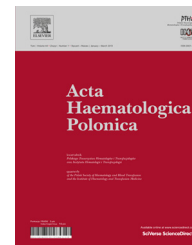


Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](#)

Acta Haematologica Polonica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/achaem

Praca poglądowa/Review

Biomarkery choroby przeszczep-przeciw- -gospodarzowi – współczesny stan wiedzy i nadzieje na przyszłość



Biomarkers of graft versus host disease – current knowledge and hope for the future

Anna Czyż*

Katedra i Klinika Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu Krwiotwórczego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu,
Kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. med. Mieczysław Komarnicki, Poznań, Polska

INFORMACJE O ARTYKULE

Historia artykułu:

Otrzymano: 31.05.2013

Zaakceptowano: 02.07.2013

Dostępne online: 18.07.2013

Słowa kluczowe:

- choroba przeszczep-przeciwko-gospodarzowi
- biomarkery
- transplantacja allogenicnych komórek krwiotwórczych

Keywords:

- Graft versus host disease
- Biomarkers
- Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation

ABSTRACT

Despite the progress that has been made in the diagnosis and treatment of graft versus host disease (GvHD) this complication remains a major limitation of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (alloHSCT). The goal of searching for GvHD biomarkers is the individualization of immunosuppressive prophylaxis in patients undergoing alloHSCT and personalized therapy of patients with diagnosed GvHD. The approaches for biomarker discovery may be based on the knowledge of the pathophysiology of acute and chronic GvHD, or carried out with the use of modern proteomics. This paper presents the results of prospective studies aimed at the discovery and validation of GvHD biomarkers. The predictive, diagnostic and prognostic value of the biomarkers, such as interleukin 8, tumor necrosis factor α (TNF- α), soluble TNF receptor type 1, soluble receptor for interleukin 2, hepatocyte growth factor, cytokeratin-18 fragments, regenerating islet-derived 3- α and elafin are discussed, along with the consideration on the usefulness of monitoring of immune cells subpopulations, such as regulatory T cells, NKT cells, naive B cells and memory B cells. The potential impact of biomarkers on GvHD prophylaxis and treatment is presented.

© 2013 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Urban & Partner Sp. z o.o. All rights reserved.

Wstęp

Transplantacja allogenicnych macierzystych komórek krwiotwórczych (*allogeneic haematopoietic stem cell transplantation*;

alloHSCT) jest obecnie szeroko stosowaną metodą leczenia nowotworowych i nienowotworowych chorób hematologicznych. Głównym jej ograniczeniem pozostaje choroba przeszczep-przeciw-gospodarzowi (*graft versus host disease*; GvHD). Ostra GvHD (*acute GvHD*; aGvHD) pomimo profilaktycznego

* Adres do korespondencji: Katedra i Klinika Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu Krwiotwórczego UM, ul. Szamarzewskiego 84, 60-569 Poznań, Polska. Tel.: +48 61 85 49 571; fax: +48 61 85 49 578.

Adres email: aczyz@onet.eu.

leczenia immunosupresyjnego rozwija się u 20–80% chorych poddanych alloHSCT. Częstość występowania i stopień ciężkości aGvHD zależy od wielu czynników związanych z chorym, dawcą i procedurą transplantacyjną. Do najlepiej poznanych i udokumentowanych czynników ryzyka wystąpienia ostrej GvHD należą przede wszystkim niezgodność w zakresie antygenów HLA pomiędzy biorcą i dawcą komórek krwiotwórczych, przeszczepienie komórek od dawcy niespokrewnionego oraz stosowanie napromieniania całego ciała w przygotowaniu do alloHSCT [1–3]. Przeżycie chorych, u których rozpoznano aGvHD, zależy od odpowiedzi na leczenie steroidami stosowanymi standardowo w pierwszej linii terapii immunosupresyjnej. Przewlekła GvHD (chronic GvHD; cGvHD), która rozwija się u około 40–60% chorych, najczęściej pomiędzy 6. a 24. miesiącem po transplantacji, stanowi główną przyczynę późnej śmiertelności niezwiązanej z nawrotem choroby (*non-relapse mortality*; NRM) [1]. W grupie dorosłych chorych, u których rozpoznano postać rozległą cGvHD, śmiertelność sięga 60% po 8 latach od jej rozpoznania [4]. Na ryzyko wystąpienia przewlekłej GvHD najsilniej wpływa starszy wiek chorego, przeszczepienie mężczyźnie komórek krwiotwórczych pobranych od kobiety oraz transplantacja komórek krwiotwórczych pobranych z krwi obwodowej [1, 5].

Celem toczących się licznych prospektywnych badań jest poszukiwanie laboratoryjnych biomarkerów GvHD, których oznaczenie w surowicy, moczu lub ślinie pozwoliłoby dokładnie oszacować ryzyko wystąpienia tego powikłania, rozpoznać je przed pojawieniem się pierwszych objawów klinicznych, a także przewidzieć szansę uzyskania odpowiedzi na zastosowane leczenie u chorych z już rozpoznany GvHD. Biomarkery poszukiwane są na podstawie wiedzy dotyczącej patofizjologii GvHD lub też są identyfikowane z użyciem nowoczesnej proteomiki wykorzystującej elektroferezę 2D, spektrometrię mas bądź immunologiczne mikromacierze białkowe [6]. Zastosowanie tych metod pozwala na identyfikację bardzo dużej liczby białek-kandydatów w testowanych próbkach biologicznych, takich jak krew, mocz lub ślina.

Potencjalnym celem poszukiwania biomarkerów GvHD jest indywidualizacja leczenia chorych poddawanych alloHSCT. Identyfikacja chorych z wysokim ryzykiem wystąpienia GvHD mogłaby prowadzić do ich ściślejszego monitorowania i zintensyfikowania profilaktyki tego powikłania. Rozpoznanie GvHD na podstawie oceny biomarkerów przed pojawieniem się objawów klinicznych pozwoliłoby na zastosowanie strategii leczenia wyprzedzającego, a zdefiniowanie chorych z wysokim ryzykiem niepowodzenia leczenia pierwszej linii GvHD prowadziłoby do wczesnej intensyfikacji terapii immunosupresyjnej, np. poprzez wprowadzenie dodatkowego leku do standardowej pierwszej linii leczenia opartej na steroidzie. Optymalny test laboratoryjny służący do wykrywania biomarkerów GvHD powinien być prosty, nieinwazyjny i umożliwiać różnicowanie objawów GvHD z objawami o innej etiologii oraz pozwalać na ocenę stopnia ciężkości choroby. Modelowy test pozwalałby również na wczesne przewidywanie odpowiedzi na leczenie, ryzyka śmierci niezwiązanej z nawrotem choroby podstawowej i odległego przeżycia chorych po alloHSCT.

Biomarkery ostrej GvHD

Białka osoczowe

Od ponad dekady publikowane są doniesienia dotyczące przydatności oznaczania przed transplantacją oraz we wczesnym okresie po przeszczepieniu różnych białek osoczowych jako potencjalnych biomarkerów ostrej GvHD (Tab. 1). Identyfikacja białek o potencjalnym znaczeniu predykcyjnym, diagnostycznym lub prognostycznym opiera się na wynikach badań z zastosowaniem nowoczesnych technik proteomicznych pozwalających na testowanie bardzo dużej liczby peptydów w próbce biologicznej. Wybór testowanych białek wpływa też ze znajomości patofizjologicznych procesów prowadzących do wystąpienia aGvHD. W świetle współczesnej wiedzy procesy te przebiegają w trzech fazach [7]. We wczesnym okresie po transplantacji w wyniku uszkodzenia tkanek wywołanego chemioterapią lub chemioradioterapią, stosowaną w przygotowaniu („kondycjonowaniu”) przed alloHSCT, dochodzi do uwolnienia prozapalnych cytokin, takich jak czynnik martwicy nowotworów α (*tumor necrosis factor α* ; TNF- α), interleukina 1 (IL-1) i IL-7, a także do przenikania do krążenia poprzez ścianę uszkodzonych jelit lipopolisacharydu (LPS) pochodzenia bakteryjnego. Prozapalne cytokiny i LPS aktywują komórki prezentujące antygen (*antigen-presenting cells*; APC) biorcy (faza I). APC biorcy poprzez działanie IL-12 i IL-23 pobudzają pomocnicze limfocyty T (Th) dawcy do produkcji cytokin odpowiedzi immunologicznej typu Th1, tj. IL-2, IL-6 i IFN- γ (interferon γ) (faza II). Interleukiny 2 i 6 indukują proliferację i różnicowanie aktywowanych cytotoksycznych limfocytów T dawcy oraz stymulują komórki NK, a IFN- γ pobudza komórki jednojądrowe do wydzielania IL-1 i TNF- α . Aktywowane cytotoksyczne limfocyty T i komórki NK, podobnie jak IL-1 i TNF- α indukują apoptozę w komórkach narządów docelowych biorcy (faza III). W opublikowanych stosunkowo licznych doniesieniach wykazano, że w grupie chorych z ostrą GvHD w porównaniu z chorymi, u których nie występuje to powikłanie, stwierdza się wyższe stężenie łańcucha α rozpuszczalnego receptora dla IL-2 (sIL-2R α) [8], TNF- α [9, 10] i jego receptora typu 1 (TNF receptor 1; TNFR1) [11–13], a także IL-6 [14], IL-8 [15] i IL-12 [16] (Tab. 1). Głównym zastrzeżeniem związanym z wykorzystaniem tych cytokin jako markerów ostrej GvHD jest wzrost ich stężenia w przebiegu innych nieinfekcyjnych i infekcyjnych powikłań po transplantacji, takich jak zespół niedrożności zatokowej wątroby czy posocznica [17–19]. Poza badaniem biomarkerów związanych z systemową odpowiedzią immunologiczną poszukiwane są również markery specyficzne dla uszkodzenia pojedynczych tkanek czy narządów. Do takich biomarkerów zaliczone mogą być fragmenty cytokeratyny-18 (KRT18) będące markerami apoptozy komórek nabłonka, których wzrost stężenia wykazano w przebiegu aGvHD z objawami uszkodzenia jelit i wątroby [20, 21]. Inną cytokiną związaną z uszkodzeniem komórek nabłonka jest czynnik wzrostu hepatocytów (*hepatocyte growth factor*; HGF), który wydzielany przez komórki mezenchymalne wykazuje działanie mitogenne na komórki pochodzenia nabłonkowego.

Tabela I – Osoczowe biomarkery ostrej choroby przeszczep-przeciw-gospodarzowi
Table I – Plasma biomarkers of acute graft vs. host disease

Marker/badanie	Charakterystyka parametru	Znaczenie predykcyjne	Znaczenie diagnostyczne	Znaczenie prognostyczne	Populacja badana (liczba chorych)
TNF- α					
Remberger 1995 [9]	Wyższe stężenie w czasie kondycjonowania	aGvHD	ND	ND	HSCT MRD i URD (112)
Liu 2010 [10]	Wyższe stężenia od dnia +1. do dnia + 21.	aGvHD 2-4	ND	ND	HSCT MRD i URD (101)
TNFR1					
Choi 2008 [11]	Stosunek stężenia w +7. dniu do stężenia wyjściowego > 2,5	aGvHD 2-4 NRM	ND	ND	HSCT MRD i URD (438)
Kitko 2008 [12]	Stosunek stężenia w +7. dniu do stężenia wyjściowego > 2,5	aGvHD 2-4 NRM	ND	ND	HSCT MRD i URD u dzieci (82)
August 2011 [13]	> 1040 pg/ml w +15 dniu po HSCT	aGvHD 3-4 przed +60. dniem	ND	ND	HSCT MRD i URD (62)
IL-6					
Liu 2010 [10]	Wzrost stężenia od dnia +1. do dnia + 21.	aGvHD 2-4	ND	ND	HSCT MRD (101)
Malone 2007 [14]	Wzrost stężenia w okresie 15 dni przed pojawieniem się objawów aGvHD	ND	aGvHD 2-4	ND	MAC HSCT MRD i URD (147)
IL-12					
Mohty 2005 [16]	Wzrost stężenia w +28. dniu po HSCT	ND	aGvHD 2-4	ND	RIC HSCT MRD (113)
Elafina					
Paczesny 2010 [24]	Wyższe stężenie w pierwszej dobie aGvHD	ND	Skórna postać aGvHD vs inne zmiany skórne	↑ NRM, ↓ OS	HSCT MRD i URD (512)
KRT18					
Luft 2007 [20]	Wyższe stężenie w dniu rozpoczęcia leczenia aGvHD (diagnostyka), spadek stężenia w czasie leczenia IS (rokowanie)	ND	Jelitowa postać aGvHD vs inne rodzaje zapalenia jelit	Odpowiedź na leczenie IS	HSCT MRD i URD (55)
Harris 2012 [21]	Wyższe stężenia w pierwszej dobie aGvHD	ND	Jelitowa postać aGvHD vs inne rodzaje zapalenia jelit	↑ NRM	HSCT MRD i URD (954)
REG3 α					
Harris 2012 [21]	Wyższe stężenie w pierwszej dobie aGvHD	ND	Jelitowa postać aGvHD vs inne rodzaje zapalenia jelit	↑ NRM Oporność na leczenie IS	HSCT MRD i URD (954)

Skróty: TNF- α – czynnik martwicy nowotworów, TNFR1 – receptor dla TNF typu 1, KRT18 – fragmenty cytokeratyny-18, IL – interleukina, REG3c – białko *regenerating-islet-derived-3- α* , aGvHD – ostra choroba przeszczep-przeciw-gospodarzowi, HSCT MRD – przeszczepienie macierzystych komórek krwiotwórczych od zgodnego dawcy rodzinnego, HSCT URD – przeszczepienie macierzystych komórek krwiotwórczych od dawcy niespokrewnionego, RIC – przygotowanie o zredukowanej intensywności, leczenie IS – leczenie immunosupresyjne, NRM – śmiertelność niezwiązana z nawrotem, OS – przeżycie całkowite, ND – brak danych.

Wzrost stężenia tej cytokiny odzwierciedla fizjologiczną odpowiedź na uszkodzenie tkanek w przebiegu aGvHD. U chorych z aGvHD stwierdzono wyższe stężenie HGF aniżeli u chorych bez objawów aGvHD [22, 23]. Poszukiwane są także markery, które pozwoliłyby na różnicowanie objawów narządowych związanych z aGvHD z objawami wywołanymi innymi czynnikami, np. różnicowanie wysypki skórnej w przebiegu GvHD z wysypką polekową czy różnicowanie biegunki w przebiegu jelitowej postaci GvHD z biegunką infekcyjną lub biegunką wywołaną toksycznością kondycjonowania. Do takich biomarkerów może być zaliczona elafina,

enzym o właściwościach inhibitora leukocytarnej proteazy znajdujący się w skórze i wykazujący przeciwbakteryjną aktywność. Paczesny i wsp. z University of Michigan, stosując technikę spektrometrii mas, wykazali podwyższone stężenie elafiny w osoczu chorych z objawami skórnymi aGvHD [24]. Następnie, wykorzystując test immunoenzymatyczny ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), przeprowadzono walidację biomarkera i zbadano osoczowe stężenie elafiny w dużej grupie chorych poddanych alloHSCT. Stwierdzono, że stężenie elafiny w grupie chorych ze zmianami skórnymi w przebiegu aGvHD było znamienne wyższe od stężenia

w grupie chorych z wysypką skórą o innej etiologii. Ponadto w badaniu tym udokumentowano związek pomiędzy stężeniem elafiny a NRM po 12 miesiącach od alloHSCT. Autorzy wykazali zatem, że biomarker ten może być wykorzystany zarówno w diagnostyce różnicowej zmian skórnych w przebiegu aGvHD, jak i we wczesnej stratyfikacji ryzyka u chorych z rozpoznaniem aGVHD. Inne wielośrodkowe badanie prowadzone przez zespół z Michigan dotyczyło chorych z objawami jelitowymi i wątrobowymi aGvHD. Harris i wsp. zidentyfikowali jako potencjalny osoczowy biomarker postaci jelitowej aGvHD przeciwbakteryjne białko REG3 α (*regenerating islet-derived 3- α*) w warunkach fizjologicznych obecne w komórkach Panetha [21]. Autorzy wykazali następnie, że stężenie REG3 α u chorych z biegunką w przebiegu aGvHD jest znacząco wyższe od stężenia stwierdzanego u chorych po alloHSCT z biegunką o innej etiologii. Podobne różnice zaobserwowano w stężeniu KRT18. W badaniu tym udowodniono ponadto, że stężenie zarówno REG3 α , jak i HGF jest czynnikiem prognostycznym wpływającym na NRM po 12 miesiącach od alloHSCT.

Analiza dotychczas opublikowanych badań sugeruje jednak, że dla zwiększenia specyficzności i wartości predykcyjnej stosowanych testów laboratoryjnych wskazane jest jednocześnie oznaczenie kilku potencjalnych markerów GvHD (Tab. II). Zespół badawczy z University of Michigan, stosując technikę immunologicznych mikromacierzy białek, odkrył zestaw ośmiu potencjalnych biomarkerów aGvHD o znaczeniu diagnostycznym i prognostycznym, a następnie, wykorzystując testy immunoenzymatyczne ELISA, przeprowadził testowanie i walidację odkrytego panelu markerów [23]. Autorzy wykazali, że cztery z ośmiu odkrytych biomarkerów, tj. IL-2R α , TNFR1, IL-8 oraz HGF tworzą panel, który pozwala na wczesną diagnostykę aGvHD. Ponadto zastosowany panel czterech markerów pozwolił na przewidywanie ryzyka

śmierci oraz przeżycia całkowitego chorych z objawami aGvHD w sposób niezależny od stopnia ciężkości powikłania, a także innych czynników klinicznych, takich jak wiek, rodzaj dawcy, stopień zgodności antygenów HLA pomiędzy dawcą a biorcą, rodzaj kondycjonowania oraz stan zaawansowania choroby podstawowej. W innym badaniu prowadzonym przez zespół z Michigan badano stężenie trzech markerów, IL-2R α , TNFR1 i elafiny przed kondycjonowaniem oraz w dniach +7 i +14 po alloHSCT u chorych, u których nie rozwinęła się jeszcze aGVHD [25]. Badanie przeprowadzono z intencją opracowania panelu, który pozwoliłby na przewidywanie wystąpienia aGvHD. Opracowany model statystyczny oparty na stężeniach tych trzech biomarkerów pozwolił z 75-procentową specyficznością i 57-procentową czułością przewidzieć wystąpienie aGvHD 2.–4. stopnia. W kolejnym badaniu Levine i wsp. testowali panel 6 biomarkerów (IL-2R α , TNFR1, HGF, IL-8, elafina, REG3 α) u chorych z ustalonym rozpoznaniem aGvHD w celu określenia ich przydatności dla przewidywania odpowiedzi na leczenie immunosupresyjne [26]. Osoczowe stężenie wybranych białek badano w chwili rozpoznania aGvHD, a następnie po 2 i 4 tygodniach leczenia immunosupresyjnego. Autorzy wykazali, że zaproponowany panel sześciu markerów pozwala przewidzieć brak odpowiedzi na terapię immunosupresyjną po 4 tygodniach leczenia oraz oszacować ryzyko NRM po 6 miesiącach od chwili rozpoczęcia leczenia aGvHD.

Według autorów opublikowanych doniesień prezentujących wyniki dużych, prospektywnych badań, w wyniku których odkryto i zwalidowano biomarkery aGvHD, aktualny stan wiedzy pozwala na planowanie prospektywnych badań II fazy, których celem będzie indywidualizacja leczenia immunosupresyjnego zarówno chorych z wysokim ryzykiem wystąpienia aGvHD, jak i chorych z już rozpoznaną aGVHD i wysokim ryzykiem niepowodzenia standardowej terapii

Tabela II – Panele osoczowych biomarkerów choroby przeszczep przeciw gospodarzowi
Table II – Biomarker panels of acute graft vs. host disease

Panel/badanie	Charakterystyka parametru	Znaczenie predykcyjne	Znaczenie diagnostyczne	Znaczenie prognostyczne	Populacja badana (liczba chorych)
Panel: IL-2R α , TNFR1, HGF, IL-8 Paczesy 2009 [23]	Wyższe stężenie w pierwszej dobie aGvHD	ND	aGvHD	↑ NRM, ↓ OS	HSCT MRD i URD (466)
Panel: IL-2R α , TNFR1, elafina Paczesy 2010 [25]	Wyższe stężenie przed HSCT oraz w dniach +7. i +14.	aGvHD 2–4	ND	ND	HSCT URD (513)
Panel: IL-2R α , TNFR1, elafina, HGF, IL-8, REG3 α Levine 2012 [26]	Wyższe stężenie w pierwszej dobie aGvHD oraz w 14. i 28. dobie leczenia	ND	ND	Brak odpowiedzi na leczenie, ↑ NRM	HSCT MRD i URD (112)

Skróty: TNFR1 – receptor dla TNF typu 1, IL – interleukina, IL-2R α – łańcuch α rozpuszczalnego receptora dla interleukiny 2, REG3 α – białko *regenerating-islet-derived-3- α* , aGvHD – ostra choroba przeszczep-przeciw-gospodarzowi, HSCT MRD – przeszczepienie macierzystych komórek krwiotwórczych od zgodnego dawcy rodzinnego, HSCT URD – przeszczepienie macierzystych komórek krwiotwórczych od dawcy niespokrewnionego, NRM – śmiertelność niezwiązana z nawrotem, OS – przeżycie całkowite, ND – brak danych.

immunosupresyjnej [6]. Przeprowadzenie takich badań musi być jednak poprzedzone walidacją zidentyfikowanych biomarkerów w różnych rodzajach alloHSCT, z uwzględnieniem m.in. sposobu kondycjonowania, rodzaju dawcy i źródła komórek krwiotwórczych. Realizacja tego zadania wymaga przeprowadzenia prospektywnych wieloosrodkowych badań obejmujących bardzo duże grupy chorych.

Komórki układu immunologicznego

Powrót do stanu prawidłowego liczby i funkcji komórek układu immunologicznego jest jednym z ważnych czynników wpływających na wyniki alloHSCT. Normalizacja liczby granulocytów, monocytów i komórek NK następuje zwykle w ciągu kilku pierwszych tygodni po transplantacji, natomiast zaburzenia dotyczące liczby krążących limfocytów T i B trwają zwykle znacznie dłużej i występują przez kilka, a nawet kilkanaście miesięcy po przeszczepieniu. Jeszcze bardziej opóźniony może być powrót do stanu prawidłowego funkcji limfocytów T. Wczesny szybki wzrost bezwzględnej liczby limfocytów, jak również liczby limfocytów T CD4+ po alloHSCT jest korzystnym czynnikiem prognostycznym związanym z niższą NRM, dłuższym przeżyciem wolnym od białaczki i przeżyciem całkowitym [27–29]. Wśród subpopulacji komórek limfoidalnych poszukuje się również biomarkerów aGvHD o znaczeniu diagnostycznym lub prognostycznym. Na modelach zwierzęcych udokumentowano kluczową rolę limfocytów T regulatorowych CD4+CD25+Foxp3+ we wzmacnianiu tolerancji immunologicznej oraz zabezpieczeniu przed GvHD. Wyniki badań klinicznych prowadzonych u chorych poddawanych alloHSCT prowadzą jednak do rozbieżnych wniosków. Magenau i wsp. z University of Michigan wykazali odwrotną korelację odsetka limfocytów T CD4+CD25+Foxp3+ ocenianego w początkowym okresie aGvHD ze stopniem ciężkości powikłania [30]. Wysoki odsetek limfocytów T regulatorowych wykazywał ponadto związek z odpowiedzią na leczenie immunosupresyjne. Autorzy stwierdzili również, że odsetek komórek CD4+CD25+Foxp3+ <0,5% jest niezależnym niekorzystnym czynnikiem prognostycznym dla przeżycia całkowitego chorych z aGvHD. Spostrzeżeń Magenau i wsp. nie potwierdziły wyniki badania zespołu z Seattle. Lord i wsp. oceniali odsetek limfocytów T regulatorowych we krwi i błonie śluzowej żołądka u chorych po alloHSCT, u których przeprowadzono gastroskopię z powodu objawów chorobowych związanych z górnym odcinkiem przewodu pokarmowego [31]. Autorzy nie wykazali związku pomiędzy odsetkiem komórek CD4+CD25+Foxp3+ a rozpoznaniem lub ciężkością jelitowej postaci aGvHD. Inną subpopulacją limfocytów ocenianą jako potencjalny laboratoryjny marker aGvHD są klasyczne komórki NKT (*invariant natural killer T cells*; iNKT), których rekonstrukcja po alloHSCT poprzedza rekonstrukcję limfocytów T [32]. Wykazano, że wyższy stosunek komórek iNKT do T ($>0,58 \times 10^{-3}$) w 15. dobie po alloHSCT jest związany z niższym ryzykiem wystąpienia aGvHD [32].

Interpretację wyników badań dotyczących przydatności oznaczania subpopulacji komórek układu immunologicznego w przewidywaniu ryzyka aGvHD i wyników alloHSCT znacznie utrudnia różnorodna metodologia stosowana przez zespoły badawcze, a także znaczna heterogenność badanych grup

pod względem źródła przeszczepianych komórek krwiotwórczych, rodzaju dawcy i sposobu kondycjonowania. Jednak z uwagi na kluczową rolę komórek układu odpornościowego w rozwoju aGvHD warto śledzić dalsze kierunki rozwoju tych badań.

Biomarkery przewlekłej GvHD

W roku 2006 grupa robocza *National Institutes of Health* opracowała kryteria wyboru i charakterystykę potencjalnych optymalnych biomarkerów cGvHD [33]. Pomimo opublikowanych rekomendacji dotyczących dalszego kierunku poszukiwań dotychczas nie przeprowadzono walidacji potencjalnych biomarkerów w dużych, prospektywnych badaniach. Poszukiwania biomarkerów wśród prozapalnych białek osoczkowych pozwoliły na wykazanie zwiększonego stężenia TNF- α i IFN- γ w okresie poprzedzającym wystąpienie postaci rozległej cGvHD [34], a także wzrostu stężenia IL-2R α we wczesnym okresie cGvHD [35, 36]. Potencjalne biomarkery cGvHD poszukiwane są także wśród cytokin odpowiedzi typu Th2, która wydaje się mieć kluczowe znaczenie w patogenezie cGvHD [37, 38]. Wykazano znamienne wyższe stężenie IL-10 u chorych z cGvHD w porównaniu z chorymi bez cGvHD [37, 38]. Dotychczas jednak nie przeprowadzono badań walidacyjnych, które pozwoliłyby ustalić przydatność kliniczną poczynionych obserwacji. Pratt i wsp. z Calgary opublikowali wyniki bardziej zaawansowanej pracy badawczej dotyczącej IL-15, cytokiny stymulującej proliferację komórek NK i NKT. Autorzy wykazali związek stężenia IL-15 w 7. dniu po alloHSCT z ryzykiem wystąpienia cGvHD [39]. Zespół ten przeprowadził następnie badanie mające na celu walidację odkrytego biomarkera. Wykazano, że niskie stężenie IL-15 (<30,6 ng/L) wiąże się z ponad trzykrotnym wzrostem ryzyka wystąpienia cGvHD. Próby ustalenia wartości klinicznej oznaczania potencjalnych biomarkerów są utrudnione poprzez bliski związek cGvHD z reakcją GVL, w przebiegu której komórki układu immunologicznego dawcy mogą skutecznie zwalczać komórki nowotworowe biorcy. Istotną rolę w patofizjologii cGvHD odgrywa nie tylko odpowiedź limfocytów T na allogeniczne antygeny zgodności tkankowej, ale również aktywacja autoreaktywnych limfocytów B indukowana prawdopodobnie przez limfocyty T. Jako potencjalne biomarkery cGvHD wskazywane były regulatorowe limfocyty T CD4+CD25+FOXP3+, limfocyty Th17, monocyty, komórki NK i różne subpopulacje limfocytów B. Rola limfocytów T regulatorowych CD4+CD25+FOXP3+ jako biomarkera cGvHD pozostaje niejasna. Wyniki opublikowanych badań są sprzeczne. Zespoły badawcze pracujące nad tym zagadnieniem donoszą zarówno o podwyższonej [40], jak i obniżonej [38] lub niezminionej [41] liczbie tych komórek w cGvHD. Rozbieżności te wymagają wyjaśnienia na drodze dalszych badań. W ostatnich latach wskazuje się na powiązanie pomiędzy limfocytami T regulatorowymi a limfocytami Th produkującymi IL-17 [42, 43]. Limfocyty Th17 wskazywane są jako potencjalne biomarkery cGvHD [42]. Szczególne zainteresowanie w ostatnich latach skupia się na komórkach B i ich aktywacji. U chorych z cGvHD stwierdzono niższą bezwzględną liczbę limfocytów B w porównaniu z chorymi po alloHSCT bez objawów cGvHD, natomiast wyższe stężenie

czynnika aktywującego komórki B (BAFF) [44, 45]. Wykazano ponadto zwiększoną ekspresję molekuly kostymulującej CD86 po stymulacji receptora TLR9 (Toll-like receptor 9) limfocytów B chorych z cGvHD [46]. W patogenezie cGvHD, poza nasiloną aktywacją limfocytów B, prawdopodobnie odgrywa również rolę zaburzenie proporcji pomiędzy niedojrzałymi limfocytami B a komórkami pamięci [45, 47, 48]. Opóźniony powrót do homeostazy komórek B może mieć kluczowe znaczenie dla nadmiernej aktywacji autoreaktywnych limfocytów B w cGvHD [45]. Subpopulacje limfocytów B jako potencjalne biomarkery cGvHD wymagają dalszej walidacji dla pełniejszej oceny ich znaczenia diagnostycznego i prognostycznego.

Dalsze kierunki badań nad biomarkerami GvHD

Biomarkery GvHD mogą w przyszłości mieć istotny wpływ na indywidualizację leczenia chorych poddawanych alloHSCT. Dotychczasowe wysiłki badawcze skupiają się głównie na poszukiwaniu i walidacji biomarkerów ostrej GvHD. Wykazana wysoka specyficzność i wartość predykcyjna odkrytych paneli biomarkerów osoczowych aGvHD pozwala na planowanie dalszych prospektywnych badań nad celowością wprowadzenia terapii wyprzedzającej i zintensyfikowania leczenia aGvHD na podstawie uzyskanych wyników wybranych paneli testów laboratoryjnych. Odkryte biomarkery aGvHD mogą stać się w przyszłości również celem dla nowych leków immunosupresyjnych specyficznych dla aGvHD. Prace dotyczące poszukiwania i walidacji biomarkerów cGvHD są mniej zaawansowane. Wynika to częściowo z nie w pełni poznanej patogeny cGvHD. Rola limfocytów T regulatorowych i zaburzenie równowagi pomiędzy odpowiedzią Th1 i Th2 oraz ich potencjalne znaczenie jako biomarkerów cGvHD muszą być wyjaśnione na drodze dalszych badań. Gromadzone są coraz liczniejsze dowody na istotną rolę limfocytów B w patogenezie cGvHD. Badania nad znaczeniem subpopulacji limfocytów B i czynnika aktywującego komórki B jako potencjalnych biomarkerów cGvHD mogą prowadzić do szerszego zastosowania rituksymabu w profilaktyce GvHD. Dotychczas wykryte potencjalne biomarkery cGvHD wymagają jednak walidacji w dalszych prospektywnych badaniach.

Konflikt interesu/Conflict of interest

Nie występuje.

Finansowanie/Financial support

Nie występuje.

Etyka/Ethics

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

PIŚMIENNICTWO/REFERENCES

- [1] Flowers ME, Inamoto Y, Carpenter PA, et al. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood* 2011;117(11):3214–3219.
- [2] Jagasia M, Arora M, Flowers ME, et al. Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2012;119(1):296–307.
- [3] Lee SJ, Klein J, Haagenson M, et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood* 2007;110(13):4576–4583.
- [4] Arora M, Burns LJ, Davies SM, et al. Chronic graft-versus-host disease: a prospective cohort study. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003;9(1):38–45.
- [5] Stern M, Passweg JR, Locasciulli A, et al. Influence of donor/recipient sex matching on outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for aplastic anemia. *Transplantation* 2006;82(2):218–226.
- [6] Paczesny S. Discovery and validation of graft-versus-host disease biomarkers. *Blood* 2013;121(4):585–594.
- [7] Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009;373(9674):1550–1561.
- [8] Shaiegan M, Irvani M, Babae GR, Ghavamzadeh A. Effect of IL-18 and sIL2R on aGVHD occurrence after hematopoietic stem cell transplantation in some Iranian patients. *Transpl Immunol* 2006;15(3):223–227.
- [9] Remberger M, Ringden O, Markling L. TNF alpha levels are increased during bone marrow transplantation conditioning in patients who develop acute GVHD. *Bone Marrow Transplant* 1995;15(1):99–104.
- [10] Liu D, Yan C, Xu L, et al. Diarrhea during the conditioning regimen is correlated with the occurrence of severe acute graft-versus-host disease through systemic release of inflammatory cytokines. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16(11):1567–1575.
- [11] Choi SW, Kitko CL, Braun T, et al. Change in plasma tumor necrosis factor receptor 1 levels in the first week after myeloablative allogeneic transplantation correlates with severity and incidence of GVHD and survival. *Blood* 2008;112(4):1539–1542.
- [12] Kitko CL, Paczesny S, Yanik G, et al. Plasma elevations of tumor necrosis factor-receptor-1 at day 7 postallogeneic transplant correlate with graft-versus-host disease severity and overall survival in pediatric patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14(7):759–765.
- [13] August KJ, Chiang KY, Bostick RM, et al. Biomarkers of immune activation to screen for severe, acute GVHD. *Bone Marrow Transplant* 2011;46(4):601–604.
- [14] Malone FR, Leisenring WM, Storer BE, et al. Prolonged anorexia and elevated plasma cytokine levels following myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplant. *Bone Marrow Transplant* 2007;40(8):765–772.
- [15] Uguccioni M, Meliconi R, Nesci S, et al. Elevated interleukin-8 serum concentrations in beta-thalassemia and graft-versus-host disease. *Blood* 1993;81(9):2252–2256.
- [16] Mohty M, Blaise D, Faucher C, et al. Inflammatory cytokines and acute graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2005;106(13):4407–4411.
- [17] Foley R, Couban S, Walker I, et al. Monitoring soluble interleukin-2 receptor levels in related and unrelated donor

- allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1998;21(8):769-773.
- [18] Schots R, Kaufman L, Van Riet I, et al. Proinflammatory cytokines and their role in the development of major transplant-related complications in the early phase after allogeneic bone marrow transplantation. *Leukemia* 2003; 17(6):1150-1156.
- [19] Holler E, Kolb HJ, Moller A, et al. Increased serum levels of tumor necrosis factor alpha precede major complications of bone marrow transplantation. *Blood* 1990;75(4):1011-1016.
- [20] Luft T, Conzelmann M, Benner A, et al. Serum cytokeratin-18 fragments as quantitative markers of epithelial apoptosis in liver and intestinal graft-versus-host disease. *Blood* 2007;110(13):4535-4542.
- [21] Harris AC, Ferrara JL, Braun TM, et al. Plasma biomarkers of lower gastrointestinal and liver acute GVHD. *Blood* 2012;119(12):2960-2963.
- [22] Okamoto T, Takatsuka H, Fujimori Y, et al. Increased hepatocyte growth factor in serum in acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 2001;28(2):197-200.
- [23] Paczesny S, Krijanovski OI, Braun TM, et al. A biomarker panel for acute graft-versus-host disease. *Blood* 2009; 113(2):273-278.
- [24] Paczesny S, Braun TM, Levine JE, et al. Elafin is a biomarker of graft-versus-host disease of the skin. *Sci Transl Med* 2010;2(13):13ra2.
- [25] Paczesny S, Braun T, Lugt MV, et al. Three Biomarker Panel at Day 7 and 14 Can Predict Development of Grade II-IV Acute Graft-Versus-Host Disease. In *Bood ASH Annual Meeting Abstracts*; 2010;675.
- [26] Levine JE, Logan BR, Wu J, et al. Acute graft-versus-host disease biomarkers measured during therapy can predict treatment outcomes: a Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network study. *Blood* 2012;119(16):3854-3860.
- [27] Le Blanc K, Barrett AJ, Schaffer M, et al. Lymphocyte recovery is a major determinant of outcome after matched unrelated myeloablative transplantation for myelogenous malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009; 15(9):1108-1115.
- [28] 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(10):1216-1223.
- [29] Montero A, Savani BN, Shenoy A, et al. T-cell depleted peripheral blood stem cell allotransplantation with T-cell add-back for patients with hematological malignancies: effect of chronic GVHD on outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12(12):1318-1325.
- [30] Magenau JM, Qin X, Tawara I, et al. Frequency of CD4(+) CD25(hi)FOXP3(+) regulatory T cells has diagnostic and prognostic value as a biomarker for acute graft-versus-host-disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16(7): 907-914.
- [31] Lord JD, Hackman RC, Gooley TA, et al. Blood and gastric FOXP3+ T cells are not decreased in human gastric graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17(4):486-496.
- [32] Rubio MT, Moreira-Teixeira L, Bachy E, et al. Early posttransplantation donor-derived invariant natural killer T-cell recovery predicts the occurrence of acute graft-versus-host disease and overall survival. *Blood* 2012; 120(10):2144-2154.
- [33] Schultz KR, Miklos DB, Fowler D, et al. Toward biomarkers for chronic graft-versus-host disease: National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: III. Biomarker Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12(2):126-137.
- [34] Ritchie D, Seconi J, Wood C, et al. Prospective monitoring of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma to predict the onset of acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11(9):706-712.
- [35] Fujii H, Cuvelier G, She K, et al. Biomarkers in newly diagnosed pediatric-extensive chronic graft-versus-host disease: a report from the Children's Oncology Group. *Blood* 2008;111(6):3276-3285.
- [36] Kobayashi S, Imamura M, Hashino S, et al. Clinical relevance of serum soluble interleukin-2 receptor levels in acute and chronic graft-versus-host disease. *Leuk Lymphoma* 1997;28(1-2):159-169.
- [37] Tanaka J, Imamura M, Kasai M, et al. Th2 cytokines (IL-4, IL-10 and IL-13) and IL-12 mRNA expression by concanavalin A-stimulated peripheral blood mononuclear cells during chronic graft-versus-host disease. *Eur J Haematol* 1996;57(1):111-113.
- [38] Skert C, Damiani D, Michelutti A, et al. Kinetics of Th1/Th2 cytokines and lymphocyte subsets to predict chronic GVHD after allo-SCT: results of a prospective study. *Bone Marrow Transplant* 2009;44(11):729-737.
- [39] Pratt LM, Liu Y, Ugarte-Torres A, et al. IL15 levels on day 7 after hematopoietic cell transplantation predict chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant* 2013;48(5):722-728.
- [40] Clark FJ, Gregg R, Piper K, et al. Chronic graft-versus-host disease is associated with increased numbers of peripheral blood CD4+CD25high regulatory T cells. *Blood* 2004;103(6):2410-2416.
- [41] Meignin V, Peffault de Latour R, Zuber J, et al. Numbers of Foxp3-expressing CD4+CD25high T cells do not correlate with the establishment of long-term tolerance after allogeneic stem cell transplantation. *Exp Hematol* 2005;33(8):894-900.
- [42] Dander E, Balduzzi A, Zappa G, et al. Interleukin-17-producing T-helper cells as new potential player mediating graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem-cell transplantation. *Transplantation* 2009;88(11):1261-1272.
- [43] Ratajczak P, Janin A, Peffault de Latour R, et al. Th17/Treg ratio in human graft-versus-host disease. *Blood* 2010;116(7):1165-1171.
- [44] Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, et al. High levels of B-cell activating factor in patients with active chronic graft-versus-host disease. *Clin Cancer Res* 2007;13(20):6107-6114.
- [45] Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, et al. Altered B-cell homeostasis and excess BAFF in human chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2009;113(16):3865-3874.
- [46] She K, Gilman AL, Aslanian S, et al. Altered Toll-like receptor 9 responses in circulating B cells at the onset of extensive chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13(4):386-397.
- [47] Greinix HT, Pohlreich D, Kouba M, et al. Elevated numbers of immature/transitional CD21- B lymphocytes and deficiency of memory CD27+ B cells identify patients with active chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14(2):208-219.
- [48] D'Orsogna LJ, Wright MP, Krueger RG, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients have defects of both switched and igm memory B cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15(7):795-803.