



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Haematologica Polonica

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

Praca oryginalna/Original Research Article

Interferon γ i interleukina-2 a ostra choroba przeszczep-przeciw-gospodarzowi i powikłania infekcyjne u pacjentów po allogenicznnej transplantacji komórek krwiotwórczych

Interferon- γ and interleukin-2 in patients with acute graft-versus-host disease and infectious complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Malwina Rybicka^{1,*}, Mirosław Markiewicz¹, Elżbieta Pietruszka¹, Karol Goraus¹, Aleksandra Suszka-Świtek², Ryszard Wiaderkiewicz², Sylwia Mizia³, Monika Dzierżak-Mietła¹, Krzysztof Białas¹, Sławomira Kyrz-Krzemień¹

¹Katedra i Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku, Wydział Lekarski w Katowicach Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, Polska

²Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Wydział Lekarski w Katowicach Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, Polska

³Katedra Zdrowia Publicznego, Zakład Organizacji i Zarządzania, Wydział Nauk o Zdrowiu Wrocławskiego Uniwersytetu Medycznego, Wrocław, Polska



INFORMACJE O ARTYKULE

Historia artykułu:

Otrzymano: 29.03.2016

Zaakceptowano: 19.04.2016

Dostępne online: 25.04.2016

Słowa kluczowe:

- interleukina-2
- interferon- γ
- ostra białaczka szpikowa
- allogeniczna transplantacja komórek krwiotwórczych
- ostra choroba przeszczep-przeciw-gospodarzowi

A B S T R A C T

Introduction: The allogeneic Hematopoietic Stem Cells Transplantation (alloHSCT) is associated with the risk of Graft versus Host Disease (GvHD) and infections. The pathogenesis of acute GvHD is related to T-lymphocytes, which identify alloantigens on host's Antigen Presenting Cells, induce production of IFN- γ and IL-2, recruit the immunological effector cells and destroy tissues and organs. **Aim:** The aim of the study was to analyse the relationship between IL-2 and IFN- γ serum concentrations and acute GvHD and infections. **Material and methods:** The study involved 62 patients, 30 (48%) male and 32 (52%) female, aged at median 49.5 (19–68) years, after alloHSCT from sibling (n = 12) or from unrelated donor (n = 50) performed for acute myeloid leukemia (AML) with myeloablative conditioning (n = 26, 42%) and with non-myeloablative conditioning (n = 36, 58%) in Katowice in years 2012–2014. All patients received standard immunosuppressive therapy with cyclosporin-A and methotrexate plus pre-transplant anti-thymocyte globulin in unrelated setting. Blood samples were collected pre-transplant before start and

* Adres do korespondencji: SP Szpital Kliniczny im. A. Mielęckiego SUM, ul. Dąbrowskiego 25, 40-032 Katowice, Polska. Tel.: +48 25-91-281.

Adres email: malwina.rybicka@gmail.com (M. Rybicka).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.achaem.2016.04.005>

0001-5814/© 2016 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Sp. z o.o. All rights reserved.

Keywords:

- Interleukin-2
- Interferon- γ
- Acute Myeloid Leukemia
- Allogeneic stem cell transplantation
- Acute graft-versus-host disease

after (on day -1) the conditioning therapy and on days +2 +4, +6, +10, +20, +30 after alloHSCT. The IL-2 and IFN- γ serum concentrations were determined with use of ELISA assay. Before statistical analysis patients were divided into 4 groups according to the presence of acute GvHD and clinical manifestation of bacterial, viral or fungal infection. **Results:** Group I – patients with neither acute GvHD nor infectious complications, n = 15 (24%), group II – patients with infectious complications without acute GvHD, n = 17 (27%), group III – patients with acute GvHD without infectious complications, n = 9 (15%), and group IV – patients with both acute GvHD and infectious complications, n = 21 (34%). IFN- γ levels were higher in group II than in other groups on days +20 (p = 0.014) and +30 (p = 0.008). The POST-HOC tests revealed lower levels of IFN- γ on day +30 in group I (p = 0.039) and in group IV (p = 0.017) as compared to group II. The concentration of IL-2 was undetectable in almost all patients at all studied time points. **Conclusion:** Serum concentration of IFN- γ following alloHSCT gradually increases. High serum concentration of IFN- γ is related to infectious complications rather than to acute GvHD. Undetectable serum concentration of IL-2 in majority of patients prevents from drawing conclusions.

© 2016 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Sp. z o.o. All rights reserved.

Wstęp

Procedura allogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych (*Allogeneic Hematopoietic Stem Cells Transplantation*; alloHSCT) jest obarczona ryzykiem powikłań, takich jak choroba przeszczep-przeciw-gospodarzowi (*Graft versus Host Disease*; GvHD) oraz infekcje. Choroba przeszczep-przeciw-gospodarzowi jest jednym z najważniejszych i potencjalnie śmiertelnych powikłań po allogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych. Obserwuje się ją zarówno po transplantacjach od dawcy spokrewnionego, jak i niespokrewnionego. Występuje w dwóch postaciach: ostrej (*Acute Graft versus Host Disease*; aGvHD) i przewlekłej (*Chronic Graft versus Host Disease*; cGvHD). Za komórki układu odpornościowego indukujące GvHD uznano limfocyty T dawcy, które są aktywowane przez klasyczne antygeny zgodności tkankowej (*Human Leukocyte Antigens*; HLA) w przypadku przeszczepień od nie w pełni zgodnych dawców lub przez słabe antygeny zgodności tkankowej w przypadku przeszczepień od w pełni zgodnych dawców [1, 2]. Koncepcja patofizjologiczna ostrej choroby przeszczep przeciw gospodarzowi stworzona przez Ferrare i wsp. [3] zakłada, że patogeniza aGvHD związana jest z trzema następującymi po sobie etapami: w pierwszej fazie przedprzeszczepowe leczenie kondycjonujące prowadzi do uszkodzenia i aktywacji tkanek gospodarza wraz z indukcją cytokin prozapalnych TNF- α i IL-1, a następnie aktywacji komórek dendrytycznych gospodarza (*Antigen Presenting Cells*; APC). W drugiej fazie limfocyty T, które rozpoznają alloantygeny na komórkach gospodarza, inicjują tzw. „burzę cytokinową”, w tym sekrecję interferonu (IFN) γ i interleukiny (IL) 2 oraz rekrutują komórki efektorowe układu odpornościowego i w następstwie w trzeciej fazie następuje uszkodzenie tkanek oraz narządów poprzez proces zapalny indukowany cytokinami produkowanymi przez zasiedlające je aktywowane limfocyty T cytotoksyczne, NK i makrofagi. IFN- γ i IL-2 są kluczowymi cytokinami wyzwalającymi reakcję przeszczep-przeciw-gospodarzowi poprzez zwielokrotnioną aktywację komórek układu immunologicznego w odpowiedzi na alloantygeny [4].

Cel

Celem badania była analiza związku pomiędzy stężeniem w surowicy krwi cytokin (IFN- γ i IL-2) a ostrą GvHD i infekcją.

Materiał i metody

Badaniem objęto 62 pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki szpikowej poddanych allogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych w latach 2012–2014 na Oddziale Hematologii i Transplantacji Szpiku Samodzielnego Publicznego Szpitala Klinicznego Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach. Wśród badanych było 30 (48%) mężczyzn i 32 (52%) kobiety, w wieku od 19 do 68 lat (mediana 49,5). Czas od rozpoznania do przeszczepienia wynosił od 4 miesięcy do 10 lat (mediana 11 miesięcy), przy czym w momencie przeszczepienia 54 (87%) pacjentów było w pełnej remisji (*Complete Remission*; CR), 3 (5%) w częściowej remisji (*Partial Remission*; PR), a pozostali remisji nie osiągnęli. Leczenie kondycjonujące przebiegało wg następujących schematów: TreoFluATG (n = 26, 42%), BuCyATG (n = 14, 23%), BuCy (n = 6, 10%), TreoFlu (n = 5, 8%), TBICyATG (n = 5, 8%), BuFluATG (n = 3, 5%) oraz w pojedynczych przypadkach TreoFluThymo, BuFlu, BuCyThymo, z czego protokół mieloablacyjny (*Myeloablative Conditioning*; MAC) stanowił 42% (n = 26), a nie-mieloablacyjny (*Reduced Intensity Conditioning*; RIC) 58% (n = 36). Pięćdziesięciu (81%) pacjentów otrzymało komórki krwiotwórcze od dawcy niespokrewnionego (*Unrelated Donor Hematopoietic Stem Cells Transplantation*; URDHSCT), pozostali (n = 12, 19%) od dawcy spokrewnionego (*Sibling Hematopoietic Stem Cells Transplantation*; sibHSCT). Wszyscy pacjenci zostali poddani standardowej terapii immunosupresyjnej, w tym w 95% przypadków opartej na cyklosporynie i metotreksacie rozszerzonej o globulinę antytymocytarną w przypadku przeszczepu od dawcy niespokrewnionego. aGvHD była rozpoznawana na podstawie kryteriów klinicznych i stopniowana wg skali Glucksberga. Powikłania infekcyjne rozpoznawano na

podstawie objawów klinicznych oraz wyników badań bakteriologicznych pobranych materiałów. Zgon w okresie pobytu szpitalnego po przeszczepieniu do +30 doby po alloHSCT nastąpił u 4 pacjentów (6%). Do badania pobierano od każdego pacjenta próbki krwi obwodowej w obj. 5 ml na skrzep w następujących punktach czasowych: przed rozpoczęciem leczenia kondycjonującego, po jego zakończeniu (doba -1) oraz po przeszczepieniu w dniach: +2 +4, +6, +10, +20, +30, o ile zgon nie nastąpił wcześniej. Pobraną krew natychmiast odwirowywano, a uzyskaną surowicę przechowywano w zamrożeniu, w temperaturze -80°C do czasu analizy. Stężenie IFN- γ i IL-2 w badanym materiale zostało oznaczone metodą ELISA.

Wyniki

Charakterystyki badanej populacji dokonano poprzez prezentację rozkładu procentowego wariantów zmiennych jakościowych, natomiast dla zmiennych ilościowych za pomocą mediany oraz zakresu. Stężenia analizowanych cytokin poddano wstępnej ocenie we wszystkich punktach pomiaru, wyliczając wartość średnią, medianę, odchylenie standardowe (*Standard Deviation*; SD) i błąd standardowy średniej (*Standard Error of the Mean*; SEM) oraz określając wartość minimalną i maksymalną. Ze względu na odnotowanie silnej asymetrii prawostronnej rozkładu cytokin, co skutkowało odrzuceniem hipotezy o normalności ich rozkładu weryfikowanej testem Shapiro-Wilka, w dalszych analizach za miarę tendencji centralnej przyjęto medianę, a rozstęp międzykwartylowy został użyty jako miara rozproszenia. Ponadto w testowaniu hipotez statystycznych posłużono się procedurami nieparametrycznymi. Ze względu na mnogość wartości 0 analizowanych cytokin, zmienne określające wartość ich stężeń w badanych punktach pomiaru zostały skategoryzowane nie tylko względem poziomów odcięcia określonych przez producenta zestawów (dla IL-2 7 pg/ml, dla IFN- γ 5 pg/ml), ale również względem wartości 0. Całość analizy statystycznej przeprowadzono na poziomie istotności 0,05. Za istotne statystycznie uznano wyniki, dla których p okazało się mniejsze niż 0,05 ($p < 0,05$), z zachowaniem 95% przedziału ufności (*Confidence Interval*; CI).

Pacjenci zostali skategoryzowani na 4 grupy w oparciu o wystąpienie aGvHD oraz infekcji (Tab. I). U pacjentów w grupie I ($n = 15$, 24%) nie stwierdzono objawów ostrej

Tabela I – Kategoryzacja pacjentów po alloHSCT ze względu na wystąpienie aGvHD i infekcji
Table I – Classification of aGvHD and infectious complications in patients after alloHSCT

Liczebność n (% ogółu)	Bez infekcji	Z infekcją	Ogółem
aGvHD 0	15 (24) (GRUPA I)	17 (27) (GRUPA II)	32 (52)
aGvHD I-III	9 (15) (GRUPA III)	21 (34) (GRUPA IV)	30 (48)
Ogółem	24 (39)	38 (61)	62 (100)

GvHD ani infekcji, w grupie II ($n = 17$, 27%) obserwowano u pacjentów powikłania infekcyjne po alloHSCT, bez ostrej GvHD, w grupie III ($n = 9$, 15%) wystąpiła u pacjentów ostra GvHD bez powikłań infekcyjnych, a w grupie IV ($n = 21$, 34%) stwierdzono u pacjentów zarówno ostrą GvHD, jak i infekcję. Analiza stężeń IFN- γ oznaczanych w kolejnych punktach pomiaru wykazała pojawienie się różnic pomiędzy grupami pacjentów w dniach +20 i +30 po alloHSCT (Tab. II). Istotnie wyższe wartości tej cytokiny zanotowano w grupie II w dniach +20 ($p = 0,014$) i +30 ($p = 0,008$) w porównaniu z pozostałymi grupami pacjentów. Na podstawie testów POST-HOC stwierdzono znamienne niższe stężenia IFN- γ w dniu +30 w grupie I ($p = 0,039$) i IV ($p = 0,017$) w stosunku do grupy II. Stężenie IL-2 było niewykrywalne prawie u wszystkich pacjentów we wszystkich punktach czasowych pomiaru. Na Ryc. 1 pokazano średnie stężenia IFN- γ przed i po alloHSCT w ww. 4 grupach pacjentów.

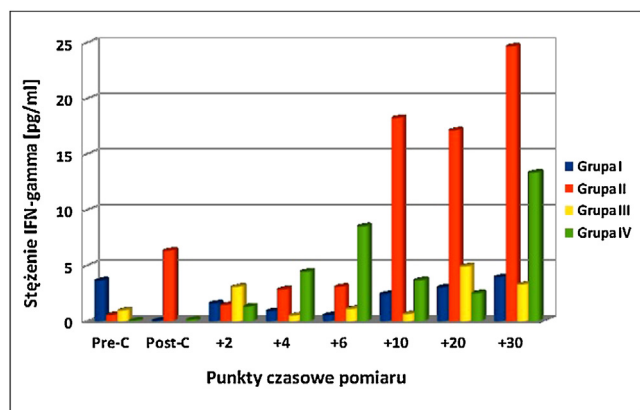
Omówienie

W niniejszej pracy przedstawiono profile stężeń IL-2 i IFN- γ w zależności od występowania objawów ostrej choroby przeszczep przeciw gospodarzowi oraz powikłań infekcyjnych po alloHSCT. W niniejszym doniesieniu stężenie cytokin badano we wczesnym okresie po alloHSCT obejmującym pierwsze 30 dni po przeszczepieniu. Przed, w trakcie i po pobraniu krwi do oznaczenia cytokin nie stymulowano komórek je wydzielających substancjami mitogennymi (LPS – Lipopolysaccharide, PHA – Phytohemagglutinin), pozwala to uznać uzyskane stężenia cytokin i ich profile za odzwierciedlenie rzeczywistych ich wartości u pacjentów poddanych alloHSCT. Niskie stężenia IFN- γ i IL-2 wykazane w badaniu przed i po alloHSCT oraz niewielki odsetek

Tabela II – Stężenie IFN- γ [pg/ml] w surowicy krwi pacjentów skategoryzowanych ze względu na wystąpienie aGvHD i infekcji
Table II – IFN- γ serum concentrations [pg/ml] in patients with aGVHD and infection

Stężenie IFN- γ [pg/ml]								
Mediana (Q1-Q3)	Pre-C	Post-C (doba -1)	+2	+4	+6	+10	+20	+30
GRUPA I	0 (0-1,50)	0 (0-0)	0 (0-0,50)	0 (0-0,58)	0 (0-0)	0 (0-0,63)	0 (0-3,97)	0 (0-3,00)
GRUPA II	0 (0-0)	0 (0-1,63)	0 (0-1,52)	0 (0-1,25)	0 (0-1,10)	0 (0-1,52)	8,25 (0,28-30,46)	17,58 (3,00-46,12)
GRUPA III	0 (0-0,84)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-3,83)	1,05 (0-6,78)
GRUPA IV	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0,52)	0 (0-3,45)	0 (0-12,7)	0 (0-4,32)	0,22 (0-2,51)	0 (0-4,30)
Test Kruskala i Wallisa (p)	0,305	0,077	0,714	0,431	0,123	0,517	0,014	0,008

Pre-C – przed leczeniem kondycjonującym; Post-C – po leczeniu kondycjonującym; Q1 – kwartył 1; Q3 – kwartył 3.



Ryc. 1 – Średnie stężenia IFN- γ [pg/ml] przed i po alloHSCT w 4 grupach pacjentów

Fig. 1 – IFN- γ mean serum concentrations of [pg/ml] before and after alloHSCT in 4 groups of patients

pacjentów ze stężeniem tych cytokin powyżej poziomu odcięcia uznanego jako wynik pozytywny mogą być spowodowane głęboką pancytopenią występującą po leczeniu kondycjonującym i po zastosowaniu ATG (Antithymocyte Globulin), która skutkuje brakiem komórek produkujących cytokiny. Ponadto, stosowana immunosupresja wpływa na upośledzenie funkcji komórek układu krwiotwórczego i wydzielania przez nie cytokin. Niskie stężenia IFN- γ i IL-2 mogą świadczyć poniekąd o skutecznym leczeniu immunosupresyjnym. Natomiast od 20. dnia po alloHSCT, wraz z postępującą rekonstrukcją komórek układu krwiotwórczego, stężenia cytokin stopniowo wzrastały.

W niniejszym opracowaniu stężenia badanych cytokin były niskie i wśród niewielkiego odsetka pacjentów przekroczyły wartość punktu odcięcia uznaną za wynik pozytywny. Może być to związane z dysfunkcją limfocytów spowodowaną intensywnym leczeniem AML. U pacjentów z AML limfocyty T wykazują zaburzenia genetyczne i zaburzenia fenotypu oraz upośledzenie swojej funkcji i zmniejszenie liczby komórek [5]. Udowodniono, że może się to wiązać z dysfunkcją receptora limfocytów T (TCR) (szczególnie podjednostki ζ), którego uszkodzenie powoduje zmniejszenie obrony immunologicznej w białaczkach. Ponadto limfocyty T, zwłaszcza z receptorem TCR V β , u pacjentów z AML nie ulegają pełnej regeneracji po leczeniu indukującym [6, 7]. Dodatkowo długotrwała stymulacja antygenowa limfocytów T doprowadza do „wyczerpania” tych komórek, które charakteryzuje się utratą zdolności limfocytów T do wydzielania cytokin, takich jak: IL-2, TNF- α i IFN- γ , proliferacji i wyzwalania reakcji cytotoksycznych [8].

Sadeghi i wsp. [9] przedstawili w swojej pracy model myszy aGvHD oparty na kondycjonowaniu za pomocą wysokodawkowanej chemioterapii. Zwierzęta poddano kondycjonowaniu, a następnie podzielono na dwie grupy. Grupę I stanowiły zwierzęta, które poddano przeszczepieniu allogenicznemu, a grupę II zwierzęta, które otrzymały przeszczep syngeniczny. W okresie poprzyszczepowym codziennie pobierano próbkę krwi oraz badano zwierzęta pod kątem objawów aGvHD, a następnie, dla potwierdzenia obecności

aGvHD, próbki zajętych organów były badane histopatologicznie. Autorzy nie stosowali leczenia immunosupresyjnego w okresie poprzyszczepowym. Okres regeneracji komórek szpiku wykazywał zmienność w zależności od typu przeszczepienia: u myszy po przeszczepieniu syngenicznym był on szybszy i trwał krócej niż u osobników po przeszczepieniu allogenicznym (początek regeneracji w +1 dobie, szczyt w +5 dobie i koniec w +21, natomiast u myszy po przeszczepieniu allogenicznym nie nastąpiła pełna regeneracja do +21 doby). Na podstawie analizy zebranych próbek krwi autorzy badali rekonstrukcję komórek układu immunologicznego u myszy oraz kinetykę cytokin: IFN- γ , IL-2 i TNF- α we wczesnym okresie po przeszczepieniu. Udowodniono, że u osobników po przeszczepieniu allogenicznym proliferacja i dojrzewanie komórek dendrytycznych i limfocytów T CD8+ dawcy zachodziły szybciej w porównaniu z myszami po przeszczepieniu syngenicznym: odpowiednio od +3 dnia i od +5 dnia po przeszczepieniu. Badając kinetykę cytokin, autorzy obserwowali systematyczny wzrost ich stężeń (wszystkich cytokin) pokrywający się z tempem regeneracji komórek szpiku i pojawianiem się w krwiobiegu komórek dendrytycznych i limfocytów T. Wzrost stężeń cytokin był większy u osobników po przeszczepieniu allogenicznym, u których obserwowano aGvHD. Stwierdzono również, że stężenia ww. cytokin, wzrastając począwszy od niskiego stężenia w dniu przeszczepienia, osiągały najwyższy poziom w +5 dobie u myszy poddanych allogenicznemu przeszczepieniu komórek krwiotwórczych, które rozwinęły aGvHD, z następczym spadkiem stężenia w kolejnych dobach. U zwierząt po syngenicznym przeszczepieniu takiego zjawiska nie obserwowano.

W odróżnieniu od niniejszego opracowania autorzy przytoczonego powyżej badania, konstruując model badawczy, oparli go na badaniu myszy i nie uwzględnili w nim leczenia immunosupresyjnego, wobec tego przedstawiona kinetyka zmian stężeń cytokin, jak i rekonstrukcja komórek szpiku były pozbawione blokującego wpływu leków immunosupresyjnych na komórki układu immunologicznego i na wydzielanie cytokin. Odzwierciedla to opisana przez nich szybka regeneracja komórek szpiku z jednoczesnym wzrostem stężeń cytokin. W przedstawionym badaniu nie uwzględniono okresu przed leczeniem kondycjonującym, a czas obserwacji był krótszy i wynosił 21 dni po przeszczepieniu.

W badaniu przeprowadzonym przez Ju i wsp. [10] analizowano ekspresję cytokin na poziomie molekularnym i ekspresji białka u 30 pacjentów po allogenicznym przeszczepieniu komórek krwiotwórczych z krwi obwodowej (allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation; alloPBSCT). Grupa pacjentów objęta badaniem nie była homogenna pod względem choroby będącej wskazaniem do przeszczepienia. Jako leczenie kondycjonujące zastosowano mieloablacyjny schemat Cy+VP16+TBI, a cyklosporynę A + metotreksat jako profilaktykę aGvHD. Próbkę krwi pobierano od pacjentów przed alloPBSCT, w czasie wystąpienia objawów aGvHD oraz po opanowaniu farmakologicznym objawów tejże choroby. Następnie próbki inkubowano przez 12 godzin w temp. 37°C, dodawano zawiesinę lipopolisacharydu i PHA, a następnie metodą ELISA mierzono stężenie cytokin: IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 i IL-18. U wszystkich pacjentów uzyskano regenerację układu białokrwińskiego

z medianą czasu regeneracji przypadającą w +17 dobie po alloPBSCT. Wśród 30 badanych pacjentów 16 nie rozwinęło aGvHD, 7 miało objawy aGvHD I stopnia, a u kolejnych 7 wystąpiła aGvHD II-IV stopnia. Ekspresja badanych cytokin, szczególnie IL-2 i IFN- γ , zarówno na poziomie mRNA, jak i białka, była znacząco wyższa u pacjentów z aGvHD. Wraz ze wzrostem stopnia ciężkości aGvHD obserwowano jej wzrost, a wraz z opanowaniem objawów aGvHD wyraźny spadek. W opisywanym badaniu korelacja między stężeniem białek ww. cytokin a objawami aGvHD była silniejsza niż między ekspresją ich mRNA a objawami tej choroby.

Autorzy ww. doniesienia, w odróżnieniu od niniejszej pracy, oznaczali stężenie badanych cytokin po stymulacji lipopolisacharydem i PHA, które zwiększają wydzielanie cytokin, uzyskując tym samym duże ich stężenie. Ponadto, mimo prowadzenia standardowego leczenia immunosupresyjnego, uzyskano wysokie stężenia IL-2 (>100 pg/ml), zarówno w grupie pacjentów z objawami aGvHD, jak i w grupie pacjentów bez objawów tej choroby. W niniejszym badaniu stężenie IL-2 pozostawało nieoznaczalne prawie u wszystkich pacjentów bez względu na obecność lub brak objawów aGvHD, a stężenie IFN- γ było wyższe w grupie pacjentów bez objawów aGvHD. Uzyskanie przez autorów wysokich stężeń IL-2 w obydwu grupach pacjentów z lub bez aGvHD, mimo stosowania standardowej immunosupresji, wskazuje na możliwy decydujący wpływ stymulacji LPS i PHA komórek układu immunologicznego na uzyskanie wysokich stężeń cytokin. Rzeczywisty obraz kinetyki zmian stężeń IL-2 i IFN- γ w okresie przeszczepowym u pacjentów rozwijających aGvHD jest przez to w przywołanej pracy zatarty.

Badaniem przeprowadzonym przez Visentainer i wsp. [11] objęto 13 chorych po alloHSCT od w pełni zgodnego dawcy, u których metodą ELISA w ciągu 15 tygodni po alloHSCT oznaczano w surowicy stężenia cytokin. Jedynie stężenie IL-10 i rozpuszczalnego receptora dla IL-2 było istotnie wyższe w grupie pacjentów z objawami aGvHD w porównaniu z grupą pacjentów bez objawów tej choroby. Ponadto, poziom rozpuszczalnego receptora dla IL-2 wzrastał w bezpośredniej korelacji z wszczepem komórek szpiku i początkiem objawów aGvHD.

Analizując związek IFN- γ z powikłaniami infekcyjnymi u pacjentów po alloHSCT, w niewielu dostępnych publikacjach znaleźć można dane prezentujące odmienne stanowiska na ten temat. W pracy Gayoso i wsp. [12] w grupie 26 pacjentów badano zależność między stężeniem IFN- γ a wystąpieniem infekcji CMV w okresie powyżej 6 miesięcy od alloHSCT. Jako profilaktykę aGvHD zastosowano cyklosporynę z metotreksatem u pacjentów po kondycjonowaniu mieloablacyjnym i cyklosporynę z mykofenolanem mofetilu po kondycjonowaniu RIC. Zakażenie CMV rozpoznawano na podstawie wykrycia DNA wirusa CMV metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). Oznaczenia wirusii CMV wykonywano dwa razy w tygodniu przez pierwszy miesiąc po alloHSCT, a następnie jeden raz w tygodniu. W przypadku stwierdzenia reaktywacji wirusa CMV pacjenta poddawano leczeniu walgancyklowirem. Próbkę krwi do badania pobierano od pacjentów po okresie 6 miesięcy od alloHSCT, wirowano i w supernatancie oznaczano stężenie IFN- γ metodą ELISA. Autorzy udowodnili, że u pacjentów, u których wystąpiła reaktywacja wirusa CMV, stężenie IFN- γ

było wyższe (>0,2 IU/ml) niż w grupie pacjentów bez reaktywacji tego wirusa.

Natomiast w doniesieniu Peng i wsp. [13] badano związek cytokin prozapalnych z wystąpieniem inwazyjnej infekcji grzybiczej u pacjentów po alloHSCT. Analizie poddano 47 pacjentów poddanych allo-HSCT z powodu różnych chorób hematologicznych oraz grupę kontrolną liczącą 40 zdrowych ochotników. Wszyscy otrzymali mieloablacyjne leczenie kondycjonujące, w tym 17 pacjentów z ATG, a 30 bez ATG. W leczeniu immunosupresyjnym zapobiegającym aGvHD zastosowano: u 30 chorych takrolimus z metotreksatem i mykofenolanem mofetilu, a u 17 cyklosporynę z metotreksatem i mykofenolanem mofetilu. Stężenia cytokin: IL-6, IL-10, IFN- γ , TGF- β oznaczano metodą ELISA w 1., 2. i 3. miesiącu po allo-HSCT, a inwazyjną infekcją grzybiczą rozpoznawano na podstawie objawów klinicznych i wyników badań laboratoryjnych. Na podstawie uzyskanych wyników autorzy stwierdzili, że stężenie IL-6 rosło stopniowo w czasie, aż do osiągnięcia wartości szczytowej w 2 miesiącu po alloHSCT, by następnie się obniżyć. W 3. miesiącu było jednak zdecydowanie wyższe u chorych po alloHSCT, w porównaniu z grupą kontrolną. Podobnie, porównując wyniki uzyskane u chorych po alloHSCT z grupą kontrolną, stężenie IL-10 wzrastało w okresie potransplantacyjnym, natomiast poziom TGF- β ulegał stopniowemu obniżaniu. W przypadku IFN- γ nie odnotowano istotnej zmienności stężenia tej cytokiny między analizowanymi grupami. Ponadto, nie udowodniono związku między wystąpieniem inwazyjnej infekcji grzybiczej a zmianami stężenia IFN- γ oraz pozostałych cytokin.

W wyżej przytoczonych publikacjach autorzy skupili uwagę na wykazaniu zależności między jednym, wybranym powikłaniem infekcyjnym a stężeniem konkretnych cytokin prozapalnych. Grupy badanych nie były homogenne pod względem jednostki chorobowej będącej wskazaniem do alloHSCT, oznaczenia cytokin przeprowadzono w późnym okresie potransplantacyjnym oraz nie uwzględniono wpływu GvHD i innych powikłań infekcyjnych, głównie bakteryjnych, na uzyskiwane wyniki. W odróżnieniu do niniejszej pracy, w której badano zależność między stężeniem cytokin a powikłaniami infekcyjnymi i aGvHD we wczesnym okresie po alloHSCT, przywołane powyżej badania odzwierciedlają kinetykę zmian stężeń cytokin późnego okresu po alloHSCT w odniesieniu do wybranych powikłań infekcyjnych, bez uwzględnienia wczesnego okresu przeszczepowego. W niniejszej pracy udowodniono istnienie potencjalnego związku między stężeniem IFN- γ a występowaniem powikłań infekcyjnych, podczas gdy w przytoczonych doniesieniach dane na ten temat są niejednoznaczne.

Wnioski

Wyższe stężenia IFN- γ są bardziej związane z powikłaniami infekcyjnymi niż z wystąpieniem aGvHD. Stężenie IFN- γ w grupie pacjentów wyłącznie z ostrą GvHD, w grupie z ostrą GvHD i infekcją oraz w grupie bez GvHD i infekcji jest znamienne niższe niż w grupie pacjentów tylko z infekcją. Stężenia IL-2 w surowicy krwi u pacjentów z AML

w okresie pierwszych 30 dni po alloH SCT są bardzo niskie i nie mają znaczenia diagnostycznego.

Wkład autorów/Authors' contributions

Według kolejności.

Konflikt interesu/Conflict of interest

Nie występuje.

Finansowanie/Financial support

Dnia 30.09.2013 roku zawarto ze Śląskim Uniwersytetem Medycznym w Katowicach umowę nr KNW-2-047/D/3/N na finansowanie realizacji pracy naukowo-badawczej.

Etyka/Ethics

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

Dnia 3.07.2012 roku uzyskano zgodę nr KNW/0022/KB1/71/I/12 Komisji Bioetycznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

PIŚMIENNICTWO / REFERENCES

- [1] Goulmy E. Human minor histocompatibility antigens: new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy. *Immunol Rev* 1997;157:125-140.
- [2] Spierings E, Kim YH, Hendriks M, et al. Multicenter analyses demonstrate significant clinical effects of minor histocompatibility antigens on GvHD and GvL after HLA-matched related and unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19:1244-1253.
- [3] Ferrara JL, Reddy P. Pathophysiology of graft-versus-host disease. *Semin Hematol* 2006;43:3-10.
- [4] Ferrara JL. Pathogenesis of acute graft-versus-host disease: cytokines and cellular effectors. *J Hematother Stem Cell Res* 2000;9:299-306.
- [5] Govindaraj C, Tan P, Walker P, Wei A, Spencer A, Plebanski M. Reducing TNF receptor 2+ regulatory T cells via the combined action of azacitidine and the HDAC inhibitor, panobinostat for clinical benefit in acute myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res* 2014;20:724-735.
- [6] Shi L, Chen S, Zha X, et al. Enhancement of the TCR ζ Expression, Polyclonal Expansion, and Activation of T Cells from Patients with Acute Myeloid Leukemia After IL-2, IL-7, and IL-12 Induction. *DNA Cell Biol* 2015;34:481-488.
- [7] Chen S, Zha X, Shi L, et al. Upregulated TCR ζ improves cytokine secretion in T cells from patients with AML. *J Hematol Oncol* 2015;8:72.
- [8] Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol* 2011;131:492-499.
- [9] Sadeghi B, Al-Hashmi S, Hassan Z, et al. Expansion and activation kinetics of immune cells during early phase of GVHD in mouse model based on chemotherapy conditioning. *Clin Dev Immunol* 2010;1429-1443.
- [10] Ju XP, Xu B, Xiao ZP, et al. Cytokine expression during acute graft-versus-host disease after allogeneic peripheral stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2005;35:1179-1186.
- [11] Visentainer JE, Lieber SR, Persoli LB, et al. Serum cytokine levels and acute graft-versus-host disease after HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol* 2003;31:1044-1050.
- [12] Gayoso I, Cantisán S, Cerrato C, et al. Clinical factors influencing phenotype of HCMV-specific CD8+ T cells and HCMV-induced interferon- γ production after allogeneic stem cells transplantation. *Clin Dev Immunol* 2013;2013:347213.
- [13] Peng XG, Dong Y, Zhang TT, Wang K, Ma YJ. Immune Reconstitution of CD4+T Cells after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation and its Correlation with Invasive Fungal Infection in Patients with Hematological Malignancies. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16:3137-3140.