dodawano mieszaninę przeciwciał oraz przeciwciała anti-INF γ , próbki utrwalono i permeabilizowano według instrukcji Rapid Cytokine Inspector (CD4/CD8 T Cell) Kit. Do 5 próbek przeniesiono zawartość komór testowych oraz próbek kontrolnych, komórki płukano w CellWash i wirowano 5 minut w temperaturze 25°C, przy prędkości 200 x g. Po odciążeniu supernatantu, do pelletu komórkowego dodawano 50 μ l mieszaniny przeciwciał (30 μ l mix, 10 μ l anti-INF- γ , 10 μ l). Następnie próbki wytrząsano 2 minuty i inkubowano w temperaturze pokojowej w ciemności 8 minut. Do komórek dodawano 25 μ l utrwalacza z zestawu Rapid Cytokine Inspector, wytrząsano próbki 2 minuty i kolejne 8 minut inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej. Błona komórkowa następnie była poddana permeabilizacji poprzez odczynnik Perm Rapid Cytokine Inspector (25 μ l, 2min wytrząsania i 18 minut inkubacji w ciemności, 25°C). Nadmiar odczynników odpłukiwano CellWash i wirowano 5 minut w temperaturze 4°C, przy prędkości 200 x g. Po odciążeniu supernatantu i zawieszeniu w 500 μ l Cell Wash, dokonywano analizy w 10-kolorowym cytofluorymetrze przepływowym FACS Canto firmy Becton Dickinson za pomocą oprogramowania BD FACSDiva Software.

Ocena reaktywności przeciwwirusowej polegała na detekcji limfocytów wydzielających interferon- γ i wykazujących błonowe wiązanie przeciwciała anty-INF- γ PE.

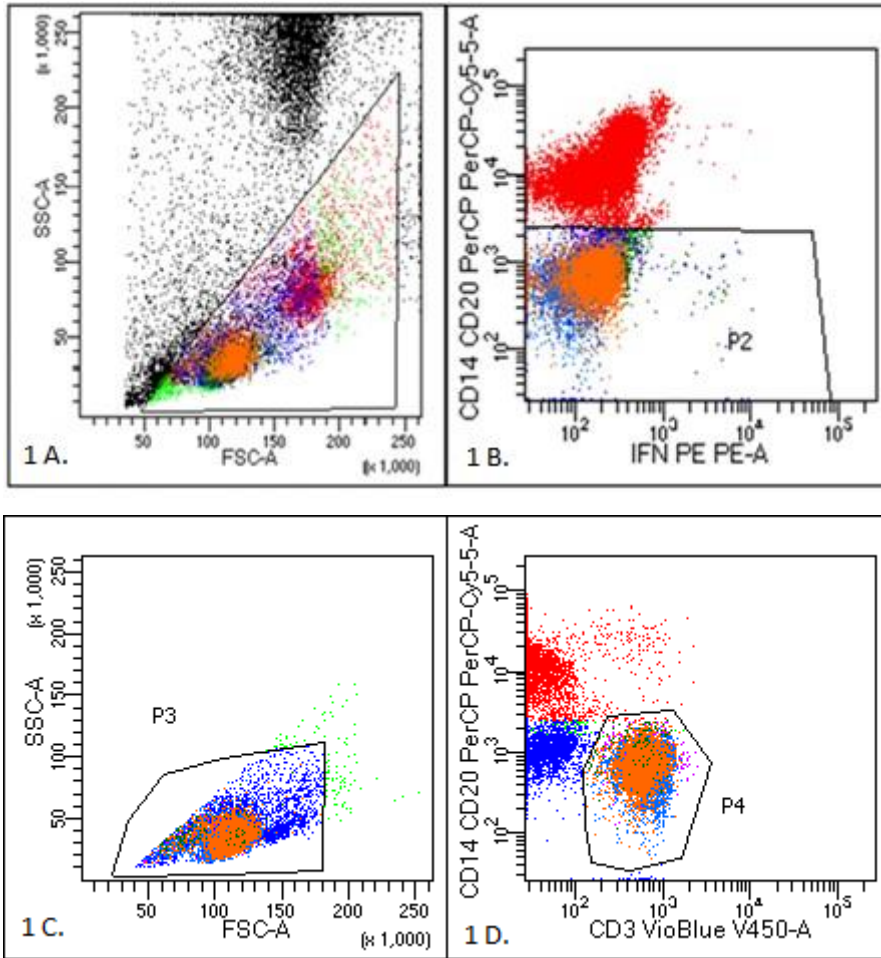
Tabela 7. przedstawia przeciwciała używane w Rapid Cytokine Inspector (CD4/CD8 T Cell) Kit. FcR Blocking Reagent hamował wiązanie niespecyficzne przeciwciał, wykluczając wyniki fałszywie dodatnie.

Tabela 7. Spis użytych przeciwciał z fluorochromami

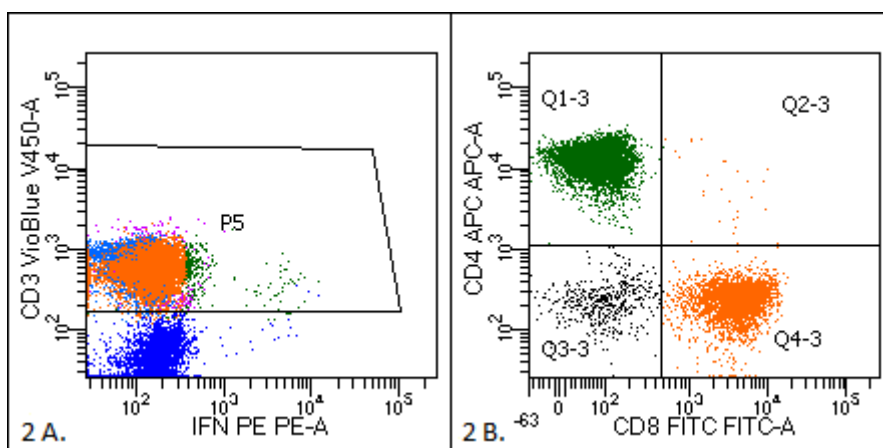
Przeciwciało	Fluorochrom
CD3	VioBlue
CD4	APC
CD8	FITC
CD14	PerCP
CD20	PerCP

Strategia bramkowania cytofluorometrycznego

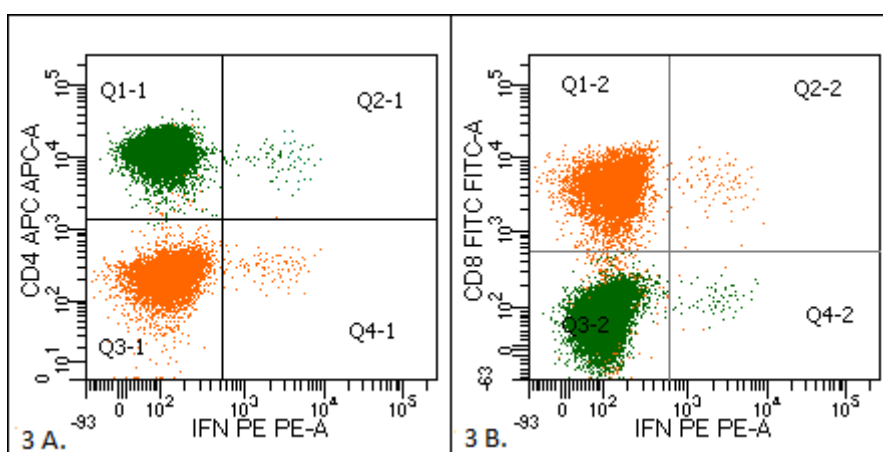
Wyniki opracowano na podstawie analizy 10 000 komórek poszczególnej próbki. Za pomocą diagramu FSC-A/SSC-A wybrano populację mononuklearów do dalszej analizy (bramka P1, rycina 1A). Bramkę P2 założono, aby wyodrębnić komórki wykazujące obecność CD14⁺ i CD20⁺ na powierzchni błony komórkowej i wyeliminować je z dalszych badań (rycina 1B). Bramka P3 zawężyła pole analizy do jednorodnej populacji komórek (rycina 1C). Kolejnym etapem była prezentacja jedynie limfocytów T CD3⁺/anty-INF- γ (bramka P4, rycina 1D). Bramka P5 uwzględniła obecność komórek INF- γ (+) w populacji limfocytów CD3⁺ (rycina 2A). Subpopulacje CD4⁺ i CD8⁺ oceniono na podstawie diagramu krzyżowego (rycina 2B), a na kolejnych diagramach krzyżowych przedstawiono liczbę komórek wiążących przeciwciało anty-INF- γ w populacji limfocytów CD4⁺ (rycina 3 A) i CD8⁺ (rycina 3 B).



Rycina 1. Wyodrębnienie populacji limfocytów T na podstawie morfologii komórek i odrzucenie komórek CD14+ oraz CD20+.



Rycina 2. Identyfikacja populacji CD3⁺ wydzielającej INF- γ oraz podział na subpopulacje CD3⁺CD4⁺ / CD3⁺CD8⁺.

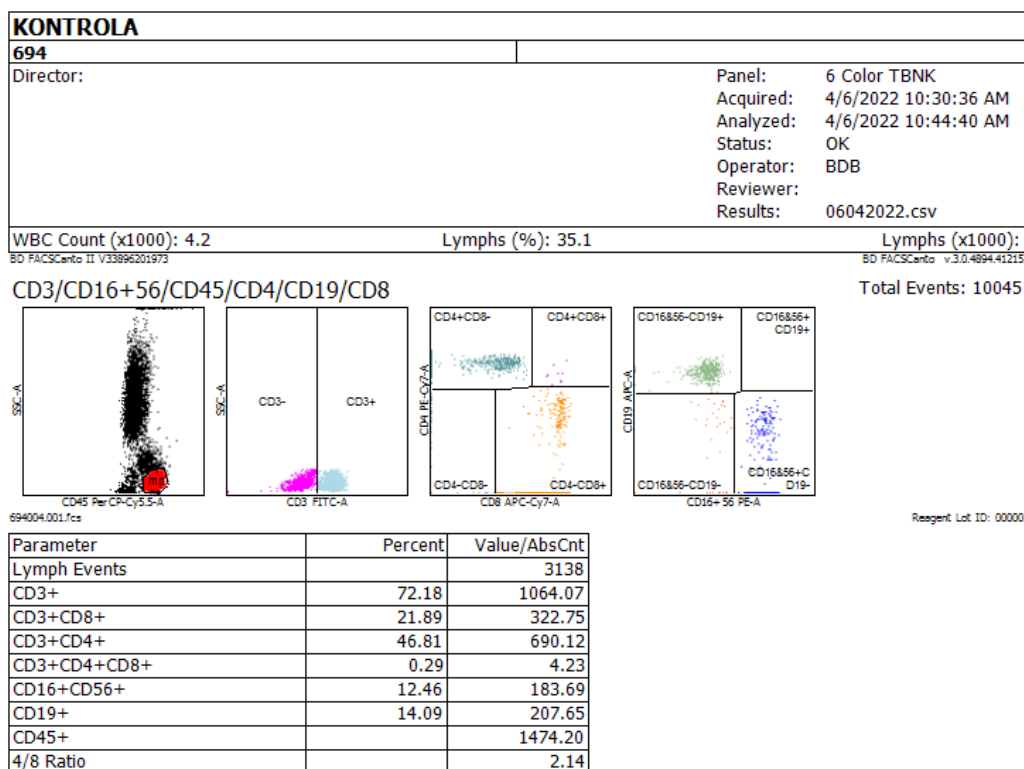


Rycina 3. Ocena wydzielania INF- γ wśród limfocytów CD3⁺CD4⁺ / CD3⁺CD8⁺

Skład ilościowy i jakościowy materiału przeszczepowego oraz odbudowę immunologiczną oceniano na podstawie badania subpopulacji limfocytów w mikrolitrze krwi (kom/ μ l) techniką cytofluorometrii przepływowej.

Do identyfikacji populacji badanych komórek używano BD MultitestTM 6-Color TBNK. Próbkę kontrolną materiału przeszczepowego rozcieńczono CellWash do uzyskania stężenia 10 tys. kom/ μ l. 50 μ l zawiesiny przeniesiono do probówek TrueCount[®] i dodano 50 μ l zawiesiny przeciwciał (CD45⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD56⁺, CD19⁺). Do kontroli oznaczenia stosowano zestawów Beckton Dickinson: High (materiał przeszczepowy), Low (krew obwodowa w czasie monitorowania odbudowy immunologicznej). Próbkę testową oraz odpowiednią kontrolę inkubowano w ciemności

w temperaturze pokojowej 10 minut. Następnie dodawano 450 µl mieszaniny lizującej (10% roztwór BD FACS™ Lysing Solution w wodzie destylowanej) i pozostawiano na 10 minut w ciemności w temperaturze 25°C. Po tym czasie próbki były gotowe do analizy cytofluorymetrycznej. Oceny limfocytów dokonywano przy użyciu programu Canto (rycina 4).



Rycina 4. Obraz kontroli rozkładu ilościowego i jakościowego subpopulacji limfocytów.

4.3 Zestawienie odczynników i sprzętu wykorzystanego do przeprowadzenia badań

4.3.1 Wykaz aparatury wykorzystanej do prowadzonych badań

Nazwa aparatury i model	Producent, kraj
Wirówka Centrifuge 5810R	Eppendorf, Niemcy
Inkubator CO ₂ Steri-Cycle i160	ThermoScientific, Niemcy
Worteks IKA MS 3 Vortexer	IKA Werke, Niemcy
Cytometr FACSCanto	Becton Dickinson, USA
Analizator Hematologiczny Medonic	Boule, Szwecja

4.3.2 Wykaz odczynników wykorzystanych do przeprowadzenia badań

Nazwa odczynnika	Producent, kraj	Nr katalogowy
Ficoll-Paque TM PLUS	Cytiva, Szwecja	71101700-EL
CellWash/PBS	Becton Dickinson, USA	349524
Brefeldin A	MiltenyiBiotec, Niemcy	51910302873
PepTivator [®] CMV pp65 - HT	MiltenyiBiotec, Niemcy	130-097-727
PepTivator [®] ADV5 Hexon – HT	MiltenyiBiotec, Niemcy	130-098-237
PepTivator [®] EBV BZLF1 - HT	MiltenyiBiotec, Niemcy	130-098-239
Rapid Cytokine Inspector (CD4/CD8 T Cell) Kit	MiltenyiBiotec, Niemcy	130-097-343
Anti-INF- γ -PE	MiltenyiBiotec, Niemcy	130-113-493
Staphylococcal enterotoxin B from <i>Staphylococcus aureus</i>	Merck, Niemcy	S4881
FACSFlow	Becton Dickinson, USA	342003
FACS Diva CS&T Research Beads	Becton Dickinson, USA	655051
MicroAmp TM Optical	Thermo Fisher Scientific,	4311971

Adhesive Film	USA	
BD Multitest™ 6-Color TBNK	Becton Dickinson, USA	644611
BD Trucount™ Tubes	Becton Dickinson, USA	340334
BD FACS™ Lysing Solution	Becton Dickinson, USA	349202
BD™ Multi-Check Control	Becton Dickinson, USA	340911

W dwóch przypadkach „na ratunek życia” wyizolowano na skalę kliniczną limfocyty dawcy wykazujące specyficzność przeciw antygenom wirusa ADV. Pobrano próbkę krwi od obojga rodziców i poddano ją screeningowi przy użyciu kitu PepTivator® ADV5 Hexon – HT według powyżej opisanej procedury. Do aferezy niestymulowanych mononuklearów wybrano w obu przypadkach rodzica, którego limfocyty zdolne były do większej produkcji interferonu-gamma po inkubacji z antygenami wirusa ADV. Produkt aferezy był opracowany w procedurze CCS z użyciem systemu CliniMACS Prodigy, Miltenyi Biotech.

5. Analiza statystyczna uzyskanych wyników

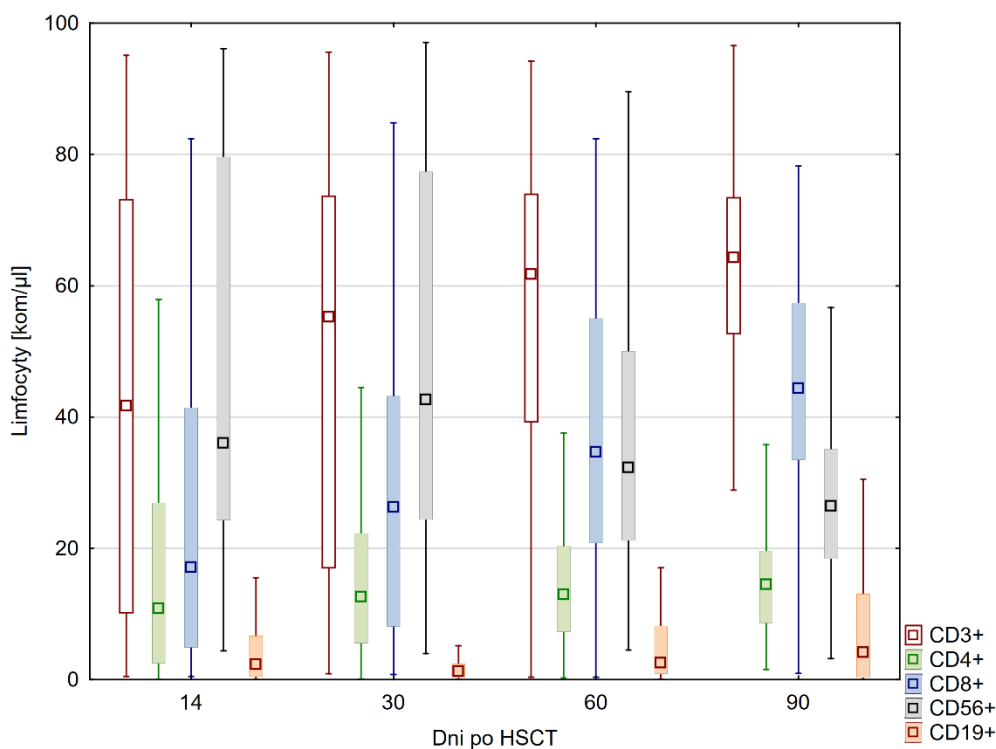
Przeprowadzono analizę związku parametrów charakteryzujących dawcę i biorcę z odnową immunologiczną oraz występowaniem zakaźnych i niezakaźnych powikłań po przeszczepieniu komórek macierzystych. Oceniono związek między liczbą limfocytów T, B, komórek NK, limfocytów VST a występowaniem zakażeń wirusowych wywołanych przez ADV, CMV, i EBV, zapadalnością na ostrą i przewlekłą postać choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi.

Analizę statystyczną otrzymanych wyników prowadzono przy wykorzystaniu programu Dell®Statistica v 14.0. Normalność rozkładu wyników sprawdzono testem Shapiro-Wilka, który wykazał, że zebrane dane nie mają rozkładu normalnego. W dalszej analizie zastosowano testy nieparametryczne. Dla danych ilościowych stosowano test U Manna-Whitneya oraz ANOVA Kruskala-Wallisa, a następnie odpowiednią analizę post-hoc przy wykorzystaniu zestawu medycznego w programie Statistica v. 14.0. Różnice w cechach jakościowych określono za pomocą testu chi-kwadrat. Analizę korelacji pomiędzy poszczególnymi cechami prowadzono przy wykorzystaniu testu Spearmana. We wszystkich stosowanych testach istotności określono na poziomie $p < 0,05$.

6. Wyniki

6.1 Odnowa limfocytna po przeszczepieniu HSC

Wyniki rekonstrukcji immunologicznej zostały przedstawione w postaci liczby komórek we krwi obwodowej jako liczba bezwzględna (liczba limfocytów/ μl krwi) oraz względna (odsetek, %) od 14-21 dnia do 90 dnia po transplantacji HSC. Dane pochodzące z przeprowadzonych badań zaprezentowane są na rycinie 5. Szczegółowe dane liczbowe zestawiono w tabeli 8.



Rycina 5. Przebieg odnowy limfocytniej poszczególnych subpopulacji limfocytów w badanej grupie pacjentów od 14-21 dnia od przeszczepienia do 90 dnia po HSCT. Populacje limfocytów przedstawiono jako komórki: CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD56+, CD19+. Słupki przedstawiają mediany odnotowanych w grupie badanej wartości.

Tabela 8. Zestawienie liczby komórek/ul poszczególnych subpopulacji limfocytów w 14, 30, 60 i 90 dniu po HSCT.

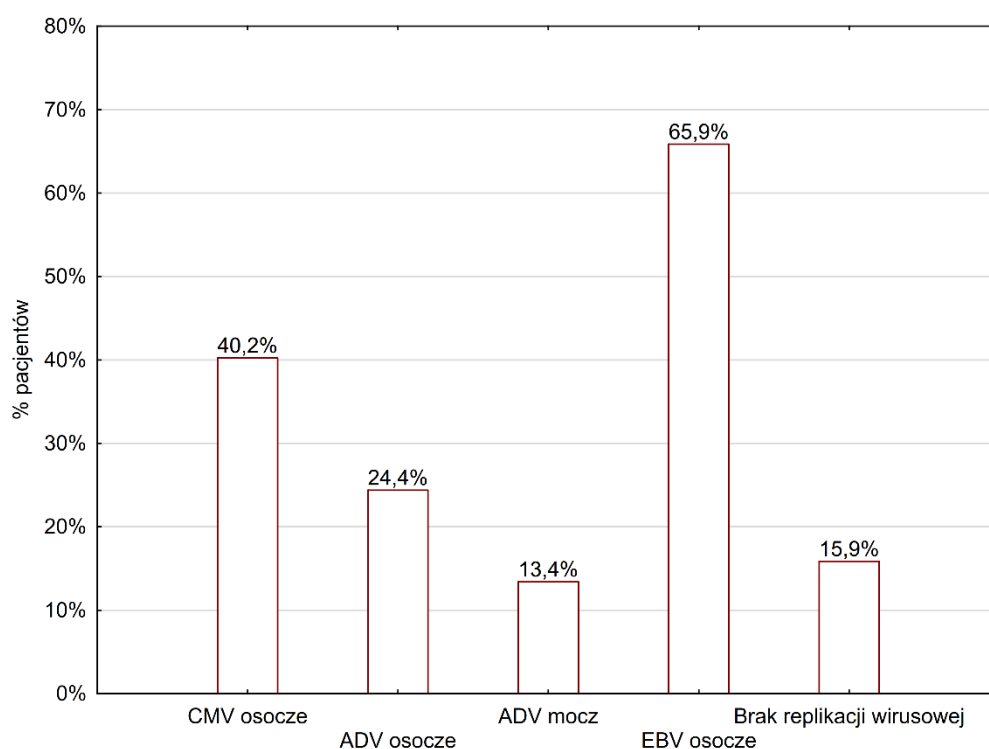
Subpopulacje limfocytów	Liczba kom/ul (mediana oznaczeń)			
	14 dni Po HSCT	30 dni po HSCT	60 dni po HSCT	90 dni po HSCT
Limfocyty CD3+	41,73	55,23	61,73	64,30
Limfocyty CD4+	10,8	12,60	12,94	14,47
Limfocyty CD 8+	17,07	26,29	34,65	44,33
Limfocyty CD 56+	36,00	42,65	32,33	26,43
Limfocyty CD 19+	2,3	1,28	2,53	4,13

6.2 Częstość występowania infekcji wirusowych

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. Wyniki występowania replikacji poszczególnych wirusów u obserwowanych pacjentów przedstawiono w tabeli 9 i na rycinie 6. Najczęściej wykrywanym wirusem był EBV, jego obecność w osoczu odnotowano w 54 testowanych próbkach w czasie pierwszych trzech miesięcy po HSCT. W 4 przypadkach ciężkich infekcji ADV liczba replikonów przekroczyła górną granicę oznaczalności.

Tabela 9. Występowanie replikacji wirusowych u 82 pacjentów po HSCT w ciągu pierwszych 90 dni po przeszczepie

Wirus	Lokalizacja	Liczba przypadków	
		n	%
CMV	osocze	33	40
	ADV		
	osocze	20	24
	mocz	11	13
EBV	osocze	54	66
Nie wystąpiła replikacja wirusowa		13	16



Rycina 6. Odsetek występowania replikacji wirusowych w badanej grupie pacjentów do 90 doby po HSCT.

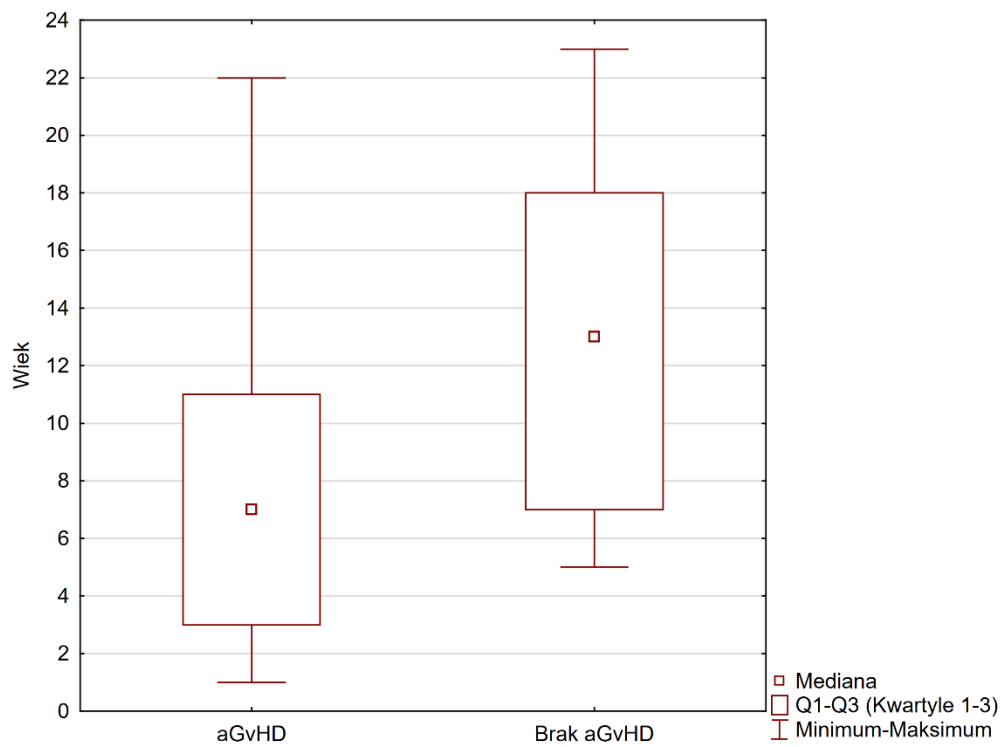
6.3 Częstość występowania GvHD

Ostra postać GvHD wystąpiła u 53 pacjentów, co stanowi 65% grupy badanej. Przewlekłą formę GvHD zdiagnozowano u 7 osób – 9% badanych pacjentów.

6.3.1 Związek między wiekiem pacjenta a wystąpieniem GvHD

Grupa pacjentów z aGvHD miała niższą medianę wieku niż pacjenci bez tego powikłania (7 lat vs 13 lat, $p=0,001$) (rycina 7).

Dla cGVHD nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w zależności od czynników demograficznych.



Rycina 7. Mediana wieku w grupie z aGVHD i bez aGVHD.

6.4 Wyniki rekonstytucji immunologicznej

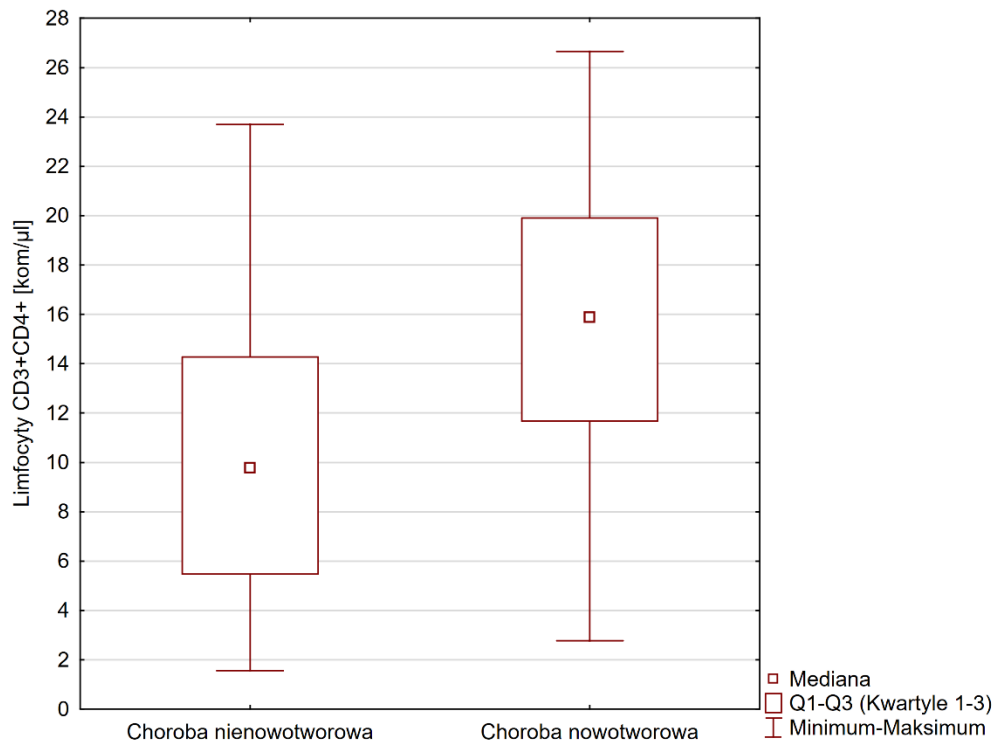
6.4.1 Związek rozpoznania z rekonstytucją immunologiczną i powikłaniami poprzyszczepowymi

W badanej grupie przeanalizowano wpływ rozpoznania nowotworowego lub nienowotworowego na wystąpienie powikłań. Rodzaj pierwotnego rozpoznania nie miał wpływu na częstość powikłań ($p=ns$). Szczegółowe wyniki przedstawiono w tabeli 10.

Tabela 10. Częstość powikłań po HSCT w zależności od rodzaju pierwotnego rozpoznania.

Rodzaj powikłań po HSCT	Choroba nowotworowa	Choroba nienowotworowa
aGVHD	66,07%	59,09%
cGvHD	8,93%	4,55%
Infekcja CMV	44,64%	36,36%
Infekcja ADV	36,36%	21,43%
Infekcja EBV	63,64%	69,64%

Rekonstytucja immunologiczna limfocytów w dniu 30, 60 i 90 po HSCT nie wykazała różnic w zależności od pierwotnego wskazania do transplantacji macierzystych komórek hematopoetycznych. Tylko liczba limfocytów CD3+CD4+ w 90 dniu po HSCT była wyższa u pacjentów z rozpoznaniem choroby nowotworowej (15,87 vs 9,77; $p=0,016$) (rycina 8).

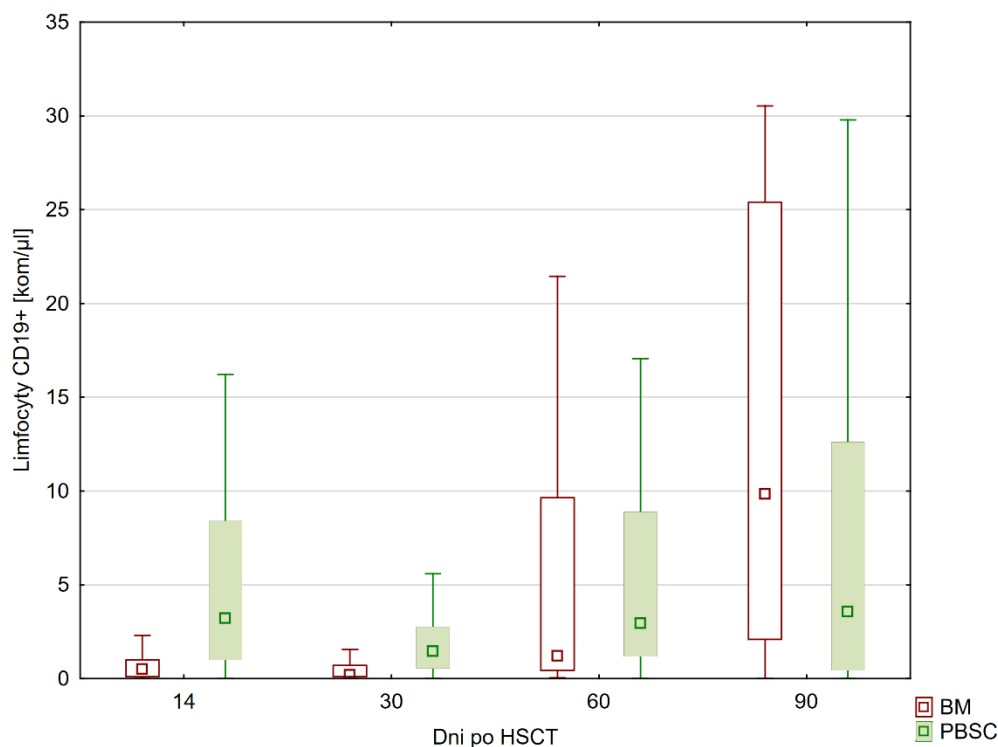


Rycina 8. Liczba limfocytów CD3+CD4+ w 90 dobie po HSCT w zależności od pierwotnego rozpoznania (choroba nienowotworowa vs choroba nowotworowa; $p=0,016$).

6.4.2 Efekty pochodzenia materiału przeszczepowego

6.4.2.1 Związek pochodzenia materiału przeszczepowego z rekonstytucją immunologiczną

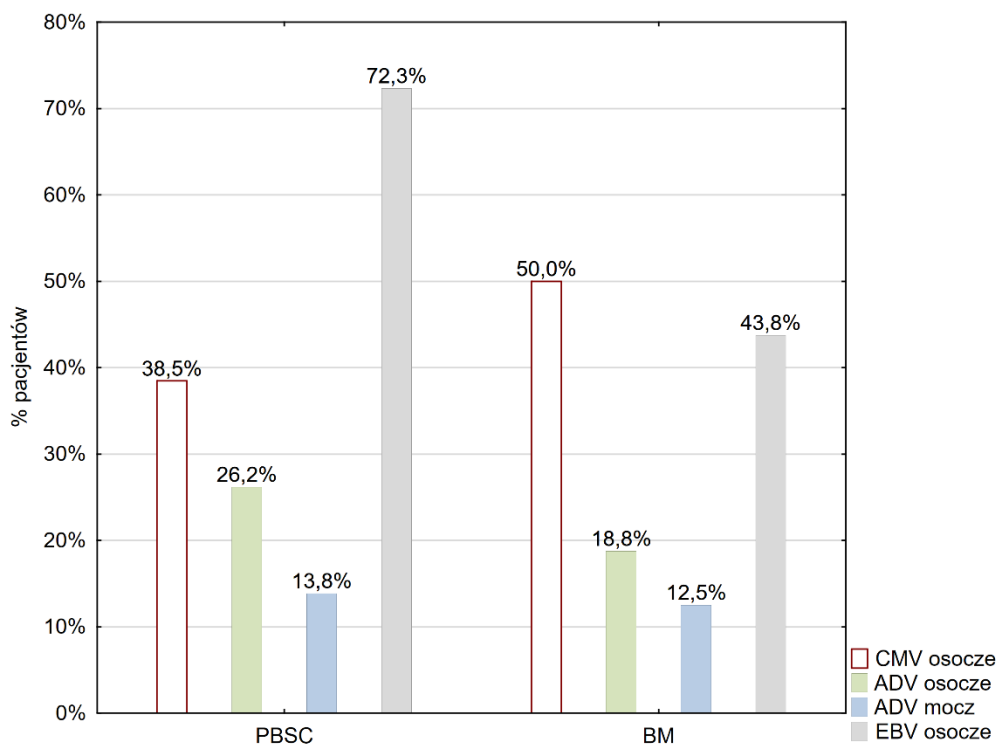
Badanie odbudowy immunologicznej poszczególnych subpopulacji limfocytów po przeszczepieniu hematopoetycznych komórek macierzystych wykazało wyższą liczbę limfocytów B u biorców PBSC w porównaniu z biorcami BM w dobie 14 (3,20 vs 0,5 kom/ul, $p=0,0005$) i w dobie 30 po HSCT (1,45 vs 0,20 kom/ul, $p=0,00007$) (rycina 9).



Rycina 9. Liczba limfocytów B (CD19+ kom/μl) w zależności od źródła pochodzenia hematopoetycznych komórek macierzystych (szpik kostny - BM vs komórki macierzyste krwi obwodowej - PBSC) w badanej grupie pacjentów do 90 dnia po HSCT.

6.4.2.2 Związek pochodzenia materiału przeszczepowego z występowaniem zakażeń po przeszczepieniu hematopoetycznych komórek macierzystych

Replikacja wirusa EBV występowała częściej (72,31 vs 43,75%; $p=0,029$) u biorców, którzy otrzymali komórki hematopoetyczne krwi obwodowej w porównaniu z biorcami szpiku kostnego. Źródło pochodzenia HSC nie miało wpływu na częstość występowania infekcji CMV i ADV (rycina 10).



Rycina 10. Częstość występowania replikacji wirusowych (CMV, ADV, EBV) w osoczu i w moczu pacjentów w zależności od źródła pochodzenia HSC (PBSC vs BM). Istotność statystyczna wykazana w przypadku występowania infekcji EBV wynosiła $p=0,029$.

6.4.3 Efekty zależne od rodzaju kondycjonowania

6.4.3.1 Związek kondycjonowania z rekonstytucją immunologiczną i powikłaniami poprzyszczepowymi

W badanej grupie pacjentów zastosowano kondycjonowanie mieloablacyjne (MAC), kondycjonowanie o zredukowanej intensywności (RIC) i kondycjonowanie niemieloablacyjne (NMA). Na podstawie tego podziału przeprowadzono ocenę odbudowy limfocytarnej w 30, 60 i 90 dniu po HSCT, wystąpienia GvHD oraz zakażeń wirusowych. Szczegółowe wyniki przedstawiono w tabelach 11, 12, 13 i 14.

Tabela 11. Występowanie powikłań (GvHD i infekcje wirusowe) po HSCT w grupie badanej w zależności od zastosowanego rodzaju kondycjonowania MAC/RIC/NMA.

Rodzaj powikłania po HSCT	Rodzaj kondycjonowania		
	MAC	RIC	NMA
aGvHD	77,73%	68,2%	22,22%
cGvHD	13,64%	4,55%	11,11%
Infekcja CMV	18,18%	50,00%	55,56%
Infekcja ADV	27,27%	15,91%	55,56%
Infekcja EBV	63,64%	70,45%	55,56%

Tabela 12. Zestawienie odbudowy limfocytarnej w 30, 60 i 90 dniu po HSCT dla protokołu kondycjonowania MAC.

Rodzaj kondycjonowania: MAC			
Odbudowa limfocytarna	Liczba kom/ul (mediana oznaczeń)		
	30 dni po HSCT	60 dni po HSCT	90 dni po HSCT
Limfocyty CD3+	61,08	62,43	68,63
Limfocyty CD4+	24,38	19,50	17,30
Limfocyty CD 8+	24,23	33,03	41,90
Limfocyty CD 56+	36,45	30,05	24,60
Limfocyty CD 19+	1,55	1,50	3,23

Tabela 13. Zestawienie odbudowy limfocytarnej w 30, 60 i 90 dniu po HSCT dla protokołu kondycjonowania RIC.

Rodzaj kondycjonowania: RIC			
	Liczba kom/ul (mediana oznaczeń)		
Odbudowa limfocytarna	30 dni po HSCT	60 dni po HSCT	90 dni po HSCT
Limfocyty CD3+	51,90	59,13	66,99
Limfocyty CD4+	10,80	12,04	14,37
Limfocyty CD 8+	28,25	39,57	48,64
Limfocyty CD 56+	44,70	32,97	27,10
Limfocyty CD 19+	1,3	1,93	2,02

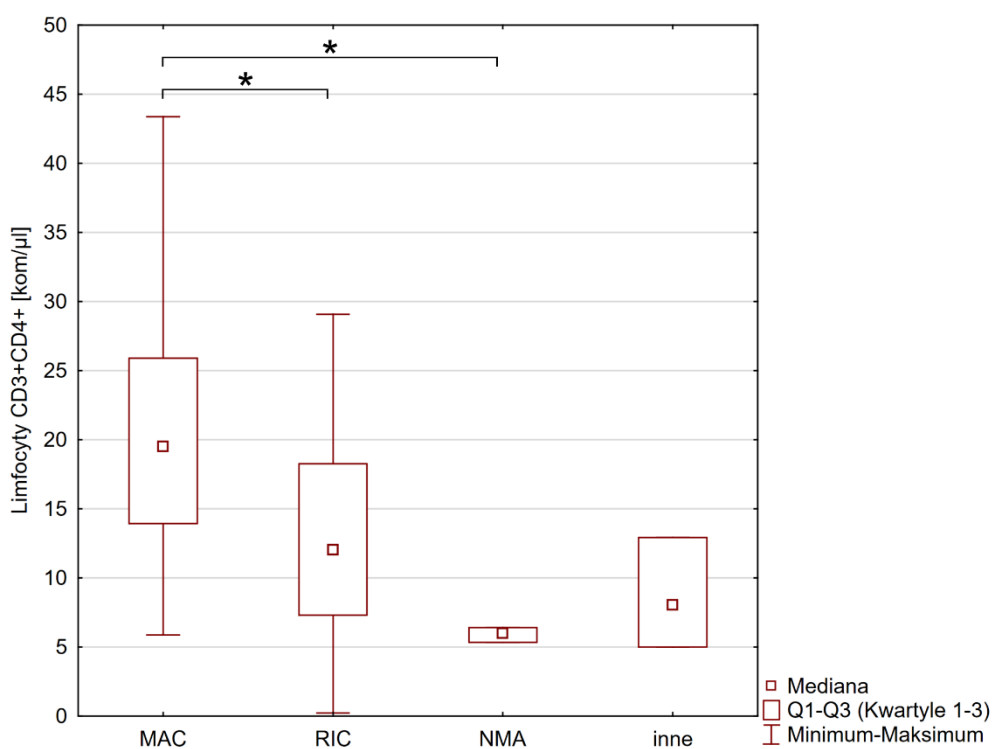
Tabela 14. Zestawienie odbudowy limfocytarnej w 30, 60 i 90 dniu po HSCT dla protokołu kondycjonowania NMA.

Rodzaj kondycjonowania: NMA			
	Liczba kom/ul (mediana oznaczeń)		
Odbudowa limfocytarna	30 dni po HSCT	60 dni po HSCT	90 dni po HSCT
Limfocyty CD3+	39,20	60,38	54,98
Limfocyty CD4+	12,40	5,98	8,57
Limfocyty CD 8+	31,15	52,83	41,00
Limfocyty CD 56+	59,85	21,17	24,93
Limfocyty CD 19+	0,95	15,13	24,13

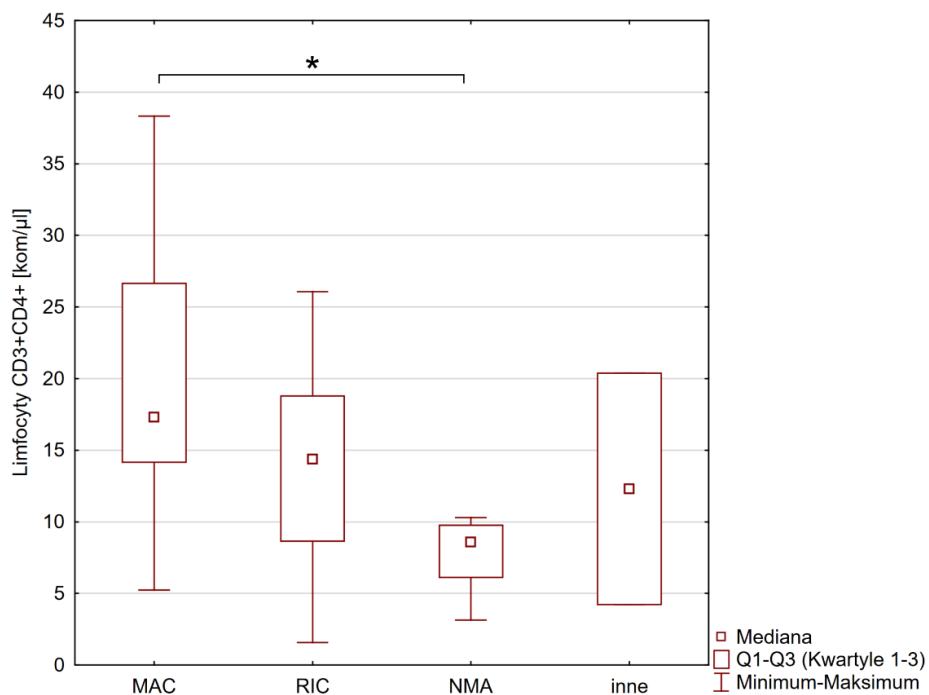
Po kondycjonowaniu MAC obserwowano wyższą niż po NMA bezwzględną liczbę limfocytów należących do subpopulacji CD3+CD4+ w dobie 60 i 90 po przeszczepieniu (odpowiednio: 12,04 vs 5,98, $p=0,001$, rycina 11; 14,37 vs 8,57, $p=0,006$, rycina 12).

W 60 i 90 dobie zaobserwowano statystycznie istotnie wyższą liczbę limfocytów B, po kondycjonowaniu NMA (odpowiednio: 1,93 vs 15,13, $p=0,009$, rycina 13; 2,02 vs 24,13, $p=0,009$, rycina 14).

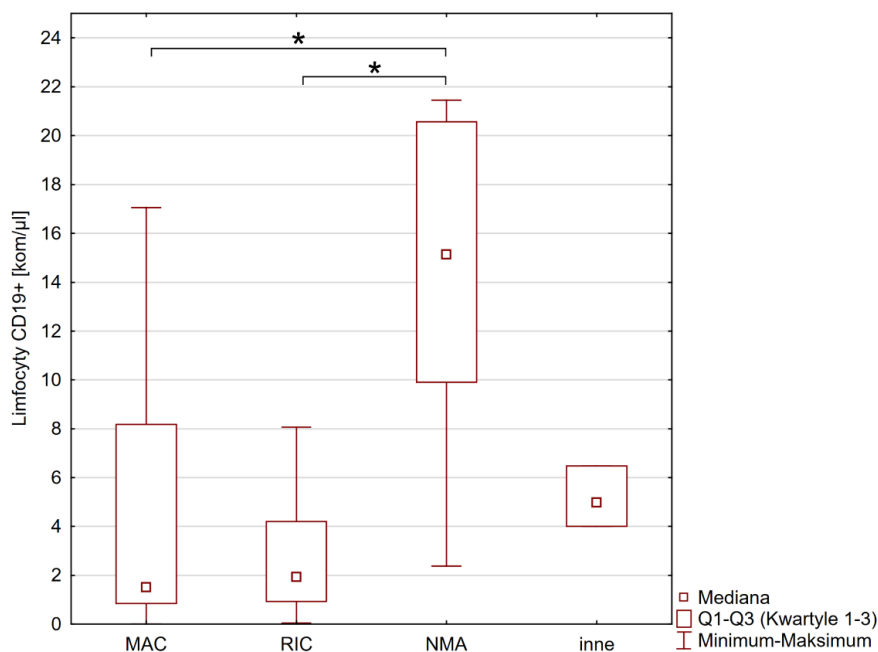
W pozostałych punktach oceny nie stwierdzono różnic statystycznych w odbudowie subpopulacji CD3+, CD3+CD8+ oraz komórek NK w zależności od rodzaju kondycjonowania.



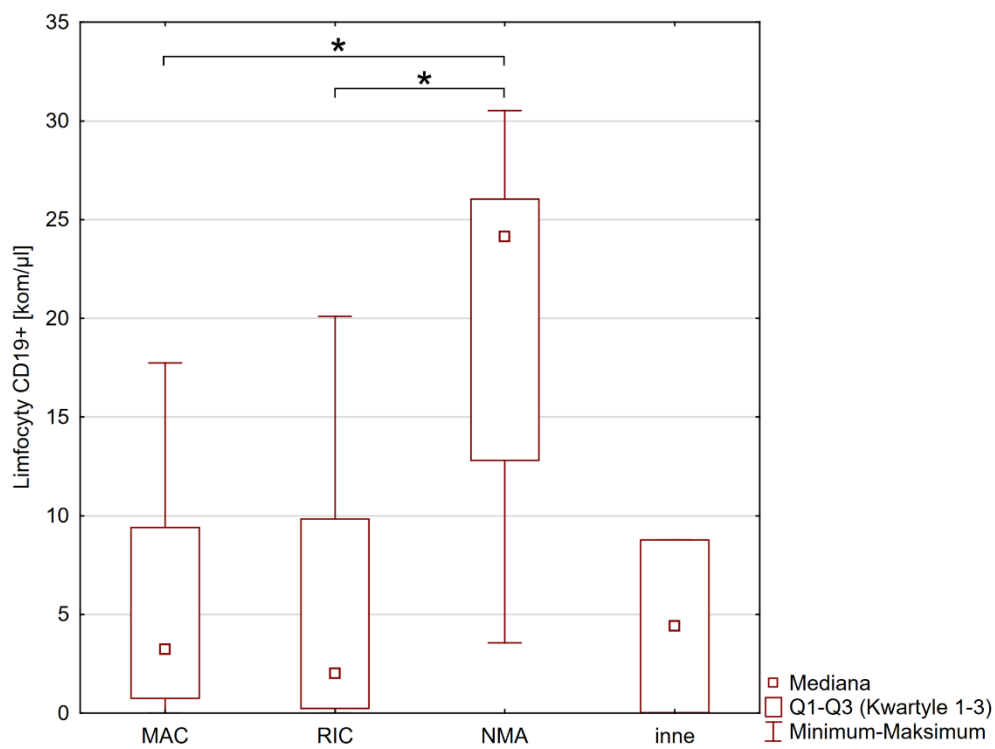
Rycina 11. Liczba limfocytów CD3+CD4+ na mikrolitr w dobie 60 po HSCT w zależności od zastosowanego protokołu kondycjonowania ($p=0,001$). Wyniki istotne statystycznie ($p<0,05$) oznaczono gwiazdką „*”.



Rycina 12. Liczba limfocytów CD3+CD4+ na mikrolitr w dobie 90 po HSCT w zależności od zastosowanego protokołu kondycjonowania ($p=0,006$). Wyniki istotne statystycznie ($p<0.05$) oznaczono gwiazdką „*”.



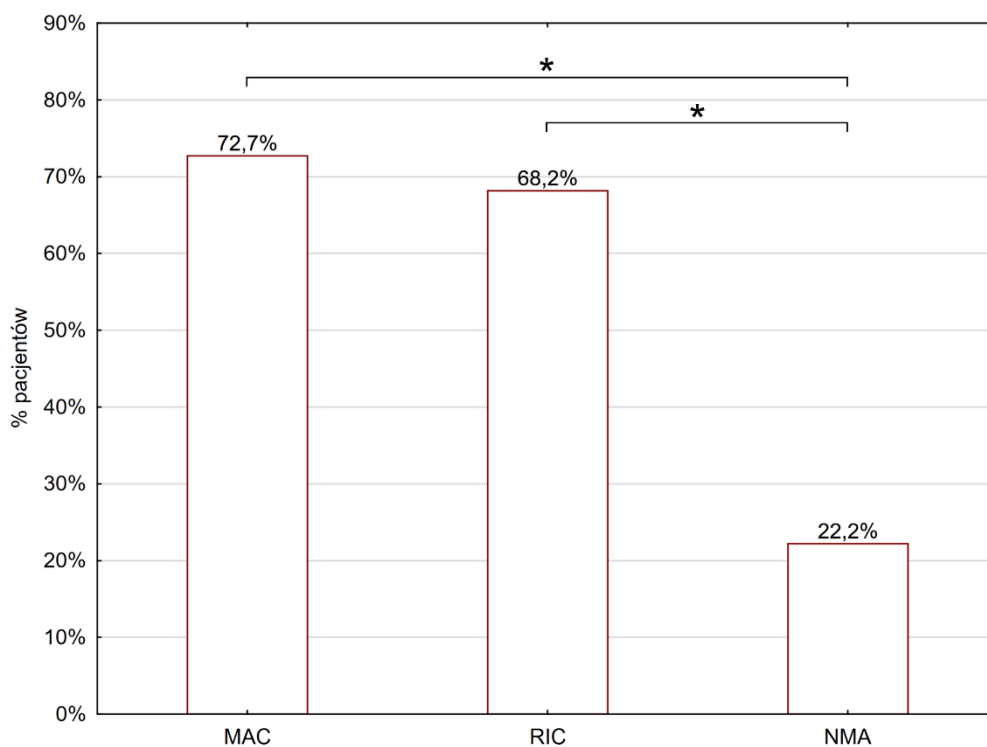
Rycina 13. Liczba limfocytów CD19+ na mikrolitr w dobie 60 po HSCT w zależności od zastosowanego protokołu kondycjonowania ($p=0,009$). Wyniki istotne statystycznie ($p<0.05$) oznaczono gwiazdką „*”.



Rycina 14. Liczba limfocytów CD19+ na mikrolitr w dobie 90 po HSCT w zależności od zastosowanego protokołu kondycjonowania ($p=0,009$). Wyniki istotne statystycznie ($p<0.05$) oznaczono gwiazdką „*“.

6.4.3.2 Wpływ kondycjonowania na występowanie GvHD

Ostra postać GvHD wystąpiła częściej u pacjentów poddanych kondycjonowaniu MAC i RIC niż po uprzednim kondycjonowaniu NMA (73% vs 68% vs 22%, $p=0,048$) (rycina 15). Zastosowany protokół kondycjonowania nie miał wpływu na późniejsze wystąpienie cGvHD.



Rycina 15. Częstość aGvHD w badanej grupie pacjentów poddanych kondycjonowaniu MAC/RIC/NMA ($p=0,048$). Wyniki istotne statystycznie ($p<0.05$) oznaczono gwiazdką

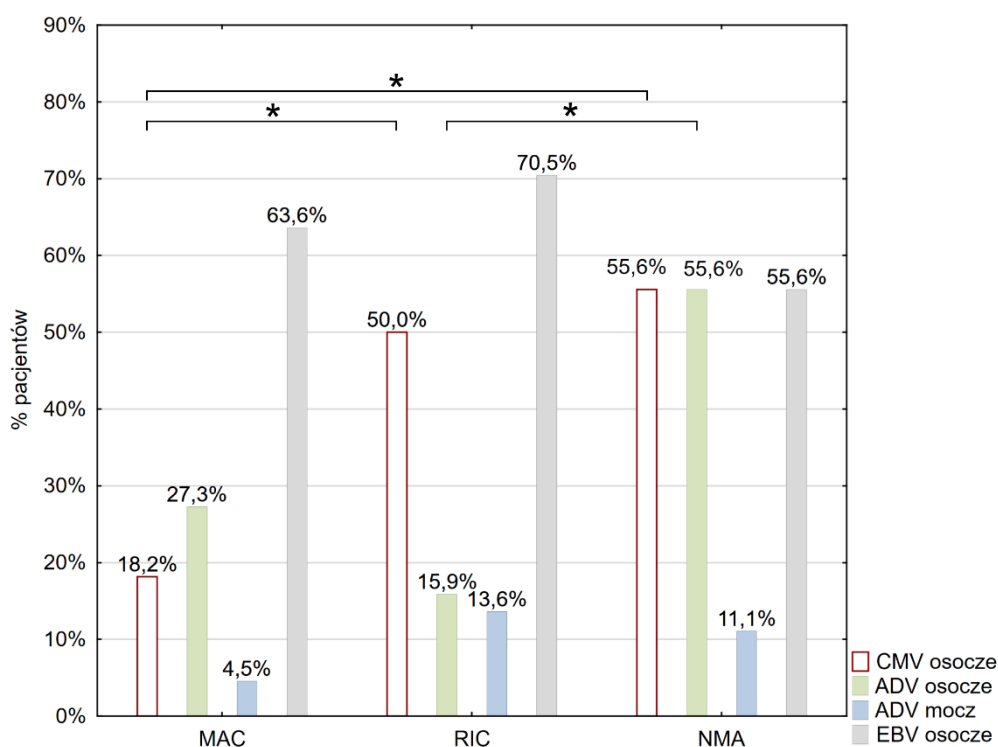
„*”.

6.4.3.3 Wpływ rodzaju kondycjonowania na zakażenia poprzyszczepowe

Analizując dane dotyczące replikacji wirusowych wykazano, że wirus cytomegalii najrzadziej wykrywany był w grupie pacjentów otrzymujących kondycjonowanie MAC, a najczęściej w grupie NMA (18% vs 53%, $p=0,053$).

ADV wykryto w osoczu pacjentów najrzadziej po zastosowaniu protokołu RIC, a najczęściej po NMA (16% vs 56%, $p=0,028$).

Analiza replikacji ADV w moczu nie wykazała statystycznie istotnych zależności. Wirus Epstein-Barr ulegał replikacji niezależnie od zastosowanego kondycjonowania. Powyższe wyniki przedstawia rycina 16.



Rycina 16. Częstość występowania replikacji wirusowych (CMV, ADV, EBV) w osoczu i w moczu pacjentów w zależności od protokołu kondycjonowania (MAC, RIC, NMA), ($p<0,05$).

6.4.4 Terapia limfodeplecyjna przed przeszczepieniem hematopoetycznych komórek macierzystych

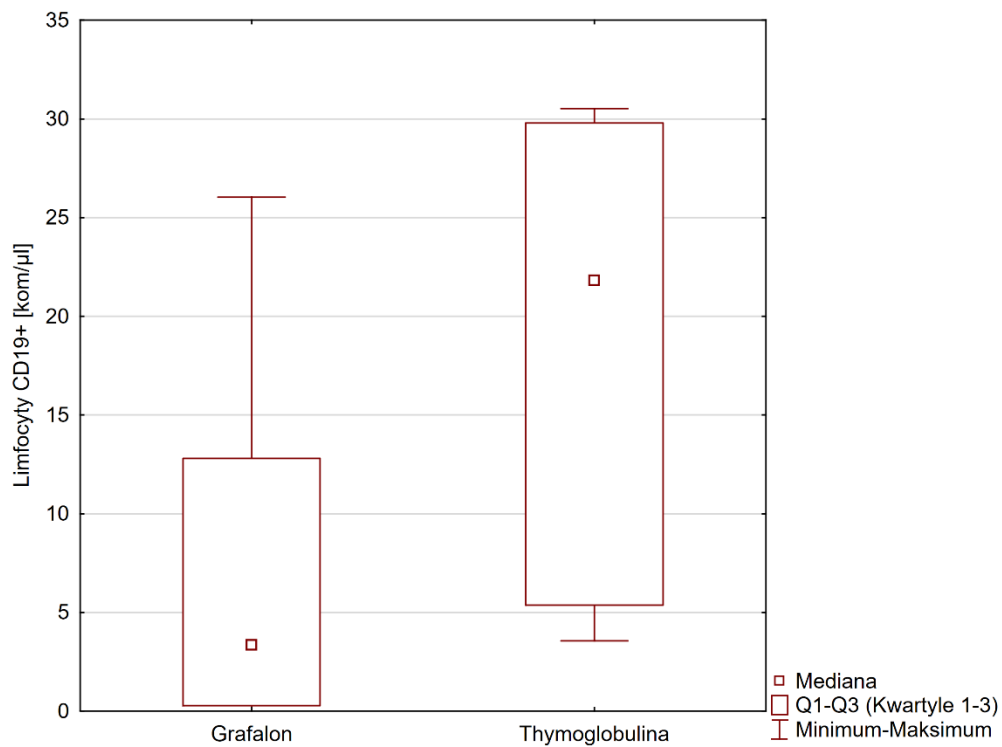
6.4.4.1 Związek terapii limfodeplecyjnej z rekonstytucją immunologiczną i powikłaniami poprzyszczepowymi

W zależności od rodzaju zastosowanej terapii limfodeplecyjnej, pacjenci zostali podzieleni na 3 grupy: PTCy (ang. Post-Transplant Cyclophosphamide), ATG (Grafalon, Thymoglobulina) i bez limfodeplecji *in vivo*.

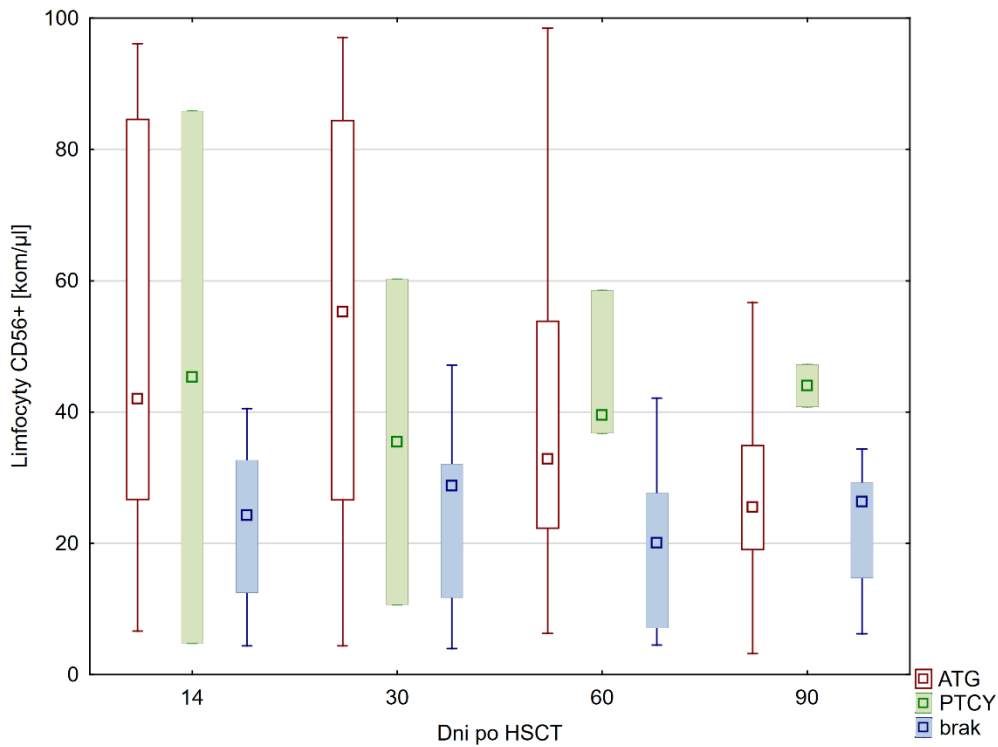
Porównanie odbudowy limfocytarnej limfocytów T i komórek NK w 30, 60 i 90 dniu w grupie pacjentów otrzymujących Grafalon i Thymoglobulinę nie wykazało istotnych różnic i grupę tę analizowano wspólnie. Istotna statystycznie była jedynie różnica liczby limfocytów B, których odsetek w 90 dniu po HSCT był większy po immunosupresji wywołanej Thymoglobuliną (21,82 vs 3,35, $p=0,016$, rycina 17).

Odbudowę limfocytów w 30, 60 i 90 dniu porównano między grupami otrzymującymi ATG, PTCy i grupie bez limfodeplecji. Limfocyty T najszybciej regenerowały się w grupie nie otrzymującej leków, a najslabiej po podaniu ATG do 60 dnia po HSCT, z kolei w 90 dniu nie wykazano zależności odbudowy immunologicznej od terapii immunosupresyjnej. Subpopulacja CD3+CD4+ osiągała najwyższą liczbę bezwzględną w grupie pacjentów po zastosowaniu PTCy, a najniższą po ATG. Limfocyty CD3+CD8+ w całym badanym okresie nie wykazały różnic odnowy immunologicznej bez względu na stosowaną terapię.

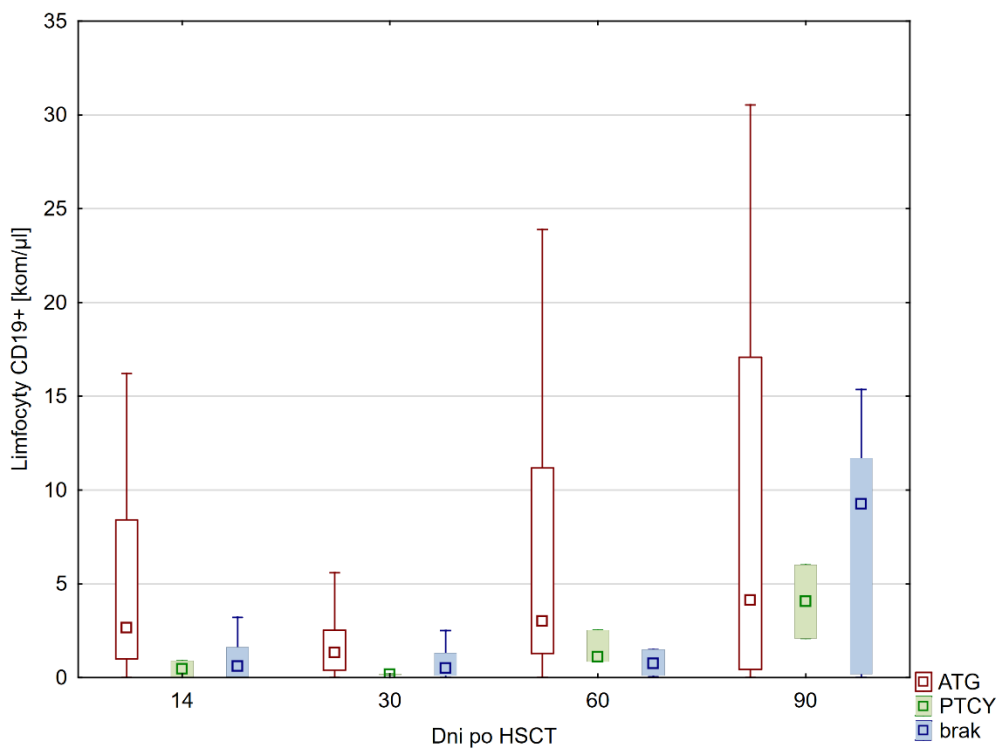
Subpopulacje komórek NK (rycina 18) i limfocytów B (rycina 19) osiągnęły najwyższą wartość w grupie otrzymującej ATG, najniższą w grupie bez stosowania immunosupresji, oprócz badania dla 90 dnia po przeszczepie. Większość powyższych wyników była istotna statystycznie ($p<0,050$).



Rycina 17. Liczba limfocytów B (CD19+) w 90 dniu po HSCT w zależności od zastosowanej seroterapii (Grafalon vs Thymoglobulina). Przedstawiona istotność statystyczna po zastosowaniu Thymoglobuliny wynosi $p=0,016$.



Rycina 18. Liczba komórek NK w zależności od rodzaju terapii limfodeplecyjnej (ATG/PTCy/brak terapii) ($p < 0,050$).



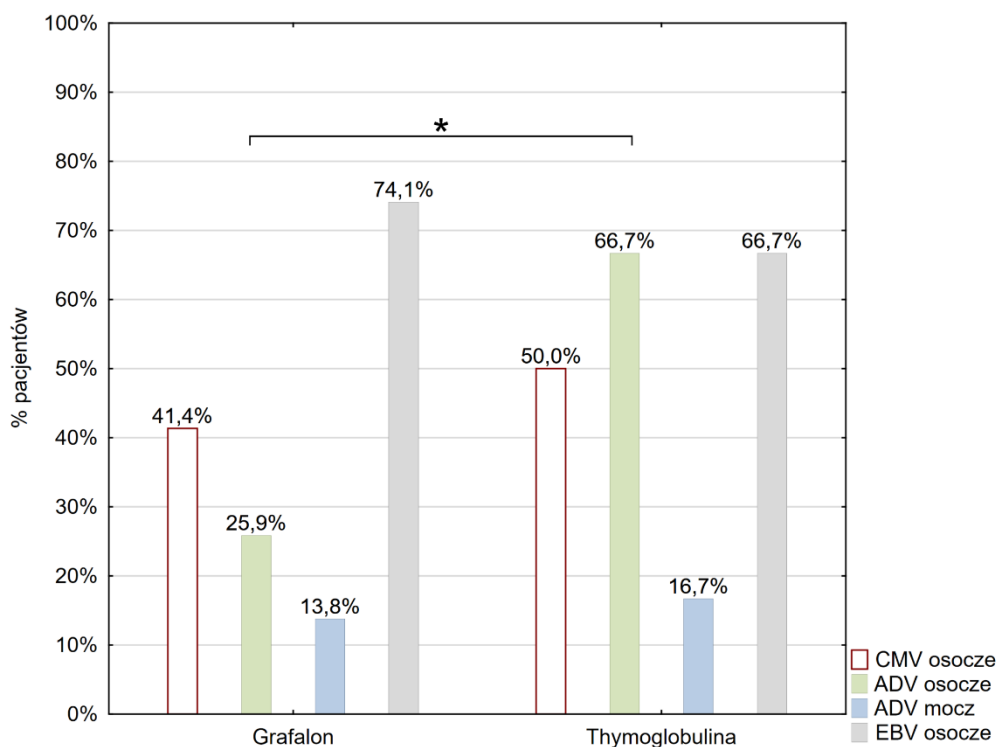
Rycina 19. Liczba limfocytów CD19+ w zależności od od rodzaju terapii limfodeplecyjnej (ATG/PTCy/brak terapii) ($p < 0,050$).

6.4.4.2 Wpływ terapii limfodeplecyjnej na występowanie GvHD

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w występowaniu ostrej i przewlekłej postaci GvHD pomiędzy grupami z zastosowaniem PTCy, ATG i brakiem limfodeplecji.

6.4.4.3 Wpływ terapii limfodeplecyjnej na zakażenia poprzyszczepowe

Rodzaj terapii limfodeplecyjnej nie miał wpływu na częstość zakażeń CMV. W grupie pacjentów, która nie otrzymała leków immunosupresyjnych, nie wykryto replikacji ADV. W grupie pacjentów poddanych seroterapii, ryzyko replikacji ADV istotnie wyższe u chorych dostających Thymoglobulinę, w porównaniu z grupą otrzymującą Grafalon (25,9% vs 66,7%, $p=0,037$, rycina 20). Zakażenia EBV nie wykazały związku z rodzajem terapii limfodeplecyjnej.



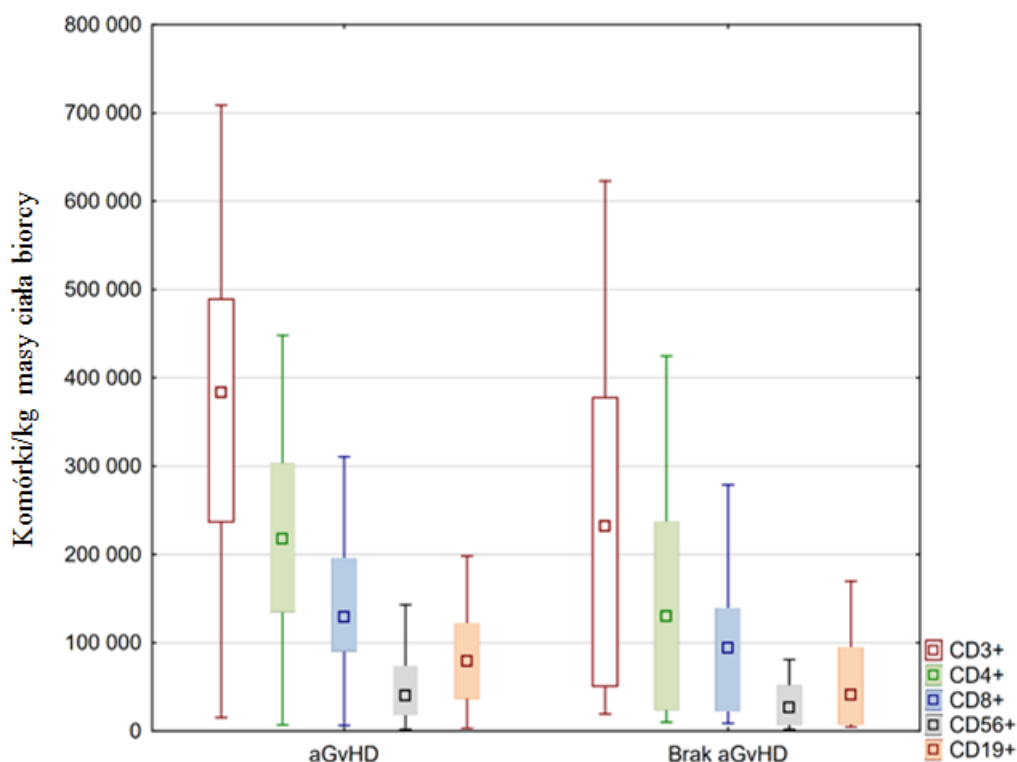
Rycina 20. Częstość występowania replikacji wirusowych (CMV, ADV, EBV) w osoczu i w moczu pacjentów w zależności od terapii limfodeplecyjnej (Grafalon vs Thymoglobulina). Istotność statystyczna w przypadku infekcji ADV oznaczona w osoczu pacjentów badanej grupy otrzymującej Grafalon lub Thymoglobulinę wynosiła $p=0,037$.

6.4.5 Czynniki ryzyka dla wystąpienia GvHD

6.4.5.1 Skład materiału przeszczepowego a występowanie GvHD

Przeanalizowano liczbę limfocytów w poszczególnych subpopulacjach w materiale przeszczepowym w przeliczeniu na kg masy ciała biorcy oraz dane dotyczące wystąpienia w okresie aGvHD i cGvHD. Uzyskane wyniki wykazały zależność między wyższą liczbą podanych limfocytów CD3+ oraz CD3+CD4+ i CD3+CD8+ na kilogram masy ciała biorcy, a wyższym ryzykiem wystąpienia aGvHD. Wyniki są istotne statystycznie, odpowiednio: dla limfocytów CD3+: 232181 vs 383575, $p=0,047$, CD3+CD4+: 129765 vs 217560, $p=0,040$, CD3+CD8+: 93955 vs 129115, $p=0,032$ (rycina 21).

Całkowita liczba limfocytów obecnych w HSCT/kg masy ciała biorcy nie miała wpływu na wystąpienie cGvHD.



Rycina 21. Zależność między liczbą przeszczepionych limfocytów na kg masy ciała biorcy, a wystąpieniem aGvHD. Istotność statystyczną wykazały limfocyty o fenotypie CD3+ ($p=0,047$), CD3+CD4+ ($p=0,040$) i CD3+CD8+ ($p=0,032$).

6.4.5.2 Źródło pochodzenia hematopoetycznych komórek macierzystych a występowanie GvHD

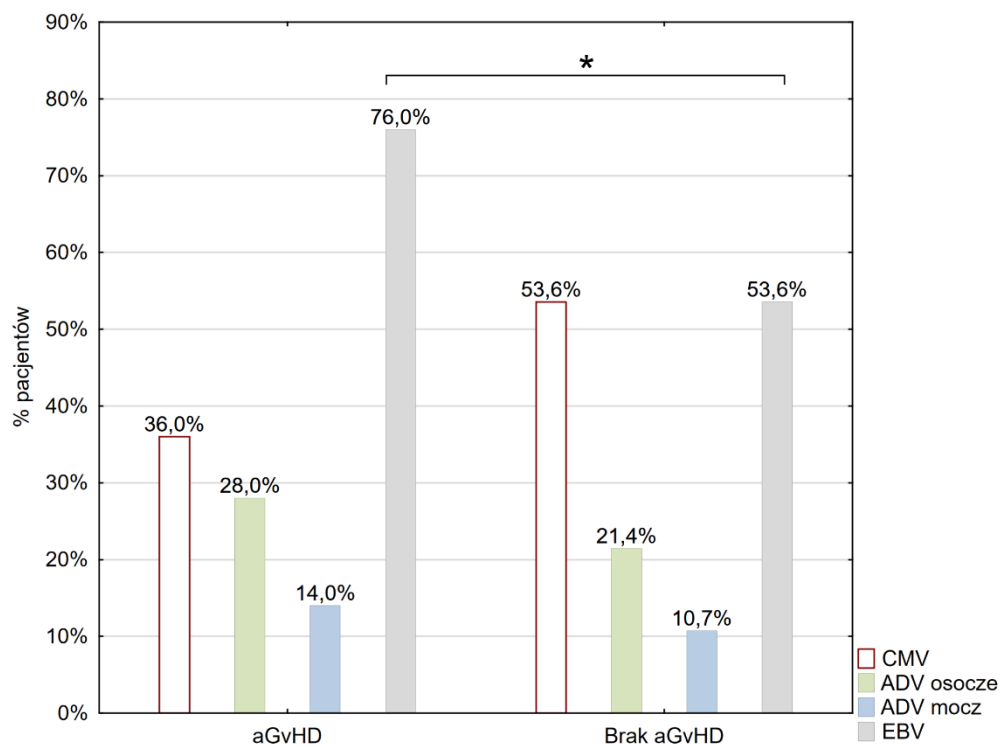
W analizie źródła pochodzenia hematopoetycznych komórek macierzystych nie zaobserwowano wpływu na wystąpienie ostrej lub przewlekłej postaci GvHD.

6.4.5.3 Związek między wystąpieniem GvHD a zakażeniami wirusowymi

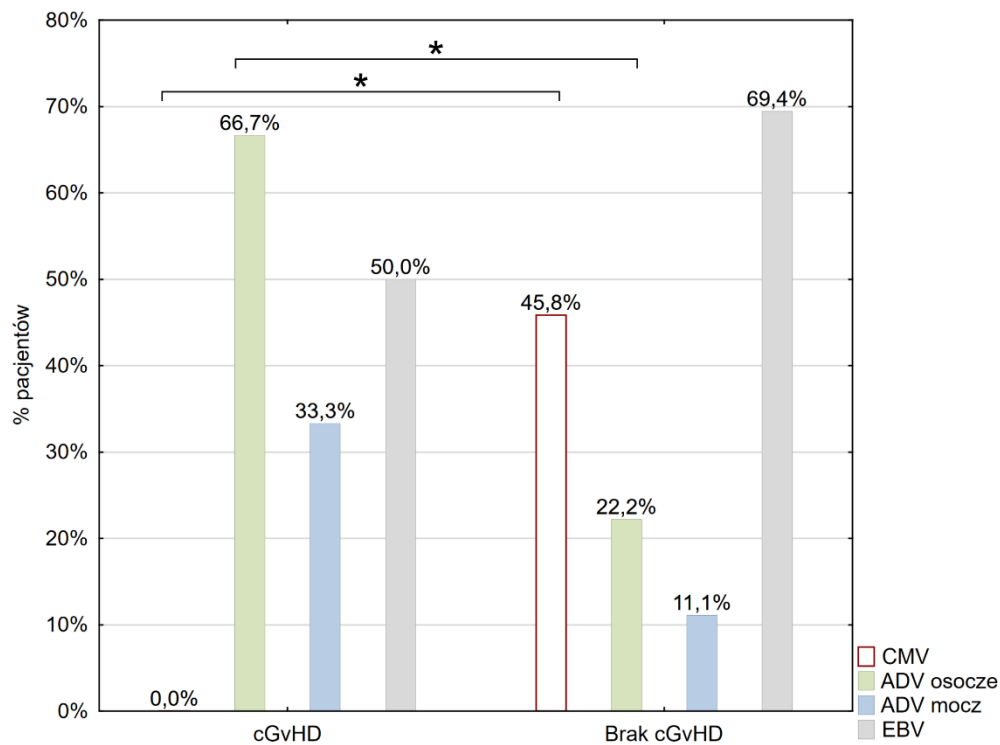
Grupę poddano analizie pod względem wystąpienia ostrej postaci GvHD i zakażeń wirusowych. W grupie pacjentów z aGVHD wykazano wyższą częstość replikacji EBV (76 vs 53.6%, $p=0,042$) (rycina 22).

Badanie zależności między wystąpieniem przewlekłej postaci GvHD i wcześniejszego zakażenia wirusowego wykazało, że u żadnego z pacjentów, którzy rozwinęli objawy cGVHD, nie stwierdzono wcześniej replikacji CMV ($p=0,029$).

W grupie pacjentów, u których wystąpiła cGVHD, zaobserwowano w okresie poprzyszczepowym wyższą częstość replikacji ADV (66,7% vs 22,2%; $p=0,017$). Replikacja wirusa EBV nie wykazała związku z ryzykiem wystąpienia cGvHD. Rycina 23 przedstawia dane dotyczące cGvHD i występowania infekcji wirusowych.



Rycina 22. Częstość występowania replikacji wirusowych (CMV, ADV, EBV) w osoczu i w moczu pacjentów zestawiona z wystąpieniem aGvHD. Istotność statystyczną („*”) wykazano w przypadku infekcji EBV (p=0,042).

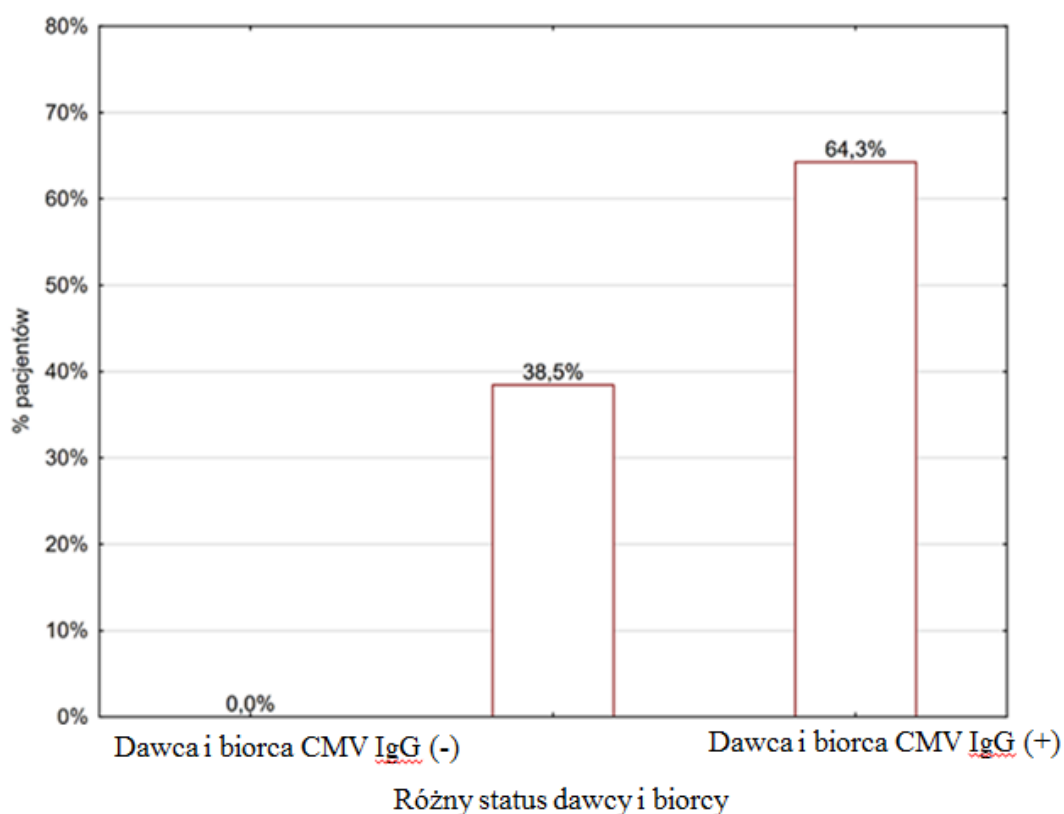


Rycina 23. Częstość występowania replikacji wirusowych (CMV, ADV, EBV) w osoczu i w moczu pacjentów zestawiona z wystąpieniem cGVHD. Statystycznie istotna była zależność zapadalności na CMV i późniejszego wystąpienia cGVHD ($p=0,029$) oraz pojawienia się infekcji adenowirusem i ryzykiem rozwinięcia cGVHD ($p=0,017$). Wyniki istotne statystycznie ($p<0.05$) oznaczono gwiazdką „*”.

6.4.6 Czynniki ryzyka dla zakażeń po przeszczepieniu

6.4.6.1 Wpływ statusu serologicznego dawca-biorca na zakażenia poprzyszczepowe

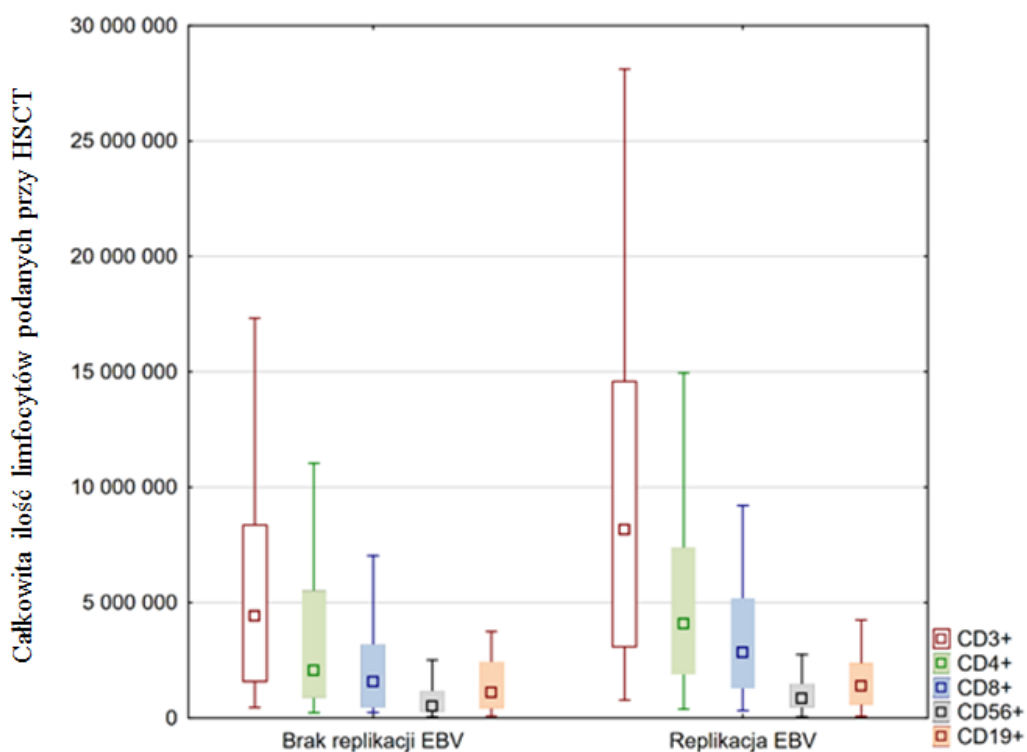
Przeprowadzono analizę występowania poprzyszczepowej wirerii CMV w zależności od statusu IgG dla CMV lub EBV u dawcy i biorcy. Analiza wykazała wysokie ryzyko replikacji wirusa cytomegalii w sytuacji, kiedy dawca i biorca nie są zgodni względem statusu serologicznego dla wirusa CMV przed HSCT. Wynik był istotny statystycznie i wynosił $p=0,007$ (rycina 24). Analiza statusu serologicznego EBV nie wykazała istotnej statystycznie różnicy dla układów pomiędzy dawcą i biorcą.



Rycina 24. Odsetek wystąpienia replikacji wirusa CMV w zależności od zgodności statusu serologicznego dawcy i w CMV IgG ($p=0,007$).

6.4.6.2 Związek między składem materiału przeszczepowego a wystąpieniem infekcji wirusowych

Zaobserwowano istotną statystycznie zależność między wyższą całkowitą liczbą podanych limfocytów CD3+ i CD3+CD8+ a wystąpieniem replikacji EBV (odpowiednio mediana 4 419 301 000 vs 8 166 400 000, $p=0,037$; mediana 1 574 316 000 vs 2 840 934 000, $p=0,033$) (rycina 25). Przy porównaniu liczby limfocytów T na kilogram wagi biorcy takiej zależności nie zaobserwowano. Dla pozostałych patogenów nie zaobserwowano istotnych statystycznie zależności.



Rycina 25. Zależność między liczbą całkowitą podanych limfocytów a wystąpieniem replikacji EBV. Istotność statystyczna została wykazana dla subpopulacji limfocytów CD3+ i CD3+CD8+ (odpowiednio $p=0,045$; $p=0,034$).

6.5 Badania reaktywności przeciwwirusowej i jej związek z powikłaniami poprzyszczepowymi

6.5.1 Częstość występowania limfocytów VST

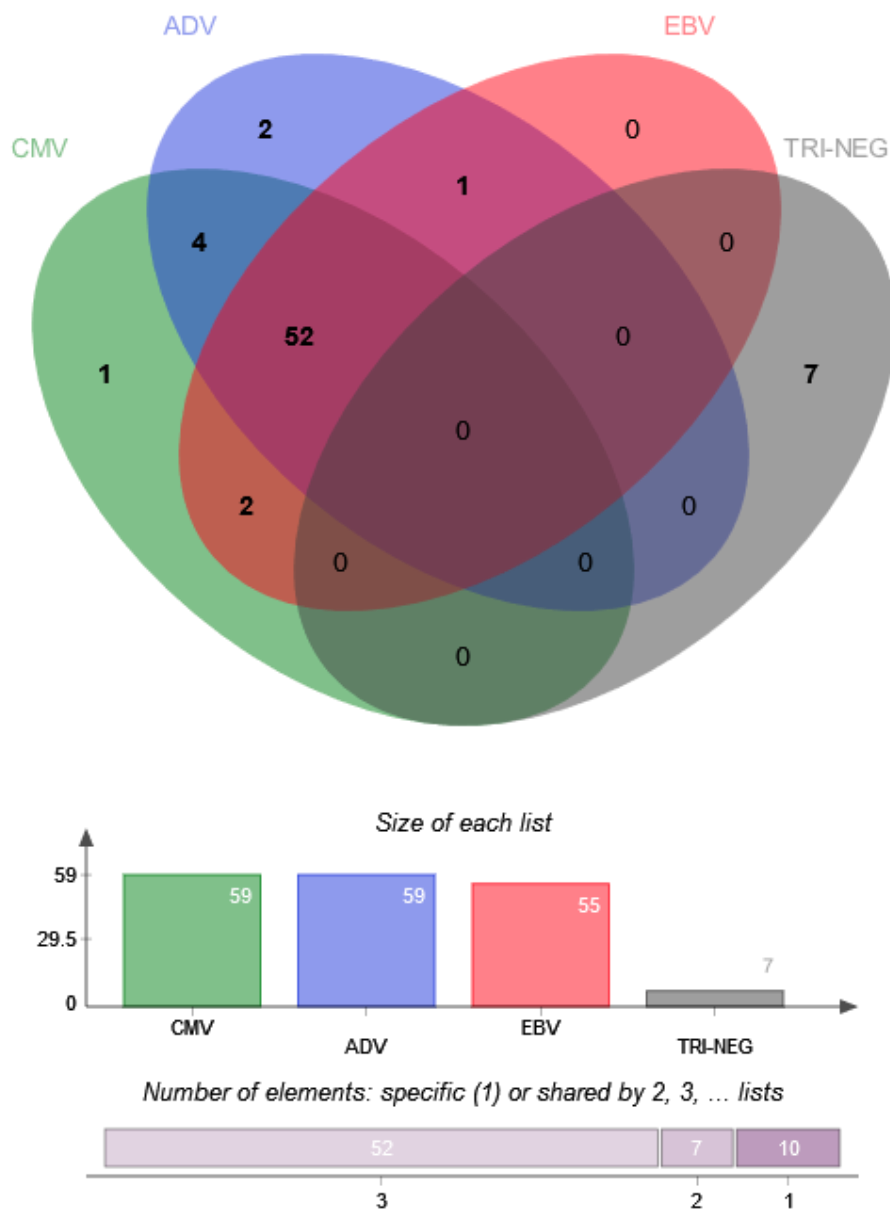
W badanej grupie oceniono odsetek limfocytów VST przeciwko każdemu z wirusów ADV, CMV i EBV w preparatach komórek macierzystych. Liczbę badanych komórek VST, o aktywności odpowiednio przeciwko CMV/ADV/EBV w badanych preparatach, przedstawia tabela 15. Po przeanalizowaniu występowania VST stwierdzono obecność w 75-84% subpopulacji limfocytów T komórek o reaktywności przeciwwirusowej

Tabela 15. Występowanie komórek VST reaktywnych wobec CMV/ADV/EBV w poszczególnych subpopulacjach limfocytów (CD4+ i CD8+).

Subpopulacja	Brak reaktywności		Obecne reaktywne limfocyty	
	Liczba	Odsetek	Liczba	Odsetek
CD4+ CMV	20	25,3%	59	74,7
CD8+ CMV	14	17,7%	65	82,3
CD4+ ADV	12	16,7	60	83,3
CD8+ ADV	17	23,6	55	76,4
CD4+ EBV	15	22,1	53	77,9
CD8+ EBV	17	25,0	51	75,0

W 7 z 78 badanych próbek mononuklearów nie wykazano reaktywności limfocytów wobec żadnego z badanych wirusów. Przeanalizowano charakterystykę preparatów PBPC w odniesieniu do współwystępowania specyficznych limfocytów przeciwwirusowych i wyniki przedstawiono na diagramie Venna (rycina 26).

Badania korelacji między statusem serologicznym dawcy przeciwko CMV i EBV a liczbą limfocytów reaktywnych przeciwwirusowo w materiale przeszczepowym nie wykazały wyników istotnych statystycznie.



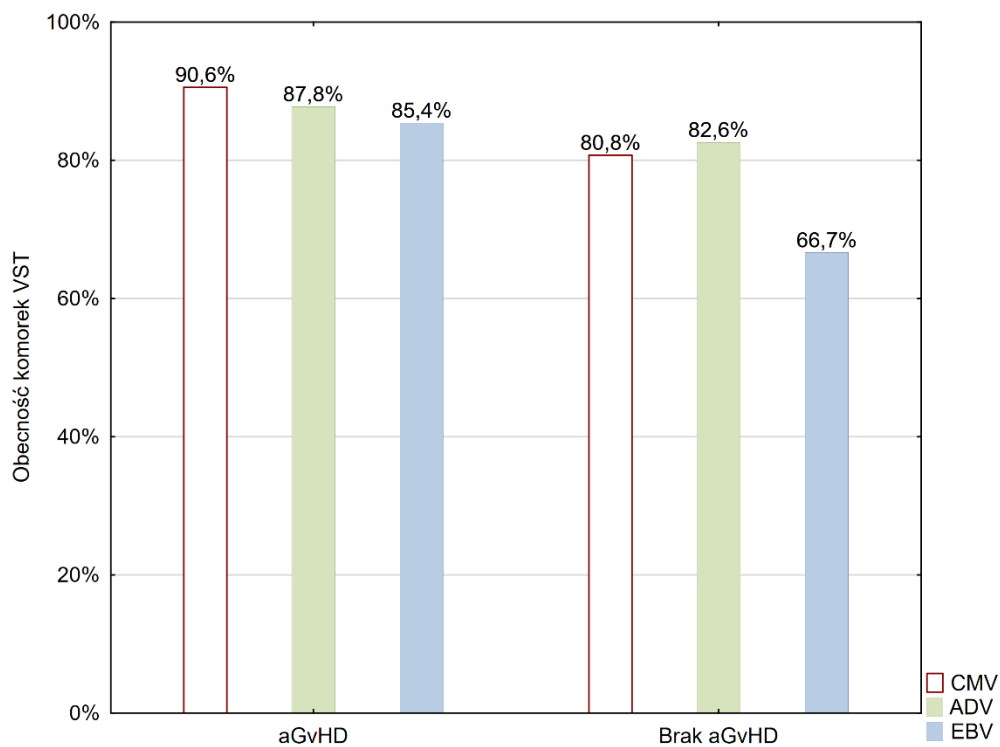
Rycina 26. Diagram Venna prezentujący współwystępowanie limfocytów przeciwwirusowych w materiale przeszczepowym od poszczególnych dawców. CMV, ADV, EBV reprezentują przypadki wykazujące reaktywność przeciwko odpowiednim wirusom. Grupa TRI-NEG zawiera 7 przypadków dawców nie posiadających VST przeciwko żadnemu z wirusów.

6.5.2 Występowanie powikłań w zależności od obecności limfocytów VST

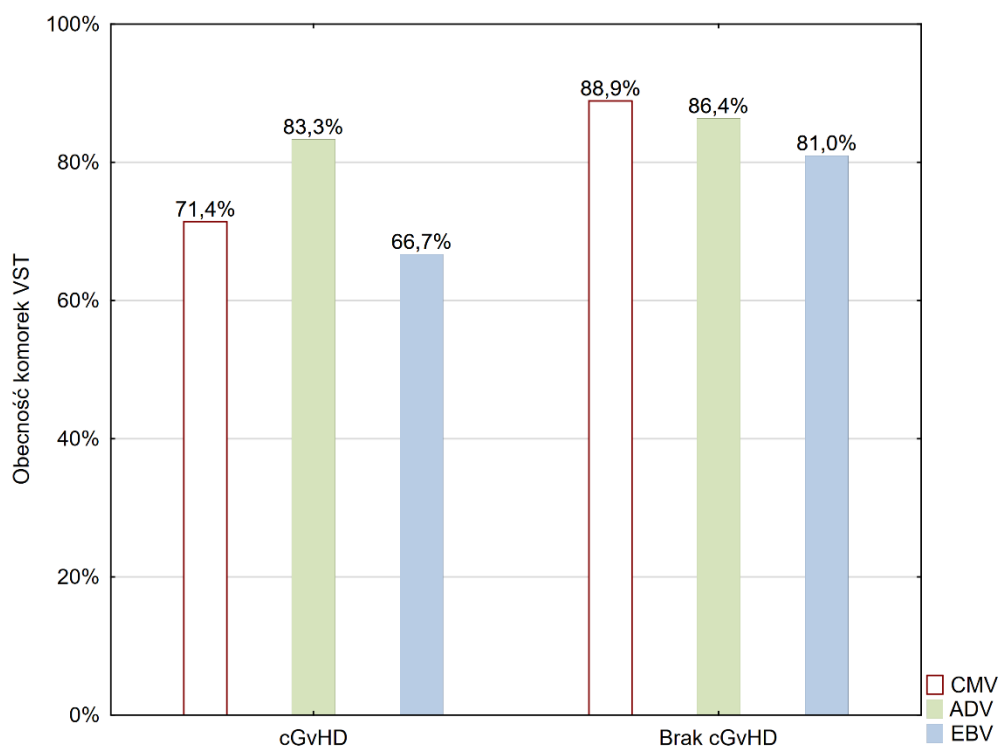
Przeprowadzono analizę wpływu występowania komórek VST na przeżycie pacjentów (tabela 16), wystąpienie aGvHD (rycina 27) i cGvHD (rycina 28) oraz częstość replikacji wirusowej w badanym okresie czasu (tabela 17). Obecność komórek VST o reaktywności przeciwwirusowej nie miała wpływu na prawdopodobieństwo przeżycia, występowanie objawów choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi ani na występowanie replikacji wirusowych w badanej grupie.

Tabela 16. Prawdopodobieństwo przeżycia do 90 dnia po HSCT w zależności od reaktywności limfocytów wobec antygenów wirusa CMV/ADV/EBV.

	VST (+)	VST (-)	p
CMV	89,7%	72,7%	ns
ADV	88,5%	72,7%	ns
EBV	89,1%	64,3%	ns



Rycina 27. Zależność obecności komórek VST i ryzyka wystąpienia aGvHD w badanej grupie pacjentów.



Rycina 28. Zależność obecności komórek VST i ryzyka wystąpienia cGvHD.

Tabela 17. Prawdopodobieństwo wystąpienia replikacji CMV/ADV/EBV w zależności od reaktywności limfocytów wobec antygenów danego wirusa (CMV/ADV/EBV).

	VST (+)	VST (-)	p
CMV	87,5%	87,2%	ns
ADV	100%	82,1%	ns
EBV	84,8%	69,6%	ns

U pacjentów wykazujących obecność VST, mediany odsetka komórek reaktywnych w subpopulacjach limfocytów T CD3+/CD4+ i CD3+/CD8+ wynosiły odpowiednio 0,13-0,24% i 0,14-0,21% i nie wykazywały różnic pomiędzy poszczególnymi wirusami (tabela 18).

Tabela 18. Zestawienie mediany, wartości minimalnej i wartości maksymalnej odsetka komórek VST CD4+ i CD8+ reaktywnych wobec CMV/ADV/EBV.

Odsetek limfocytów VST				
	Mediana	Minimum	Maksimum	p
CD4+ CMV	0,13%	0,01%	2,46%	ns
CD4+ ADV	0,24%	0,02%	2,74%	
CD4+ EBV	0,18%	0,01%	3,01%	
CD8+ CMV	0,14%	0,01%	5,05%	ns
CD8+ ADV	0,15%	0,01%	3,48%	
CD8+ EBV	0,21%	0,01%	2,52%	

Uwzględniając masę ciała biorcy i bezwzględną liczbę limfocytów VST w preparacie PBPC obliczono liczbę limfocytów VST w przeliczeniu na kilogram wagi pacjenta. Tabela 19 prezentuje otrzymane wyniki.

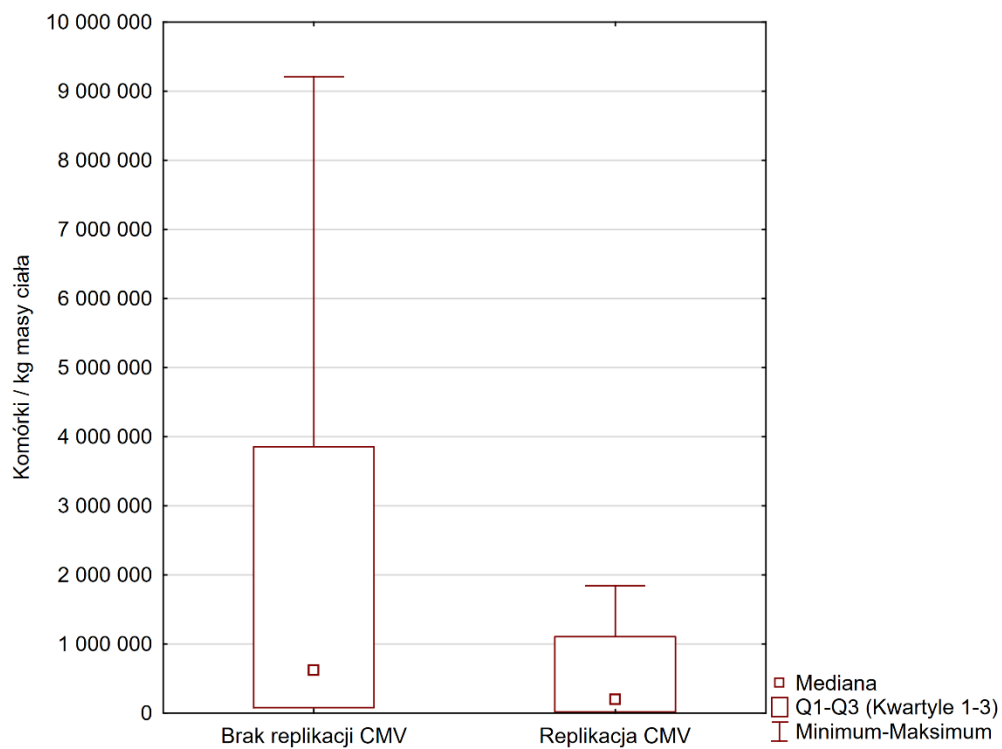
Tabela 19. Zestawienie liczby komórek VST CD4+ i CD8+ reaktywnych względem CMV/ADV/EBV podanych biorcy w przeliczeniu na kg masy jego ciała.

Bezwzględna liczba limfocytów VST/kg masy ciała biorcy			
	Mediana	Minimum	Maksimum
CD4+ CMV	731 332	8 156	29 436 467
CD8+ CMV	793 444	8 158	28 756 737
CD4+ ADV	1 080 343	13 817	18 538 741
CD8+ ADV	591 026	8 415	17 524 741
CD4+ EBV	863 254	16 198	20 988 911
CD8+ EBV	1 030 443	4 212	22 536 395

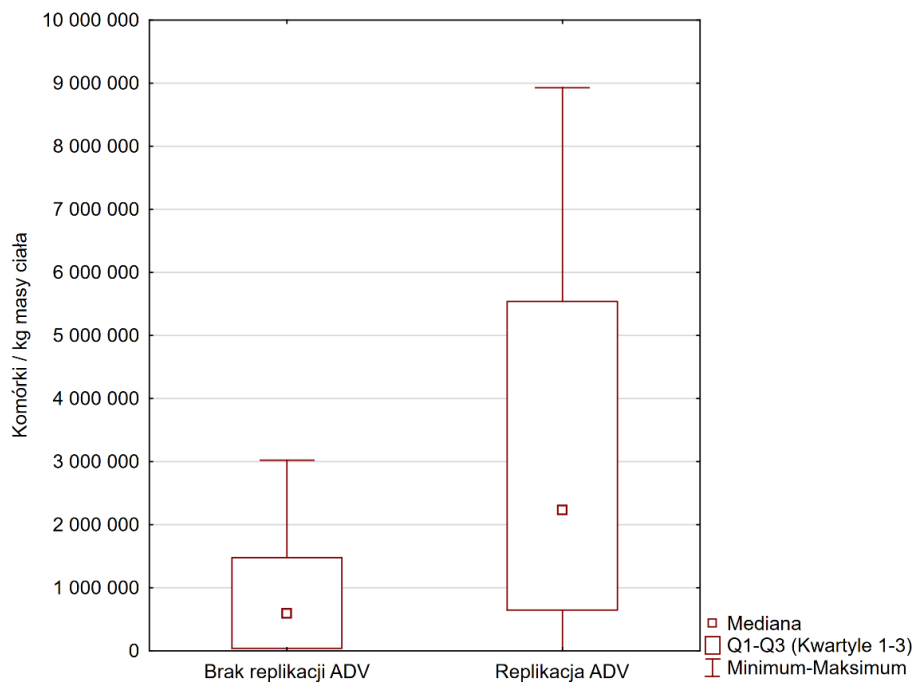
6.5.3 Związek między liczbą podanych limfocytów reaktywnych na kilogram a występowaniem zakażeń wirusowych

Zapadalność na infekcje wirusowe oceniono w zależności od liczby podanych limfocytów VST na kilogram wagi. Wykazano, że pacjenci, u których nie wystąpiła replikacja CMV, otrzymali wyższą liczbę limfocytów VST przeciwko CMV o fenotypie CD3+CD8+ (618 146/kg vs 198 348/kg; $p=0,049$) (rycina 29). Z kolei wyższa liczba limfocytów reaktywnych wobec antygenów ADV o fenotypie CD3+CD4+ była związana z wyższym ryzykiem wystąpienia infekcji ADV u pacjentów, którzy otrzymali dane preparaty PBSC (2 233 948/kg vs 588 037/kg; $p=0,018$) (rycina 30).

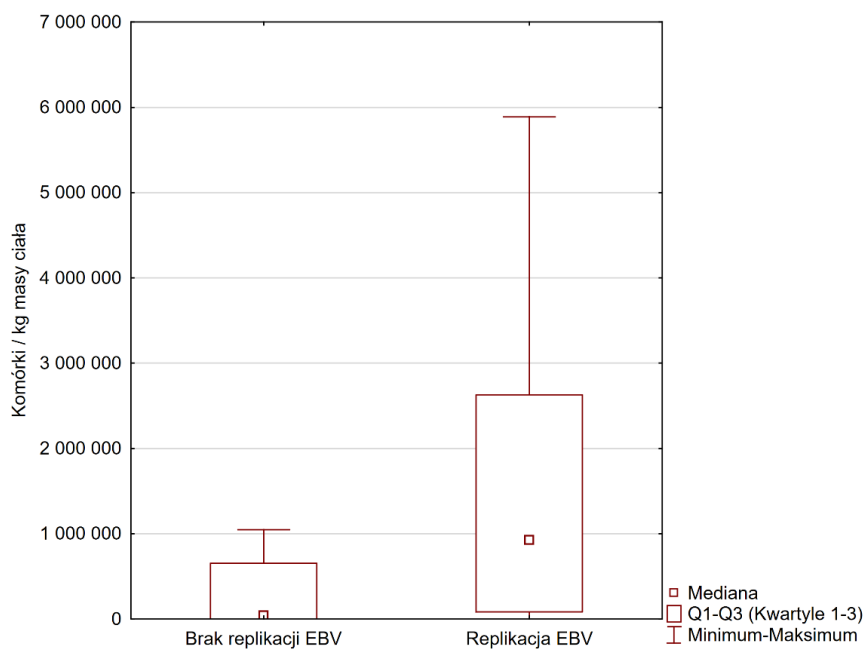
Podobnie jak dla ADV, pacjenci, którzy otrzymali wyższą liczbę limfocytów VST o fenotypie CD3+CD4+ wykazującą reaktywność wobec EBV mieli wyższą częstość replikacji EBV (923 756/kg vs 39 686/kg; $p=0,006$) (rycina 31).



Rycina 29. Liczba limfocytów VST CD3+CD8+ (komórki/kg masy ciała) o reaktywności przeciw CMV w materiale przeszczepowym a występowanie replikacji CMV po przeszczepieniu ($p=0,049$).



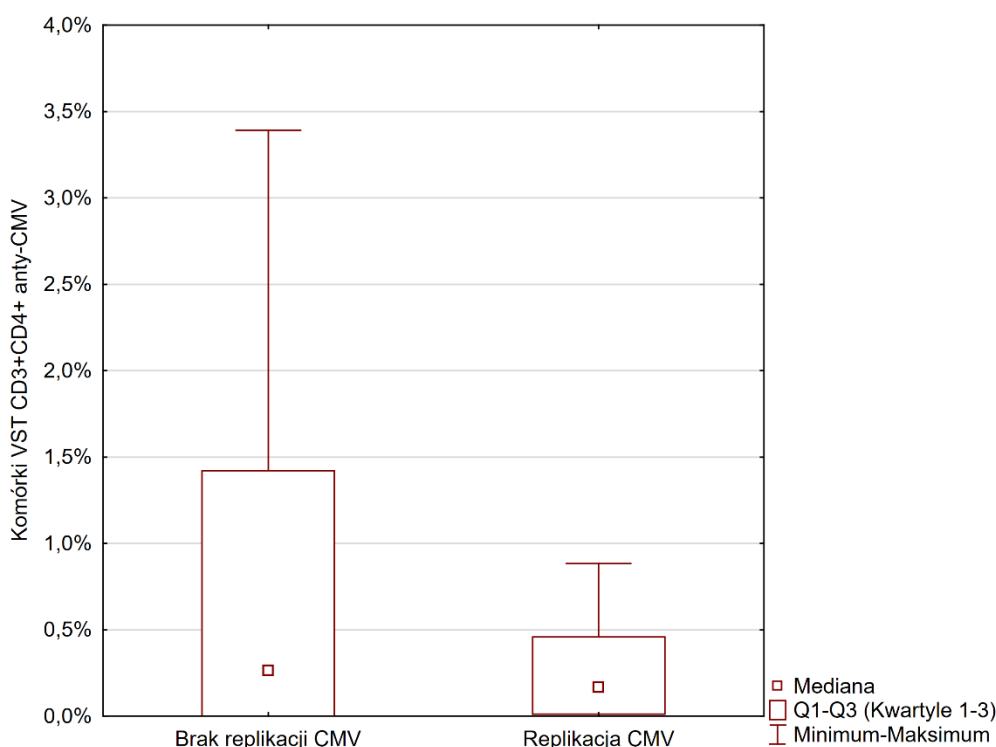
Rycina 30. Liczba limfocytów VST CD3+CD4+ (komórki/kg masy ciała) o reaktywności przeciw ADV w materiale przeszczepowym a występowanie replikacji ADV po przeszczepieniu ($p=0,018$).



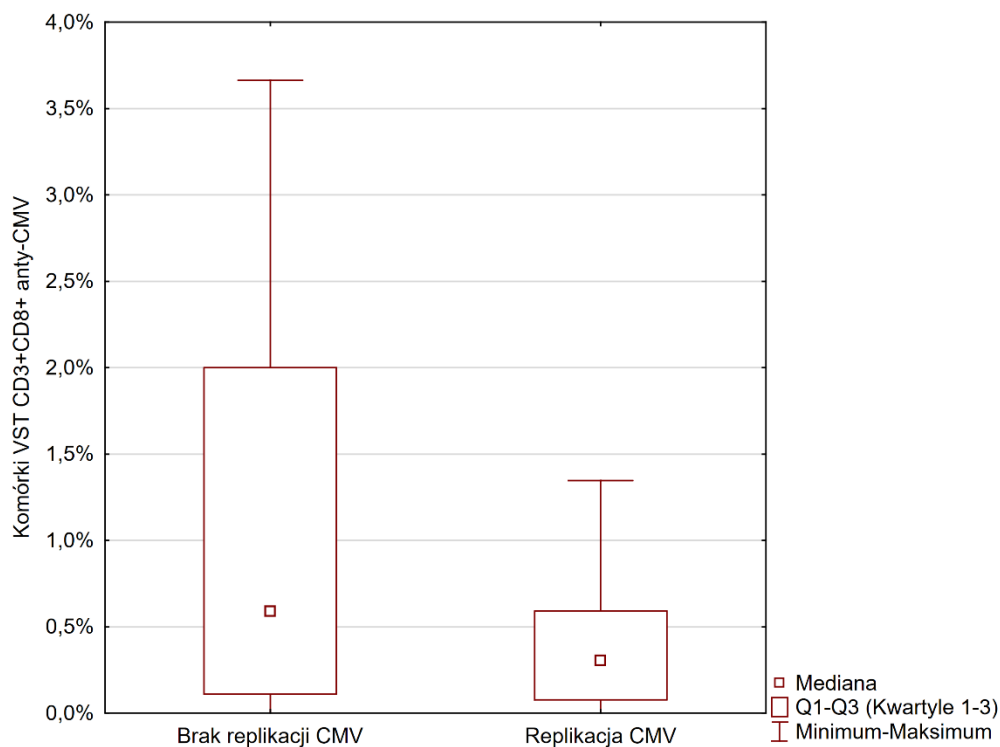
Rycina 31. Liczba limfocytów VST CD3+CD4+ (komórki/kg masy ciała) o reaktywności przeciw EBV w materiale przeszczepowym a występowanie replikacji EBV po przeszczepieniu ($p=0,006$).

6.5.4 Związek między odsetkiem limfocytów reaktywnych a występowaniem zakażeń wirusowych

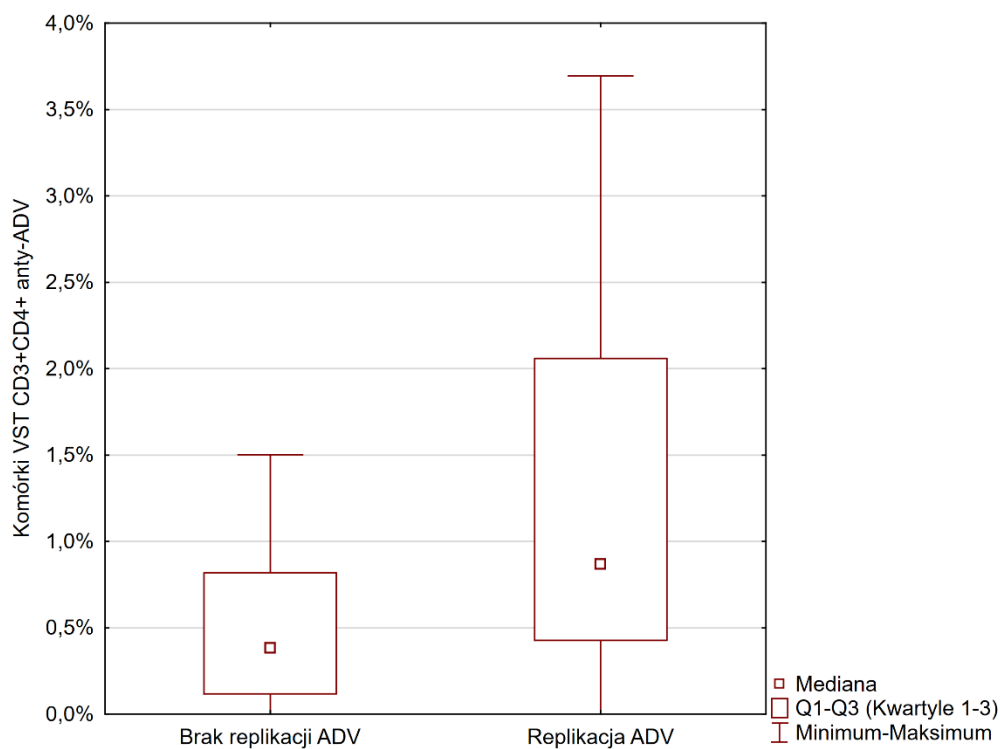
Oceniono zapadalność biorców na zakażenia wirusowe w zależności od odsetka limfocytów VST obecnych w preparatach HSC. W badaniach wykazano, że wyższy odsetek limfocytów VST o fenotypie CD3+CD8+ reaktywnych wobec CMV w preparacie PBSC zmniejszał ryzyko wystąpienia zakażenia CMV po przeszczepie (0,59% vs 0,30%, $p=0,046$) (rycina 33). Wyższe odsetki limfocytów VST reaktywnych przeciw antygenom ADV wykazały statystycznie istotny związek ze zwiększoną zapadalnością na ADV w okresie po HSCT (subpopulacja CD3+CD4+: 0,87% vs 0,38%; $p=0,019$; subpopulacja CD3+CD8+: 0,81% vs 0,24%; $p=0,039$) Zależności przedstawiono na rycinach odpowiednio 34 i 35. Wyższy odsetek limfocytów VST o fenotypie CD3+CD4+ reaktywnych przeciwko EBV miał związek z wyższym ryzykiem replikacji EBV (0,54% vs 0,15%, $p=0,022$) (rycina 36).



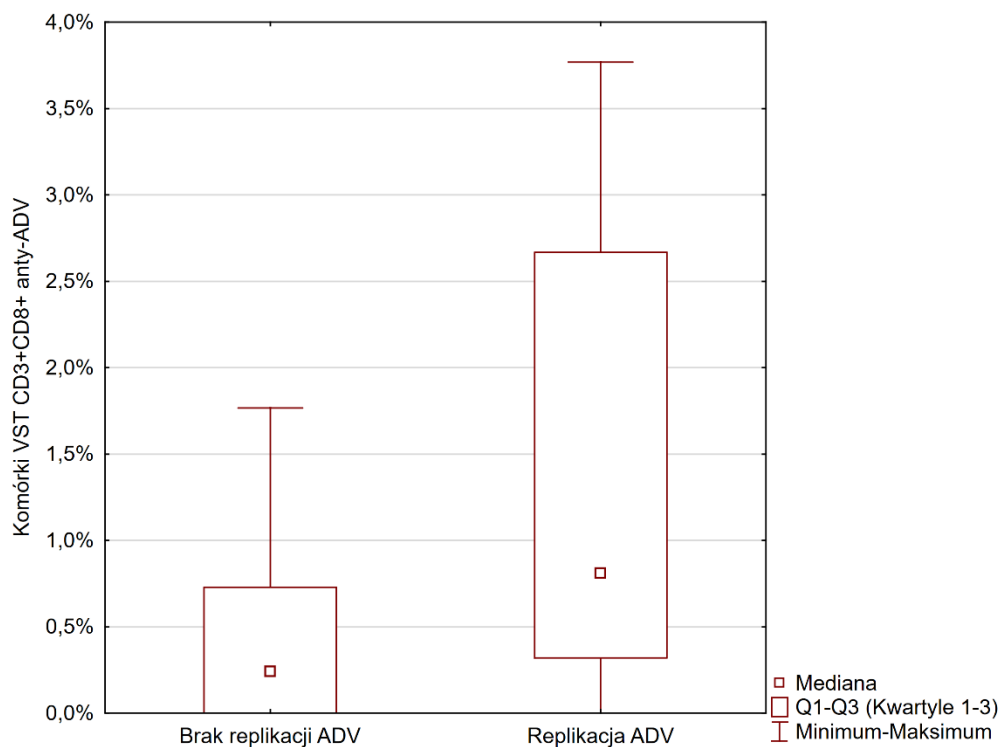
Rycina 32. Odsetek limfocytów VST o reaktywności przeciwko CMV w materiale przeszczepowym a występowanie replikacji CMV po przeszczepie



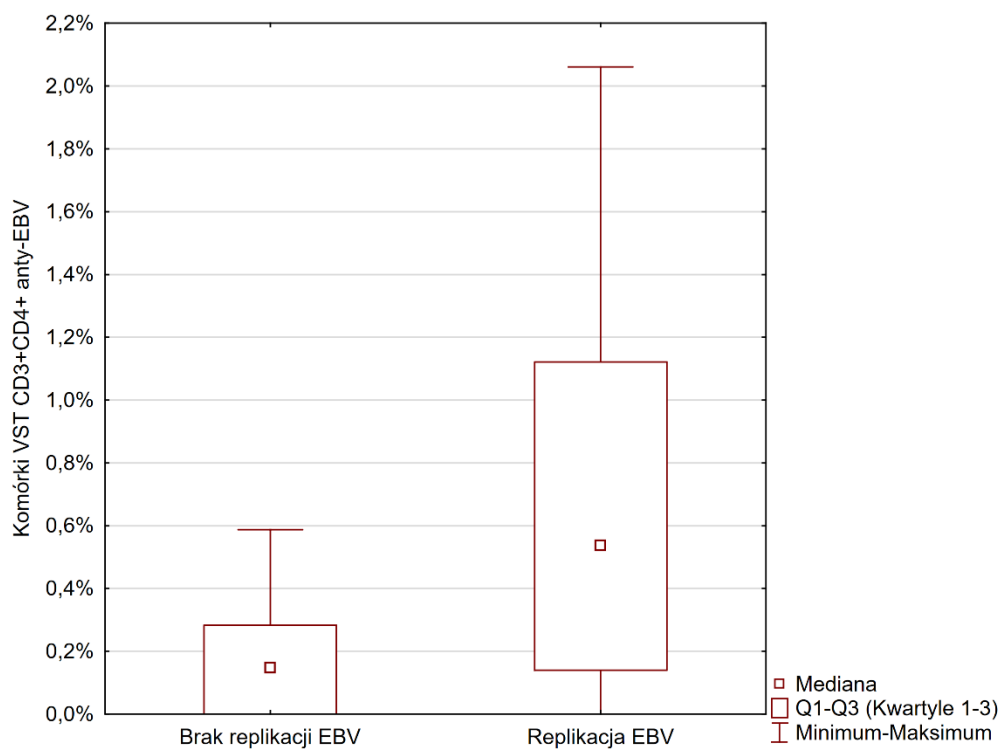
Rycina 33. Odsetek limfocytów VST CD3+CD8+ o reaktywności przeciwko CMV w materiale przeszczepowym a występowanie replikacji CMV po przeszczepie (p=0,046).



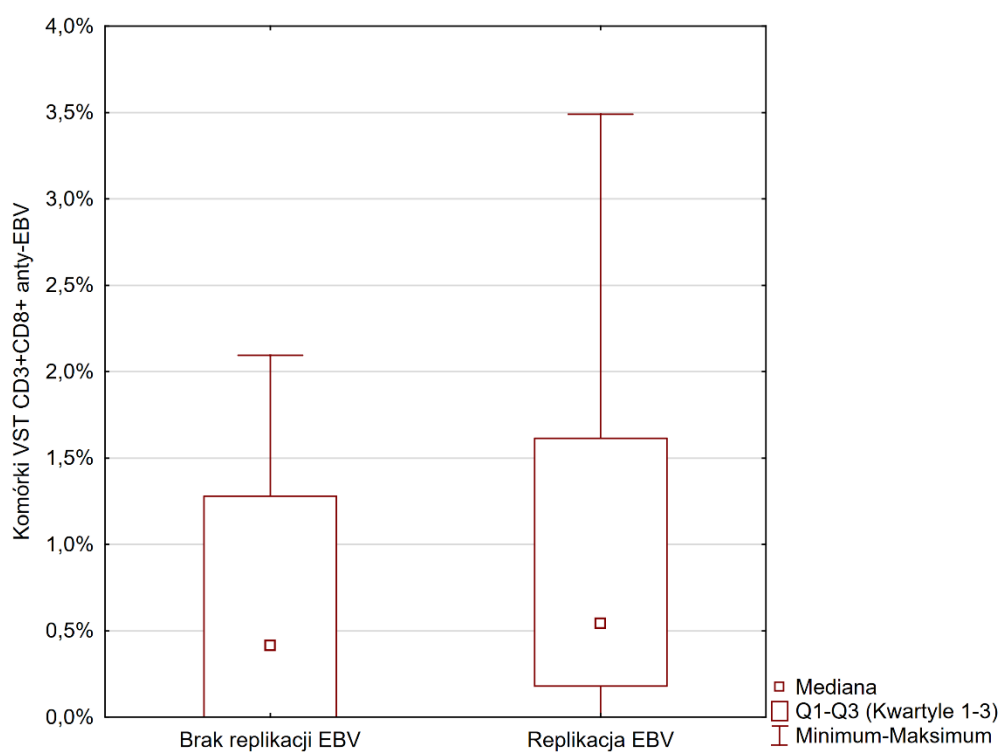
Rycina 34. Odsetek limfocytów VST CD3+CD4+ o reaktywności przeciwko ADV w materiale przeszczepowym a występowanie replikacji ADV po przeszczepie (p=0,019).



Rycina 35. Odsetek limfocytów VST CD3+CD8+ o reaktywności przeciwko ADV w materiale przeszczepowym a występowanie replikacji ADV po przeszczepie ($p=0,039$).



Rycina 36. Odsetek limfocytów VST CD3+CD4+ o reaktywności przeciwko EBV w materiale przeszczepowym a występowanie replikacji EBV po przeszczepie ($p=0,022$).



Rycina 37. Odsetek limfocytów VST CD3+CD8+ o reaktywności przeciwko EBV w materiale przeszczepowym a występowanie replikacji EBV po przeszczepie

6.6 Immunoterapia za pomocą limfocytów VST – procedura CCS

Praktycznym aspektem wiedzy o występowaniu limfocytów rozpoznających specyficzne antygeny wirusowe i aktywujących się pod ich wpływem, jest możliwość immunoterapii zakażeń za pomocą pobrania, oczyszczenia i przeniesienia limfocytów o specyficznej aktywności przeciwwirusowej od zdrowego dawcy do pacjenta z zakażeniem oportunistycznym. W trakcie trwania badań przeprowadzono taki zabieg u 2 pacjentów z niekontrolowanym zakażeniem ADV.

System użyty do przygotowania komórek VST - CliniMACS Prodigy Cytokine Capture System wzbogaca produkt w limfocyty T pamięci CD4+ i CD8+ wydzielające IFN-gamma, które są specyficzne wobec zastosowanego antygeny. Zautomatyzowana procedura rozpoczyna się od przygotowania próbki i stymulacji antygenowej limfocytów T za pomocą PepTivatorów, czyli mieszaniny syntetycznych oligopeptydów (15-merowych) obejmujących sekwencję antygenów wirusowych i niewymagających prezentacji za pomocą antygenów zgodności tkankowej MHC. Po stymulacji następuje znakowanie białych krwinek odczynnikiem CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix, składającym się z przeciwciał CD45 skoniugowanych z przeciwciałami specyficznymi dla interferonu gamma.

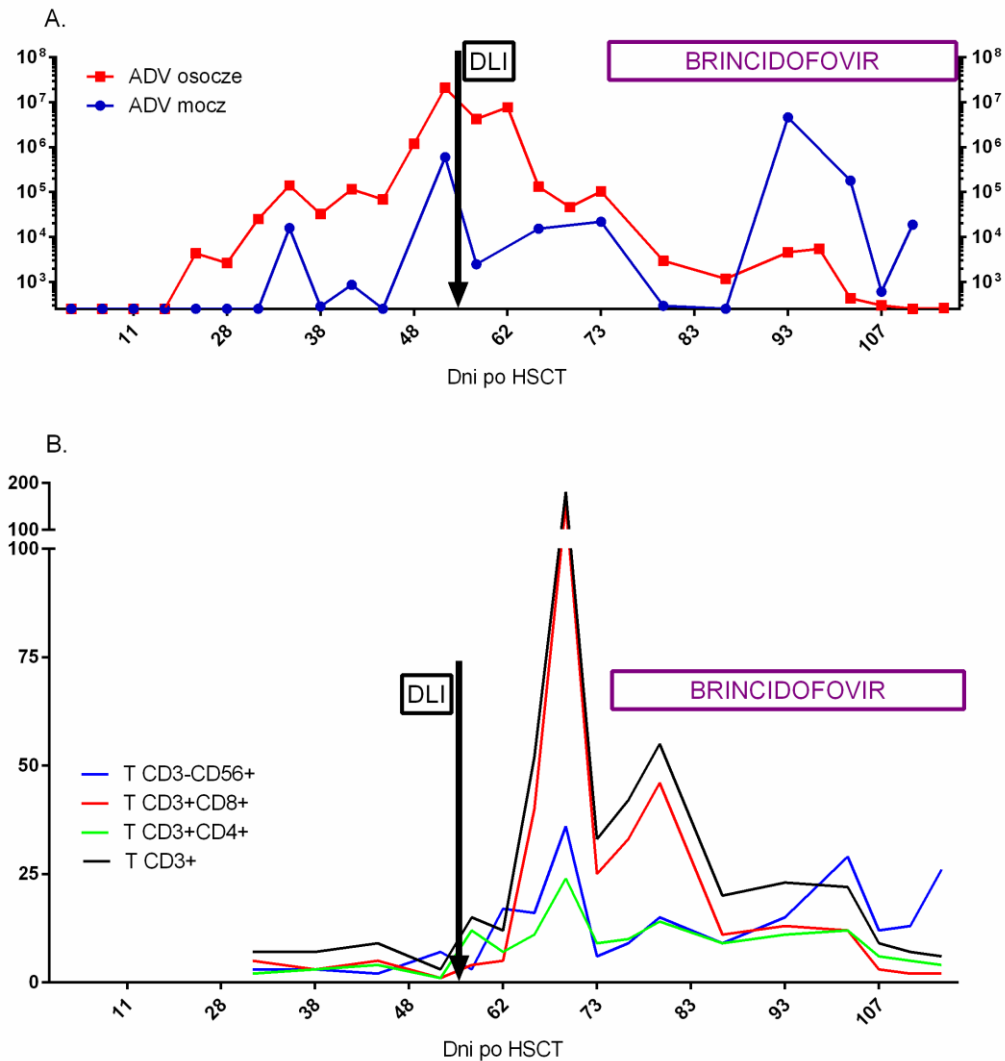
Procedura została przeprowadzona z wykorzystaniem limfocytów pobranych od haploidentycznego, spokrewnionego dawcy z wykorzystaniem mieszaniny peptywatorów odpowiadających antygenom ADV.

Jakość produktu komórkowego oceniono na podstawie wydzielania INF- γ . U obu pacjentów podano izolowane komórki, u jednego pacjenta uzyskano ekspansję *in vivo* i znaczący spadek replikacji wirusa (rycina 38A). Bezwzględna liczba limfocytów CD4+ i CD8+ we krwi pacjenta po podaniu preparatu VST była niska (rycina 38B), ale badania replikacji ADV we krwi i moczu pacjentów poddanych terapii VST, wykazały zahamowanie replikacji (rycina 39).

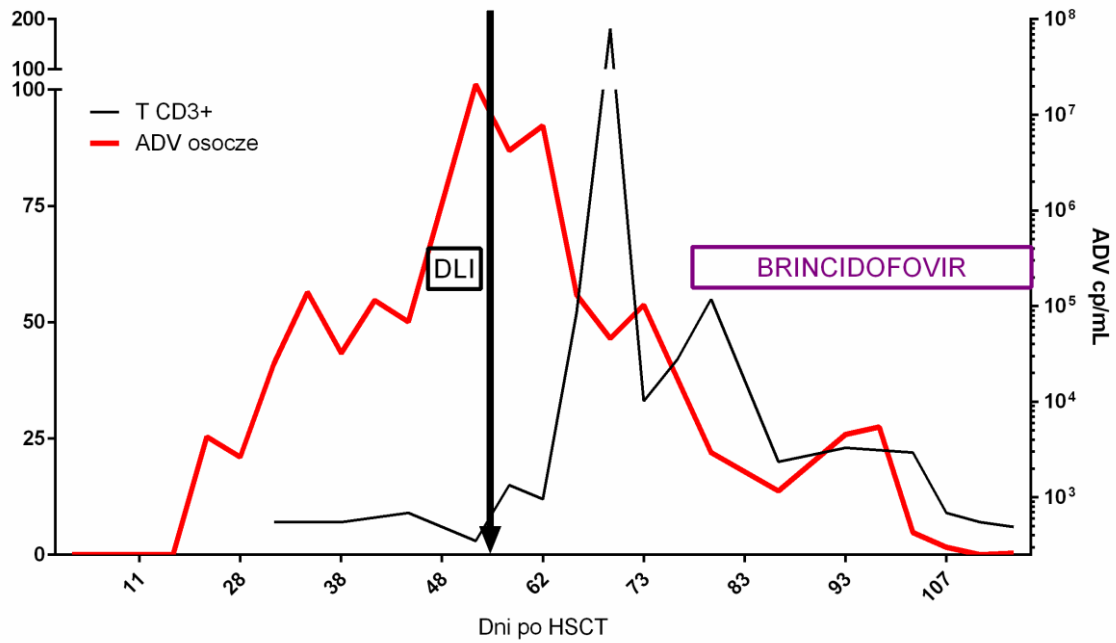
Po 4 tygodniach od podania VST zaobserwowano spadek liczby limfocytów T i wyczerpanie odporności przeciwwirusowej, czego następstwem był wzrost replikacji ADV. Wobec dostępności nowego, eksperymentalnego preparatu o aktywności przeciwwirusowej – brincidofowiru – podano go pacjentowi uzyskując spadek replikacji ADV.

U drugiego pacjenta szybki zgon związany z postępem powikłań poprzyszczepowych, nie pozwolił na ocenę efektywności.

Obaj pacjenci zmarli z powodu ciężkich powikłań nie związanych z adenowirozą (pacjent 1- inwazyjna grzybica płuc, pacjent 2 – z angiopatią związaną z przeszczepem).



Rycina 38 A. Wartości replikacji ADV w osoczu i moczu w kolejnych dniach po przeszczepieniu szpiku. B. Wartości liczbowe subpopulacji limfocytarnych po przeszczepieniu szpiku. DLI wskazuje na datę podania limfocytów dawcy o specyficzności przeciwko ADV. Okres leczenia brincidofowirem jest oznaczony nad wykresem.



Rycina 39. Prezentacja liczby kopii ADV w osoczu i liczby limfocytów T u pacjenta. DLI wskazuje na datę podania limfocytów dawcy o specyficzności przeciwko ADV. Okres leczenia brincidofowirem jest oznaczony nad wykresem.

7. Dyskusja

Transplantacja hematopoetycznych komórek macierzystych to część schematu leczenia wielu schorzeń hematologicznych i hematologicznych, pozwalająca osiągnąć całkowite wyleczenie choroby pierwotnej. Liczne badania odbudowy immunologicznej po HSCT mają na celu identyfikację czynników ryzyka infekcji oportunistycznych i w efekcie zmniejszenie śmiertelności związanej z zastosowaną terapią.

Przedmiotem badań były badania znaczenia limfocytów T o reaktywności przeciwwirusowej obecnych w materiale przeszczepowym. Sformułowane wnioski mają pozwolić ocenić przydatność zastosowania limfocytów VST, jako potencjalnej metody terapeutycznej infekcji wirusowych opornych na standardowe leki.

Pierwszym etapem analizy była ocena czynników wpływających na występowanie powikłań zakaźnych i niezakaźnych, w celu zbadania charakterystyki badanej grupy i określenia, czy występowały w niej wyznaczniki ryzyka typowe dla biorców allogenicznych przeszczepień hematopoetycznych komórek macierzystych.

Kolejny etap analizy był ukierunkowany na ocenę związku aktywności przeciwwirusowej limfocytów obecnych w materiale przeszczepowym z występowaniem powikłań.

7.1 Odbudowa limfocytarna

Wysokie dawki chemioterapii stosowane w schematach kondycjonujących prowadzące do mieloablacji przed transplantacją powodują aplazję szpiku kostnego i długotrwałą leukopenię, zwiększającą ryzyko infekcji oportunistycznych[1–4]. Na rekonstrukcję immunologiczną w badanej przez mnie grupie pacjentów wpływały takie czynniki jak źródło HSC, skład przeszczepu, schemat kondycjonowania czy rodzaj profilaktyki GvHD. Obserwacja ta jest zgodna ze stanem wiedzy, potwierdzając typowy charakter badanej przez mnie grupy pacjentów.

Monocyty, neutrofile i komórki NK odbudowują się w pierwszym miesiącu po HSCT i przez to wrodzona odporność stanowi najwcześniejszą linię obrony[54]. Znaczenie odporności wrodzonej w kontroli zakażeń wirusowych jest mniejsze niż odporności nabytej, swoistej, czego dowodem może być wczesna śmiertelność pacjentów

z ciężkimi, złożonymi niedoborami odpornościowymi (SCID) związanych z nieobecnością lub głęboką niewydolnością funkcji limfocytów T[54].

Skład komórkowy przeszczepu ma wpływ na rekonstytucję odporności nieswoistej, np. dla komórek NK wykazano związek między ich liczbą w materiale przeszczepowym, a odnową układu odpornościowego po przeszczepieniu[55]. Hematopoetyczne czynniki wzrostu, jak G-CSF lub GM-CSF, mogą skrócić czas trwania neutropenii u biorcy HSCT i zmniejszyć częstość występowania infekcji, ale nie przekłada się to w znaczący sposób na zmniejszenie śmiertelności. Podobnie badania mówiące o zastosowaniu G-CSF po chemioterapii, wskazują na przyspieszoną regenerację neutrofilii i skróconym czasie hospitalizacji, ale bez poprawy przeżycia[56].

Odporność nabyta, w której uczestniczą limfocyty T i B, regeneruje się w późniejszym okresie po przeszczepieniu i ma kluczowe znaczenie zarówno dla utrzymania tolerancji immunologicznej, jak i długoterminowej ochrony przed infekcjami i nawrotami choroby nowotworowej[54]. Niska liczba bezwzględna limfocytów 30 dnia po HSCT jest złym czynnikiem prognostycznym dalszej regeneracji u biorcy, który otrzymał przeszczepienie od dawcy allogenicznego (MUD lub MRD)[14]. W odróżnieniu od odporności nieswoistej, w przypadku limfopenii nie ma możliwości przyspieszenia odnowy limfocytarnej, pośrednio można ją przyspieszyć przez podanie wlewów limfocytów od dawcy, ale wiąże się to z ryzykiem wystąpienia aGvHD[57].

7.2 Źródło hematopoetycznych komórek macierzystych

Wyniki oceny odbudowy immunologicznej potwierdzają jej zależność od pochodzenia hematopoetycznych komórek macierzystych pod względem rodzaju preparatu i typu dawcy, co znajduje potwierdzenie w literaturze przedmiotu. Preparaty HSC, których całkowita liczba komórek jądrzastych wynosi co najmniej $2,5 \times 10^7$ komórek/ μ l lub zawierające co najmniej $1,7 \times 10^5$ komórek CD34+/kg masy ciała biorcy charakteryzują się szybszym zasiedleniem niszy szpikowej, wzrostem liczby neutrofilii i zmniejszoną częstością niepowodzeń wszczepu[58]. Zaletą przeszczepienia aspiratu szpiku kostnego jest mniejsze ryzyko wystąpienia GvHD, ale czas odnowy leukocytarnej jest nieco dłuższy. Preparaty PBSC zawierają w swoim składzie więcej komórek macierzystych CD34+ i zarazem więcej limfocytów T niż BM[59]. W przypadku krwi pępowinowej odbudowa trwa dłużej ze względu na niższą liczbę komórek hematopoetycznych,

ponadto komórki układu odpornościowego w UCB są funkcjonalnie naiwne co skutkuje wyższym ryzykiem zakażeń[60–62].

Na podstawie wielu badań, można stwierdzić tendencję do uzyskiwania zbliżonych wyników przeszczepień MUD i MRD, co wynika z coraz skuteczniejszej terapii immunosupresyjnej i wspomagającej. J. Heimall i współpracownicy analizując grupę pacjentów poddaną HSCT z powodu SCID, nie zaobserwowali istotnych różnic w odbudowie limfocytarnej w zależności od stopnia spokrewnienia dawcy (MUD/MRD)[55,63].

7.3 Pierwotne rozpoznanie

Rekonstytucja immunologiczna limfocytów po HSCT nie wykazała zależności od pierwotnego wskazania do transplantacji, czym najprawdopodobniej należy wytłumaczyć brak różnic w częstości zakażeń wirusowych, występowania aGvHD lub cGvHD pomiędzy grupami dzieci z chorobami nowotworowymi i nienowotworowymi. O ile intensywność okołoprzeszczepowej immunosupresji w chorobach nienowotworowych jest wyższa niż w nowotworach, to fakt intensywnej odnowy immunologicznej zminimalizował efekty zależne od rozpoznania. Nie można wykluczyć, że analiza tych czynników w większej grupie pacjentów pozwoliłaby na ujawnienie się innych efektów.

7.4 Kondycjonowanie

W badanej grupie wykazano różnice w tempie odbudowy poszczególnych subpopulacji limfocytów w zależności od zastosowanego protokołu kondycjonowania (MAC/RIC/NMA). Obserwacje kinetyki wszczepienia w zależności od rodzaju schematu kondycjonującego po HSCT znajdują poparcie w aktualnej literaturze. Kondycjonowanie mieloablacyjne wykorzystujące napromienianie całego ciała (TBI, ang. Total Body Irradiation) wiąże się z szybszą regeneracją neutrofilii i płytek niż kondycjonowanie oparte na chemioterapii. Stosowanie kondycjonowania o zmniejszonej intensywności RIC redukuje toksyczności tkankowe i w efekcie obniża ryzyko komplikacji związanych z długim czasem odnowy immunologicznej[58]. Szansa na wcześniejszą odbudowę limfocytów T i B po zastosowaniu MAC wiąże się z wyższą

potencjalną toksycznością i wyższym ryzykiem powikłań pogarszających jakość życia pacjenta.

Kondycjonowanie przed procedurą HSCT oraz alloreaktywność materiału przeszczepowego są czynnikami wpływającymi na niedobór komórek T, ponieważ niezależnie zakłócają prawidłowe funkcjonowanie grasicy[64].

Decyzja o wyborze kondycjonowania zależy od rodzaju dawcy HSC, stanu klinicznego pacjenta oraz pierwotnego wskazania do transplantacji, co sprawia że te czynniki trudno analizować w sposób niezależny[55].

7.5 Rodzaj leczenia limfodeplecyjnego

Terapia immunosupresyjna zapobiegająca wystąpieniu GVHD wywarła w moich badaniach istotny wpływ na odnowę limfocytarną i występowanie zakażeń. Różnice w statusie serologicznym wobec badanych wirusów między dawcą i biorcą wpłynęły na wyjściowe ryzyko zakażeń wirusowych w okresie braku wystarczającej ochrony ze strony odbudowującego się układu immunologicznego.

Tempo odnowy składników układu immunologicznego i rekonstrukcja układu odpornościowego wpływa na występowanie komplikacji poprzyszczepowych[63]. Poszczególne subpopulacje limfocytów ulegają odnowie w różnych okresach po HSCT. Pierwsze pojawiają się limfocyty T CD8+, następnie CD4+ i naiwne limfocyty CD4+[65]. Obniżona liczba limfocytów T CD4+ koreluje ze zwiększonym ryzykiem infekcji[65]. Subpopulacja T CD8+ uzyskuje sprawność u większości pacjentów w ciągu roku po HSCT, podczas gdy limfocyty CD4+, w ciągu pierwszego roku od zabiegu, odnawiają się jedynie u 28% pacjentów[66]. Wnioski kilku grup badawczych wskazują na zależność między wczesnym odzyskaniem bezwzględnej liczby limfocytów po niezmodyfikowanej lub częściowej deplecji limfocytów T, a poprawą całkowitego przeżycia i niższą śmiertelnością związaną z przeszczepem[67–69].

W dostępnej literaturze profilaktyka choroby przeszczep-przeciwno-gospodarzowi z zastosowaniem PTCy i jej wpływ na częstotliwość infekcji wirusowych i ich przebieg u dzieci nie jest szeroko opisana[70]. Oltolini i zespół w swojej pracy zaobserwowali wysoki wskaźnik zachorowań po terapii PTCy, szczególnie większą częstość infekcji bakteryjnych spowodowaną prawdopodobnie uszkodzeniem śluzówek, ale z drugiej strony szybką i szeroką odbudowę limfocytarną, która może zredukować ryzyko infekcji wirusowych[70]. Obserwacje grupy badanej Slade'a i współpracowników

potwierdzają powszechne występowanie zakażeń bakteryjnych po zastosowaniu PTCy ale również wskazują na istotną częstość replikacji CMV[71]. Wnioski te potwierdzają Garcia-Cadenas i wsp., opisując zachorowalność na CMV we wczesnym okresie po przeszczepieniu z PTCy bez ryzyka ciężkich i śmiertelnych powikłań[72]. Na podstawie uzyskanych przeze mnie wyników i zgodnie ze stanem wiedzy można przypuszczać, że zaletą PTCy jest szybsza odbudowa immunologiczna zapewniająca ochronę przeciwinfekcyjną[54].

Zgodnie z przewidywaniami terapie limfodeplecyjne z zastosowaniem PTCy lub ATG (Grafalon, Thymoglobulinę) wywołały większe opóźnienie w odnowie immunologicznej w porównaniu do grupy nie poddanej limfodeplecji. Zwiększone ryzyko adenowirozy po zastosowaniu Thymoglobuliny można tłumaczyć głębszą limfodeplecją z powodu dłuższego działania biologicznego tego leku niż Grafalonu[73–75]. Profilaktyka GvHD obejmująca podanie ATG niezależnie od użytego preparatu, wiąże się z wydłużonym okresem odbudowy układu odpornościowego[65].

Ustalenie odpowiedniej dawki i schematu seroterapii są zagadnieniami, które nie zostały rozwiązane w sposób zadowalający[76]. Skuteczna profilaktyka GvHD zakłada taką podaż leków immunosupresyjnych, która nie dopuści do wystąpienia objawów aGvHD i późniejszych objawów cGvHD, jednocześnie nie przyczyniając się do zwiększenia zachorowalności na infekcje oportunistyczne po HSCT[77]. Szeroko opisana w literaturze jest zależność wysokich dawek ATG z opóźnieniem odbudowy limfocytarnej, skutkująca zwiększoną liczbą zachorowań na CMV i EBV a celem klinicystów dobór umiarkowanej dawki o wymiernych korzyściach[76,78].

7.6 Choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi

W badanej grupie zaobserwowałam związek między wyższą całkowitą liczbą limfocytów T w materiale przeszczepowym, liczbą limfocytów CD4+ oraz limfocytów CD8+ a występowaniem aGvHD, co potwierdza pogląd, że aGvHD zależy przede wszystkim od obecności limfocytów pasażerskich w materiale przeszczepowym.

Wyższa zapadalność na aGVHD wiąże się z wzrostem ryzyka powikłań. Konieczność zastosowania leczenia immunosupresyjnego w celu leczenia aGvHD zwiększa ryzyko replikacji wirusowej po HSCT[19,44].

W badanej przeze mnie grupie pacjentów potwierdzono zależność między wystąpieniem GvHD a zwiększeniem ryzyka wystąpienia zakażenia wirusowego,

u czego podłoża mogą leżeć zaburzenia regulacji odpowiedzi odpornościowej oraz efekty upośledzenia odporności nieswoistej i swoistej wskutek intensywnego leczenia immunosupresyjnego.

W badaniu Matsumury-Kimoto leczenie aGVHD za pomocą glikokortykosterydów wiązało się z wysoką zapadalnością na zakażenia w ciągu 6 miesięcy po przeszczepieniu, infekcje grzybicze wykryto u 14%, infekcje CMV u 21%, inne zakażenia wirusowe u 28%, a infekcje wywołane bakteriami Gram (-) u 20% pacjentów[19]. Ryzyko rozwoju infekcji było większe jeśli aGvHD pojawiła się do 26 dnia po HSCT, a leczeniu immunosupresyjnemu towarzyszyła niska wartość leukocytów. Do zahamowania działania neutrofilii konieczna jest wyższa dawka glikokortykosteroidów, niż do upośledzenia funkcji limfocytów, co tłumaczy wyższą zapadalność na zakażenia wirusowe i utrzymywanie się ryzyka replikacji wirusowej nawet przy mało intensywnej terapii immunosupresyjnej.

W przypadku cGvHD poddano analizie zależność zwiększonego ryzyka wystąpienia schorzenia po wykryciu replikacji wirusowych, ponieważ monitorowanie rekonstrukcji immunologicznej i zakażeń trwało 90 dni, a objawy cGvHD z reguły pojawiają się w późniejszym okresie[19,44].

Osiągnięcie prawidłowej rekonstrukcji immunologicznej jest związane z redukcją ryzyka wystąpienia cGvHD[65].

Podsumowując, skład materiału przeszczepowego, rodzaj kondycjonowania oraz wiek pacjenta wpływały na ryzyko występowania GvHD w badanej przez mnie grupie.

7.7 Częstość występowania replikacji wirusowych

Powikłania infekcyjne, zwłaszcza infekcje wirusowe, pozostają istotną przyczyną zachorowalności i śmiertelności po allogenicznym przeszczepie komórek krwiotwórczych[33,79].

W okresie obserwacji u pacjentów najczęściej wykrywane było zakażenie EBV. Biorcy HSCT wykazują znaczne ryzyko rozwoju PTLD i chłoniaków związanych replikacją EBV[21]. Czynniki jak wiek pacjenta, stan ogólny chorego, rodzaj choroby, schemat TBI, profilaktyka GvHD i źródło komórek macierzystych wpływają na ryzyko wystąpienia replikacji EBV[80]. Na podstawie badania L. Zhou wiadomo też, że limfocyty T CD8⁺ reaktywne wobec EBV mogą się pojawić w ciągu + 30 dni po

przeszczepie, co dowodzi, że ochrona przeciwko EBV jest jednym z priorytetów układu odpornościowego[43].

Zakażenia EBV mogą ujawniać swój szkodliwy wpływ w połączeniu z innymi czynnikami związanymi z przeszczepem i przebiegiem po transplantacji. W grupie badanej przez Q. Li wyższa dawka TBI (TBI>6 Gy) nie wpływała na przeżycie pacjentów po HSCT, ale wraz z obciążeniem EBV i wystąpieniem ostrego GvHD obniżała prawdopodobieństwo przeżycia[21]. W badaniach zaobserwowano dwa modele replikacji EBV – pierwszy z wyraźnym szczytem wiremii 1-3 miesiąca po przeszczepieniu HSC, która następnie spadała i stabilizowała się na niskim poziomie przez 6-12 miesięcy oraz pacjenci stopniowo wykazujący wzrost replikacji, której szczyt przypadał na 6-12 miesiąc po HSCT. Obserwacja ta podkreśla znaczenie, jak ważne jest regularne oznaczanie wiremii EBV-DNA po HSCT w celu wczesnego wykrycia infekcji i interwencji w postaci redukcji leczenia immunosupresyjnego lub podania rytuksymabu zapobiegającego wystąpieniu zespołów limfoproliferacyjnych.

W ostatnich latach zastosowanie limfocytów VST od dawcy ma udowodnione skuteczne i bezpieczne działanie w ograniczeniu infekcji wirusowych[33]. Według danych literaturowych, limfocyty T o aktywności wobec EBV zmniejszają ryzyko wystąpienia zakażenia EBV i zespołów limfoproliferacyjnych[43].

Wyniki badań nie pozwalają na określenie optymalnego momentu do przeprowadzenia terapii komórkowej w celu zapobiegania lub leczenia infekcji EBV[21,43,45].

Kolejnym zagadnieniem była ocena zakażeń ADV, które są częściej wykrywane w populacji pediatrycznej, szczególnie w ciągu pierwszych 100 dni po HSCT i mogą zwiększać ryzyko zgonu[36,81,82]. W badanej grupie wiremia ADV występowała częściej po kondycjonowaniu niemieloablacyjnym, związanym z silniejszą okołoprzeszczepową immunosupresją. W badanej przez mnie grupie, adenowiroza była czynnikiem zwiększającym ryzyko cGVHD, co sugeruje rolę replikacji wirusowej w indukcji GVHD. W populacji pediatrycznej częstym źródłem ADV jest zakażenie błony śluzowej jelit, a replikacja w obrębie jelita często poprzedza wiremię[83]. Z tego powodu lokalna replikacja ADV w przewodzie pokarmowym uznana za główny czynnik ryzyka wystąpienia infekcji inwazyjnej[84]. L. Feghoul i wsp., w ciągu pierwszych 100 dni po przeszczepie, odnotował zachorowalność na zakażenia układu pokarmowego związane z ADV u 36%, ogólnoustrojowe zakażenie u 24% i inne choroby związane z infekcją adenowirusem u 18,3% badanej grupy pacjentów[85]. Rola

układu odpornościowego w kontroli zakażeń ADV jest kluczowa, ryzyko zakażenia uogólnionego wzrasta, gdy bezwzględna liczba limfocytów spada poniżej $200/\text{mm}^3$ [86]. Obecność limfocytów specyficznych wobec ADV jest kluczowa do zwalczania infekcji i w razie opornego zakażenia transfer limfocytów może być skuteczną terapią[87]. Nie wykazano dotąd korelacji między liczbą przeniesionych limfocytów T i skutecznością terapii adoptywnej[87–89].

W grupie badanej w niniejszej pracy, CMV został wykryty u 41% pacjentów do 90 dnia po transplantacji hematopoetycznych komórek macierzystych. Było to zgodne z doniesieniami literaturowymi, wskazującymi na częstość replikacji CMV wynoszącą od 12,8% do 41%[64]. Podobnie jak w przypadku ADV, replikacja CMV najczęściej była obserwowana w populacji poddanej kondycjonowaniu NMA, a rzadziej w przypadku kondycjonowania mieloablacyjnego.

Znamiennym czynnikiem ryzyka replikacji CMV w okresie po HSCT jest status serologiczny biorcy i dawcy przeszczepu. U pacjentów seropozytywnych przed przeszczepem częstość reaktywacji zakażenia CMV wynosi 70%[90]. U około 80% seropozytywnych względem CMV biorców może dojść do reaktywacji wirusa bez zastosowania odpowiedniej profilaktyki[91,92].

Poszukiwanie seronegatywnego dawcy dla seronegatywnego biorcy jest jednym z kryteriów doboru ograniczającym ryzyko zakażenia CMV[92,93]. Na podstawie analizy danych rejestrowych EBMT z 50 000 przeszczepień wykazano, że seronegatywni pod względem CMV biorecy, otrzymujący materiał przeszczepowy od niespokrewnionego dawcy seropozytywnego (CMV+), mają krótszy całkowity czas przeżycia, w porównaniu z dawcami seronegatywnymi (CMV-). Analiza danych, w grupie badanej, dotyczących statusu serologicznego dawcy i biorcy pod względem obecności IgG dla CMV wykazała wysokie ryzyko replikacji wirusa cytomegalii w sytuacji, kiedy dawca i biorca nie są zgodni względem statusu serologicznego dla wirusa CMV przed HSCT. Przedstawione dane są zgodne z doniesieniami naukowymi innych zespołów badawczych[10,64,93].

Efekt różnic w statusie CMV zależy też od innych czynników, zarówno intensywność kondycjonowania, jak i typ dawcy modulują wpływ statusu serologicznego CMV dawcy na rokowanie pacjenta[91,93,94]. Nie zaobserwowano różnicy wpływu statusu serologicznego CMV, jeśli dawca był spokrewniony i zgodny w układzie HLA[95].

7.8 Występowanie VST w materiale przeszczepowym

Analizy występowania powikłań zakaźnych i niezakaźnych w badanej grupie były konieczne do jej scharakteryzowania i do oceny znaczenia komórek VST dla biorcy przeszczepu.

Nowatorskim pomysłem była analiza liczby VST w aferezacie komórek macierzystych pobranych po mobilizacji dawcy lub w preparacie szpiku kostnego, a nie w próbkach krwi żyłnej stanowiących typowy materiał dla takich badań. Obserwacje E.R. Samuela wykluczyły wpływ G-CSF na dalszą pobudliwość limfocytów względem antygenów wirusowych, co świadczy o wiarygodności uzyskanych wyników potencjału do reaktywności przeciwwirusowej materiału przeszczepowego[96].

Stymulowany aferezat krwi obwodowej może posłużyć jako materiał do oceny reaktywności wirusowej i jego frakcja może zostać potencjalnie wykorzystana do wyizolowania preparatu limfocytów przeciwwirusowych do późniejszego zastosowania. Z uwagi na odstęp czasowy między pozyskaniem aferezatu do przeszczepienia a potencjalnym wykorzystaniem do terapii przeciwwirusowej nie jest możliwe wytwarzanie dla każdego biorcy jedno- lub wielospecyficznego preparatu VST z powodu niskiego prawdopodobieństwa takiej terapii przy wysokim koszcie i pracochłonności wytworzenia takiego produktu. Tym niemniej, w przypadku prowadzenia rutynowego screeningu aktywności przeciwwirusowej produktu komórkowego, w przypadku wykrycia niskiej reaktywności przeciwwirusowej, można zidentyfikować dodatkowy czynnik ryzyka replikacji wirusowej po przeszczepieniu i wykorzystać go w algorytmie bardziej intensywnej terapii preemptywnej. Wykrycie u dawcy materiału przeszczepowego wysokiej reaktywności przeciwwirusowej może posłużyć jako czynnik kwalifikujący go w razie konieczności do pobrania niestymulowanego aferezatu mononuklearów krwi obwodowej do wytworzenia limfocytów przeciwwirusowych lub do innych rodzajów terapii za pomocą modyfikowanych wlewów limfocytów.

Warto podkreślić, że w moim badaniu tylko w 9% przypadków dawców reaktywność przeciwwirusowa wobec wszystkich patogenów była niska. W pozostałych przypadkach mediana odsetka liczebności populacji o reaktywności przeciwwirusowej wobec każdego z patogenów wynosiła między 0,13 do 0,24% wszystkich badanych komórek. Biorąc pod uwagę wysoką komórkowość produktu PBPC, przekłada się to na obecność kilku milionów limfocytów VST w każdym przeszczepionym preparacie. Nawet

zastosowanie seroterapii niszczącej większość limfocytów w materiale przeszczepowym nie eliminuje całkowicie tej odporności.

Konsekwencją wykonanych badań jest zwrócenie uwagi na zróżnicowaną wartość dawców komórek macierzystych w aspekcie reaktywności przeciwwirusowej i wpływu tej cechy na ryzyko występowania zakażeń po HSCT. Kryterium reaktywności przeciwwirusowej nie jest wykorzystywane w procedurze doboru dawcy przeszczepu poza szczególną i omawianą wcześniej sytuacją statusu serologicznego wobec CMV. Na podstawie moich badań można wyciągnąć wniosek, że istnieje możliwość określenia dodatkowych czynników ryzyka występowania zakażeń po przeszczepieniu, natomiast nie określono optymalnej metody takiego postępowania.

Obecnie prowadzone badania reaktywności przeciwwirusowej koncentrują się na ocenie aktywacji limfocytów pod wpływem pełnych antygenów lub syntetycznych peptydów wirusowych i określeniu stężeń wydzielanego interferonu gamma za pomocą metod ELISA lub ELISpot. Warto podkreślić, że co prawda celem pracy nie było opracowanie procedury monitorowania stanu układu odpornościowego po przeszczepieniu, ale prowadzone przeze mnie badania w sposób bezpośredni określają liczbę limfocytów przeciwwirusowych i mogą być wykonywane na pojedynczych próbkach, co przyspiesza dostępność wyniku. Badania cytofluorymetryczne mogą również wykazać swoją przewagę u pacjentów z niską liczbą limfocytów i niewystarczającym wydzielaniem interferonu. Techniki określające reaktywność przeciwko CMV były do tej pory wykorzystywane u biorców przeszczepień komórek macierzystych lub narządów litych i można wiązać nadzieje z ich przyszłym włączeniem do rutynowej opieki nad pacjentami[97,98].

Interesującą obserwacją w moich badaniach jest brak związku pomiędzy statusem serologicznym dawcy wobec wirusa i liczbą limfocytów VST. Może to wynikać z faktu, że pozytywny status serologiczny oznacza obecność specyficznych przeciwciał, czyli efektu odpowiedzi ze strony limfocytów B, natomiast rola odpowiedzi humoralnej odgrywa najprawdopodobniej mało istotną rolę w zwalczaniu zakażeń wirusowych po HSCT. Odporność przeciwwirusowa opiera się przede wszystkim o odporność specyficzną uwarunkowaną przez limfocyty T, a w dalszej kolejności przez odporność nieswoistą ze strony komórek NK.

Należy podkreślić, że całkowita liczba limfocytów T lub subpopulacji CD4+ lub CD8+ w przeliczeniu na kilogram wagi biorcy nie wykazała związku z wystąpieniem zakażeń wirusowych. Ta obserwacja może mieć istotne konsekwencje w perspektywie

immunoterapii poprzyszczepowej. Z praktycznej perspektywy, jedną z metod postępowania u pacjentów z niekontrolowanymi infekcjami wirusowymi może być podanie wlewów limfocytów dawcy. W procedurze DLI brana jest pod uwagę całkowita liczba limfocytów T, natomiast na podstawie moich obserwacji efekt przeciwwirusowy nie jest związany z tą wartością, ale z liczbą komórek VST. U biorców przeszczepów zastosowanie wysokiej liczby alloreaktywnych limfocytów T bez specyficzności przeciwwirusowej może z kolei spowodować wystąpienie ostrej choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi, a przez to doprowadzić do konieczności intensyfikacji immunosupresji przeciwdziałającej zwalczaniu zakażenia wirusowego. Przyjmując założenie, że odporność przeciwwirusowa jest związana z subpopulacją limfocytów VST stanowiącą jedynie niewielki odsetek podawanych komórek, to należy przede wszystkim rozwijać techniki izolacji komórkowej i celowanej terapii przeciwwirusowej w celu ograniczenia efektów poza celem terapeutycznym.

W badaniach zaobserwowałam ochronny efekt ze strony wyższej liczby limfocytów VST przeciwko CMV w materiale przeszczepowym. Natomiast interesującą i sprzeczną z oczekiwaniami obserwacją było stwierdzenie zależności między liczbą limfocytów reaktywnych przeciwko EBV i ryzykiem replikacji wirusa po przeszczepieniu. W przypadku wirusa CMV obecność limfocytów reaktywnych zmniejszała ryzyko zakażenia CMV, natomiast w przypadku EBV i ADV wyższa liczba limfocytów wiązała się z wyższym ryzykiem replikacji wirusowej. Co ciekawe, wyższa liczba limfocytów T również wiązała się ze zwiększonym ryzykiem replikacji EBV. Wyjaśnienie tego zjawiska może nie być możliwe na etapie przeprowadzonych przeze mnie badań i wymaga weryfikacji w większej grupie pacjentów i z zastosowaniem innych metod. Ostrożność w interpretacji musi uwzględniać fakt niskiej liczby limfocytów o aktywności przeciwwirusowej wobec ADV i EBV, ale zarówno odsetek jak i liczba bezwzględna wszystkich podtypów limfocytów przeciwwirusowych nie wykazały istotnych statystycznie różnic (tabele 18 i 19).

Obecność wyższej liczby limfocytów przeciwwirusowych, mogących odpowiadać za niekorzystny efekt dla zapadalności zakażeń, mogła być następstwem niedawnego kontaktu dawcy z wirusem, ale dawcy HSCT przechodzą w ciągu miesiąca przed donacją komórek badania kwalifikacyjne i fakt objawowego zakażenia powinien zostać wykryty. Innym wyjaśnieniem jest możliwość istnienia bezobjawowego nosicielstwa lub reaktywacji zakażenia wirusowego, które doprowadza do stymulacji układu odpornościowego dawcy. Obecność latentnych wirusów w materiale przeszczepowym

od dawcy mogłaby po przeszczepieniu wywołać nadkażenie (superinfekcję) w organizmie biorcy. Wirus EBV występuje w fazie latentnej w leukocytach, z którymi może ulec przeniesieniu z organizmu dawcy do biorcy. Taki mechanizm z kolei nie wyjaśnia, dlaczego w przypadku CMV jest obecny efekt ochronny, mimo podobieństw w występowaniu ostrej i latentnej fazy zakażenia. Dla wirusa ADV istnieje dodatkowy mechanizm ograniczający skuteczność układu odpornościowego. Wirus ADV ulega najsilniejszej replikacji i tworzy rezerwuar w błonie śluzowej przewodu pokarmowego i dróg oddechowych, gdzie z kolei efektywność odpowiedzi komórkowej jest ograniczona z powodu styczności ze środowiskiem zewnętrznym[35–37].

Wobec dalej omawianej skuteczności limfocytów VST w zwalczaniu infekcji, w tym wywołanych przez ADV i EBV, należy wziąć pod uwagę, że opisany przeze mnie efekt może wynikać z niewychwyconej, lokalnej specyfiki występowania zakażeń wirusowych lub występowania replikacji wirusowych w konsekwencji zwiększonej immunosupresji po wystąpieniu aGVHD, mogącej być skutkiem wysokiej liczby limfocytów w materiale przeszczepowym.

7.9 Terapia z wykorzystaniem VST

Prowadzone badania miały na celu stworzenie podstaw teoretycznych i technicznych do terapii komórkowej z wykorzystaniem limfocytów VST. Praktycznymi ograniczeniami tej procedury jest konieczność spersonalizowania terapii ze względu na status reaktywności przeciwwirusowej i co najmniej częściową zgodność w antygenach HLA pomiędzy dawcą i biorcą VST. Długoterminowy efekt i trwałość limfocytów jest wciąż przedmiotem badań, jednak obecne dane wskazują na korzystny profil ryzyka. Ocena bezpieczeństwa VST wskazuje na bardzo dobry profil kliniczny z niskim ryzykiem choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi[52,99] .

Terapia komórkowa z użyciem VST, od pierwotnego dawcy HSCT lub od dawców zewnętrznych, wykazała skuteczność w leczeniu zakażeń CMV po HSCT[100–102]. W ciągu prawie 30 lat eksperymentów z transferem limfocytów T, 74% z 246 ocenianych pacjentów odpowiedziało na leczenie, w tym 85% odpowiedziało na transfer komórek T specyficznych dla CMV, 62% na komórki T specyficzne wobec EBV, a 74% na transfer komórek T specyficzny dla ADV[103].

Nawet niewielka liczba specyficznych limfocytów VST może ulec ekspansji i kontrolować infekcję[51,87–89]. W opisanym przeze mnie przypadku niska liczba

specyficznych limfocytów przeciw ADV uległa ekspansji, czemu towarzyszył spadek liczby kopii adenowirusa we krwi. Obserwacja ta potwierdza kluczową rolę komórek T w ochronie przeciwwirusowej[87].

Według doniesień T. Feuchtingera i zespołu, nawet pojedynczy limfocyt T swoisty wobec antygeny wirusa może ulegać ekspansji *in vivo*, a dodatkowo wydzielając cytokiny do otoczenia, może wpływać na inne składowe układu immunologicznego[53]. Tak niskie dawki, jak 360 komórek VST/kg masy ciała pacjenta, są wystarczające dla uzyskania efektu terapeutycznego.

Terapie komórkami VST mogą przyspieszyć odbudowę odporności na liczne infekcje wirusowe i grzybicze[104].

W badaniu Cobbold i wsp. obserwowano spadek wiremii u każdego z pacjentów poddanych terapii specyficznymi wobec CMV limfocytami CD8+, z tego 8 pacjentów wyleczono całkowicie[105].

Inna grupa pacjentów po HSCT, z objawowym zakażeniem CMV lub wiremią oporną na standardowe leczenie, poddana terapii VST specyficznymi względem CMV, uzyskała odpowiedź terapeutyczną u 83% biorców[53]. Korzystny efekt terapeutyczny odnotowano u dwóch przypadkach zapalenia mózgu wywołanego przez CMV, jednocześnie nie odnotowano objawów GvHD ani innych skutków ubocznych[53].

Fabrizio i współautorzy przedstawili retrospektywną analizę pacjentów otrzymujących VST w celu leczenia infekcji CMV i (lub) choroby po przeszczepie allogenicznym. Pacjenci z wyjściową niską liczbą komórek CD4 wykazywali wyższą odpowiedź na leczenie, poprawę całkowitego przeżycia i ochronę przed zgonem związanym z CMV[106]. Podawanie częściowo zgodnych w HLA, allogenicznych VST w EBV-PTLD doprowadziło po 6 miesiącach od wlewu do korzystnej odpowiedzi u 52% pacjentów[107,108].

Rubinstein i wsp. opisał 43 wlewy VST u 30 pacjentów leczonych z powodu adenowiremii i/lub choroby adenowirusowej. Siedmiu pacjentów otrzymało VST pochodzące od dawcy HSC, 21 pacjentów otrzymało VST od innego dawcy, a 2 otrzymało VST od obu źródeł dawców. Odpowiedzi kliniczne zaobserwowano u 81% pacjentów, a odpowiedź całkowitą u 58%[109].

K. Kallay i wsp. w grupie 9 pacjentów spełniających kryteria terapii swoistymi limfocytami T przeciwwirusowymi (CMV, EBV, ADV) potwierdzili skuteczność terapii VST z wykorzystaniem tej samej procedury, co w powyższej pracy[52]. U 8 pacjentów ustąpiły objawy zakażenia a u 7 pacjentów wiremia spadła poniżej poziomu

detekcji.

W badanej grupie tylko 1 pacjent zmarł z powodu zapalenia płuc wywołanego CMV. W późniejszym czasie obserwacji 2 pacjentów zmarło z powodu inwazyjnej aspergilozy, jednak choroba wirusowa uległa zahamowaniu lub ustąpiła. Nie odnotowano przypadków GvHD, odrzucenia, toksyczności lub nawracającej infekcji[52]. Autorzy pracy zwracają uwagę na zmniejszenie dawki steroidów do 1 mg/kg w przypadku, kiedy pacjent przyjmuje immunosupresję ze względu na GvHD. Wysokie dawki leków immunosupresyjnych obniżają skuteczność VST, ponieważ prowadzą do apoptozy podanych limfocytów[49,52,110].

Tzannou przedstawiła wyniki badania klinicznego II fazy z VST o specyficzności wielowirusowej przeciwko EBV, BKV, CMV, ADV i ludzkiemu herpeswirusowi 6 (HHV-6). VST podano 38 pacjentom z 45 zakażeniami. Pojedyncza infuzja spowodowała skumulowany wskaźnik całkowitej lub częściowej odpowiedzi wynoszący 92% (95% CI, 78,1% do 98,3%) oraz następujące wskaźniki według wirusa: 100% dla BKV (n = 16), 94% dla CMV (n = 17), 71% dla ADV (n = 7), 100% dla EBV (n = 2) i 67% dla HHV-6 (n = 3). Korzyść kliniczną osiągnięto u 31 pacjentów leczonych z powodu jednej infekcji i siedmiu pacjentów leczonych z powodu wielu infekcji[111]. Di Ciaccio i współpracownicy donieśli, że 53-letnia kobieta z przeszczepem z powodu nawrotowej białaczki, z ciężką chorobą przeszczep przeciwko gospodarzowi, otrzymała pięć infuzji limfocytów T od trzech różnych dawców, które ostatecznie wyeliminowały poważne ogólnoustrojowe zakażenia cytomegalowirusem i adenowirusem oraz chłoniaka wywołanego przez EBV[112].

W badaniu S. Naika częściowa lub całkowita odpowiedź przeciwko wirusom po podaniu VST nastąpiła u 81% pacjentów, mimo wcześniejszego niepowodzenia farmakoterapii przeciwwirusowej. Czas odpowiedzi wahał się od 2 tygodni do 3 miesięcy (w większości przypadków odpowiedź wystąpiła w ciągu pierwszego miesiąca), a całkowite przeżycie po terapii wynosiło 80%[49]. U 4 z 36 badanych pacjentów w ciągu 45 dni po infuzji VST, wystąpiły objawy GvHD, która odpowiedziała na leczenie. Autorzy wiążą wystąpienie GvHD z samą procedurą transplantacji HSC a nie z infuzją VST. Ostatnie doniesienia wskazują na skuteczność kliniczną nawet częściowo dopasowanych komórek VST o ile w aktywności przeciwwirusowej pośredniczy co najmniej jeden antygen MHC[49].

VST od dawcy utrzymują się tylko przejściowo, nie przekraczając 90 dni po wlewie[113]. Fakt ograniczonej żywotności VST ogranicza ich długotrwały efekt

przeciwważny, ale z drugiej strony podnosi bezpieczeństwo dla biorcy HSCT. Istnieją też doniesienia o dłuższym utrzymywaniu się limfocytów VST. Badanie komórek VST wykazało, że poza młodymi, naiwnymi limfocytami, komórkami pamięci centralnej, największy odsetek tej populacji tworzą komórki pamięci efektorowej. Obecność komórek efektorowych możliwa była do potwierdzenia u pacjentów po VST przez ponad 6 miesięcy po infuzji[53], choć istnieją dane potwierdzające obecność specyficznych komórek pamięci nawet 2 lata po infuzji[51].

Mimo licznych korzyści płynących z zastosowania VST, terapia nie została jeszcze wprowadzona do rutynowego zastosowania w warunkach klinicznych. Wykorzystanie urządzenia do wzbogacania komórek w obiegu zamkniętym, przy pełnej automatyzacji i w oparciu o technikę CCS, umożliwia szersze zastosowanie i daje szansę na rozpowszechnienie metody generowania specyficznych przeciwwirusowo limfocytów T[114].

Opracowanie metod pozbawionych etapu ekspansji lub wytworzenie uniwersalnych preparatów VST może pozwolić na szybką interwencję terapeutyczną i wczesne zastosowanie terapii komórkowej w szczególnie ciężkich przypadkach klinicznych, a w efekcie na zmniejszenie komplikacji i śmiertelności związanej z zakażeniami wirusowymi.

7.10 Podsumowanie

Zaobserwowany wpływ występowania VST na wyniki HSCT może stanowić argument na rzecz stosowania farmakoterapii lub terapii komórkowych po przeszczepieniu szpiku. Identyfikacja reaktywności wirusowej lub jej braku w materiale przeszczepowym co najmniej w przypadku CMV może zostać wykorzystana jako czynnik kwalifikujący do bardziej intensywnej profilaktyki farmakologicznej zakażeń wirusowych po przeszczepieniu szpiku.

8. Wnioski

1. Większość preparatów przeszczepowych od dawcy niespokrewnionego zawiera limfocyty reaktywne wobec antygenów wirusów CMV, ADV i EBV.
2. Obecne w materiale przeszczepowym limfocyty wykazujące reaktywność przeciwko CMV chronią biorcę przeszczepu przed replikacją tego wirusa.
3. Obecność limfocytów reaktywnych wobec patogenów wirusowych w produkcie komórkowym nie oznacza potencjału do ochrony przeciwzakaźnej u biorcy przeszczepu.
4. 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.

9. Streszczenie

Wstęp

Allogeniczne przeszczepienie hematopoetycznych komórek macierzystych (HSCT) jest metodą skutecznego leczenia wielu schorzeń hematologicznych i hematoonkologicznych. 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 uwzględniać 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 wpływających 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 próbki izolowano mononukleary metodą wirowania w gradiencie ciężkości. Wyizolowane mononukleary stymulowano mieszaniną syntetycznych oligopeptydów odpowiadających sekwencji antygenów odpowiednich wirusów, a następnie za pomocą cytofluorymetrii przepływowej

identyfikowano 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 replikacji 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 poprzszczepowym 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.

10. Abstract

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.

11. Spis tabel

Tabela 1. Wskazania do przeprowadzenia przeszczepienia hematopoetycznych komórek macierzystych.....	11
Tabela 2. Stopień nasilenia (stage) objawów ze strony poszczególnych narządów w ostrej GvHD u dzieci	20
Tabela 3. Ocena całkowita (grade) ostrej postaci GvHD w oparciu o 4-stopniową skalę (stage) zajęcia poszczególnych narządów	21
Tabela 4. Zestawienie odsetka śmiertelności i powikłań związanych z infekcjami po przeszczepieniu hematopoetycznych komórek macierzystych oraz zapadalność na choroby wirusowe.	22
Tabela 5. Charakterystyka CMV, ADV i EBV oraz objawy infekcji oportunistycznych po HSCT.....	26
Tabela 6. Charakterystyka grupy badanej.	30
Tabela 7. Spis użytych przeciwciał z fluorochromami	34
Tabela 8. Zestawienie liczby komórek/ul poszczególnych subpopulacji limfocytów w 14, 30, 60 i 90 dniu po HSCT.....	41
Tabela 10. Częstość powikłań po HSCT w zależności od rodzaju pierwotnego rozpoznania.....	44
Tabela 11. Występowanie powikłań (GvHD i infekcje wirusowe) po HSCT w grupie badanej w zależności od zastosowanego rodzaju kondycjonowania MAC/RIC/NMA.	48
Tabela 12. Zestawienie odbudowy limfocytarnej w 30, 60 i 90 dniu po HSCT dla protokołu kondycjonowania MAC.	48
Tabela 13. Zestawienie odbudowy limfocytarnej w 30, 60 i 90 dniu po HSCT dla protokołu kondycjonowania RIC.	49
Tabela 14. Zestawienie odbudowy limfocytarnej w 30, 60 i 90 dniu po HSCT dla protokołu kondycjonowania NMA.....	49
Tabela 17. Prawdopodobieństwo wystąpienia replikacji CMV/ADV/EBV w zależności od reaktywności limfocytów wobec antygenów danego wirusa (CMV/ADV/EBV).....	69
Tabela 19. Zestawienie liczby komórek VST CD4+ i CD8+ reaktywnych względem CMV/ADV/EBV podanych biorecy w przeliczeniu na kg masy jego ciała.	70

12. Spis rycin

Rycina 1. Wyodrębnienie populacji limfocytów T na podstawie morfologii komórek i odrzucenie komórek CD14+ oraz CD20+.....	35
Rycina 2. Identyfikacja populacji CD3+ wydzielającej INF- γ oraz podział na subpopulacje CD3+CD4+ / CD3+CD8+.....	36
Rycina 3. Ocena wydzielania INF- γ wśród limfocytów CD3+CD4+ / CD3+CD8+	36
Rycina 4. Obraz kontroli rozkładu ilościowego i jakościowego subpopulacji limfocytów.....	37
Rycina 5. Przebieg odnowy limfocytarnej poszczególnych subpopulacji limfocytów w badanej grupie pacjentów od 14-21 dnia od przeszczepienia do 90 dnia po HSCT.	40
Rycina 7. Mediana wieku w grupie z aGVHD i bez aGVHD.	43
Rycina 8. Liczba limfocytów CD3+CD4+ w 90 dobie po HSCT w zależności od pierwotnego rozpoznania.....	45
Rycina 9. Liczba limfocytów B (CD19+ kom/ μ l) w zależności od źródła pochodzenia hematopoetycznych komórek macierzystych (szpik kostny - BM vs komórki macierzyste krwi obwodowej - PBSC) w badanej grupie pacjentów do 90 dnia po HSCT.....	46
Rycina 10. Częstość występowania replikacji wirusowych (CMV, ADV, EBV) w osoczu i w moczu pacjentów w zależności od źródła pochodzenia HSC (PBSC vs BM).	47
Rycina 11. Liczba limfocytów CD3+CD4+ na mikrolitr w dobie 60 po HSCT w zależności od zastosowanego protokołu kondycjonowania ($p=0,001$). Wyniki istotne statystycznie ($p<0.05$) oznaczono gwiazdką „*”.....	50
Rycina 12. Liczba limfocytów CD3+CD4+ na mikrolitr w dobie 90 po HSCT w zależności od zastosowanego protokołu kondycjonowania ($p=0,006$). Wyniki istotne statystycznie ($p<0.05$) oznaczono gwiazdką „*”.....	51
Rycina 13. Liczba limfocytów CD19+ na mikrolitr w dobie 60 po HSCT w zależności od zastosowanego protokołu kondycjonowania ($p=0,009$). Wyniki istotne statystycznie ($p<0.05$) oznaczono gwiazdką „*”.....	51
Rycina 15. Częstość aGvHD w badanej grupie pacjentów poddanych kondycjonowaniu MAC/RIC/NMA ($p=0,048$). Wyniki istotne statystycznie ($p<0.05$) oznaczono gwiazdką „*”.....	53

Rycina 16. Częstość występowania replikacji wirusowych (CMV, ADV, EBV) w osoczu i w moczu pacjentów w zależności od protokołu kondycjonowania (MAC, RIC, NMA), ($p < 0,05$).....	54
Rycina 17. Liczba limfocytów B (CD19+) w 90 dniu po HSCT w zależności od zastosowanej seroterapii (Grafalon vs Thymoglobulina).....	56
Rycina 18. Liczba komórek NK w zależności od rodzaju terapii limfodeplecyjnej (ATG/PTCy/brak terapii) ($p < 0,050$).	57
Rycina 19. Liczba limfocytów CD19+ w zależności od od rodzaju terapii limfodeplecyjnej (ATG/PTCy/brak terapii) ($p < 0,050$).	57
Rycina 20. Częstość występowania replikacji wirusowych (CMV, ADV, EBV) w osoczu i w moczu pacjentów w zależności od terapii limfodeplecyjnej (Grafalon vs Thymoglobulina).	58
Rycina 21. Zależność między liczbą przeszczepionych limfocytów na kg masy ciała biorcy, a wystąpieniem aGvHD.	59
Rycina 22. Częstość występowania replikacji wirusowych (CMV, ADV, EBV) w osoczu i w moczu pacjentów zestawiona z wystąpieniem aGvHD.....	61
Rycina 23. Częstość występowania replikacji wirusowych (CMV, ADV, EBV) w osoczu i w moczu pacjentów zestawiona z wystąpieniem cGvHD. Statystycznie istotna były zależności zapadalności na CMV i późniejszego wystąpienia cGvHD ($p = 0,029$) oraz pojawienia się infekcji adenowirusem i ryzykiem rozwinięcia cGvHD ($p = 0,017$). Wyniki istotne statystycznie ($p < 0,05$) oznaczono gwiazdką „*”.....	62
Rycina 24. Odsetek wystąpienia replikacji wirusa CMV w zależności od zgodności statusu serologicznego dawcy i w CMV IgG ($p = 0,007$).	63
Rycina 25. Zależność między liczbą całkowitą podanych limfocytów a wystąpieniem replikacji EBV.	64
Rycina 26. Diagram Venna prezentujący współwystępowanie limfocytów przeciwwirusowych w materiale przeszczepowym od poszczególnych dawców.....	66
Rycina 27. Zależność obecności komórek VST i ryzyka wystąpienia aGvHD w badanej grupie pacjentów.....	68
Rycina 28. Zależność obecności komórek VST i ryzyka wystąpienia cGvHD.....	68
Rycina 29. Liczba limfocytów VST CD3+CD8+ (komórki/kg masy ciała) o reaktywności przeciw CMV w materiale przeszczepowym a występowanie replikacji CMV po przeszczepieniu ($p = 0,049$).....	71

Rycina 30. Liczba limfocytów VST CD3+CD4+ (komórki/kg masy ciała) o reaktywności przeciw ADV w materiale przeszczepowym a występowanie replikacji ADV po przeszczepieniu (p=0,018).....	72
Rycina 31. Liczba limfocytów VST CD3+CD4+ (komórki/kg masy ciała) o reaktywności przeciw EBV w materiale przeszczepowym a występowanie replikacji EBV po przeszczepieniu (p=0,006).....	72
Rycina 32. Odsetek limfocytów VST o reaktywności przeciwko CMV w materiale przeszczepowym a występowanie replikacji CMV po przeszczepie	73
Rycina 33. Odsetek limfocytów VST CD3+CD8+ o reaktywności przeciwko CMV w materiale przeszczepowym a występowanie replikacji CMV po przeszczepie (p=0,046).	74
Rycina 34. Odsetek limfocytów VST CD3+CD4+ o reaktywności przeciwko ADV w materiale przeszczepowym a występowanie replikacji ADV po przeszczepie (p=0,019).	74
Rycina 35. Odsetek limfocytów VST CD3+CD8+ o reaktywności przeciwko ADV w materiale przeszczepowym a występowanie replikacji ADV po przeszczepie (p=0,039).	75
Rycina 36. Odsetek limfocytów VST CD3+CD4+ o reaktywności przeciwko EBV w materiale przeszczepowym a występowanie replikacji EBV po przeszczepie (p=0,022).	75
Rycina 37. Odsetek limfocytów VST CD3+CD8+ o reaktywności przeciwko EBV w materiale przeszczepowym a występowanie replikacji EBV po przeszczepie.....	76
Rycina 38 A. Wartości replikacji ADV w osoczu i moczu w kolejnych dniach po przeszczepieniu szpiku. B.	78
Rycina 39. Prezentacja liczby kopii ADV w osoczu i liczby limfocytów T u pacjenta.	79

13. Bibliografia

1. Hierlmeier S, Eyrich M, Wöfl M, et al. Early and late complications following hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients - A retrospective analysis over 11 years. *PLoS One* 2018;13:1–16.
2. Gorin NC. Bone marrow harvesting for HSCT. In: *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Springer International Publishing; 2018. page 109–15.
3. Peters C, Locatelli F, Bader P. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children and Adolescents. 2019;539–45.
4. Gibson BES, Sauer MG, Amrolia P. Acute myeloid leukemia in children [Internet]. In: *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Springer International Publishing; 2018. page 523–30.
5. Duarte RF, Labopin M, Bader P, et al. Indications for haematopoietic stem cell transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2019. *Bone Marrow Transplant*. 2019;54:1525–52.
6. Snowden JA, Styczyński J, Snarski E, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in autoimmune diseases: update from EBMT Autoimmune Diseases Working Party with special reference to Poland. *Acta Haematol. Pol*. 2021;52:217–24.
7. Witt V, Peters C. Collection of HSC in children. In: *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Springer International Publishing; 2018. page 123–6.
8. Riccardi F, Castagnola E. General management of the patient: Specific aspects of children. In: *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Springer International Publishing; 2018. page 197–205.
9. Castillo N, García-Cadenas I, Barba P, et al. Early and Long-Term Impaired T Lymphocyte Immune Reconstitution after Cord Blood Transplantation with Antithymocyte Globulin. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2017;23:491–7.
10. Laberko A, Bogoyavlenskaya A, Shelikhova L, et al. Risk Factors for and the Clinical Impact of Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus Infections in Pediatric Recipients of TCR- α/β - and CD19-Depleted Grafts. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2017;23:483–90.
11. de Koning C, Plantinga M, Besseling P, et al. Immune Reconstitution after

- Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in Children. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2016;22:195–206.
12. Airoidi I, Bertaina A, Prigione I, et al. $\gamma\delta$ T-cell reconstitution after HLA-haploidentical hematopoietic transplantation depleted of TCR- $\alpha\beta$ + / CD19+ lymphocytes. *Blood* 2015;125:2349–58.
 13. Bader P. Documentation of engraftment and chimerism after HSCT [Internet]. In: *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies.* Springer International Publishing; 2018. page 143–7.
 14. Tian DM, Wang Y, Zhang XH, et al. Rapid recovery of CD3+CD8+ T cells on day 90 predicts superior survival after unmanipulated haploidentical blood and marrow transplantation. *PLoS One* 2016;11:1–17.
 15. Huenecke S, Cappel C, Esser R, et al. Development of three different NK cell subpopulations during immune reconstitution after pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Prognostic markers in GvHD and viral infections. *Front. Immunol.* 2017;8:1–10.
 16. Yu XX, Han TT, Xu LL, et al. Effect of the in vivo application of granulocyte colony-stimulating factor on NK cells in bone marrow and peripheral blood. *J. Cell. Mol. Med.* 2018;22:3025–34.
 17. Goldberg JD, Zheng J, Ratan R, et al. *HHS Public Access.* 2018;58:1859–71.
 18. Hoare RL, Veys P, Klein N, et al. Predicting CD4 T-Cell Reconstitution Following Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2017;102:349–57.
 19. Matsumura-Kimoto Y, Inamoto Y, Tajima K, et al. Association of Cumulative Steroid Dose with Risk of Infection after Treatment for Severe Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2016;22:1102–7.
 20. Törlén J, Ringdén O, Garming-Legert K, et al. A prospective randomized trial comparing cyclosporine/methotrexate and tacrolimus/sirolimus as graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2016;101:1417–25.
 21. Li Q, Rane L, Poiret T, et al. Both high and low levels of cellular Epstein-Barr virus DNA in blood identify failure after hematologic stem cell transplantation in conjunction with acute GVHD and type of conditioning. *Oncotarget* [Internet] 2016;7:30230–40.
 22. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, et al. National Institutes of Health

- Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2005;11:945–56.
23. Chapter 13 - Graft-versus-host disease. ESH eLearning. and Tamas Masszi J. Apr 1 2012; 165677.
 24. Molina B, Gonzalez Vicent M, Herrero B, et al. Kinetics and Risk Factors of Relapse after Allogeneic Stem Cell Transplantation in Children with Leukemia: A Long-Term Follow-Up Single-Center Study. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2019;25:100–6.
 25. Mo X, Wang Y, Zhang X, et al. Interferon- α Is Effective for Treatment of Minimal Residual Disease in Patients with t(8;21) Acute Myeloid Leukemia After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Results of a Prospective Registry Study. *Oncologist* 2018;23:1349–57.
 26. Czyżewski K, Styczyński J, Giebel S, et al. Age-dependent determinants of infectious complications profile in children and adults after hematopoietic cell transplantation: lesson from the nationwide study. *Ann. Hematol.* 2019;98:2197–211.
 27. Czyżewski K, Dziedzic M, Salamonowicz M, et al. Epidemiology, outcome and risk factors analysis of viral infections in children and adolescents undergoing hematopoietic cell transplantation: Antiviral drugs do not prevent Epstein-Barr virus reactivation. *Infect. Drug Resist.* 2019;12:3893–902.
 28. Jarvis MA, Nelson JA. Mechanisms of human cytomegalovirus persistence and latency. *Front. Biosci.* 2002;7.
 29. Rowe RG, Guo D, Lee M, et al. Cytomegalovirus Infection in Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Risk Factors for Primary Infection and Cases of Recurrent and Late Infection at a Single Center. *Biol. Blood Marrow Transplant.* [Internet] 2016;22:1275–83.
 30. Pukownik E, Kubicka M, Kurylo-Rafinska B, et al. Impact of CMV and EBV on Immune Recovery After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in Children. *Anticancer Res.* 2018;38:6009–13.
 31. Al Hamed R, Bazarbachi AH, Mohty M. Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disease (EBV-PTLD) in the setting of allogeneic stem cell transplantation: a comprehensive review from pathogenesis to forthcoming treatment modalities. *Bone Marrow Transplant.* 2020;55:25–39.

32. Cho SY, Lee DG, Kim HJ. Cytomegalovirus Infections after Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Current Status and Future Immunotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20.
33. Rustia E, Violago L, Jin Z, et al. Risk Factors and Utility of a Risk-Based Algorithm for Monitoring Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, and Adenovirus Infections in Pediatric Recipients after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2016;22:1646–53.
34. Lion T. Adenovirus persistence, reactivation, and clinical management. *FEBS Lett.* 2019;593:3571–82.
35. Lee YJ, Prockop SE, Papanicolaou GA. Approach to adenovirus infections in the setting of hematopoietic cell transplantation. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2017;30:377–87.
36. Sedláček P, Petterson T, Robin M, et al. Incidence of Adenovirus Infection in Hematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients: Findings from the AdVance Study. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2019;25:810–8.
37. Kosulin K, Berkowitsch B, Matthes S, et al. Intestinal Adenovirus Shedding Before Allogeneic Stem Cell Transplantation Is a Risk Factor for Invasive Infection Post-transplant. *EBioMedicine* 2018;28:114–9.
38. Bergelson JM, Krithivas A, Celi L, et al. The Murine CAR Homolog Is a Receptor for Coxsackie B Viruses and Adenoviruses. *J. Virol.* 1998;72:415–9.
39. Khanal S, Ghimire P, Dhamoon AS. The Repertoire of Adenovirus in Human Disease: The Innocuous to the Deadly. *Biomedicines* 2018;6.
40. Kimura H, Fujiwara S. Overview of EBV-associated T/NK-cell lymphoproliferative diseases. *Front. Pediatr.* 2019;6:1–5.
41. CM B, JI C. How I treat T-cell chronic active Epstein-Barr virus disease. *Blood* 2018;131:2899–905.
42. Xu LP, Zhang CL, Mo XD, et al. Epstein-Barr Virus-Related Post-Transplantation Lymphoproliferative Disorder after Unmanipulated Human Leukocyte Antigen Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Incidence, Risk Factors, Treatment, and Clinical Outcomes. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2015;21:2185–91.
43. Zhou L, Lu DP. Immune reconstitution of HLA-A*0201/BMLF1- and HLA-A*1101/LMP2-specific Epstein Barr virus cytotoxic T lymphocytes within 90 days after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Virol. J.*

- 2019;16:1–11.
44. Szmit Z, Kalwak A 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;28:1185–92.
 45. McLaughlin LP, Rouse R, Gottschalk S, et al. EBV/LMP-specific T cells maintain remissions of T- and B-cell EBV lymphomas after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2018;132:2351–61.
 46. Withers B, Blyth E, Clancy LE, et al. Long-term control of recurrent or refractory viral infections after allogeneic HSCT with third-party virus-specific T cells. *Blood Adv.* 2017;1:2193–205.
 47. Kim N, Nam Y-S, Im K-I, et al. Robust Production of Cytomegalovirus pp65-Specific T Cells Using a Fully Automated IFN-Cytokine Capture System. *Transfus Med Hemother* 2018;45:13–22.
 48. Yan CH, Liu Q fa, Wu D pei, et al. Prophylactic Donor Lymphocyte Infusion (DLI) Followed by Minimal Residual Disease and Graft-versus-Host Disease–Guided Multiple DLIs Could Improve Outcomes after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Patients with Refractory/Relapsed Acute. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2017;23:1311–9.
 49. Naik S, Nicholas SK, Martinez CA, et al. Adoptive immunotherapy for primary immunodeficiency disorders with virus-specific T lymphocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2016;137:1498-1505.e1.
 50. Bunos M, Hümmer C, Wingefeld E, et al. Automated isolation of primary antigen-specific T cells from donor lymphocyte concentrates: results of a feasibility exercise. *Vox Sang.* 2015;109:387–93.
 51. Koehne G, Hasan A, Doubrovina E, et al. Immunotherapy with Donor T Cells Sensitized with Overlapping Pentadecapeptides for Treatment of Persistent Cytomegalovirus Infection or Viremia. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2015;21:1663–78.
 52. Kállay K, Kassa C, Réti M, et al. Early Experience With CliniMACS Prodigy CCS (IFN-gamma) System in Selection of Virus-specific T Cells From Third-party Donors for Pediatric Patients With Severe Viral Infections After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J. Immunother.* 2018;41:158–63.
 53. Feuchtinger T, Opherk K, Bethge WA, et al. Adoptive transfer of pp65-specific T

- cells for the treatment of chemorefractory cytomegalovirus disease or reactivation after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood* 2010;116:4360–7.
54. Baumeister SHC, Rambaldi B, Shapiro RM, et al. Key Aspects of the Immunobiology of Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation. *Front. Immunol.* 2020;11.
 55. Heimall J, Puck J, Buckley R, et al. Current Knowledge and Priorities for Future Research in Late Effects after Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HCT) for Severe Combined Immunodeficiency Patients: A Consensus Statement from the Second Pediatric Blood and Marrow Transplant Consortium . *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2017;23:379–87.
 56. Baron F, Nagler A. Novel strategies for improving hematopoietic reconstruction after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation or intensive chemotherapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2017;17:163–74.
 57. Scarisbrick JJ, Dignan FL, Tulpule S, et al. A multicentre UK study of GVHD following DLI: Rates of GVHD are high but mortality from GVHD is infrequent. *Bone Marrow Transplant.* 2015 501 2014;50:62–7.
 58. Baron F, Nagler A. Novel strategies for improving hematopoietic reconstruction after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation or intensive chemotherapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2017;17:163–74.
 59. Li Q, Luo J, Zhang Z, et al. G-CSF-Mobilized Blood and Bone Marrow Grafts as the Source of Stem Cells for HLA-Identical Sibling Transplantation in Patients with Thalassemia Major. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2019;25:2040–4.
 60. Fujimoto A, Hiramoto N, Yamasaki S, et al. Risk Factors and Predictive Scoring System For Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* [Internet] 2019;25:1441–9.
 61. Mo XD, Zhao XY, Liu DH, et al. Umbilical cord blood transplantation and unmanipulated haploidentical hematopoietic SCT for pediatric hematologic malignances. *Bone Marrow Transplant.* 2014 498 2014;49:1070–5.
 62. Robin M, Ruggeri A, Labopin M, et al. Comparison of Unrelated Cord Blood and Peripheral Blood Stem Cell Transplantation in Adults with Myelodysplastic Syndrome after Reduced-Intensity Conditioning Regimen: A Collaborative Study from Eurocord (Cord blood Committee of Cellular Therapy & Immunobiology

- Working Party of EBMT) and Chronic Malignancies Working Party. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2015;21:489–95.
63. Farhadfar N, Hogan WJ. Overview of the progress on haploidentical hematopoietic transplantation. *World J. Transplant.* 2016;6:665.
 64. Wu JL, Ma HY, Lu CY, et al. Risk factors and outcomes of cytomegalovirus viremia in pediatric hematopoietic stem cell transplantation patients. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2017;50:307–13.
 65. Goldberg JD, Zheng J, Ratan R, et al. Early recovery of T cell function predicts improved survival after T-cell depleted allogeneic transplant HHS Public Access. *Leuk Lymphoma [Internet]* 2017;58:1859–71.
 66. Goldberg JD, Zheng J, Ratan R, et al. Early recovery of T-cell function predicts improved survival after T-cell depleted allogeneic transplant. *Leuk. Lymphoma* 2017;58:1859–71.
 67. Savani BN, Mielke S, Rezvani K, et al. Absolute lymphocyte count on day 30 is a surrogate for robust hematopoietic recovery and strongly predicts outcome after T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2007;13:1216–23.
 68. Kim DH, Kim JG, Sohn SK, et al. Clinical impact of early absolute lymphocyte count after allogeneic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* 2004;125:217–24.
 69. Chakrabarti S, Brown J, Guttridge M, et al. Early lymphocyte recovery is an important determinant of outcome following allogeneic transplantation with CD34+ selected graft and limited T-cell addback. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32:23–30.
 70. Oltolini C, Greco R, Galli L, et al. Infections after Allogeneic Transplant with Post-Transplant Cyclophosphamide: Impact of Donor HLA Matching. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2020;26:1179–88.
 71. Slade M, Goldsmith S, Rizwan R, et al. Epidemiology of infections following haploidentical peripheral blood hematopoietic cell transplantation. *Transpl. Infect. Dis.* 2017;19.
 72. Irene GC, Albert E, Anna BV, et al. Patterns of infection and infectious-related mortality in patients receiving post-transplant high dose cyclophosphamide as graft-versus-host-disease prophylaxis: impact of HLA donor matching. *Bone Marrow Transplant.* 2021;56:818–27.

73. Admiraal R, Nierkens S, de Witte MA, et al. Association between anti-thymocyte globulin exposure and survival outcomes in adult unrelated haemopoietic cell transplantation: a multicentre, retrospective, pharmacodynamic cohort analysis. *Lancet. Haematol.* 2017;4:e183–91.
74. Admiraal R, van Kesteren C, Jol-van der Zijde CM, et al. Population pharmacokinetic modeling of Thymoglobulin(®) in children receiving allogeneic-hematopoietic cell transplantation: towards improved survival through individualized dosing. *Clin. Pharmacokinet.* 2015;54:435–46.
75. Vogelsang V, Kruchen A, Wustrau K, et al. Influence of anti-thymocyte globulin plasma levels on outcome parameters in stem cell transplanted children. *Int. Immunopharmacol.* 2020;83.
76. Liu J, Xu L-P, Bian Z, et al. Differential impact of two doses of antithymocyte globulin conditioning on lymphocyte recovery upon haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *J. Transl. Med.* 2015;13:391.
77. Lin R, Wang Y, Huang F, et al. Two dose levels of rabbit antithymocyte globulin as graft-versus-host disease prophylaxis in haploidentical stem cell transplantation: A multicenter randomized study. *BMC Med.* 2019;17.
78. Zhou X, Lu X, Yan L, et al. [Optimization of ATG dose in haploid hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2020;41:557–63.
79. Hiwarkar P, Gaspar HB, Gilmour K, et al. Impact of viral reactivations in the era of pre-emptive antiviral drug therapy following allogeneic haematopoietic SCT in paediatric recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2013;48:803–8.
80. Adkins DR, DiPersio JF. Total body irradiation before an allogeneic stem cell transplantation: Is there a magic dose?. *Curr. Opin. Hematol.* 2008;15:555–60.
81. Huang YT, Kim SJ, Lee YJ, et al. Co-Infections by Double-Stranded DNA Viruses after Ex Vivo T Cell-Depleted, CD34 + Selected Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2017;23:1759–66.
82. Mynarek M, Ganzenmueller T, Mueller-Heine A, et al. Patient, Virus, and Treatment-Related Risk Factors in Pediatric Adenovirus Infection after Stem Cell Transplantation: Results of a Routine Monitoring Program. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2014;20:250–6.
83. Hiwarkar P, Kosulin K, Cesaro S, et al. Management of adenovirus infection in patients after haematopoietic stem cell transplantation: State-of-the-art and real-

- life current approach. *Rev. Med. Virol.* 2018;28:e1980.
84. Kosulin K, Pichler H, Lawitschka A, et al. Diagnostic parameters of adenoviremia in pediatric stem cell transplant recipients. *Front. Microbiol.* 2019;10:1–9.
 85. Feghoul L, Chevret S, Cuinet A, et al. Adenovirus infection and disease in paediatric haematopoietic stem cell transplant patients: Clues for antiviral preemptive treatment. *Clin. Microbiol. Infect.* 2015;21:701–9.
 86. Yilmaz M, Chemaly RF, Han XY, et al. Adenoviral infections in adult allogeneic hematopoietic SCT recipients: a single center experience. *Bone Marrow Transplant.* 2013 489 2013;48:1218–23.
 87. Keib A, Mei Y-F, Cicin-Sain L, et al. Measuring Antiviral Capacity of T Cell Responses to Adenovirus. *J. Immunol.* 2019;202:618–24.
 88. Feuchtinger T, Matthes-Martin S, Richard C, et al. Safe adoptive transfer of virus-specific T-cell immunity for the treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* 2006;134:64–76.
 89. Feucht J, Opherk K, Lang P, et al. Adoptive T-cell therapy with hexon-specific Th1 cells as a treatment of refractory adenovirus infection after HSCT. *Blood* 2015;125:1986–94.
 90. George B, Pati N, Gilroy N, et al. Pre-transplant cytomegalovirus (CMV) serostatus remains the most important determinant of CMV reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the era of surveillance and preemptive therapy. *Transpl. Infect. Dis.* 2010;12:322–9.
 91. Ljungman P, Hakki M, Boeckh M. Cytomegalovirus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2011;25:151–69.
 92. Ramanathan M, Teira P, Battiwalla M, et al. Impact of Early Cytomegalovirus Reactivation in Cord Blood Stem Cell Recipients in the Current Era. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51:1113.
 93. Cesaro S, Crocchiolo R, Tridello G, et al. Comparable survival using a CMV-matched or a mismatched donor for CMV+ patients undergoing T-replete haplo-HSCT with PT-Cy for acute leukemia: A study of behalf of the infectious diseases and acute leukemia working parties of the EBMT. *Bone Marrow Transplant.* 2018;53:422–30.
 94. Kröger N, Zabelina T, Krüger W, et al. Patient cytomegalovirus seropositivity with or without reactivation is the most important prognostic factor for survival

- and treatment-related mortality in stem cell transplantation from unrelated donors using pretransplant in vivo T-cell depletion with anti-thymocyte globulin. *Br. J. Haematol.* 2001;113:1060–71.
95. Ljungman P, Brand R, Hoek J, et al. Donor cytomegalovirus status influences the outcome of allogeneic stem cell transplant: a study by the European group for blood and marrow transplantation. *Clin. Infect. Dis.* 2014;59:473–81.
 96. Samuel ER, Newton K, MacKinnon S, et al. Successful isolation and expansion of CMV-reactive T cells from G-CSF mobilized donors that retain a strong cytotoxic effector function. *Br. J. Haematol.* 2013;160:87–100.
 97. Wagner-Drouet E, Teschner D, Wolschke C, et al. Comparison of Cytomegalovirus-Specific Immune Cell Response to Proteins versus Peptides Using an IFN- γ ELISpot Assay after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Diagnostics* 2021, Vol. 11, Page 312 2021;11:312.
 98. Gliga S, Fiedler M, Dornieden T, et al. Comparison of Three Cellular Assays to Predict the Course of CMV Infection in Liver Transplant Recipients. *Vaccines* 2021, Vol. 9, Page 88 2021;9:88.
 99. Abraham AA, John TD, Keller MD, et al. Safety and feasibility of virus-specific T cells derived from umbilical cord blood in cord blood transplant recipients. *Blood Adv.* 2019;3:2057–68.
 100. Gerdemann U, Katari UL, Papadopoulou A, et al. Safety and clinical efficacy of rapidly-generated trivirus-directed T cells as treatment for adenovirus, EBV, and CMV infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Mol. Ther.* 2013;21:2113–21.
 101. Papadopoulou A, Gerdemann U, Katari UL, et al. Activity of broad-spectrum T cells as treatment for AdV, EBV, CMV, BKV, and HHV6 infections after HSCT. *Sci. Transl. Med.* 2014;6.
 102. O'Reilly RJ, Koehne G, Hasan AN, et al. T-cell depleted allogeneic hematopoietic cell transplants as a platform for adoptive therapy with leukemia selective or virus-specific T-cells. *Bone Marrow Transplant.* 2015;50:S43–50.
 103. Kaeuferle T, Krauss R, Blaesche F, et al. Strategies of adoptive T -cell transfer to treat refractory viral infections post allogeneic stem cell transplantation. *J. Hematol. Oncol.* 2019;12:1–10.
 104. Gottlieb DJ, Clancy LE, Withers B, et al. Prophylactic antigen-specific T-cells targeting seven viral and fungal pathogens after allogeneic haemopoietic stem

- cell transplant. *Clin. Transl. Immunol.* 2021;10.
105. Cobbold M, Khan N , Pourgheysari B, et al. Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J. Exp. Med.* 2005;202:379–86.
 106. Fabrizio VA, Irene Rodriguez-Sanchez M, Mauguen A, et al. Adoptive therapy with CMV-specific cytotoxic T lymphocytes depends on baseline CD4+ immunity to mediate durable responses. *Blood Adv.* 2021;5:496–503.
 107. Haque T, Wilkie GM, Taylor C, et al. Treatment of Epstein-Barr-virus-positive post-transplantation lymphoproliferative disease with partly HLA-matched allogeneic cytotoxic T cells. *Lancet (London, England)* 2002;360:436–42.
 108. Haque T, Wilkie GM, Jones MM, et al. Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial. *Blood* 2007;110:1123–31.
 109. Rubinstein JD, Zhu X, Leemhuis T, et al. Virus-specific T cells for adenovirus infection after stem cell transplantation are highly effective and class II HLA restricted. *Blood Adv.* 2021;5:3309–21.
 110. Pelák O, Stuchlý J, Król L, et al. Appearance of cytomegalovirus-specific T-cells predicts fast resolution of viremia post hematopoietic stem cell transplantation. *Cytometry B. Clin. Cytom.* [Internet] 2017;92:380–8.
 111. Tzannou I, Papadopoulou A, Naik S, et al. Off-the-Shelf Virus-Specific T Cells to Treat BK Virus, Human Herpesvirus 6, Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, and Adenovirus Infections After Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *J. Clin. Oncol.* 2017;35:3547–57.
 112. Di Ciaccio PR, Avdic S, Sutrave G, et al. Successful treatment of CMV, EBV, and adenovirus tissue infection following HLA-mismatched allogeneic stem cell transplant using infusion of third-party T cells from multiple donors in addition to antivirals, rituximab, and surgery. *Transpl. Infect. Dis.* 2021;23.
 113. O'Reilly RJ, Prockop S, Hasan AN, et al. Virus-specific T-cell banks for “off the shelf” adoptive therapy of refractory infections. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51:1163–72.
 114. Kumaresan P, Figliola M, Moyes JS, et al. Automated cell enrichment of cytomegalovirus-specific T cells for clinical applications using the cytokine-capture system. *J. Vis. Exp.* 2015;2015.