

# STRESZCZENIE

## Analiza rekonstytucji immunologicznej u dzieci po allogenicznej transplantacji komórek hematopoetycznych z uwzględnieniem licznych czynników ją modyfikujących

### WSTĘP

**Znaczenie odnowy immunologicznej.** Allogeniczna transplantacja krwiotwórczych komórek macierzystych (*allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*, allo-HSCT) jest uznaną metodą leczenia wielu chorób nowotworowych i nienowotworowych. Po zabiegu następuje okres głębokiej limfopenii i niedoboru odporności będący konsekwencją ablacji układu immunologicznego za pomocą kondycjonowania przed przeszczepieniem oraz terapii immunosupresyjnej po allo-HSCT. Funkcje układu immunologicznego są głęboko upośledzone przez wiele miesięcy po transplantacji co jest związane ze zwiększonym ryzykiem zakażeń oportunistycznych, w tym reaktywacji wirusowych i wystąpienia choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (*graft versus host disease*, GvHD). Głównymi przyczynami chorobowości i umieralności pacjentów po HSCT są: nawrót choroby podstawowej, GvHD oraz zakażenia bakteryjne wirusowe i grzybicze [1].

**Czynniki modyfikujące odnowę immunologiczną.** Czas trwania pełnej odnowy immunologicznej układu krwiotwórczego po allo-HSCT różni się między pacjentami a na jego tempo i jakość mają wpływ różne czynniki zewnętrzne i wewnętrzne. Najbardziej znaczącymi determinantami wczesnej rekonstytucji układu odpornościowego opisanymi w literaturze są: liczba przeszczepionych komórek macierzystych (CD34+) i limfocytów T (CD3+), wiek pacjenta, status CMV dawcy i biorcy, rodzaj przeszczepienia, protokół kondycjonowania oraz rodzaj profilaktyki GvHD [2, 3, 4]. Właściwa funkcja limfocytów T ma kluczowe znaczenie w warunkowaniu wyniku HSCT, a sprawna limfopoeza w grasicy (tymopoeza) jest niezwykle istotna w procesie odtworzenia pełnej funkcji układu odpornościowego [5, 6].

**Przebieg odnowy immunologicznej.** Rekonstytucja immunologiczna rozpoczyna się zwykle od pojawiających się w krwiobiegu granulocytów, monocytów, makrofagów i limfocytów NK. Następnie zaczynają być produkowane subpopulacje limfocytów T, a na końcu limfocyty B. Komórki T mogą być generowane dwiema różnymi drogami: szlak niezależny od grasicy przeważa we wczesnym okresie po transplantacji, podczas gdy aktywna tymopoeza (szlak zależny od grasicy) uzyskuje przewagę w późniejszym okresie po przeszczepie i prowadzi do odtworzenia czynnościowo kompetentnego, w pełni dojrzałego

kompartymencie naiwnych limfocytów T o szerokiej specyficzności antygenowej [7, 8]. W ścieżce niezależnej od grasicy następuje transfer dojrzałych, pochodzących od dawcy limfocytów T w materiale przeszczepowym, które następnie ulegają ekspansji obwodowej i szybko reagują na uprzednio napotkane patogeny, chroniąc biorcę przed infekcjami, jednakże mają ograniczoną różnorodność receptorów komórek T (TCR) [5, 9]. Do uzyskania trwałej, skutecznej i elastycznej odporności, która może reagować na szeroki zakres antygenów, konieczne jest powstawanie i różnicowanie pochodzących od dawcy prekursorów limfoidalno-mieloidalnych (*lymphoid-myeloid progenitors*, LMP) w grasicy biorcy. W szlaku zależnym od grasicy generowane są komórki RTE (*recent thymic emigrants*), kluczowe dla trwałej rekonstrukcji limfocytów T i zapewnienia różnorodnego repertuaru receptora komórek T, zdolnego do reagowania na szerokie spektrum antygenów [10, 11, 12]. Analiza efektywności tymopoezy może być przydatna do przewidywania wyników klinicznych transplantacji [13]. Czynniki uszkadzającymi grasicę, opóźniającymi produkcję de novo limfocytów T po HSCT są: zaawansowany wiek biorcy, występowanie i stopień ostrej oraz przewlekłej GvHD (aGvHD, cGvHD), intensywność kondycjonowania, źródło komórek macierzystych, zakażenia w okresie okołoprzeszczepowym (zwłaszcza reaktywacja CMV) oraz wcześniejsze leczenie choroby podstawowej z wykorzystaniem chemioterapii [14, 15].

**Infekcje w okresie poprzyszczepowym i związek z odnową immunologiczną.** Zakażenia we wczesnym okresie po transplantacji (faza aplastyczna) wynikają z niedoboru liczby oraz funkcji zarówno granulocytów i komórek jednojądrzastych i są to głównie zakażenia bakteryjne lub grzybicze [16]. Później, w okresie od początkowego wszczepienia szpiku do co najmniej trzeciego miesiąca, zakażenia wynikają głównie z niedoboru odporności komórkowej, ze zmniejszoną liczbą i funkcją swoistych oraz nieswoistych komórek cytotoksycznych [17]. Podczas tej fazy największym zagrożeniem są infekcje wirusowe, głównie w formie reaktywacji, z których najczęstszy problem stanowi wirus cytomegalii (CMV) oraz wirus Epstein-Barr (EBV). Wystąpienie i nasilenie aGvHD jest głównym czynnikiem opóźniającym rekonstrukcję immunologiczną i sprzyjającym infekcjom na tym etapie. W trzeciej fazie, począwszy od czwartego miesiąca, na odnowę immunologiczną wpływa głównie obecność i stopień cGvHD i jest ona przede wszystkim związana z niedoborem immunoglobulin, a pacjenci są najbardziej narażeni na zakażenia bakteryjne, w szczególności bakteriami otoczkowymi. Częstość występowania infekcji w okresie poprzyszczepowym jest zależna zależy od szybkości rekonstrukcji immunologicznej i wydaje się być związana z intensywnością immunosupresji i zastosowanymi lekami, najprawdopodobniej przez ich wpływ na liczbę i funkcję komórek T [18]. Wczesne infekcje

wirusowe mogą również mieć bezpośredni wpływ na opóźnienie regeneracji odporności po HSCT [19]. W ostatnich latach osiągnięto znaczne postępy w monitorowaniu i leczeniu zakażeń po HSCT wśród których CMV pozostaje głównym powikłaniem wirusowym [20]. W pracach wchodzących w skład pracy doktorskiej zajmowałam się problematyką zakażeń poprzyszczepowych i związku z odnową limfocytarną oraz czynnikami wpływającymi na aktywność limfopoetyczną grasicy. Badania zostały pozytywnie zaopiniowane przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu – Opinia Komisji Bioetycznej numer KB-220/2018 z 24.04.2018.

### **Odnowa immunologiczna, a ustąpienie zaburzeń autoimmunologicznych.**

Prawidłowa odnowa immunologiczna u dzieci po allo-HSCT z towarzyszącymi chorobami autoimmunologicznymi może doprowadzić do wyleczenia tych schorzeń. Doskonałym przykładem są pacjenci ze schorzeniami wymagającymi transplantacji, u których dodatkowo diagnozuje się celiakię. Za patomechanizm celiakii (*celiac disease*- CD) odpowiada nieprawidłowa reakcja immunologiczna organizmu osób genetycznie predysponowanych wywołana przez gluten i związane z nim prolaminy (gliadynę, sekalinę, hordeinę). Jeden z elementów gluteiny (frakcja glutenu rozpuszczalna w wodzie i alkoholu) oddziałuje na enterocyty, zwiększając przepuszczalności bariery jelitowej i umożliwiając transmisję makrocząsteczek glutenu do układu krążenia, gdzie jest fagocytowany przez komórki prezentujące antygen (*antigen-presenting cells*, APC) i za pośrednictwem receptorów TCR wywołuje odpowiedź ze strony limfocytów Th, manifestującą się wydzielaniem cytokin prozapalnych aktywujących limfocyty T cytotoksyczne CD8<sup>+</sup> (Tc), które doprowadzają do zniszczenia enterocytów, pociągając za sobą większość objawów klinicznych choroby trzewnej. Najważniejszą rolę w zapoczątkowaniu kaskady nieprawidłowej odpowiedzi immunologicznej pełni upośledzona regulacja odpowiedzi układu odpornościowego przez limfocyty pomocnicze T CD4<sup>+</sup> (Th). Istota CD została gruntownie przebadana, ale podstawowe zjawiska immunologiczne są tylko częściowo zrozumiałe. Jedyna dostępna obecnie metoda leczenia wymaga stałego przestrzegania diety bezglutenowej, chociaż ze względu na wykazaną skuteczność terapii immunosupresyjnej, obecnie bada się szczepionki indukujące tolerancję [21]. Pomyślnie próby wyleczenia nawrotowej celiakii (*refractory celiac disease*, RCD) dzięki zastosowaniu autologicznego HSCT (allo-HSCT) opisano w literaturze [22, 23]. Wykazano też, że allo-HSCT jest opcją leczniczą w różnych chorobach autoimmunologicznych, ale ryzyko związane ze śmiertelnością związaną z procedurą przeszczepienia przewyższa jego użyteczność w tych wskazaniach. Istnieje kilka doniesień o sporadycznej remisji CD po allogenicznym HSCT wykonanym w przypadku innych chorób zagrażających życiu [24, 25,

26]. W ramach pracy doktorskiej opisałam przypadek wyleczenia rodzinnej postaci celiakii po przeszczepieniu szpiku kostnego u dziecka z przewlekłą chorobą ziarniniakową.

## OMÓWIENIE PRAC

### 1. **Thymic activity in immune recovery after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children** (Tł. Rola grasicy w odnowie immunologicznej po allotransplantacjach krwiotwórczych komórek macierzystych u dzieci).

Jednym z głównych czynników warunkujących prawidłową odnowę immunologiczną po transplantacji jest prawidłowa funkcja grasicy, której została poświęcona niniejsza publikacja. Wydajność tymopoezy oceniano na podstawie ilościowego oznaczenia bezwzględnej liczby komórek RTE zdefiniowanych, jako naiwne komórki T wykazujące na swojej powierzchni ekspresję antygenów CD3+/CD4+/CD31+/CD45RA+ za pomocą cytometrii przepływowej. Grupę badaną stanowiło 52 pacjentów Kliniki Transplantacji Szpiku Onkologii i Hematologii Dziecięcej we Wrocławiu. Analiza wykazała, że niższy wiek biorcy odwrotnie koreluje z liczbą RTE, potwierdzając, że związana z wiekiem involucja grasicy wywiera duży wpływ na odnowę immunologiczną. Pacjenci poddani transplantacji od dawców niespokrewnionych mieli znacznie gorszą funkcję grasicy w porównaniu z biorcami przeszczepów od dawców rodzinnych. Tymopoeza była też upośledzona w przypadku zastosowania ATG (globuliny antytymocytarnej) jako profilaktyki GvHD. Rodzaj kondycjonowania przed HSCT ma również duży wpływ na funkcję grasicy jako, że jest ona wrażliwym celem dla zarówno chemio- jak i radioterapii. Z tego samego powodu gorsza funkcja grasicy była też obserwowana u pacjentów poddanych transplantacji z powodu choroby nowotworowej w porównaniu z nienowotworową, a wiązało się to z intensywniejszym leczeniem dzieci z chorobami nowotworowymi w okresie przed transplantacją. Negatywny wpływ na wydajność tymopoezy poprzez zmniejszenie produkcji RTE miało również wystąpienie i bardziej zaawansowany stopień aGvHD. Te wstępne ustalenia i identyfikacja czynników ryzyka pogorszenia aktywności grasicy mogą w przyszłości pomóc w wyborze kandydatów do zastosowania eksperymentalnych strategii pobudzających regenerację grasicy.

## **2. Immune recovery and the risk of CMV/ EBV reactivation in children post allogeneic hematopoietic stem cell transplantation** (Tł. Odnowa immunologiczna i ryzyko reaktywacji wirusów CMV/EBV u dzieci po allogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych)

W kolejnej pracy wchodzącej w skład cyklu analizowano wpływ reaktywacji wirusów CMV oraz EBV na kinetykę i profil odnowy immunologicznej po allo-HSCT, w korelacji z innymi potencjalnymi czynnikami opóźniającymi pełen powrót funkcji układu odpornościowego i promujących reaktywację wirusowe. Prospektywnej analizie poddano 86 pacjentów Kliniki Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej we Wrocławiu. Ocenie poddano następujące subpopulacje limfocytów T (CD3<sup>+</sup>): limfocyty T pomocnicze (*helper T lymphocytes*, Th: CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), limfocyty T cytotoksyczne/ supresorowe (*cytotoxic/suppressor T lymphocytes*, Tc: CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), limfocyty B (CD19<sup>+</sup>) i limfocyty NK (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>). Analiza wykazała, że reaktywacja CMV wywiera długotrwały, dynamiczny wpływ na szybkość odnowy immunologicznej u pacjentów pediatrycznych po HSCT. Upośledzona rekonstytucja w zakresie limfocytów T, w szczególności subpopulacji Tc oraz w mniejszym stopniu Th sprzyja reaktywacji CMV. Dodatkowo w badaniu potwierdzono, że reaktywacja CMV sama w sobie stymuluje proliferację limfocytów Tc, co może z kolei skutkować zwiększonym ryzykiem aGvHD postaci jelitowej. Zaobserwowano, że bezwzględne wartości limfocytów B pozostają niskie u pacjentów z reaktywacją CMV. Wykazano również, że zastosowanie ATG i szybka rekonstytucja limfocytów B sprzyja reaktywacji EBV. W grupie badanej nie udowodniono wpływu reaktywacji wirusa EBV na występowanie GvHD, co pozostaje w sprzeczności z danymi literaturowymi i może być wynikiem zbyt niskiej liczebności grupy. Nie obserwowano wpływu reaktywacji wirusowych na rekonstytucję w zakresie komórek NK. Uzyskane wyniki podkreślają znaczenie dokładnego monitorowania reaktywacji wirusowych u pacjentów pediatrycznych po HSCT i pozostawanie we wzajemnej zależności reaktywacji wirusowych, które mogą upośledzać odnowę immunologiczną jak i opóźnionej odnowy immunologicznej, która może promować reaktywację wirusów CMV i EBV. Niezwykle istotny w kontekście prawidłowej odnowy immunologicznej wydaje się dobór optymalnego rodzaju kondycjonowania terapii immunosupresyjnej, terapii GvHD i przeciwwirusowej.

**3. Familial celiac disease remission as a result of a full donor immunological recovery after sibling cord blood transplantation for chronic granulomatous disease- a case report** (Tł. Remisja rodzinnej postaci celiakii jako wynik pełnej odnowy immunologicznej komórkami dawcy po przeszczepieniu komórek macierzystych krwi pępowinowej od zgodnego rodzeństwa z powodu przewlekłej choroby ziarniniakowej)

W trzeciej pracy, składającej się na cykl publikacji oceniłam rekonstytucję immunologiczną w kontekście przywrócenia tolerancji na gluten i wyleczenia pacjenta z celiakii. Praca zawiera opis przypadku chłopca z rozpoznaną zarówno przewlekłą chorobą ziarniniakową (*chronic granulomatous disease*, CGD), jak i rodzinną chorobą trzewną (*celiac disease*, CD), który przeszedł transplantację krwi pępowinowej od częściowo zgodnego brata. Prawie rok po allo-HSCT u pacjenta wprowadzono dietę zawierającą gluten i nie zaobserwowano ponownego pojawienia się klinicznych, serologicznych czy histologicznych markerów CD. Odnowa immunologiczna z udziałem allogenicznych limfocytów i eliminacja auto-przeciwciał, które powodowały uszkodzenia jelit przed transplantacją ma kluczowe znaczenie dla indukcji tolerancji glutenu. Opisany pacjent wykazał podobny wzorzec zanikania przeciwciał indukowanych glutenem i rozwój trwałej remisji. U chłopca podano alemtuzumab, jako części kondycjonowania przed przeszczepem oraz zastosowano terapię metylprednizolonem w leczeniu aGvHD, co dodatkowo zahamowało produkcję limfocytów do 6 miesięcy po HSCT, opóźniając wszelkie próby wprowadzenia glutenu. Dopiero po zakończeniu leczenia immunosupresyjnego podjęto próby wprowadzenia diety bogatej w gluten. Na podstawie danych literaturowych można oczekiwać, że zanik przeciwciał chorobotwórczych nastąpi od kilku miesięcy do 1 roku po transplantacji pod warunkiem stabilnego chimeryzmu dawcy w zakresie produkcji limfocytów B. Optymalnym czasem na wprowadzenie glutenu jest stabilny stan pacjenta oraz minimalizacja ryzyka aGvHD, a więc należy odczekać co najmniej 3 miesiące po HSCT. Zmianom diety musi towarzyszyć ściśle monitorowanie pacjenta ze względu na ryzyko nawrotu choroby z uwagi na znane czynniki genetyczne i środowiskowe predysponujące do rozwoju CD. Opisany pacjent cierpiał na dwie niezależne i dziedziczne choroby o podłożu immunologicznym z częściowo pokrywającymi się objawami, które mogły prowadzić do błędnej diagnozy i nieprawidłowego leczenia CD. Przypadek ten podkreśla potrzebę drobiazgowej diagnostyki różnicowej w pierwotnych niedoborach odporności (*primary immunodeficiency diseases*, PID), zwłaszcza biorąc pod uwagę potencjał zjawisk dysregulacji immunologicznej. Przedstawione dane potwierdzają dodatkowo wcześniejsze rzadkie obserwacje, że allogeniczny HSCT prowadzi do trwałej indukcji tolerancji glutenu

u pacjentów z CD, co może uzasadniać jego kliniczne zastosowanie u pacjentów z opornymi na leczenie podtypami CD (*refractory celiac disease- RCD*). Pełna odnowa immunologiczna komórkami dawcy ma kluczowe znaczenie w powodzeniu zarówno transplantacji jak i eliminacji chorobotwórczych przeciwciał uszkadzających enterocyty w chorobie trzewnej.

# ABSTRACT

**Analysis of immune reconstitution in children post allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with subanalysis of numerous factors affecting the recovery.**

## INTRODUCTION

**The importance of immune recovery.** Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is a recognized treatment option for many malignant and non-malignant diseases. The procedure is followed by a period of profound lymphopenia and immunodeficiency as a consequence of the ablation of the immune system by pre-transplant conditioning and immunosuppressive therapy after HSCT. Immune system functions are severely impaired for many months following transplantation, which is associated with an increased risk of opportunistic infections, viral reactivation, and graft versus host disease (GvHD). The main causes of morbidity and mortality in patients after HSCT are: relapse of the underlying disease, GvHD as well as viral, fungal and bacterial infections [1].

**Factors modifying immune reconstitution.** The duration of complete immune recovery of the hematopoietic system after allo-HSCT varies between patients, and its speed and quality are affected by many external and internal factors. The most significant determinants of early reconstitution of the immune system described in the literature are: the number of transplanted stem cells (CD34 +) and T lymphocytes (CD3 +), patient age, CMV status of the donor and the recipient, type of transplantation, conditioning protocol and type of GvHD prophylaxis [2, 3, 4]. The proper function of T lymphocytes is crucial for the HSCT outcome, and efficient thymopoiesis is extremely important for *de novo* production of T cells and thus restoration of the fully functional immune system [5, 6].

**The course of immune recovery.** Immune reconstitution usually begins with granulocytes, monocytes, macrophages and NK lymphocytes appearing in the bloodstream. Subsequently, T cell subpopulations begin to be produced and finally B cells. T cells can be generated in two different pathways: the thymus-independent pathway prevails in the early post-transplant period, while active thymopoiesis (thymus-dependent pathway) prevails later after transplantation and results in the reconstitution of a functionally competent and fully mature compartment of naive T cells with broad antigen specificity [7, 8]. In the thymus-independent pathway mature, donor T cells are transferred in the transplant material and afterwards undergo peripheral expansion. They react quickly to previously encountered



pathogens and temporarily protect the graft recipient against infections, however, they have a limited diversity of the T cell receptor (TCR) [5, 9]. De novo generation and differentiation of donor lymphoid-myeloid precursors (lymphoid-myeloid progenitors, LMP) in the recipient's thymus are required to achieve long-lasting, effective and flexible immunity. In the thymus-dependent pathway, RTE (recent thymic emigrants) cells are generated and are crucial for permanent T cell reconstitution and for providing a diverse T cell receptor repertoire (TCR) capable of responding to a broad spectrum of antigens [10, 11, 12]. The analysis of the effectiveness of thymopoiesis can be useful in predicting the clinical outcomes of HSCT [13]. Thymus-damaging factors that delay de novo production of T-lymphocytes after HSCT are: advanced age of the recipient, occurrence and degree of both acute and chronic GvHD (aGvHD, cGvHD), intensity of pre-transplant conditioning, stem cells source, infections in the peri-transplant period (especially CMV reactivation) and pre-transplant treatment of the underlying disease [14, 15].

**Post-transplant infections and its relation to immune recovery.** Infections in the early post-transplantation period (aplastic phase) result from a deficiency in the number and function of both granulocytes and mononuclear cells and are mainly of bacterial or fungal origin [16]. Later, in the period from initial bone marrow engraftment to at least the third month after HSCT, infections result mainly from cellular immunodeficiency, with reduced number and function of specific and non-specific cytotoxic cells [17]. During this phase, the biggest threat are viral infections, mainly in the form of reactivations, the most common of which is cytomegalovirus (CMV) and Epstein Barr (EBV). The occurrence and severity of aGvHD is a major factor delaying immune reconstitution and promoting infections in this stage. In the third phase, starting from the fourth month, immune renewal is mainly influenced by the presence and the degree of chronic GvHD and is primarily associated with immunoglobulin deficiency. Therefore patients are mostly at risk of bacterial infections, in particular caused by encapsulated bacteria. The incidence of post-transplant infections depends on the speed of immune reconstitution and appears to be related to the intensity of immunosuppression and implemented drugs, most likely by their effect on T cells number and function [18]. However, early viral infections can also have a direct effect on delaying the regeneration of immunity after HSCT [19]. In recent years, significant progress has been made in monitoring and treating peri-transplant infections among which CMV remains a major viral complication [20]. In my doctoral dissertation, I analyzed post-transplant infections and their relationship with immune recovery as well as factors affecting thymus lymphopoietic activity. The research was positively

evaluated by the Bioethical Committee at the Wrocław Medical University -Opinion of the Bioethical Committee number KB-220/2018 from 24/04/2018.

**Immune recovery and correction of autoimmune disorders.** Proper immune reconstitution in children with associated autoimmune diseases, who underwent allo-HSCT may be helpful in curing these diseases. An excellent example remains patients with conditions requiring transplantation who are additionally diagnosed with celiac disease (CD) and are cured after the transplant procedure. The pathomechanism of CD is the abnormal immune response of genetically predisposed individuals to gluten and associated prolamines (gliadin, secalin, hordein). The most important role in initiating the cascade of abnormal immune response is played by impaired regulation of the immune system response by helper T cells CD4 + (Th). One of the elements of gluten (water- and alcohol-soluble fraction of gluten) affects enterocytes, increasing the permeability of the intestinal barrier and enabling the transmission of gluten macromolecules to the circulatory system. There, it is phagocytized by antigen-presenting cells (APCs) and mediated by TCR receptors, manifested by the secretion of pro-inflammatory cytokines that activate CD8 + cytotoxic T cells (Tc), which lead to the destruction of enterocytes, entailing most clinical symptoms of celiac disease. The pathogenesis of the CD has been thoroughly studied, but the basics of immunological phenomena is only partially understood. The only currently available treatment requires a lifelong gluten-free diet, although due to the proven efficacy of immunosuppressive therapy, tolerance-inducing vaccines are currently being studied [21]. Successful attempts to cure refractory celiac disease (RCD) by using autologous HSCT have been reported in the literature [22, 23]. Allo-HSCT has also been shown to be a therapeutic option in various autoimmune diseases, but the risk of mortality associated with the transplant procedure outweighs its utility in these indications. There are only few reports of CD remission after allogeneic HSCT in other life-threatening diseases [24, 25, 26]. As part of my doctoral thesis, I described a boy with chronic granulomatous disease cured from celiac disease after a bone marrow transplantation.

## **WORK OVERVIEW:**

### **1. Thymic activity in immune recovery after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children**

One of the main factors determining proper immune reconstitution after transplantation is the function of the thymus which was researched in the publication. The efficiency of thymopoiesis was assessed by flow cytometry quantifying the absolute count of RTE cells defined as naive T cells expressing on their surface the following antigens: CD3+/CD4+/CD31+/CD45RA+. The study group consisted of 52 patients from the Department of Pediatric Bone Marrow Transplantation, Oncology and Hematology in Wrocław. The analysis showed that the lower age of the recipient correlates inversely with the number of RTEs, confirming that age-related involution of the thymus has a great impact on immune renewal. Patients transplanted from matched unrelated donors had significantly worse thymus function compared to transplant recipients from matched family donors. Thymopoiesis was also impaired when ATG was implemented as GvHD prophylaxis. The type of pre-transplant conditioning has a great impact on the function of the thymus gland as it is a sensitive target for both chemo- and radiation therapy. For the same reason, worse thymus function was observed in patients undergoing transplantation due to malignant disease compared to non-malignant, and this was associated with more intensive treatment in the pre-transplant period. The occurrence and more advanced stage of aGvHD also had a negative effect on thymopoiesis efficiency by reducing the RTE production. These preliminary findings and the identification of risk factors for worsening thymus activity may in the future help in selecting candidates for experimental thymus rejuvenation strategies.

### **2. Immune recovery and the risk of CMV / EBV reactivation in children post allogeneic hematopoietic stem cell transplantation**

In the next paper included in the publication series, the impact of CMV/ EBV reactivation on the kinetics and profile of immune recovery after HSCT in correlation with other potential factors delaying the full reconstitution of the immune system and promoting viral reactivations was analyzed. The study group consisted of 86 patients treated at the Department of Pediatric Bone Marrow Transplantation, Oncology and Hematology, in Wrocław and their results were analyzed prospectively. The following subpopulations of T lymphocytes (CD3+) were evaluated: T helper lymphocytes (Th: CD3+/CD4+), cytotoxic / suppressor T lymphocytes (Tc: CD3+/ CD8+), B lymphocytes (CD19+) and NK lymphocytes (CD3-/CD56+). Our study has

proven that CMV reactivation has a long-lasting, dynamic effect on the rate of immune recovery in pediatric patients after HSCT. Impaired T-cell reconstitution, in particular Tc subpopulations and, to a lesser extent, Th, promotes CMV reactivation. In addition, the study confirmed that CMV reactivation itself stimulates Tc lymphocyte proliferation, which may result in an increased risk of intestinal aGvHD. It was observed that absolute values of B cells remain low in patients with CMV reactivation. The use of ATG (anti-thymocyte globulin) and rapid reconstitution of B cells populations promoted EBV reactivation. In the study the impact of EBV reactivation on GvHD has not been proven, which is in contradiction to the literature data and may be the result of too small study group. No effect of viral reactivation on NK cell reconstitution was observed. The results underline the importance of accurate monitoring of viral reactivations in pediatric patients after allo-HSCT and suggest that viral reactivations that can impair immune renewal as well as delayed immune renewal can promote CMV and EBV reactivation. The selection of the optimal conditioning regimen, immunosuppressive therapy, possible GvHD treatment and antiviral therapy seems to be extremely important in the context of proper immune regeneration.

### **3. Familial celiac disease remission as a result of a full donor immunological recovery after sibling cord blood transplantation for chronic granulomatous disease- a case report**

In the third paper included in the publications series immune reconstitution in the context of restoring gluten tolerance and curing the patient from celiac disease was analyzed. I presented a case report of a boy diagnosed with both chronic granulomatous disease (CGD) and familial celiac disease (CD) who underwent umbilical cord blood transplantation from a partially matched brother. Almost a year after HSCT, the patient started gluten-containing diet and no reappearance of clinical, serological or histological markers of CD was observed. Immune reconstitution with allogeneic lymphocytes and the elimination of antibodies that caused intestinal damage before transplantation is crucial for the induction of gluten tolerance. Our patient showed similar dynamics in clearance of gluten-induced antibodies and the development of permanent remission. However, the boy was given alemtuzumab as part of pre-transplant conditioning as well as steroid therapy for the treatment of aGvHD, which additionally inhibited lymphocyte production up to 6 months after HSCT, delaying any attempts to introduce gluten. Only after the end of immunosuppressive therapy attempts to introduce a gluten-containing diet were made. Based on the literature data, pathogenic antibodies can be expected to disappear from a few months to 1 year after transplantation providing stable donor chimerism in B-

lymphocyte compartment. The best moment for gluten introduction could be decided when the patient is in stable condition and the risk of aGvHD is minimized, i.e. no sooner than 3 months after HSCT. The change in the diet and the subsequent observation period must be accompanied by close monitoring of the patient due to the risk of CD recurrence for known genetic and environmental predisposing factors. The described patient suffered from two independent and hereditary immune-mediated diseases with partially overlapping symptoms that could lead to misdiagnosis and incorrect CD treatment. This case highlighted the need for meticulous differential diagnosis in primary immunodeficiency diseases (PIDs), especially considering the potential for immune dysregulation phenomena. The presented data additionally confirm earlier rare observations that allogeneic HSCT leads to permanent induction of gluten tolerance in patients with CD, which may justify its clinical use in patients with refractory celiac disease (RCD). Full immunological recovery with donor cells is crucial for the success of both transplantation and elimination of pathogenic antibodies damaging enterocytes in celiac disease.