

Streszczenie

Wirus Epsteina-Barr (EBV) jest jednym z 8 herpeswirusów zakażających ludzi. Około 50% populacji dzieci w wieku do 5 roku życia oraz 95% dorosłych jest nosicielami wirusa. EBV wywołuje bezobjawowe lub łagodne infekcje u dzieci. Zakażenie pierwotne u osób młodych może mieć postać mononukleozy zakaźnej. Jest to pierwszy wirus zakażający ludzi, któremu przypisano właściwości onkogenne, etiologicznie powiązany z patogenezą wielu rodzajów nowotworów, zarówno u osób immunokompetentnych, jak i w immunosupresji.

Komórkami docelowymi dla wirusa są limfocyty B pamięci. Miliony lat koegzystencji wirusa i człowieka doprowadziły do wytworzenia swoistych mechanizmów adaptacyjnych i unikania odpowiedzi immunologicznej. Wirus wykorzystuje biologię limfocytów B w celu przetrwania (w formie utajonej) m.in. w krążących limfocytach B pamięci, będąc przy tym niezauważalnym dla układu immunologicznego oraz co istotne, nie ujawniając przy tym swego onkogennego potencjału. Niemniej jednak, wszelkie zaburzenia równowagi wirus-układ immunologiczny mogą prowadzić do poważnych następstw. U pacjentów w immunosupresji po transplantacji, niekontrolowana proliferacja zakażonych wirusem limfocytów B może prowadzić do ich transformacji i rozwoju chłoniaka. EBV odpowiada za ponad 90% przypadków PTLD (po-przeszczepowych zespołów limfoproliferacyjnych). Na rozwój PTLD szczególnie narażeni są pacjenci pediatryczni. Wyższa częstość PTLD u dzieci, w porównaniu do pacjentów dorosłych, wydaje się być logiczną konsekwencją częstszych zakażeń pierwotnych. Z uwagi na słabo wyrażoną symptomatologię, możliwość szybkiej progresji choroby EBV do PTLD, ograniczone opcje terapeutyczne oraz fakt, że rokowanie u pacjenta z zespołem limfoproliferacyjnym zależy od szybkości jego rozpoznania, kluczowe znaczenie ma zapobieganie. Istotną rolę w rozwoju limfoproliferacji odgrywa poziom wirēmii EBV. Im poziom ten jest wyższy tym większe prawdopodobieństwo rozwoju PTLD. Niemniej jednak doświadczenia ostatnich lat wykazały, że wśród pacjentów po transplantacji można wyróżnić grupę pacjentów z utrzymującym się przez miesiące, a nawet lata, wysokim poziomem EBV DNA, któremu nie towarzyszą niepokojące objawy kliniczne mogące wskazywać na limfoproliferację (tzw. nosiciele przewlekłe wysokiej wirēmii EBV, CHVL). Stąd też zaistniała potrzeba wprowadzenia dodatkowych, obok monitorowania poziomu EBV DNA we krwi, oznaczeń które pozwolą na bardziej precyzyjne zdefiniowanie pacjentów z grupy wysokiego ryzyka rozwoju PTLD. Jest to szczególnie istotne, ponieważ wstępnym postępowaniem w leczeniu pacjentów z podejrzeniem PTLD jest zmniejszenie dawki lub

nawet całkowite odstawienie leczenia immunosupresyjnego. Redukcja immunosupresji, jest wprawdzie skuteczna w leczeniu wczesnych zmian limfoproliferacyjnych, wiąże się jednak z ryzykiem ostrego odrzucania i utraty przeszczepu.

Głównym celem prezentowanej pracy była próba wyodrębnienia genetycznych markerów wirusa oraz czynników zależnych od gospodarza, które mogą wpływać na przebieg zakażenia EBV u pacjentów pediatrycznych po transplantacji wątroby (LTx).

Cele szczegółowe obejmowały:

1. Molekularną charakterystykę szczepów EBV izolowanych z krwi oraz tkanek dzieci po przeszczepieniu wątroby i próbę wyodrębnienia genetycznych markerów wirusa predysponujących do utrzymywania się wysokiej wirerii i rozwoju PTLD.
2. Analizę profili ekspresji genów wirusa EBV w limfocytach krwi obwodowej oraz ocenę korelacji poziomu poszczególnych transkryptów EBV z poziomem wirusowego DNA we krwi dzieci po przeszczepieniu wątroby.
3. Ocenę klonalności rearanżacji genów immunoglobulin i receptorów limfocytów T we krwi obwodowej i w tkankach u dzieci po przeszczepieniu wątroby oraz analizę związku z poziomem EBV DNA, nosicielstwem CHVL i rozwojem PTLD.
4. Ocenę polimorfizmu genów cytokin i receptorów cytokin (które mogą wpływać na odpowiedź immunologiczną na zakażenie wirusem EBV) u dzieci i po przeszczepieniu wątroby oraz analizę związku z przebiegiem zakażenia wirusem EBV.

Grupa badana obejmowała 190 pacjentów pediatrycznych (mediana wieku 1,3 r., zakres 0,1-18,6 lat), u których w okresie styczeń 2000 – październik 2010 wykonano LTx, będących pod opieką Kliniki Chirurgii Dziecięcej i Transplantacji Narządów IPCZD oraz Kliniki Gastroenterologii, Hepatologii i Immunologii IPCZD. Od każdego z pacjentów w różnych okresach po przeszczepieniu wątroby, zwykle co 1-3 m-ce, pobierano próbki krwi w celu wykonania rutynowej kontroli poziomu wirerii EBV. Ostatecznie od 190 pacjentów uzyskano 2 037 próbek krwi obwodowej. Materiał badany stanowiło również 40 tkanek parafinowanych lub mrożonych (bioptyki wątroby, węzła chłonnego lub dwunastnicy) pobranych od 20 pacjentów po przeszczepieniu wątroby (w tym 15 tkanek od 5 pacjentów z rozpoznaniem PTLD). Rozwój PTLD potwierdzono badaniem histopatologicznym u 9 dzieci.

U jednej pacjentki rozpoznano EBV - niezależnego chłoniaka rozlanego z dużych komórek B. U wszystkich 8 pacjentów z PTLD EBV - zależnym, rozpoznaniu towarzyszyła wysoka wiremia, która była wyższa od poziomu EBV DNA w grupie dzieci bez PTLD, choć zakresy wartości wiremii obserwowanych u pacjentów z i bez PTLD nachodziły na siebie. U 38 pacjentów poziom wiremii utrzymywał się na wysokim poziomie, mimo redukcji immunosupresji i leczenia przeciwwirusowego (grupa CHVL). W chwili zakończenia badania u żadnego z nosicieli CHVL nie stwierdzono PTLD.

Uzyskane wyniki genotypowania wskazują, że w badanej grupie dzieci po przeszczepieniu wątroby znaczna większość (97,4%) była zakażona wirusem EBV typu A. Wskazano na możliwość ko-infekcji dwoma typami wirusa A i B, z różną dystrybucją tkankową. Nie stwierdzono istotnych korelacji między genotypem wirusa wykrywanym we krwi, a poziomem wiremii oraz rozwojem PTLD.

Analiza polimorfizmu genu LMP1 wykazała, że większość pacjentów (83%) jest zakażona szczepem wirusa z niezmienionym genem LMP1 (wt). Uzyskane wyniki badań w seryjnych próbkach krwi wskazują zarówno na możliwość zmiany wariantu genu dla białka LMP1 w trakcie trwania zakażenia, jak i na możliwość ko-infekcji dwoma różnymi, pod względem posiadanego wariantu genu LMP1, szczepami wirusa EBV. Nie stwierdzono istotnego związku między polimorfizmem genu LMP1 i poziomem EBV DNA (w tym z nosicielstwem CHVL) oraz rozwojem PTLD. Niemniej jednak, tempo spadku wiremii w wyniku redukcji immunosupresji, różniło się znamienne w zależności od wariantu LMP1 wykrywanego we krwi ($p = 0,014$). Zaobserwowano, że u pacjentów zakażonych szczepem EBV z wariantem LMP1 Δ 30 poziom EBV DNA spadał znacznie wolniej w porównaniu do pacjentów zakażonych szczepem z niezmienionym (wt) wariantem LMP1 ($Me = 1,71$ vs $3,29$ \log_{10} kopii/ μ g DNA/mies.).

Jakościowa i ilościowa analiza transkryptów latentnych i litycznego wirusa EBV pozwoliła na wykrycie różnych profili ekspresji genów EBV oraz śledzenie dynamiki ich zmian we krwi pacjentów po przeszczepieniu wątroby. Zaobserwowano korelację między wzorcem ekspresji genów EBV a czasem po przeszczepie, kiedy dany profil wykryto ($p = 0,019$). Najczęściej (w 70,5% próbek) wykrywano typ 2 latencji (definiowany, jako ekspresja LMP1 \pm LMP2). W 13% przypadków stwierdzono typ 3 latencji (ekspresja EBNA2 + inne latentne transkrypty), natomiast w 10% - typ 0 (ekspresja jedynie LMP2). Transkrypt charakterystyczny dla zakażenia litycznego (BZLF1) wykryto u 5 pacjentów. U większości dzieci, dla których

analizę ekspresji genów EBV przeprowadzono w seryjnie pobranych próbkach krwi, zaobserwowano dynamiczny charakter zmian profili ekspresji genów EBV, jak również zmienny w czasie poziom ekspresji poszczególnych genów, sięgający rzędu nawet 5 log u pojedynczego pacjenta. Wykazano, że w badanej podgrupie pacjentów poziom EBV DNA nie zależał od profilu ekspresji latentnych genów wirusa. Podobnie, obecność transkryptu charakterystycznego dla zakażenia litycznego (BZLF1), nie była związana ze znacznym wzrostem wirerii EBV. Zaobserwowano natomiast istotną korelację między wirerią a poziomem transkryptów LMP1 i LMP2 ($r = 0,34$; $p = 0,005$; LMP2: $r = 0,46$; $p < 0,0005$ odpowiednio dla LM1 i LMP2).

Wyniki badań rearanzacji genów immunoglobulin oraz receptorów limfocytów T w seryjnie pobieranych próbkach krwi oraz w tkankach pacjentów z i bez PTLD, wykazały dynamiczny charakter zmian klonalności rearanzacji oraz brak jakiegokolwiek korelacji między obecnością klonalnie zrearanzowanych genów Ig i/lub TCR we krwi, a poziomem EBV DNA. Ponadto w przypadku pacjentów, u których analizę rearanzacji przeprowadzono zarówno we krwi, jak i w materiale tkankowym, obecności klonalności w tkance nie poprzedzało wykrycie podobnych rearanzacji we krwi, i odwrotnie – wykrycie klonalności we krwi nie zawsze oznaczało obecność rearanzacji klonalnych w tkance. Co więcej, częstość i charakter klonalności przegrupowań w obrębie genów Ig/TCR w próbkach krwi nie różniły się między nosicielami CHVL, pacjentami z rozpoznaniem PTLD oraz pozostałymi pacjentami po LTx.

Analiza polimorfizmu genetycznego cytokin i receptorów cytokin, wykazała, że obecność genotypów IL-1B-511 i IL-1RN VNTR warunkujących wysoki poziom IL-1 β , może mieć znaczenie ochronne w rozwoju wirerii EBV w pierwszym roku po LTx, w tym nosicielstwa CHVL, lecz prawdopodobnie nie ma związku z PTLD. Ponadto, wykazano, że rzadsze genotypy CCL2+1543*TT oraz *CT mogą mieć znaczenie ochronne w odniesieniu do nosicielstwa CHVL (OR = 0,38; $p = 0,042$). Z kolei obecność genotypu IL12B 3'UTR warunkującego niższy poziom IL12p40 wiązała się z dłuższym okresem utrzymywania się wysokiego poziomu wirerii wśród pacjentów CHVL ($p = 0,034$).

Powyższe wyniki wskazują, że:

1. Genotyp wirusa nie ma związku z przebiegiem zakażenia EBV u dzieci po przeszczepieniu wątroby, a profil i poziom ekspresji poszczególnych genów wirusa wykazują dynamiczny charakter zmian we krwi obwodowej pacjentów w immunosupresji. Dlatego też ich ocena nie ma wartości diagnostycznej.

2. Wariant z delecją 30 bp w genie LMP1 (latentnego białka błonowego wirusa EBV) może mieć wpływ na szybkość spadku liczby kopii EBV DNA po zredukowaniu dawki immunosupresji. Stąd też oznaczenie polimorfizmu LMP1 może być pomocne w monitorowaniu odpowiedzi na leczenie u dzieci po przeszczepieniu wątroby.
3. Zwiększona częstość i korelacja poziomów transkryptów LMP1 i LMP2 z wiremią EBV u dzieci po przeszczepieniu wątroby mogą odzwierciedlać istotny udział tych białek w patogenezie zakażenia EBV u pacjentów w immunosupresji.
4. U dzieci po przeszczepieniu wątroby jakościowa ocena rearanzacji genów Ig/TCR nie ma wartości prognostycznych.
5. Zmienność genetyczna cytokin IL-1 β , IL-1RA, CCL2 oraz IL12p40 może wpływać na poziom wiremii i przebieg zakażenia EBV u dzieci po przeszczepieniu wątroby. Oznaczenie genotypu CCL2 i IL12p40 może być szczególnie pomocne w prognozowaniu nosicielstwa przewlekle wysokiego poziomu wiremii.
6. Polimorfizmy genetyczne cytokin mogą być przydatne przy opracowaniu optymalnych schematów diagnostycznych i profilaktycznych oraz indywidualizacji terapii u dzieci po przeszczepieniu wątroby.