

Received: 2008.10.21
Accepted: 2008.12.11
Published: 2008.12.30

Kolista cząsteczka DNA-TREC jako marker prawidłowej funkcji grasicy*

T-cell receptor rearrangement excision circles (TRECs) as a marker of thymic function

Barbara Wysoczańska

Laboratorium i Zakład Immunologii Klinicznej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu

Streszczenie

Proces limfopojezy przebiegający w grasicy zapewnia stałą pulę limfocytów T. Komórki opuszczające grasicę są komórkami dziewiczymi (naiwnymi) zasiedlającymi narządy obwodowe, które po antygenowym bodźcu stają się pulą komórek efektorowych i/lub pamięci. Różnorodność odpowiedzi immunologicznej gwarantują receptory TCR, których zróżnicowanie oparte jest na doborze odpowiedniej liczby segmentów wykorzystanych podczas procesu rearanżacji. W procesie tym dochodzi do wycinania fragmentów nukleotydowych DNA i formowania kolistych cząstek TREC (T – cell receptor rearrangements excision circles). Po wycięciu fragmentów DNA związanych z usunięciem fragmentu δ proces rearanżacji prowadzi do ostatecznego uformowania łańcucha TCR α . Episomalne cząsteczki DNA-TREC pozostają na stałe w matczynej komórce dziewiczej T i nie podlegają późniejszemu podziałom mitotycznym, nie powielają się zatem do komórek siostrzanych. Analiza liczby TREC stała się pomocnym narzędziem do określenia prawidłowej funkcji grasicy szczególnie u pacjentów z wrodzonymi lub nabytymi niedoborami odporności, u pacjentów po alogenicznym przeszczepie oraz u pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi. Pomocną rolę w ocenie tych sytuacji klinicznych, w których obserwowany jest zaburzony proces limfopojezy spełnia wykorzystanie ilościowej metody reakcji łańcuchowej polimerazy czasu rzeczywistego (qPCR) z odpowiednio dobraną sekwencją starterów obejmujących fragment kolistego DNA-TREC.

Słowa kluczowe:

kolista cząsteczka DNA-TREC • rearanżacja TCR • inwolucja grasicy • alogeniczny przeszczep komórek krwiotwórczych

Summary

The thymus is crucial in the reconstitution of the T-cell compartment following lymphodepletion and also in establishing a normal, diverse T-cell receptor (TCR) repertoire after immune response to antigens. TCR $\alpha\beta$ diversity is generated through rearrangements of the TCR alpha and TCR beta chain genes. The TCR delta chain locus lies within the TCR alpha chain locus and its excision forms the first step in TCR alpha chain gene rearrangement. The intervening excised DNA is circularized by the formation of a "signal joint" forming a DNA episome, termed a signal-joint T-cell receptor excision circle (sjTREC). Approximately 70% of T cells emerging from the thymus contain one or two sjTRECs – depending on whether one or both TCR α loci genes are rearranged. As these long-lived naïve T cells mature and proliferate, their sjTRECs are stable and do not divide. The thymus contributes naïve T (CD45RA+) cells with TRECs to the peri-

* Praca finansowana z grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego 2P05E 037 30.



pheral immune system, but memory T cells (CD45RO+) contain few if any detectable TRECs. Quantification of thymic function is clinically relevant in settings with immunodeficiencies, after HSCT, during HIV therapy as well as in autoimmune patients. In humans there is no specific phenotypic marker for recent thymic emigrants, therefore the use of real-time quantitative PCR methods for absolute TREC quantification provides a good tool for estimating recent thymic function in different clinical situations.

Key words: T-cell receptor excision circle TREC • TCR rearrangement • thymus involution • allogeneic hematopoietic stem cell transplantation HSCT

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=876502>

Word count: 7388

Tables: –

Figures: 5

References: 171

Adres autorki: dr n. biol. Barbara Wysoczańska, Laboratorium i Zakład Immunologii Klinicznej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda, ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: wysocz@iitd.pan.wroc.pl

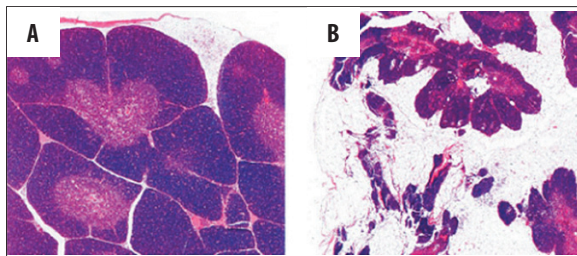
WPROWADZENIE

Grasica jest organem limfoidalnym, w którym zachodzi ontogeneza limfocytów T. Poprzez etapy pozytywnej i negatywnej selekcji grasicę opuszczają dojrzałe limfocyty T niosące na swej powierzchni zróżnicowany repertuar receptorów TCR [112]. Limfocyty T opuszczające grasicę są komórkami dziewiczymi (naiwnymi) zasiedlającymi narządy obwodowe, które po antygenowym bodźcu stają się pulą komórek efektorowych i/lub pamięci [20,151]. Układ immunologiczny dąży do zachowania stanu równowagi pomiędzy pulą komórek dziewiczych a pulą komórek efektorowych i/lub pamięci [60,133]. W wielu sytuacjach klinicznych stwierdzamy zaburzony proces limfopoezy. Ubytek liczbowy limfocytów T występuje w początkowym etapie odnowy immunologicznej po alogenicznym przeszczepieniu komórek krwiotwórczych dopóki komórki dawcy nie zasiedlą grasicy wyniszczoną stosowaną przed przeszczepieniem procedurą chemio-/radioterapii [97,139]. Pula limfocytów T może ulec zaburzeniu również w późniejszym okresie po przeszczepieniu, np. w przypadku wystąpienia powikłań po przeszczepie typu choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (GVHD) oraz podczas reaktywacji wirusowych [11,33,125,146,168]. Szczególną rolę prawidłowej odnowy immunologicznej przypisuje się po przeszczepieniu pacjentów z wrodzonymi niedoborami odporności np. SCID (severe combined immunodeficiencies). Pacjentów tych cechuje genetycznie uwarunkowana zaburzona limfopoeza, która jest związana również z zaburzoną funkcjonalnie pracą grasicy [25,62]. Alogeniczne przeszczepienie komórek krwiotwórczych u dzieci z wrodzonymi niedoborami odporności jest procedurą warunkującą ich dalsze przeżycie. Po przeszczepieniu obserwuje się u nich ponownie prawidłowej funkcji grasicy z właściwym wytwarzaniem liczby limfocytów T [5,26,116]. Wzrost liczby limfocytów T obserwuje się również u pacjentów z infekcją wirusem HIV poddanych terapii antywirusowej [44,171]. Zastosowanie terapii HAART (highly active antiretroviral therapy) powoduje przywrócenie prawidłowej proporcji limfocytów T o fenotypie CD4+ [101,128]. Odzwierciedleniem prawidłowej funkcji grasicy jest obec-

ność we krwi obwodowej komórek dziewiczych zawierających kolistą cząsteczkę DNA-TREC (T-cell receptor rearrangements excision circles) [41,56]. Episomalne cząsteczki TREC są stałym elementem komórek dziewiczych bezpośrednio opuszczających grasicę powstających podczas procesu rearanżacji receptorów TCR α i TCR β . TREC nie są powielane podczas podziałów mitotycznych do komórek siostrzanych, a ich obecność odpowiada liczbie komórek dziewiczych bezpośrednio opuszczających grasicę. TREC stanowią więc dogodny marker procesu rearanżacji receptorów TCR, a tym samym świadczą o prawidłowej limfopoezie [170]. Cytofluorymetryczne metody immunofenotypowania pozwalają na precyzyjne określenie puli komórek dziewiczych u pacjenta w określonej sytuacji klinicznej. Dodatkowo zastosowanie współczesnych technik biologii molekularnej, jaką jest reakcja łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (RQ-PCR) pozwala precyzyjnie określić liczbę TREC zawartych w puli komórek dziewiczych [37,95,104,105,123]. Badanie liczby TREC stanowiącej odzwierciedlenie prawidłowej funkcji grasicy ma swoje uzasadnienie po alogenicznym przeszczepieniu komórek krwiotwórczych, w chorobach rozrostowych układu krwiotwórczego lub wrodzonych niedoborach odporności, w terapii nabytych niedoborach odporności oraz w wybranych aspektach dotyczących niektórych chorób autoimmunologicznych, a także po zabiegu tymektomii [63,94,100,109,138,150,152,154]. Przedmiotem pracy jest podsumowanie wyników badawczych dotyczących analizy liczby TREC w wybranych sytuacjach klinicznych.

MIKROŚRODOWISKO GRASICY

Grasica jest narządem limfatycznym pochodzenia nabłonkowego położonym w śródpiersiu. Narządowi temu przypisuje się kształtowanie swoistości odpowiedzi immunologicznej przez wytwarzanie limfocytów T, które wędrują do obwodowych narządów i tkanek limfatycznych zasiedlają je [96,118,119]. Grasica jest zbudowana z dwóch płatów, a te ze zrazików. Jej rusztowania tworzy sieć gwiaździstych komórek nabłonkowych w oczkach, w której leżą limfocyty i makrofagi. Tkanka łączna torebki wnika do gra-



Ryc. 1. Utkanie tkankowe grasicy; (A) grasica małego dziecka zróżnicowana na obszar kory (pola ciemne) i rdzenia (pola jasne); (B) grasica człowieka dorosłego z przewagą przestrzeni okołonaczyniowych, nadmiernym przerostem tkanki tłuszczowej oraz widoczną redukcją obszaru kory i rdzenia świadczącym o zaawansowanym procesie inwolucji grasicy

sicy w postaci przegród dzielących jej miąższ na wyodrębnione części – zraziki. Każdy zrazik składa się z części korowej, z większą gęstością limfocytów oraz z części rdzennej (ryc. 1A). W części rdzennej występują kuliste skupiska komórek nabłonkowych: charakterystyczne tylko dla grasicy zwane ciałkami Hassalla. Do grasicy napływają ze szpiku komórki niezróżnicowane, które osiedlają się w częściach korowych zrazików, gdzie intensywnie dzielą się, dojrzewają i różnicują przechodząc kolejne etapy edukacji. Następnie limfocyty T wędrują z kory do rdzenia zrazika, a stąd drogą naczyń krwionośnych docierają do obwodowych narządów limfatycznych, gdzie pełnią swe właściwe funkcje [107,142]. Komórki nabłonkowe grasicy wytwarzają substancje o charakterze hormonalnym, wpływające na prawidłowe dojrzewanie limfocytów T stymulując ich podział. Grasica prawidłowo funkcjonuje u człowieka do okresu pokwitania, z upływem czasu ulega atrofii w procesie zwanym inwolucją [51,61,99].

INWOLUCJA GRASICY

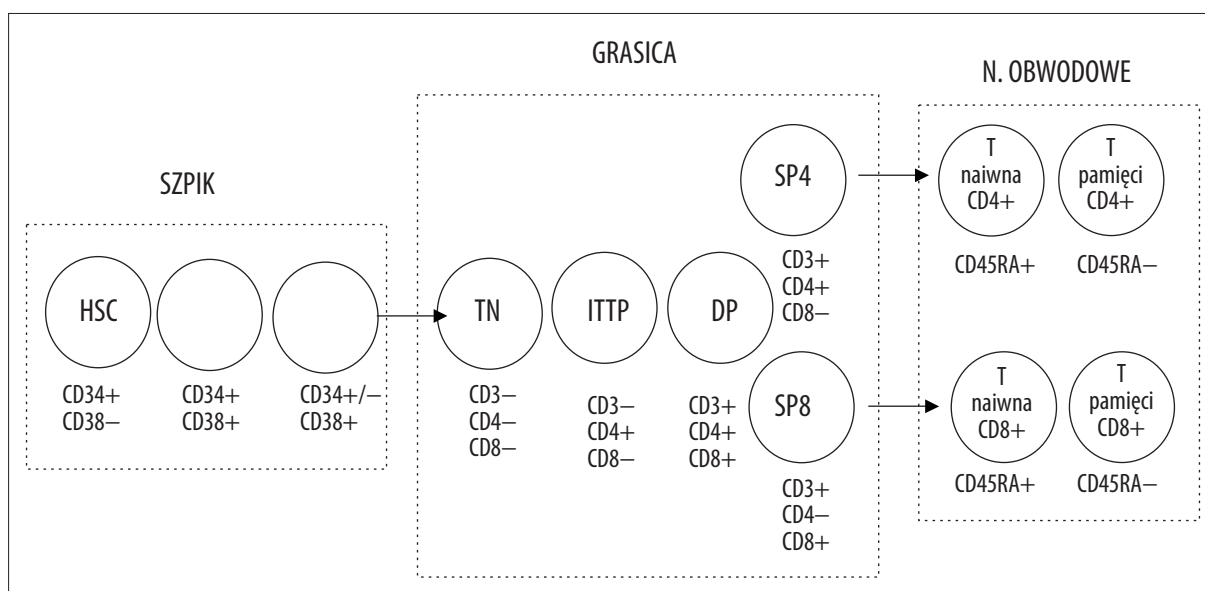
Inwolucja – (łac. *involutio*) to wsteczne zmiany budowy lub zanik tkanek czy narządów w czasie rozwoju osobniczego. Uwstecznienie lub zanikanie narządów w historii rodowej organizmów polega na zmniejszeniu się narządu od prawidłowych rozmiarów i wiąże się ze starzeniem organizmu. Przykładem tego procesu jest inwolucja grasicy polegająca na redukcji czynnościowej narządu w wyniku prawidłowo przebiegającego rozwoju ontogenetycznego [9,117]. W wyniku inwolucji w grasicy dochodzi do morfologicznych zmian struktury wewnątrz narządu (ryc. 1B). Obserwuje się zmniejszenie masy grasicy i powiększenie się proporcji przestrzeni okołonaczyniowych objętych rozrostem tkanki tłuszczowej w stosunku do nabłonka-epitelium. Obszary limfo-epitelialne (nabłonkowe) są zastępowane przez tkankę tłuszczową, łączną oraz przez przestrzenie okołonaczyniowe. Mimo stopniowej inwolucji obszary limfo-epitelialne są wciąż obecne i z czasem proces tymopoezy nie wygasa się całkowicie, a zostaje jedynie znacznie zredukowany [13,143,144]. Bezpośrednim następstwem zmniejszenia się masy grasicy jest spadek całkowitej liczby tymocytów dojrzewających w kierunku komórek T. Ten fizjologiczny proces, w naturalny sposób związany ze starzeniem się organizmu, podlega regulacji hormonalnej. W dzieciństwie i młodości w grasicy oraz we krwi obwodowej obecna jest znacząca pula limfocytów o fenotypie komórek dziewiczych, która z wiekiem się zmniejsza [44,61,66,154].

LIMFOPOEZA

Procesy zachodzące z udziałem mikrośrodowiska grasicy są przedmiotem analiz wielu grup badawczych, których doniesienia mają szczególne znaczenie w opisie i analizie roli limfocytów T w odpowiedzi immunologicznej [52]. Analiza roli genów regulujących procesy rekombinacji i rearanżacji receptorów TCR stanowi istotny wpływ na wyjaśnienie mechanizmów kontrolujących różnorodność, a tym samym funkcjonalność limfocytów T opuszczających grasicę [40,55]. Różnorodność procesów zachodzących w grasicy gwarantuje obecność w narządach obwodowych komórek T o szerokim zakresie funkcjonalności naznaczonych odpowiednim panelem markerów fenotypowych począwszy od komórek dziewiczych, poprzez komórki regulatorowe, komórki T pamięci oraz komórki efektorowe [6,35,142,155]. Funkcjonalność limfocytów T jest zapewniona przez ich udział w procesach związanych z restrykcją MHC klasy I i II, z pełnieniem funkcji efektorowych występujących po aktywacji w odpowiedzi na bodziec antygenowy. Limfocyty T są zróżnicowane fenotypowo w zależności od etapów dojrzewania i charakteryzuje je wielonarządowa obecność [18,22,47,83,106,157]. Istnienie swoistych sytuacji klinicznych wymaga dogłębnej analizy poszczególnych etapów dojrzewania i zróżnicowania repertuaru limfocytów T. Dane kliniczne pacjenta są uzupełniane przez badanie spektrytu TCR, określenie typu rearanżacji oraz stopnia klonalności [54,166]. Zrozumienie procesu limfopoezy wymaga wiedzy na temat różnorodności etapów prowadzących do uformowania immunologicznie kompetentnej komórki T. Komórki T migrują ze szpiku do grasicy, gdzie przechodzą kolejne etapy edukacji, dojrzewania i różnicowania [119]. Poprzez stadium komórek podwójnie negatywnych (DN-double negative), a następnie podwójnie pozytywnych (DP-double positive) limfocyty stają się komórkami o zadeklarowanym fenotypie komórki (SP-single positive) CD4+ lub CD8+. Podczas szlaku rozwojowego wyodrębnia się poszczególne stadia rozwojowe limfocytów T o swoistym fenotypie komórek „prymitywnych” np. CD34+CD38–CD1a–, CD34+CD38+CD1a– oraz CD34+CD38–CD1a+ związanych z korą grasicy. A następnie kolejne stadia coraz bardziej dojrzałych komórek o fenotypie CD4+CD3low, CD4+CD8+CD3–, CD4+CD8+CD3+ i wreszcie CD4+CD3+ lub CD8+CD3+ (ryc. 2). Rekapitulacją procesów zachodzących w grasicy jest obraz spotykany w ostrej białaczce limfoblastycznej linii T (acute lymphoblastic leukemia T-ALL), w której mamy do czynienia z zahamowaniem procesów różnicowania i dojrzewania limfocytów T na bardzo wczesnym etapie [8,71,93]. W białaczce limfoblastycznej do narządów obwodowych dostają się komórki T zatrzymane na etapie określonej fazy dojrzewania i różnicowania odpowiednio do: pro-T, pre-T, wczesnej lub późnej fazy korowej lub rdzennej [89,147].

Prekursory limfocytów T (pre-T) w T-ALL wykazują na swej powierzchni ekspresję CD34+, CD7+ oraz CD2+. Wczesne komórki pre-T są komórkami podwójnie negatywnymi CD4–CD8– i wykazują ekspresję CD34+, CD7+, CD2+. W procesie dojrzewania limfocyty te tracą marker CD34+ stają się komórkami podwójnie pozytywnymi CD4+ i CD8+ o małej ekspresji CD3+ utrzymując na swej powierzchni markery CD7+, CD2+, CD5+ oraz pre-TCRβ. Po rearanżacji receptora TCRα podwójnie po-





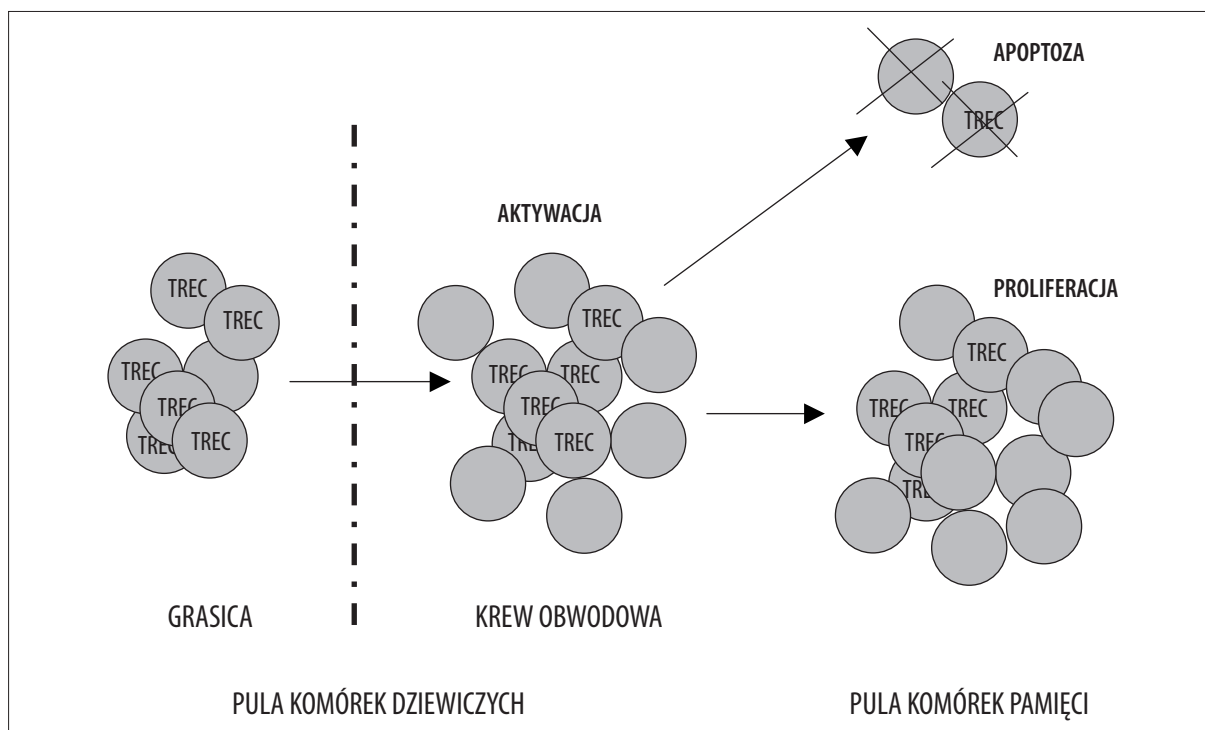
Ryc. 2. Limfocyty T dojrzewające w grasicy migrują do narządów obwodowych jako komórki dziewicze (naiwne). W odpowiedzi na bodziec antygenowy w narządach obwodowych funkcjonują jako komórki efektorowe/pamięci

zytywne komórki CD4+CD8+ późnokorowe przechodzą etap selekcji. Tylko 2% komórek podwójnie pozytywnych różnicuje się w komórki pojedynczo pozytywne dojrzałe CD4+ lub CD8+. Postaci niedojrzałe limfocytów T obecne w szpiku lub we krwi obwodowej chorego na ostrą białaczkę limfoblastyczną stanowią dogodny marker do monitorowania choroby resztkowej (minimal residual disease – MRD) u pacjentów po alogenicznym przeszczepieniu [89]. Narzędziem diagnostycznym w rozpoznaniu i monitorowaniu ostrej białaczki limfoblastycznej oprócz fenotypowania i metod cytogenetycznych jest badanie klonalności i rearanżacji TCR na poziomie genomowego DNA [10,29,40]. Obecne kłony komórek blastycznych wykazują wyłącznie swoiste rearanżacje TCR o zubożonym i silnie zawężonym spektrotypie. Czułe metody biologii molekularnej znajdują więc zastosowanie do monitorowania przetrwałych klonów białaczkowych [10,89]. Zrozumienie procesu limfopojezy wymaga wiedzy na temat różnorodności etapów prowadzących do uformowania immunologicznie kompetentnej komórki T. W przypadku limfocytów T istotnym jest również określenie roli czynników transkrypcyjnych wpływających na szlaki wspomagające i regulujące ostateczną dojrzałą funkcjonalnie postać komórki T [40]. Wymiernym znacznikiem pełnego rozwoju limfocytów T jest prawidłowa rearanżacja receptorów TCR $\alpha\beta$ oraz TCR $\gamma\delta$. Funkcjonalne receptory TCR powstają przez rekombinację segmentów V(D)J z udziałem genów aktywujących rekombinację RAG1 oraz RAG2 [55]. Dowodzi się, iż w procesie rearanżacji genów TCR obowiązuje następująca sekwencja i swoista hierarchia wydarzeń. Jako pierwsze rearanżują geny TCRD i kolejno TARG, TCRB oraz TCRA (TCRdelta > TCRgamma > TCRbeta > TCRalfa) [40,69].

KOMÓRKA DZIEWICZA T

Komórka T dziewicza (naiwna) jest komórką bezpośrednio opuszczającą grasicę, która na swej powierzchni wykazuje ekspresję swoistych markerów powierzchniowych

CD45RA, CD62L, CD27, oraz CCR7 [6,37]. Komórka naiwna podlega procesom proliferacji, aktywacji i apoptozie (ryc. 3) [35]. Komórki dziewicze mają zdolność migracji do narządów docelowych np. węzłów chłonnych, gdzie pobudzone przez bodziec antygenowy zmieniają swą funkcjonalność i stają się komórkami efektorowymi i/lub pamięci. Markerami swoistymi tych komórek są cząsteczki CD45RO, CD11a, CD44, CD95, CXCR3 oraz CCR4. Wyróżnia się pulę komórek centralnych pamięci (CM – central memory) oraz efektorowych pamięci (EM – effector memory). Komórki te charakteryzują się wysokim indeksem aktywacji i proliferacji [82,142]. Komórki dziewicze T uwalniają cytokiny oraz potrzebują ich do prawidłowego funkcjonowania [32,53]. Wykazano, że aktywacja oraz proliferacja komórek dziewiczych zapewnia równowagę (homeostazę) immunologiczną w organizmie w zależności od obecności sygnału pochodzącego z cząsteczki głównego *locus* zgodności tkankowej (MHC – major histocompatibility complex) [6]. W miarę starzenia się organizmu i postępującego zaniku grasicy w procesie inwolucji liczba limfocytów dziewiczych T zmniejsza się [81]. Dynamika zaniku grasicy jest procesem powolnym i niesłusznie jest postrzegana jako wyznacznik szybkości starzenia się naszego układu odpornościowego, bowiem populacja limfocytów T dąży do osiągnięcia stabilności (równowagi-homeostazy), zarówno pod względem liczby, jak i proporcji komórek dziewiczych i efektorowych/pamięci [81]. Na skutek działania mechanizmów wyrównawczych, dochodzi do wzrostu wytwarzania niektórych cytokin, np. IL-4 i IL-6 oraz spadku innych np. IL-12. Niezależnie od wieku organizmu, komórki T zachowują pełną zdolność do proliferacji, jednak u osób starszych dynamika tych procesów może być znacznie wolniejsza. Ponadto, obniżenie liczby komórek dziewiczych, zdolnych do przekształcenia w komórki pamięci i przechowania informacji o obcym antygenie powoduje, że stopniowo zmniejsza się zróżnicowanie fenotypowe subpopulacji limfocytów T obwodowych. Zmniejszająca się w miarę upływu lat różnorodność populacji limfocytów obwodowych wywołuje stany patologicz-



Ryc. 3. Pula komórek dziewiczych powstających w grasicy zawiera koliste cząstki DNA –TREC. Komórki dziewicze w narządach obwodowych podlegają procesom apoptozy, aktywacji i proliferacji. Liczba TREC odzwierciedla funkcjonalną pracę grasicy

ne uszkadzające te komórki, np. przez infekcje wirusowe. Stąd też ograniczona jest zdolność do szybkiej regeneracji populacji komórkowych i odpowiedzi na szczepienia w wieku starszym.

Limfocyty T dziewicze różnią się od komórek pamięci zarówno rodzajem markerów powierzchniowych, jak i profilem wytwarzanych cytokin [142]. Komórki dziewicze uwalniają cytokiny charakterystyczne dla fenotypu TH1, takich jak IL-2 i IFN- γ , podczas gdy limfocyty pamięci uwalniają cytokiny swoiste dla populacji limfocytów TH2, takich jak IL-4 i IL-6. A zatem zachodząca zmiana proporcji wymienionych populacji limfocytów może prowadzić do spowolnienia, a nawet ograniczenia odpowiedzi komórkowej skierowanej przeciwko nowym antygenom oraz do zmiany charakteru odpowiedzi immunologicznej zależnej od cytokin. Zmniejszenie zdolności do odpowiedzi na stres środowiskowy powoduje utratę równowagi wewnętrznej organizmu, co zwiększa ryzyko wystąpienia wielu chorób. Prowadzi to do upośledzenia prawidłowego funkcjonowania układu immunologicznego. Przypuszcza się, że również równowaga puli komórek T dziewiczych może być zachowana poprzez mechanizmy i procesy odbywające się poza grasicą [98]. Zakłada się więc istnienie dwóch puli komórek naiwnych: jedna bogata w komórki świeżo opuszczające grasicę (RTE – recent thymic emigrants) i druga pula komórek o wysokim indeksie proliferacji w narządach obwodowych. Interesującym wydaje się sygnał, jaki powoduje zatrzymanie komórek w fazie komórek naiwnych (RTE) oraz znalezienie markerów odróżniających pulę komórek wysoce proliferujących w narządach obwodowych. Według Kohlera i wsp. znacznikiem wyróżniającym obie populacje komórek naiwnych może być cząsteczka CD31+ (PECAM-1) [87]. Marker

CD31+ jest swoisty dla komórek grasicy (THYMIC) natomiast brak tego markera (CD31-) charakteryzuje komórki naiwne – funkcjonalne na obwodzie (CENTRAL) [77,111,121]. Częstość występowania komórek T dziewiczych CD4+CD45RA+ o fenotypie CD31+ maleje z upływem czasu. I tak np. krew pępowinowa zawiera nawet do 90–95% komórek o fenotypie CD4+CD45RA+ i ekspresji CD31+, natomiast odsetek tych komórek maleje, kiedy dochodzi do dominacji komórek CD31- w wieku dojrzałym [58]. Tylko w komórkach CD31+ wykazano obecność TREC w odróżnieniu od puli komórek CD31- i obecność poliklonalnego repertuaru TCR [107]. Wykazano, że odpowiedź przeciwko nowym antygenom zależy od komórek CD4+ rozpoznających szeroki repertuar nowych cząstek antygenowych poprzez TCR. Toteż utrata czy zmniejszenie puli komórek o fenotypie CD31+ powoduje znamienny uszczerbek działający niekorzystnie na jakość odpowiedzi immunologicznej. W wielu takich przypadkach stwierdza się generowanie komórek autoreaktywnych. Udowodniono bowiem, że dysfunkcja grasicy może prowadzić do rozwoju chorób związanych z autoagresją przez obniżenie własnej tolerancji np. reumatoidalnego zapalenia stawów czy stwardnienia rozsianego [75,117,159]. Jest to związane z nadmierną proliferacją komórek o fenotypie CD31- i utratą zróżnicowania TCR oraz brakiem potencjalnej odpowiedzi na nowe antygeny. Obecność markera CD31 na komórce dziewiczej może być wykorzystana diagnostycznie w wielu sytuacjach klinicznych. Detekcja komórek dziewiczych CD31+ pozwala na interpretację stanu klinicznego pacjenta i może służyć do oceny i monitorowania powrotu aktywności grasicy np. po zastosowaniu ablastycznej terapii. Pomiar liczby komórek dziewiczych może być użyty jako marker prognostyczny kompetencji immunologicznej badanej osoby.

Pamięć immunologiczna

Pamięć immunologiczną można określić jako gotowość organizmu do przyspieszonej i efektywnej odpowiedzi immunologicznej podczas ponownego kontaktu z antygenem. U podłoża pamięci immunologicznej leży zwiększenie liczby klonów limfocytów odpowiadających na dany antygen. Droga do powstawania limfocytów pamięci przebiega poprzez limfocyty dziewicze, które inicjują odpowiedź pierwotną (pierwszy kontakt z antygenem). Pod wpływem antygeny limfocyty dziewicze stają się komórką efektorową o właściwościach cytotoksycznych lub komórką pamięci o właściwościach długowieczności i nieustannym pobudzeniu [142]. Różnica między komórkami dziewiczymi a limfocytami pamięci jest związana z różną ekspresją cząsteczek powierzchniowych. Na limfocytach T pamięci zaobserwowano zwiększoną ekspresję cząsteczek biorących udział w adhezji do komórek prezentujących antygen (np. CD2, CD11a/CD18). Limfocyty T pamięci w porównaniu z limfocytami dziewiczymi łatwiej ulegają aktywacji przez prezentowane im antygeny, charakteryzują się wysokim indeksem proliferacji oraz zwiększonym wydzielaniem cytokin. Jednocześnie limfocyty T pamięci dysponują receptorami cząsteczek MHC przekazującymi sygnał hamujący aktywację, co chroni ich przed śmiercią indukowaną przez aktywację zapewniając im długowieczność. Wśród limfocytów T pamięci wyróżnia się limfocyty T pamięci centralne i limfocyty T pamięci efektorowe. Limfocyty T pamięci centralne mają na swej powierzchni receptor CCR7 chemokin oraz selektynę L (CD62L), podobnie jak limfocyty T dziewicze, które krążąc w organizmie przechodzą do węzłów limfatycznych. Natomiast komórki efektorowe nie przechodzą przez węzły, lecz napływają do miejsc zapalnych, gdzie bezpośrednio spełniają swe funkcje efektorowe wydzielając cytokiny lub działając cytotoksycznie. Komórki efektorowe nie mają zatem receptora CCR7 [37,142].

Aktywacja limfocytów T

Dojrzałe limfocyty T opuszczające grasicę mają fenotyp komórek spoczynkowych i noszą nazwę limfocytów dziewiczych. Warunkiem aktywacji limfocytu dziewiczego jest jego bezpośredni kontakt z komórką prezentującą poprzez MHC antygen. Limfocyt otrzymuje dwa sygnały poprzez receptor TCR i cząsteczki kostymulujące np. CD28, ICOS, czy CD2. Brak drugiego sygnału dla limfocytu T dziewiczego pozostawia komórkę w stanie anergii. W przeciwieństwie do limfocytów dziewiczych limfocyty pamięci wymagają tylko pierwszego sygnału, aby rozpocząć proliferację. W aktywacji limfocytu T biorą udział kinazy, które fosforylują reszty tyrozynowe sekwencji ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif). Rezultatem aktywacji kinaz tyrozynowych jest uruchomienie kaskady białek odpowiedzialnych za dalsze przekazanie sygnału do komórki.

Migracja limfocytów T

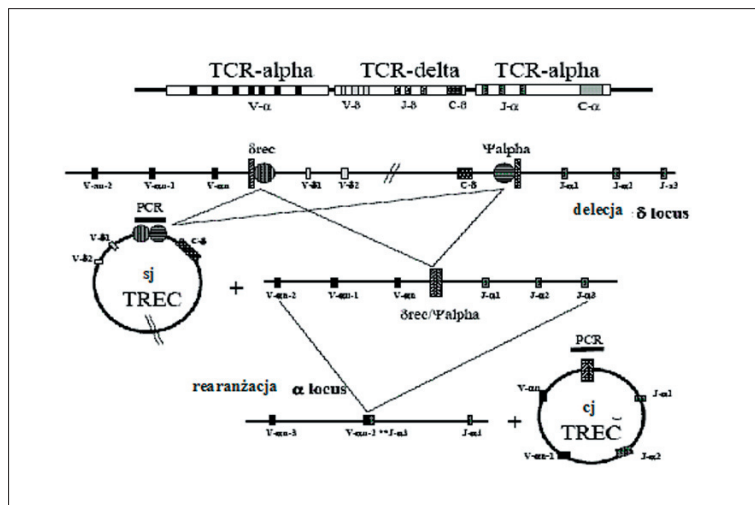
Obwodowe narządy limfatyczne są strategicznymi miejscami, w których możliwe jest pobudzenie dziewiczych limfocytów i rozpoczęcie reakcji immunologicznej. Dziewicze limfocyty T muszą rozpoznać antygen, aby móc przeżyć. Rozpoznanie antygeny pobudza proliferację, zwiększa

powinowactwo do receptorów i prowadzi do różnicowania się w komórki efektorowe bądź limfocyty pamięci T. Ukierunkowaną drogą migracji komórek T sterują cząsteczki adhezyjne. Dziewicze limfocyty po opuszczeniu centralnych narządów limfatycznych nie są jeszcze w pełni dojrzałe do pełnienia funkcji efektorowych. Bez większych preferencji docierają do obwodowych narządów limfatycznych. Limfocyty wnikające do węzła mają na swej powierzchni selektynę L oraz receptor CCR7 chemokin. Limfocyty T, które rozpoznały antygen ulegają aktywacji, zaczynają intensywnie dzielić się oraz różnicować w komórki efektorowe oraz limfocyty T pamięci. Z powierzchni limfocytów T efektorowych znika cząsteczka CCR7 i komórki te tracą zdolność do ponownego zasiedlania tkanek limfatycznych. Natomiast limfocyty T pamięci zachowują zdolność do zasiedlania węzłów limfatycznych. Przy ponownym kontakcie z antygenem komórki te ulegają aktywacji i ponownie różnicują się w limfocyty T efektorowe (docierające do tkanek objętych procesem zapalnym) oraz mniejszą populację limfocytów T pamięci (krążących między narządami limfatycznymi). Pewien odsetek limfocytów T pamięci może również docierać do tkanek nielimfatycznych. Migracja ta jest nieprzypadkowa i komórki, które uległy aktywacji w węzłach limfatycznych podskórnych będą następnie migrowały do skóry i tkanki podskórnej, a komórki, które zaktywowały się np. w kępkach Peyera i krezkowych węzłach będą migrowały do błon śluzowych. Działają tu zatem receptory zasiedlania, chemokiny oraz ligandy selektyń. Limfocyty TH1 różnią się od limfocytów TH2 ekspresją receptorów zasiedlania [102].

POWSTAWANIE KOLISTEJ CZĄSTECZKI DNA-TREC

Komórki T opuszczające grasicę można zróżnicować pod względem ekspresji łańcuchów TCR i tak wyróżnia się limfocyty T zawierające receptory TCR $\alpha\beta$ lub TCR $\gamma\delta$. Zawartość procentowa tych subpopulacji komórek T we krwi obwodowej wynosi ponad 90% dla komórek T mających TCR $\alpha\beta$ oraz 5–10% komórek T mających TCR $\gamma\delta$. Ekspresja dojrzałych receptorów TCR poprzedzona jest wieloetapowym procesem ich rekombinacji podlegającym kontroli przez IL-7 oraz geny aktywujące rekombinację RAG1/RAG2 (recombination activating genes) [108,113,135]. Aby mogła powstać dojrzała postać funkcjonalnego receptora TCR musi dojść do połączenia się segmentów V(D)J (variable, diversity, joining). Liczba tych segmentów jest zróżnicowana dla poszczególnych rodzin TCR. Kombinacje łączy i możliwości różnorodności szacuje się na około 10^{18} dla TCR $\alpha\beta$. Procesowi rearanżacji towarzyszy nie tylko przypadkowe łączenie się segmentów V(D)J, ale również wstawianie pomiędzy istniejące segmenty różnej liczby wstawek N nukleotydowych, co gwarantuje dużą zmienność i różnorodność polimorficzną receptorów TCR [110]. Tu niewątpliwą rolę odgrywa terminalna transferaza nukleotydowa (TdT). Podczas procesu rearanżacji łańcucha β i α dochodzi do wycinania kolistych fragmentów nukleotydowych TREC (T-cell receptor rearrangements excision circles) [21,38,156]. Powstawanie cząsteczek sjTREC (signal joint) oraz cjTREC (coding joint) przedstawiono na ryc. 4.

Episomalna cząsteczka DNA-TREC pozostaje w komórce matczynej T i nie podlega późniejszym podziałom mitotycznym, a zatem nie powiela się do komórki siostrzanej.



Ryc. 4. Koliste cząsteczki DNA-TREC (T cell receptor excision circles) powstają podczas rearanżacji łańcucha alfa receptora TCR na chromosomie 14. Segmenty kodujące łańcuch delta (Dδ, Jδ, Cδ oraz δRecψJa) zostają wycięte formując koliste cząstki DNA-sjTREC (signal joint) oraz cj TREC (coding joint) [123]

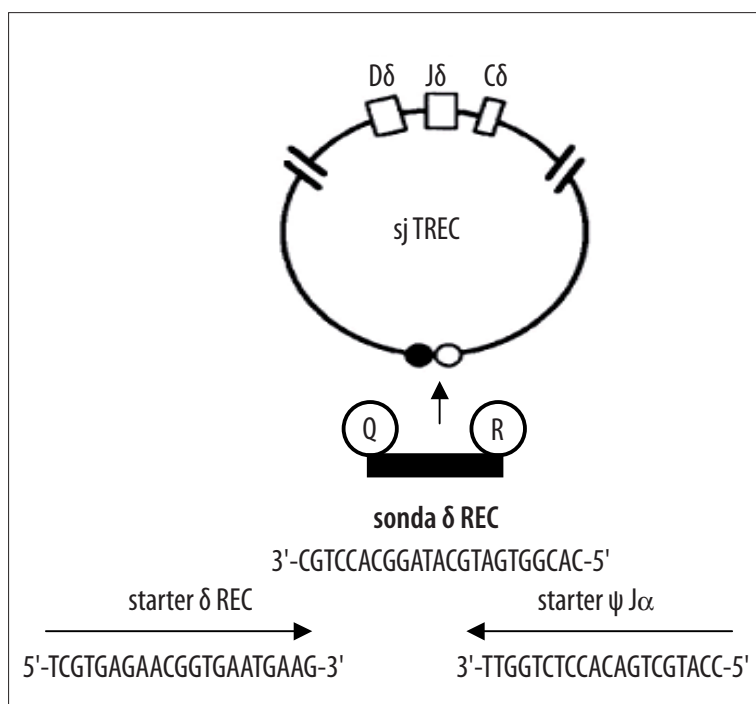
Wycięte fragmenty DNA $\delta\text{rec}/\psi\text{Ja}$ związane z delecją fragmentu δ biorą udział w dalszym procesie rearanżacji i prowadzą do ostatecznego uformowania łańcucha TCR α [69,88,165]. Koliste fragmenty DNA pozostają na stałe w komórce i opuszczają wraz z nią grasicę przedostając się do narządów obwodowych. Analiza liczby pojawiających się cząstek sjTREC stała się pomocnym narzędziem podczas monitorowania immunologicznej odnowy w niektórych sytuacjach klinicznych, takich jak odnowa po auto- lub alogenicznym przeszczepieniu komórek krwiotwórczych układu krwiotwórczego, po antywirusowej terapii w przypadku infekcji wirusem HIV oraz podczas zróżnicowanych stadiów chorób autoimmunologicznych [54,69,90,166]. Udokumentowano, że liczba sjTREC mierzona we krwi obwodowej ze frakcji komórek jednojądrowych lub w subpopulacjach limfocytów T dziewiczych stanowi odzwierciedlenie funkcjonalnej pracy grasicy [41]. Ponadto dowiedziono, że obniżenie liczby sjTREC wiąże się z wystąpieniem zaburzeń związanych z nieprawidłową pracą grasicy [66]. Zaobserwowano zależność między liczbą sjTREC a wiekiem, w miarę upływu lat liczba TREC maleje, co jest związane bezpośrednio z procesem inwolucji grasicy [44,61,67,149,153]. Udokumentowano również obniżenie liczby sjTREC we wczesnym etapie odnowy po alogenicznym przeszczepieniu komórek krwiotwórczych, oraz w sytuacjach, kiedy obserwowane są powikłania po przeszczepieniu, takie jak choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (GVHD – graft versus host disease) czy wzmożone reaktywacje wirusowe [7,49,120,145,160]. Zwiększona liczba sjTREC może odzwierciedlać skuteczność terapii antywirusowej u pacjentów HIV, a także stanowi tło i podłoże powodzenia alogenicznego przeszczepienia pacjentom z wrodzonymi niedoborami odporności [26,44,116].

METODY IDENTYFIKACJI TREC

Cząsteczki sjTREC mogą być identyfikowane ilościowo metodą reakcji łańcuchowej polimerazy czasu rzeczywistego (qPCR) z odpowiednio dobraną sekwencją starterów obejmujących fragment kolistego DNA (ryc. 5) [69]. Metoda ta pozwala na precyzyjną identyfikację liczby β TREC, sjTREC oraz cjTREC [2,69,131]. Kolejne przykładowe sekwencje starterów obejmują: 5' ψJa (-258): AAC AGC CTT TGG GAC ACT ATC oraz 3' δRecsj (+104): 5' GCT

GAA CTT ATT GCA ACT CGT GAG wraz z sondą identyfikującą $\delta\text{Rec}\psi\text{Ja}$: 5'-6FAM-CCA CAT CCC TTT CAA CCA TGC TGA CAC CTC-TAMRA [125]. sjTREC mierzy się w populacji komórek jednojądrowych (PBMNC) wyizolowanych z krwi obwodowej lub we frakcji komórek T po zastosowaniu metod magnetycznej selekcji pozytywnej komórek CD4+ lub CD8+ z użyciem komercyjnych zestawów. Aby zwiększyć czułość i precyzję pomiaru sjTREC stosuje się dodatkowo metody sortowania limfocytów T na te o fenotypie komórek dziewiczych.

Liczbę sjTREC można wyrazić wobec względnej ilości wyizolowanego DNA (sjTREC/ μg DNA), w przeliczeniu na zawartość komórek z uwzględnieniem markerów fenotypowych komórek np. sjTREC/100 tys. PBMNC, sjTREC/CD3+, sjTREC/CD4+, sjTREC/CD8+, sjTREC/CD4+ CD45RA+ CD27+. Do precyzyjnego wyrażenia liczby sjTREC konieczne jest stosowanie kontroli pozytywnej, którą może być liczba kopii genu występującego powszechnie (konstytutywny gen „house keeping gene” GAPDH lub β -aktyna). Niezbędnym do obliczenia liczby sjTREC jest użycie standardu wewnętrznego sjTREC przez wprowadzenie właściwego insertu np. do wektora pTZ57R/T. Liczba sjTREC wyrażona wobec całkowitej liczby limfocytów CD3+ precyzyjnie precyzyzuje liczbę komórek, które opuściły grasicę, a dodatkowy indeks proliferacji komórek, wyrażony przez pomiar antygenu Ki67 lub czynnika grasicy (sjTREC/ β TREC) uwierzytelnia precyzję wykonanego pomiaru [69]. Niedawne doniesienia dotyczące analizy liczby sjTREC u pacjentów po przeszczepie opierają się na analizie czynnika grasicy (TF – thymic factor), który uwzględnia indeks proliferacji komórkowej i wyrażony jest jako proporcja liczby sjTREC/ β -TREC (D β /J β). Kiedy porównywano wartość czynnika TF w grupie kontrolnej zdrowych ludzi (mediana wieku 32 lata) z grupą badaną 52 pacjentów w różnym czasie po alogenicznym przeszczepie (mediana wieku 42 lata), to z obserwacji wynikało, że dopiero po 2 latach u pacjentów po przeszczepie wartości TF mogą być zbliżone do grupy kontrolnej [131]. Liczba sjTREC u zdrowych z grupy kontrolnej wynosiła 1421 sjTREC i 15,9 β -TREC wyrażonych na 100 tys. komórek, zatem wartość czynnika grasicy wynosiła TF=89. Natomiast u chorych czynnik grasicy przed przeszczepieniem wynosił TF=49, 100 dni po przeszczepieniu wyno-



Ryc. 5. Liczba kolistych cząsteczek sjTREC może być identyfikowana metodą reakcji łańcuchowej polimerazy czasu rzeczywistego (qPCR) z odpowiednio dobraną sekwencją starterów obejmujących fragment kolistego DNA [69]

sił TF=4, rok po przeszczepieniu TF=25 i wreszcie po 2 latach TF=55 [131]. Dane te są zgodne z doniesieniami Diona i wsp., którzy zauważają, że podczas proliferacji komórek wzrastają proporcje sj/ β TREC. Podczas infekcji HIV, kiedy dochodzi do zahamowania proliferacji proporcja sj/ β TREC zmniejsza się [41]. Pomocne w obliczaniu i przewidywaniu liczby TREC stały się również stosowane modele matematyczne [130]. Liczba sjTREC mierzona w puli komórek krwi obwodowej jest zatem ściśle zależna od indeksu proliferacji i dowodzi o swoistym ‘rozcieńczeniu’ sjTREC u pacjentów objętych wysokim indeksem proliferacyjnym komórek [69,88].

LICZBA TREC A DŁUGOŚĆ TELOMERÓW

Telomer jest fragmentem chromosomu, który zabezpiecza go przed uszkodzeniem podczas kopiowania [14]. Telomer skracą się podczas każdego podziału komórki odliczając czas do jej śmierci [3,36]. Skracanie telomerów będące „licznikiem podziałów” przekłada się na procesy związane z etapami starzenia się organizmu. Telomer jako element strukturalny chromosomu zapewnia zatem jego stabilność. Sekwencja składająca się na telomer człowieka zbudowana jest z sekwencji nukleotydów TTAGGG. Telomer nie zawiera genów i nie koduje żadnych białek. Zasady nukleinowe na końcu telomeru są ułożone na kształt „koniczyny”, zawierającej dużą liczbę guaniny. Sekwencja nukleotydów w telomerze jest niezmienna i powtarzalna. Telomer i obszar subteloimerowy tworzą wspólnie tzw. końcowy fragment restrykcyjny (TRF - terminal restriction fragment). Telomer spełnia cztery zasadnicze funkcje: stanowi stabilną ochronę końca chromosomu przed uszkodzeniem lub nieprawidłową rekombinacją, umożliwia całkowitą replikację chromosomu, nadzoruje prawidłową ekspresję genów oraz wspomaga organizację chromosomów w trakcie podziałów komórki. Telomer spełnia rolę zegara komórkowego i stabilizuje chromosom tak

długo, jak długo istnieje. Chromosomy bez telomerów są lepkie, lepiej się do innych chromosomów, a także do białek DDBP (damaged DNA binding proteins), których zadaniem jest wykrywanie uszkodzeń DNA i zapobieganie dziedziczeniu uszkodzonego materiału genetycznego. Gdy telomer znika i dochodzi do odsłonięcia ostatnich sekwencji TTAGGG, białka DDBP gromadzą się na uszkodzonym chromosomie, a tym samym stają się niedostępne dla reszty komórki. Inne białka regulowane obecnością DDBP, zaczynają się uaktywniać. Są to białka regulatorowe, takie jak p53, CDK2, cyklina E, p21. Zaczyna się lawina zdarzeń mających doprowadzić do zatrzymania cyklu komórkowego, dzięki czemu nie dochodzi do replikacji uszkodzonego DNA. Każdy cykl podziału komórki skracają długość chromosomu o 50–100 końcowych nukleotydów. Ostatnie badania wskazały, że komórka naiwna CD45RA dzieli się średnio co 3,5 roku, natomiast podziały komórki pamięci odbywają się średnio co 22 tygodnie [162,163]. Dowiedziano zatem, że komórki dziewicze różnią się długością telomerów od komórek pamięci [163]. Długość telomeru zależy od wieku organizmu, im organizm starszy tym ma bardziej skrócony telomer [64]. Skracanie długości telomerów przekłada się na wzrost aktywności telomerazy, obniżenie liczby sjTREC i wiąże się bezpośrednio ze wzrostem aktywacji oraz indeksu proliferacyjnego [15,23,162]. Telomery krótsze i mniejszą liczbę sjTREC obserwuje się u osób w wieku starszym [17,36].

LICZBA TREC U PACJENTÓW Z WRODZONYMI NIEDOBORAMI ODPORNOŚCI

Odnowa limfocytów T u pacjentów z wrodzonymi niedoborami odporności, a zwłaszcza z ciężkim złożonym niedoborem SCID (severe combined immunodeficiencies) może być omawiana wyłącznie w aspekcie alogenicznego przeszczepiania komórek krwiotwórczych [5,25,116]. U pacjentów SCID nie stwierdza się obecności TREC [25]. Ma to

swoje uzasadnienie w etiologii schorzenia, które charakteryzuje się licznymi wadami genetycznymi upośledzającymi prawidłową limfopoezę [50]. Chorzy z SCID mają zredukowaną masę grasicy i częsty fenotyp choroby nosi znamię komórkowe T-. Towarzyszy temu upośledzenie innych populacji komórkowych np. B- i/lub NK- [116]. Procesy limfopozy zachodzące w grasicy u dzieci z niedoborami immunologicznymi nie są prawidłowe. Jest to bezpośrednio związane ze zmianami strukturalnymi, jakie obserwuje się w grasicy oraz ze zmniejszeniem ciężaru wagowego narządu do około 1 g [62]. Hipoplastyczność narządu, zredukowana liczba komórek nabłonkowych i dendrytycznych oraz brak jednoznacznego podziału struktury grasicy na korę i rdzeń to cechy zdefiniowanej grasicy u pacjentów z SCID [62]. Dla dzieci z wrodzonymi niedoborami immunologicznymi oprócz terapii genowej przeszczepienie komórek krwiotwórczych jest jedyną terapią leczniczą ratującą ich życie [27,28,50]. Zastąpienie zdrowymi komórkami dawcy ubytku ilościowego i czynnościowego limfocytów T i/lub B oraz komórek NK pacjenta gwarantuje jego dalsze przeżycie [25]. Liczba TREC u dzieci z SCID po przeszczepieniu odzwierciedla prawidłowe funkcje grasicy [26]. Przed przeszczepieniem oddziaływanie między prekursorami limfocytów T i komórkami nabłonka grasicy jest zaburzone i nie w pełni sprzyja dojrzewaniu tymocytów. Udokumentowano, iż pacjenci z SCID wymagają dłuższego czasu po przeszczepieniu, aby osiągnąć prawidłowe kompetencje układu immunologicznego [16].

Oprócz SCID wyróżnia się inne choroby spełniające kryterium niedoborów odporności np. zespół Omenna, zespół Hiper IGM, zespół Wiscotta-Aldricha, u których mamy do czynienia z wieloma zaburzeniami odporności na różnych od T poziomach komórkowych. Uzasadnienie badań liczby TREC u tych dzieci przed i po przeszczepieniu ma swoje przełożenie w ocenie odnowy układu immunologicznego. Liczbę TREC przed przeszczepieniem przeanalizowali Chen i wsp. i ujęli ją jako czynnik prognostyczny. Porównanie dwóch grup pacjentów z wrodzonymi niedoborami odporności wykazało, że u tych dzieci, które przed przeszczepem miały wyższą liczbę TREC wczesna odnowa immunologiczna była szybsza niż u dzieci z niską liczbą TREC [31]. Autorzy sugerują, że wczesne pojawienie się wysokiej liczby sjTREC po przeszczepieniu daje gwarancję prawidłowej odnowy immunologicznej u dzieci z wrodzonymi niedoborami immunologicznymi. Przeszczep komórek krwiotwórczych charakteryzuje się w swym początkowym okresie immunologiczną „pustką” spowodowaną toksycznym działaniem chemio-/radioterapii oraz zredukowaną aktywnością narządów limfatycznych. Komórki dawcy zasiedlają organizm biocy, czemu towarzyszy swoista burza cytokinowa. Główny narząd limfopozy – grasicca wyrównuje swą aktywność i dąży do znormalizowania swoich funkcji. Immunologiczna odnowa po przeszczepieniu jest procesem kompleksowym wymagającym określonego czasu. Istotną w procesie odnowy jest zależność pomiędzy rodzajem zastosowanej chemioterapii (wysokodawkowanej terapii mieloablacyjnej lub o zredukowanej intensywności), liczbą podanych komórek CD34+ i CD3+ dawcy, pozostałą pulą komórek biocy oraz grasicozależnego i niezależnego szlaku rozwoju limfocytów T a tempem odnowy immunologicznej [98]. W kolejnych etapach po przeszczepieniu przeważająca liczba komórek T pochodzących od dawcy przechodzi edukację w grasicy i zawiera

na swej powierzchni swoiste antygenowo receptory TCR. Badanie stopnia rearanzacji i spektrytu TCR obrazuje kinetykę nabywania różnorodności repertuaru receptorów oraz dynamikę nabywania tej różnorodności po przeszczepieniu. Analiza szerokiego repertuaru TCR oraz obecność wysokiej liczby kolistego DNA jest wyrazem prawidłowej odnowy immunologicznej, co odzwierciedla funkcja grasicy. Sarzotti i wsp. udokumentowali zależność prawidłowej odnowy po przeszczepieniu od funkcjonalnej pracy grasicy, czego wyrazem była obecność poliklonalnego repertuaru TCR popartego wysoką liczbą sjTREC u dzieci z niedoborami odporności po alogenicznym przeszczepieniu [131]. Szczególną uwagę zwraca się na możliwie szybkie rozpoznanie niedoborów odporności we wczesnym okresie od czasu pojawienia się pierwszych symptomów choroby u dzieci, co ma swoje korzystne przełożenie we wdrożeniu szybkiej terapii [25]. Współcześnie używane metody monitorujące obecność sjTREC mogą służyć jako dodatkowe narzędzie diagnostyczne do prawidłowego potwierdzenia rozpoznania wrodzonego niedoboru odporności. Badania Cavazzana-Calvo i wsp. dotyczyły 31 pacjentów z wrodzonymi niedoborami odporności ponad 10 lat po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych [26]. Analiza pacjentów dotyczyła odzwierciedlenia następującej zależności: typu chimeryzmu i obecności sjTREC. Autorzy stwierdzili, że pacjenci, którzy posiadali pełny chimeryzm dawcy również w linii mieloidealnej po zastosowaniu mieloablacyjnej terapii charakteryzowali się obecnością wysokiej liczby sjTREC w porównaniu z pacjentami z mieszanym chimeryzmem [26]. Z obserwacji własnych wynika, że pacjenci z niedoborami odporności po alogenicznym przeszczepieniu posiadający TREC+ (>10 TREC/100 tys. komórek), charakteryzowali się wyższą limfocytozą i posiadali większy odsetek komórek CD4+ i CD8+ w porównaniu z pacjentami TREC- [169]. Kompleksowe badania diagnostyczne określające fenotyp, poziom immunoglobulin, liczbę TREC oraz spektrytu TCR wykonane w różnym odstępie czasowym po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych są niezbędne do celu odzwierciedlenia prawidłowej odnowy immunologicznej u dzieci z wrodzonymi niedoborami odporności.

BADANIE LICZBY TREC U PACJENTÓW Z CHOROBYMI ROZROSTOWYMI UKŁADU KRWIOTWÓRCZEGO PO ALOGENICZNYM PRZESZCZEPIE

Alogeniczny przeszczep komórek krwiotwórczych jest metodą leczenia pacjentów, u których rozwinęły się cechy znamienne dla rozrostu nowotworowego układu krwiotwórczego [65,79,114,140]. Skuteczność przeszczepu jest uwarunkowana wieloma czynnikami, do których należą m.in.: dobór pary dawca-biorca w antygenach zgodności tkankowej (HLA), rodzaj rozpoznania oraz stadium zaawansowania choroby, a także stosowana terapia warunkująca przyjęcie się przeszczepu [59,72,85,86,94]. Pełny dobór dawcy w antygenach zgodności tkankowej stanowi o sukcesie przeszczepu, dlatego najlepszym dawcą jest dawca rodzinny. W przypadku dawcy alternatywnego (haploidentycznego lub niespokrewnionego) często mamy do czynienia z brakiem całkowitej zgodności w układzie HLA. W tych sytuacjach stosowane są metody immunosupresyjnego uwarunkowania przeszczepu lub modyfikacje materiału przeszczepowego przez usuwanie limfocytów T z udziałem metod selekcji negatywnej lub selekcji pozytywnej, kiedy materiał przeszczepowy zostaje wzbog-



gacony o komórki CD34+. O powodzeniu przeszczepu świadczy prawidłowa odnowa hematologiczna i immunologiczna gwarantująca długoterminowe przeżycie pacjenta, nieobarczonego powikłaniami po przeszczepieniu typu ostrej lub przewlekłej postaci choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (GVHD), czy też wystąpieniem infekcji wirusowych lub pojawieniem się znamion choroby resztkowej [78,141]. Terapia warunkująca przeszczep komórek krwiotwórczych odgrywa istotną rolę w tempie odnowy immunologicznej i hematologicznej. Komponenty mieloablacyjnego warunkowania złożone z silnego chemioterapeutyku lub warunkowanie o zredukowanej intensywności zasadniczo wpływają na odnowę immunologiczną pacjenta po przeszczepie, co ma swe odzwierciedlenie w postaci pełnego lub mieszanego chimeryzmu [72].

Rodzaj zastosowanej terapii warunkującej przyjęcie się przeszczepu może powodować długotrwały niedobór immunologiczny u biorcy dopóki zasiedlające się komórki dawcy nie zrekompensują tego ubytku. Chemioterapia jest bodźcem uszkadzającym narządy limfopoety w tym grasieć. Czas odnowy immunologicznej i hematologicznej wymierzony po przeszczepieniu odzwierciedla tempo odnowy i jest miernikiem immunokompetencji biorcy przeszczepu. Jest to okres, podczas którego dochodzi do największej liczby powikłań typu wzmożonych reaktywacji wirusowych, pojawiania się choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi oraz wznowienia choroby podstawowej [74].

Kinetyka odnowy immunologicznej dotyczącej linii limfocytów T po przeszczepie zależy w dużym stopniu od funkcjonalnej pracy grasicy biorcy. Istotnym jest więc monitorowanie odnowy limfocytów T u pacjentów po alogenicznym przeszczepie komórek krwiotwórczych nie tylko pod względem ilościowym i fenotypowym, ale również pod względem funkcjonalnym, czego odzwierciedleniem może być badanie różnorodności repertuaru receptorów TCR (spektrotyp), badanie klonalności TCR (rearanżacje klonalne), oraz badanie poziomu ekspresji genów biorących udział w szlaku rozwojowym limfocytów T np. NOTCH1 [126,127]. NOTCH1 jest odpowiedzialny za liniowo zdefiniowany rozwój linii T. Udokumentowano rolę mutacji w NOTCH1 w domenie odpowiedzialnej za heterodimeryzację receptora oraz mutacje w regionie 5' PEST, które mają wpływ na przekaz sygnału transdukcijnego w ostrej białaczce limfoblastycznej [20,46,115,161]. Rekonstrukcja komórek T u dawcy po przeszczepie jest procesem bimodalnym i charakteryzuje się dwuetapowym procesem odnowy immunologicznej grasicie niezależnym i grasicozależnym [98]. Etap grasicie niezależny charakteryzuje się wczesną ekspansją komórek dojrzałych T dawcy, odpowiedź ta jest antygenowo zależna, związana z obecnością komórek CD8+ dawcy oraz obecnością klonów komórek aloreaktywnych. W procesie odnowy grasicie niezależnej, komórki pochodzące od dawcy są komórkami dojrzałymi o fenotypie komórek pamięci immunologicznej oraz komórkami efektorowymi. Na etapie odnowy immunologicznej grasicie zależnej nowo powstałe komórki wywodzą się z grasicy i charakteryzują się fenotypem komórek dziewiczych-naïwnych. Istotą wielu badań klinicznych jest określenie liczby kolistej cząstki DNA-TREC zawartej w komórkach dziewiczych, które opuszczają prawidłowo funkcjonującą grasieć u pacjentów z chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego po przeszczepieniu [125,167]. Zasadność badania liczby sjTREC u tych pacjen-

tów wynika z konieczności monitorowania przebiegu prawidłowej odnowy immunologicznej biorcy, u którego niejednokrotnie dochodzi do wielu komplikacji związanych z procedurą przeszczepienia. Ocena liczby sjTREC w kontekście przeszczepów alogenicznych dotyczy sytuacji, kiedy mamy do czynienia z prawidłową odnową immunologiczną oraz w sytuacjach, kiedy dochodzi do wystąpienia powikłań związanych z typem warunkowania, stosowaną immunosupresją jak i wystąpieniem powikłań związanych z pojawieniem się ostrej lub przewlekłej choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (GVHD) czy też reaktywacji wirusowych. Badania liczby sjTREC mogą dotyczyć zarówno dawców jak i biorców przed przeszczepem [34].

Koliste cząstki TREC nie są obecne wkrótce po przeszczepie. Ich obecność stwierdza się dopiero około 60 dnia po transplantacji [125]. Ich liczba jest związana z odpowiednim przedziałem wiekowym biorcy, rodzajem chemioterapii oraz stosowaną immunosupresją. Weinberg i wsp. u pacjentów będących 6 lat po alogenicznym przeszczepie komórek krwiotwórczych badali częstość wystąpienia komórek naiwnych oraz obecność sjTREC we krwi obwodowej w zależności od wieku pacjenta i rodzaju dawcy [160]. Autorzy udokumentowali ujemną korelację między wiekiem biorcy a obecnością sjTREC, a także stwierdzili, że biorca, który otrzymał przeszczep od dawcy rodzinnego posiadał większą liczbę sjTREC po przeszczepie w porównaniu do biorcy przeszczepionego od dawcy niespokrewnionego [160]. Podobne rezultaty zaobserwowano u biorców przeszczepu warunkowanego mieloablacyjną terapią, którzy dodatkowo mieli obniżoną liczbę TREC w sytuacji, kiedy wystąpiły komplikacje typu GVHD [49,145]. Bahceci i wsp. opisał grupę pacjentów po HSCT warunkowaną niemieloablacyjną terapią i zaobserwowali wzrost liczby TREC w drugim tygodniu po przeszczepie i znacznym spadku około 6 miesięcy [12]. Znajduje to wytłumaczenie obecnością pozostałych komórek biorcy i wystąpieniem mieszanego chimeryzmu (warunkowanie o zmniejszonej sile ablacji, RIC – reduced intensity conditioning), a następnie falą komórek pochodzących od dawcy i wystąpieniem chimeryzmu pełnego. Wystąpienie komplikacji po przeszczepie w postaci ostrej lub przewlekłej postaci choroby skierowanej przeciwko gospodarzowi – GVHD wpływa na proces tymopoety i dlatego u tych pacjentów obserwuje się obniżenie liczby sjTREC. [125]. Postawiono następującą hipotezę: odnowa *de novo* repertuaru limfocytów T z komórek dawcy dojrzewających w grasicy biorcy wiąże się z rzadszym pojawieniem się GVHD i wtedy liczba TREC jest wysoka, natomiast odnowa T wywodząca się z komórek dojrzałych dawcy (dojrzewanie poza grasicą biorcy) niesie ryzyko pojawienia się GVHD i wtedy liczba TREC jest niska lub niewykrywalna. Potwierdza to pozagrasicy i wywodzący się z grasicy szlak dojrzewania limfocytów T w organizmie biorcy po alogenicznym przeszczepie [125]. Obserwacje te dotyczą zarówno ciężkiej postaci ostrej choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi w stopniu II-IV, jak również u pacjentów, u których rozwinęła się wielonarządowa przewlekła choroba cGVHD [124]. Badania własne potwierdziły tę obserwację [167]. Pacjenci po alogenicznym przeszczepie komórek krwiotwórczych badani powyżej 100 dnia od czasu podania komórek macierzystych, u których rozwinęła się przewlekła postać cGVHD mieli obniżoną liczbę sjTREC w porównaniu do pacjentów bez objawów tej choroby [167]. Liczba sjTREC była

wyższa u pacjentów z cGVHD o postaci ograniczonej (limited) w porównaniu do pacjentów z objawami wielonarządowymi (extensive) [167].

Badania liczby sjTREC mogą mieć również znaczenie prognostyczne w wielu sytuacjach klinicznych. Istnieją dane literaturowe, które opisują analizę TREC u pacjentów przed przeszczepem oraz wpływ określonej liczby sjTREC na losy pacjenta po przeszczepie. Clave i wsp. wykazali zależność odnowy immunologicznej od nasilenia wystąpienia powikłań przeszczepowych (GVHD) oraz infekcji wirusowych, co miało swe przełożenie w liczbie sjTREC przed przeszczepieniem [34]. Opisano 102 przypadki (87 pacjentów z chorobami rozrostowymi, 15 pacjentów z rozpoznaniem niezwiązanym z rozrostem układu krwiotwórczego) i wykazano, że średnia liczba sjTREC przed przeszczepem wynosiła 172 na 150 000 komórek o fenotypie CD3+ i była liczbą faworyzującą lepsze przeżycie pacjentów. Mediana sjTREC przed przeszczepem wynosiła 257 sjTREC na 150 000 komórek CD3+ (zakres od 0 do 42,746 sjTREC). Stwierdzono, że pacjenci posiadający przed przeszczepem więcej niż 172 sjTREC/10⁵ komórek CD3+ charakteryzują się lepszym przeżyciem ($p < 0,00001$), zmniejszoną liczbą incydentów ostrej postaci aGVHD II-IV stopnia ($p = 0,017$) i przewlekłej postaci cGVHD ($p = 0,023$), zmniejszonym odsetkiem wystąpienia infekcji bakteryjnych ($p = 0,003$) i wirusowych np. wirusem cytomegalii CMV ($p = 0,024$). W analizie wieloczynnikowej wykazano, że niska liczba sjTREC przed przeszczepem jest związana z podwyższonym ryzykiem reaktywacji CMV ($HR = 2,0$; $p = 0,06$) i infekcji bakteryjnej po przeszczepie ($HR = 2,8$; $p = 0,036$). W rezultacie wysoka liczba sjTREC ($HR = 6,6$; $p = 0,002$) oraz zgodność pary dawca-biorca w głównych grupach krwi ABO ($HR = 2,7$; $p = 0,02$) związane były z dłuższym przeżyciem pacjentów [34].

Levin i wsp. udokumentowali, że pacjenci, których materiał przeszczepowy poddany był usunięciu limfocytów T przed przeszczepem początkowo charakteryzują się mniejszą liczbą sjTREC w porównaniu z pacjentami, u których materiał przeszczepowy nie podlegał procedurom modyfikacji. Różnice te były zniwelowane dopiero w 9 miesiącu po przeszczepie [94]. Możliwość oceny prawidłowej odnowy immunologicznej poprzez badana fenotypowe, określenie różnorodności repertuaru receptorów T (spektrotyp TCR) może być wzbogacone o podanie liczby sjTREC. Bahceci i wsp. porównywali odnowę pacjentów poddanych terapii o zredukowanej intensywności (NST) oraz pacjentów przeszczepionych materiałem poddanym usunięciu limfocytów T (TCD). Autorzy wykazali, iż spektrotyp receptorów TCRB dwóch grup pacjentów różni się. Normalizacja repertuaru TCRB w grupie pacjentów NST następuje około 45 dnia, natomiast w grupie TCD około 100 dnia po przeszczepie. Ponadto zauważono większą liczbę sjTREC w populacji komórek CD4+ i CD8+ u pacjentów NST w porównaniu do grupy TCD [12]. Wczesna odnowa u pacjentów NST jest odzwierciedleniem ekspansji komórek wywodzących się z grasicy, gdzie mniejszy bodziec chemioterapii sprzyja szybszej odnowie immunologicznej. Poulin i wsp. analizowali funkcje grasicy poprzez analizę produktów rearanżacji TCR α i β w postaci cząstki sjTREC oraz fragmentów DbetaJbeta [124]. Analizowano grupę pacjentów będących od 1 roku do 10 lat po przeszczepie komórek hematopoetycznych, w której zaobserwowano zmniejszoną funkcję grasicy w przypadku rozwoju przewlekłej postaci

cGVHD [124]. Taalvensari i wsp. wykazali, że liczba sjTREC po przeszczepie ściśle korelowała z liczbą komórek dziewiczych oraz z poliklonalnym repertuarem TCR [148]. Podczas porównania dwóch źródeł komórek macierzystych pochodzących z krwi pępowinowej i ze szpiku w czasie 1 roku i po 2 latach po przeszczepie, repertuar TCR nie był znormalizowany, a liczba sjTREC była niska zarówno u pacjentów przeszczepionych krwią pępowinową jak i szpikiem. Zasadnicze różnice zauważono w drugim roku po przeszczepie w grupie, której podano krew pępowinową, gdzie repertuar TCR był bardziej różnorodny, a liczba sjTREC była wyższa niż u pacjentów, którym podano szpik kostny. Podanie krwi pępowinowej gwarantowało więc lepsze zadomowienie się komórek progenitorowych linii limfoidalnej w grasicy biorcy w porównaniu ze szpikiem [148]. Podczas analizy liczby sjTREC nie może być pominięty indeks proliferacji komórkowej. Ze względu na to, że podczas podziału mitotycznego komórka siostrzana nie otrzymuje cząstki TREC, komórki dzielące się stanowią przewagę i „rozcieńczają” komórki zawierające sjTREC (ryc. 3).

Spostrzeżenia Hazenberg i wsp. skłaniają do refleksji na temat swoistego przełożenia liczby sjTREC do klinicznego stanu pacjenta po HSCT [68]. Nadmierna proliferacja komórkowa może dotyczyć aktywacji układu immunologicznego, gdy dochodzi do GVHD lub infekcji. Zmniejszona liczba sjTREC w czasie trwania procesu GVHD może być tłumaczona wysokim tłem proliferacyjnym. Dodatkowym parametrem, towarzyszącym obliczaniu liczby sjTREC jest wskazana jednoczesna analiza indeksu proliferacji np. w postaci analizy Ki67 [68]. Fallen i wsp. analizowali odnowę komórek T i tempo odnowy po przeszczepie przez badanie fenotypu komórek CD4+CD45RA+ oraz liczby sjTREC w czasie 12 miesięcy od podania komórek macierzystych [48]. Szczególną uwagę autor poświęcił czynnikom, które wpływają na zaburzenie prawidłowej odnowy po przeszczepie. Analizowane proporcje populacji komórkowych, komórek dziewiczych, pamięci i efektorowych pozwoliły na ocenę grasiconiezależnej odnowy, która dotyczyła okresu do 6 miesięcy po przeszczepie, kiedy to przeważały populacje komórkowe limfocytów T dawcy o fenotypie komórki pamięci i efektorowej. W odróżnieniu od okresu późniejszego 6–12 miesięcy, kiedy to zaobserwowano odnowę grasicozależną z przewagą komórek dziewiczych [48]. Wiek pacjenta, obecność cGVHD, usuwanie limfocytów T z materiału przeszczepowego i zastosowanie Campath sprzyjają obniżeniu liczby sjTREC [48]. Badania własne potwierdzają niektóre z tych zależności [167,168]. Badana grupa pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową wykazała, że większą liczbę sjTREC mają biorcy alogenicznego przeszczepu, u których nie rozwinęła się cGVHD i gdy byli wolni od wznowy choroby podstawowej [168]. Dużą liczbę sjTREC posiadali pacjenci, których proporcje komórek o fenotypie komórek naiwnych w porównaniu do komórek pamięci/efektorowych były wyższe: CD4+CCR7+ (5,07±0,75% vs 2,67±0,33%, $p = 0,02$), CD4+CD27+CD45RO- (3,67±0,61% vs 2,45±0,55%, $p = 0,08$) [168]. Opublikowana praca Przybylskiego i wsp. potwierdza zasadność monitorowania liczby sjTREC u pacjentów po alogenicznym przeszczepie i wskazuje na czynniki wpływające na zmniejszenie liczby sjTREC u tych pacjentów [125]. Autorzy wykazali, że pacjenci przed przeszczepem wykazywali mniejszą liczbę sjTREC w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej. U 12 na 24 badanych pacjentów sjTREC pojawiły



się ok. 3–6 miesiąca po przeszczepie. U 11 pacjentów nie stwierdzono obecności sjTREC, co potwierdziło istnienie czynników wpływających negatywnie na powstawanie sjTREC. U wszystkich pacjentów sjTREC(–) zaobserwowano aGVHD II-III stopnia. Ponadto autorzy udokumentowali, że u pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową, u których stwierdzono obecność transkryptu BCR-ABL nie stwierdzono obecności sjTREC [125].

OBECNOŚĆ TREC U PACJENTÓW Z CHOROBYMI O PODŁOŻU AUTOIMMUNOLOGICZNYM

Odpowiedź immunologiczna skierowana przeciwko własnemu tkankom i narządom, u podłoża której leży antygen własny postrzegany jako obcy determinuje rozwój chorób autoimmunologicznych swoistych narządowo lub o charakterze wielonarządowym [103]. Wyróżnia się choroby o etiologii komórkowej lub humoralnej z udziałem i przewagą limfocytów TH1 (wytwarzających IL-2, IFN-gamma, z receptorem chemokinowym CCR5 i IL-12R, IL-18R) i TH2 (IL-4, -5, -10, -13). Etiologia chorób autoimmunologicznych nie jest do końca poznana, ale ustalono podłoże genetyczne warunkujące i sprzyjające pojawianiu się chorób z autoagresją [45,70,137,158].

Kayser i wsp. zaobserwowali, iż pacjenci, u których rozwija się toczeń rumieniowaty trzewny (systemic lupus erythematosus – SLE) charakteryzowali się obniżoną liczbą TREC we frakcji komórek jednojądrzastych CD4+ i CD8+ [80]. Autorzy sugerowali, że obniżona liczba TREC mogła być spowodowana albo wytwarzaniem małej liczby komórek opuszczających grasicę lub też nadmiernym wzrostem podziału komórkowego limfocytów obwodowych [80]. Badania aktywności telomerazy, enzymu powszechnie znanego jako wskaźnika indeksu proliferacji komórkowej, potwierdziły przypuszczenia, iż pacjenci SLE charakteryzują się wzrostem aktywności telomerazy, co potwierdza wzmoczoną aktywność proliferacyjną i aktywację limfocytów [91]. Badania Kurosaka i wsp. nie wykazały korelacji między poziomem sjTREC a aktywnością telomerazy, co może sugerować zmniejszenie potencjału grasicy (thymic output) u pacjentów z SLE [92]. U pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów (RA) zaobserwowano, że różnorodność repertuaru TCR jest zubożona. Komórki T naiwne i pamięci charakteryzują się obecnością skróconych telomerów [164]. Zauważa się więc przewagę komórek szybciej starzejących się [84,159].

Dodatkowo obserwuje się utratę CD28 oraz obniżoną wartość TREC. U podłoża choroby leżą uwarunkowania genetyczne związane z określonym HLA predysponującym do zachorowania np. HLA-DR4. Rozpoznanie własnych cząsteczek MHC przez TCR jest istotne podczas dojrzewania limfocytów w grasicy oraz w narządach obwodowych przy zachowaniu homeostazy. Malejące wytwarzanie komórek T w grasicy u pacjentów RA ma więc znaczenie w zachowaniu odpowiedniej puli limfocytów [73,76,122,136].

OBECNOŚĆ TREC U PACJENTÓW Z NABYTYM ZESPOŁEM NIEDOBORU ODPORNOŚCI

Stan obniżonej odporności wywołany przez AIDS (acquired immunodeficiency syndrome), którego czynnikiem wywołującym jest wirus ludzkiego niedoboru odporności

(HIV - human immunodeficiency virus) wymaga wielolekowej terapii opartej na użyciu swoistych inhibitorów enzymów wirusowych HAART (highly active antiretroviral treatment) [101,128]. Wirus HIV zakaża komórki docelowe wykorzystując cząsteczkę CD4 oraz receptory chemokin. Cząsteczka CD4 jest rozpoznawana przez fragment glikoproteiny otoczkowej wirusa gp120 wykazując większe powinowactwo niż do MHC klasy II. HIV wykorzystuje, oprócz cząsteczki CD4+, koreceptory należące do receptorów chemokin i zakaża różne populacje limfocytów, makrofagów oraz komórek dendrytycznych [30]. Pierwszym celem wirusa są komórki dendrytyczne, a także spoczynkowe limfocyty T pamięci CD4+CCR5+ obecne w błonach śluzowych. Komórki dendrytyczne wędrują w okolicy węzłów limfatycznych, w których podczas prezentacji antygenów komórkom T dochodzi do ich zakażenia. Wirus replikuje w obwodowych narządach limfatycznych, gdzie następuje destrukcja struktury węzłów, ale również grasicy i szpiku – miejsc dojrzewania komórek układu odpornościowego, toteż wprowadzono do leczenia inhibitory proteazy oraz wielolekowej terapii HAART składającej się z inhibitorów odwrotnej transkryptazy oraz inhibitorów proteaz [39,42]. Terapia zapewnia powrót właściwej proporcji CD4/CD8 oraz pojawienia się swoistych wobec HIV limfocytów CD4+ [132]. Uzasadnionym w prowadzeniu terapii HAART jest monitorowanie prawidłowej funkcji grasicy poprzez analizę TREC przed wdrożeniem terapii, a także po jej zakończeniu [4,129]. Douek i wsp. wykazali obniżenie funkcji grasicy podczas infekcji HIV, liczba TREC była zmniejszona, a jej wzrost nastąpił dopiero po wdrożeniu terapii [1,43].

OBECNOŚĆ TREC U PACJENTÓW PO ZABIEGU TYMEKTOMII

Tymektomia jest zabiegiem operacyjnym polegającym na usunięciu grasicy. Bez względu na wskazanie jest stwierdzenie obecności w badaniu tomograficznym śródpiersia grasiczaka – guza grasicy, rozpoznanie miastenui, śródoperacyjne usunięcie grasicy podczas zabiegów kardiologicznych wad wrodzonych serca u noworodków. Miastenia (łac. *myasthenia gravis*) jest przewlekłą chorobą, charakteryzującą się nużliwością (szybkim zmęczeniem i osłabieniem) mięśni. Przyczyną miastenui jest autoimmunologiczny atak tworzonych autoprzeciwciał skierowanych przeciwko receptorom acetylocholino. Wynikiem tego jest spadek liczby receptorów w obrębie mięśni i zaburzenie transmisji nerwowo-mięśniowej. Choroby grasicy, która nie ulega atrofii, nie pozostają bez związku z zachorowalnością na miastenię. U chorych z miastenią stwierdza się nieprawidłowości grasicy – w 70% wzrost (hiperplazję) z obecnością centrów rozrodczych, a u 15% chorych – grasiczak. Wyniki dotychczasowych badań potwierdzają, że zabieg tymektomii powoduje zmiany odsetków subpopulacji limfocytów krwi obwodowej oraz komórek pamięci immunologicznej w krótkim, a także w odległym okresie pooperacyjnym. Ma to wpływ na funkcjonowanie układu odpornościowego tych pacjentów zarówno w okresie okołołobiegowym, jak i w dalszym życiu. Dotyczy to również analizy liczby TREC [57,138,154]. Publikowane dane literaturowe potwierdzają obniżenie lub całkowity brak komórek dziewiczych zawierających TREC u pacjentów po zabiegu tymektomii mierzonych w różnych odstępach czasowych, tym samym dowodzi się również o braku możliwości powstawania TREC poza grasicą [57].

PODSUMOWANIE

Episomalne cząsteczki DNA-TREC jako stały element komórki dziewiczej stanowią dogodny marker odzwierciedlający prawidłową funkcję grasicy. Pomiar liczby TREC stanowi pomocną rolę w ocenie wielu sytuacji klinicznych, w których obserwowany jest zaburzony proces limfopojezy.

PIŚMIENICTWO

- [1] Aladdin H., Katzenstein T., Dreves A.M., Ryder L., Gerstoft J., Skinhøj P., Pedersen B.K., Ullum H.: T-cell receptor excisional circles, telomere length, proliferation and apoptosis in peripheral blood mononuclear cells of human immunodeficiency virus-infected individuals after 18 months of treatment induced viral suppression. *Scand. J. Immunol.*, 2003; 57: 485–492
- [2] Al-Harhi L., Marchetti G., Steffens C.M., Poulin J., Sékaly R., Landay A.: Detection of T cell receptor circles (TRECs) as biomarkers for *de novo* T cell synthesis using a quantitative polymerase chain reaction-enzyme linked immunosorbent assay (PCR-ELISA). *J. Immunol. Methods*, 2000; 237: 187–197
- [3] Allsopp R.C., Vaziri H., Patterson C., Goldstein S., Younglai E.V., Fitcher A.B., Greider C.W., Harley C.B.: Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992; 89: 10114–10118
- [4] Anselmi A., Vendrame D., Rampon O., Giaquinto C., Zanchetta M., De Rossi A.: Immune reconstitution in human immunodeficiency virus type 1-infected children with different virological responses to anti-retroviral therapy. *Clin. Exp. Immunol.*, 2007; 150: 442–450
- [5] Antoine C., Müller S., Cant A., Cavazzana-Calvo M., Veys P., Vossen J., Fasth A., Heilmann C., Wulfraat N., Seger R., Blanche S., Friedrich W., Abinun M., Davies G., Bredius R., Schulz A., Landais P., Fischer A., European Group for Blood and Marrow Transplantation, European Society for Immunodeficiency: Long-term survival and transplantation of haematopoietic stem cells for immunodeficiencies: report of the European experience 1968–99. *Lancet*, 2003; 361: 553–560
- [6] Arellano M.V., Ordóñez A., Ruiz-Mateos E., Leal-Noval S.R., Molina-Pinelo S., Hernández A., Vallejo A., Hinojosa R., Leal M.: Thymic function-related markers within the thymus and peripheral blood: Are they comparable? *J. Clin. Immunol.*, 2006; 26: 96–100
- [7] Arizcorreta A., Márquez M., Fernández-Gutiérrez C., Guzmán E.P., Brun F., Rodríguez-Iglesias M., Girón-González J.A.: T cell receptor excision circles (TRECs), CD4+, CD8+, and their CD45RO+, and CD45RA+, subpopulations in hepatitis C virus (HCV)-HIV-co-infected patients during treatment with interferon α plus ribavirin: analysis in a population on effective antiretroviral therapy. *Clin. Exp. Immunol.*, 2006; 146: 270–277
- [8] Asnafi V., Beldjord K., Boulanger E., Comba B., Le Tutour P., Estienne M.H., Davi F., Landman-Parker J., Quartier P., Buzyn A., Delabesse E., Valensi F., Macintyre E.: Analysis of TCR, pT α , and RAG-1 in T-acute lymphoblastic leukemias improves understanding of early human T-lymphoid lineage commitment. *Blood*, 2003; 101: 2693–2703
- [9] Aspinall R., Andrew D., Pido-Lopez J.: Age-associated changes in thymopoiesis. *Springer Semin. Immunopathol.*, 2002; 24: 87–101
- [10] Assaf C., Hummel M., Dippel E., Goerdt S., Müller H.H., Anagnostopoulos I., Orfanos C.E., Stein H.: High detection rate of T-cell receptor β chain rearrangements in T-cell lymphoproliferations by family specific polymerase chain reaction in combination with GeneScan technique and DNA sequencing. *Blood*, 2000; 96: 640–646
- [11] Avanzini M.A., Maccario R., Locatelli F., Giebel S., Santos C.D., Bernardo M.E., Pagliara D., Montagna D., Longo S., Amendola G., Marconi M.: Low percentages of circulating CD8+/CD45RA+ human T lymphocytes expressing $\beta 7$ integrin correlate with the occurrence of intestinal acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Exp. Hematol.*, 2006; 34: 1429–1434
- [12] Bahceci E., Epperson D., Douek D.C., Melenhorst J.J., Childs R.C., Barrett A.J.: Early reconstitution of the T-cell repertoire after non-myeloablative peripheral blood stem cell transplantation is from post-thymic T-cell expansion and is unaffected by graft-versus-host disease or mixed chimaerism. *Br. J. Haematol.*, 2003; 122: 934–943
- [13] Bertho J.M., Demarquay C., Mouliau N., Van Der Meer A., Berrih-Aknin S., Gourmelon P.: Phenotypic and immunohistological analyses of the human adult thymus: evidence for an active thymus during adult life. *Cell. Immunol.*, 1997; 179: 30–40
- [14] Blackburn E.H.: Structure and function of telomeres. *Nature*, 1991; 350: 569–573
- [15] Bodnar A.G., Kim N.W., Effros R.B., Chiu C.P.: Mechanism of telomerase induction during T cell activation. *Exp. Cell Res.*, 1996; 228: 58–64
- [16] Borghans J.A., Bredius R.G., Hazenberg M.D., Roelofs H., Jol-van der Zijde E.C., Heidt J., Otto S.A., Kuijpers T.W., Fibbe W.E., Vossen J.M., Miedema F., van Tol M.J.: Early determinants of long-term T-cell reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation for severe combined immunodeficiency. *Blood*, 2006; 108: 763–769
- [17] Borghans J.A., de Boer R.J.: Quantification of T-cell dynamics: from telomeres to DNA labeling. *Immunol. Rev.*, 2007; 216: 35–47
- [18] Boursalian T.E., Bottomly K.: Survival of naive CD4 T cells: roles of restricting versus selecting MHC class II and cytokine milieu. *J. Immunol.*, 1999; 162: 3795–3801
- [19] Boursalian T.E., Golob J., Soper D.M., Cooper C.J., Fink P.J.: Continued maturation of thymic emigrants in the periphery. *Nat. Immunol.*, 2004; 5: 418–425
- [20] Breit S., Stanulla M., Flohr T., Schrappe M., Ludwig W.D., Tolle G., Happich M., Muckenthaler M.U., Kulozik A.E.: Activating NOTCH1 mutations predict favorable early treatment response and long-term outcome in childhood precursor T-cell lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2006; 108: 1151–1157
- [21] Breit T.M., Wolvers Tettero I.L., Bogers A.J., de Krijger R.R., Wladimiroff J.W., van Dongen J.J.: Rearrangements of the human TCRD-deleting elements. *Immunogenetics*, 1994; 40: 70–75
- [22] Brocker T.: Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 1997; 186: 1223–1232
- [23] Buchkovich K.J., Greider C.W.: Telomerase regulation during entry into the cell cycle in normal human T cells. *Mol. Biol. Cell*, 1996; 7: 1443–1454
- [24] Buckley R.H.: Molecular defects in human severe combined immunodeficiency and approaches to immune reconstitution. *Annu. Rev. Immunol.*, 2004; 22: 625–655
- [25] Buckley R.H., Schiff S.E., Schiff R.I., Markert L., Williams L.W., Roberts J.L.: Hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.*, 1999; 340: 508–516
- [26] Cavazzana-Calvo M., Carlier F., Le Deist F., Morillon E., Taupin P., Gautier D., Radford-Weiss I., Caillaud-Zucman S., Neven B., Blanche S., Cheynier R., Fischer A., Hachein-Bey-Abina S.: Long-term T-cell reconstitution after hematopoietic stem-cell transplantation in primary T-cell-immunodeficient patients is associated with myeloid chimerism and possibly the primary disease phenotype. *Blood*, 2007; 109: 4575–4581
- [27] Cavazzana-Calvo M., Fischer A.: Gene therapy for severe combined immunodeficiency: are we there yet? *J. Clin. Invest.*, 2007; 117: 1456–1465
- [28] Cavazzana-Calvo M., Hachein-Bey S., de Saint Basile G., Gross F., Yvon E., Nusbaum P., Selz F., Hue C., Certain S., Casanova J.L., Bousso P., Deist F.L., Fischer A.: Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, 2000; 288: 669–672
- [29] Cazzaniga G., Biondi A.: Molecular monitoring of childhood acute lymphoblastic leukemia using antigen receptor gene rearrangements and quantitative polymerase chain reaction technology. *Haematologica*, 2005; 90: 382–390
- [30] Chattopadhyay P.K., Douek D.C., Gange S.J., Chadwick K.R., Hellerstein M., Margolick J.B.: Longitudinal assessment of *de novo* T cell production in relation to HIV-associated T cell homeostasis failure. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2006; 22: 501–507



- [31] Chen X., Barfield R., Benaim E., Leung W., Knowles J., Lawrence D., Otto M., Shurtleff S.A., Neale G.A., Behm F.G., Turner V., Handgretinger R.: Prediction of T-cell reconstitution by assessment of T-cell receptor excision circle before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients. *Blood*, 2005; 105: 886–893
- [32] Chu Y.W., Memon S.A., Sharrow S.O., Hakim F.T., Eckhaus M., Lucas P.J., Gress R.E.: Exogenous IL-7 increases recent thymic emigrants in peripheral lymphoid tissue without enhanced thymic function. *Blood*, 2004; 104: 1110–1119
- [33] Cianci R., Pinti M., Nasi M., Starnino S., Cammarota G., Miele L., De Luca A., Cauda R., Raducci F., Grieco A., Rapaccini G., Gasbarrini G., Cossarizza A., Pandolfi F.: Impairment of recent thymic emigrants in HCV infection. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2005; 18: 723–728
- [34] Clave E., Rocha V., Talvensaar K., Busson M., Douay C., Appert M.L., Rabian C., Carmagnat M., Garnier F., Filion A., Socié G., Gluckman E., Charron D., Toubert A.: Prognostic value of pretransplantation host thymic function in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 2005; 105: 2608–2613
- [35] Corthay A.: A three-cell model for activation of naïve T helper cells. *Scand. J. Immunol.*, 2006; 64: 93–96
- [36] De Boer R.J., Noest A.J.: T cell renewal rates, telomerase, and telomere length shortening. *J. Immunol.*, 1998; 160: 5832–5837
- [37] De Rosa S.C., Herzenberg L.A., Herzenberg L.A., Roederer M.: 11-color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naïve T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. *Nat. Med.*, 2001; 7: 245–248
- [38] de Villartay J.P., Hockett R.D., Coran D., Korsmeyer S.J., Cohen D.I.: Deletion of the human T-cell receptor δ -gene by a site-specific recombination. *Nature*, 1988; 335: 170–174
- [39] Di Mascio M., Sereti L., Matthews L.T., Natarajan V., Adelsberger J., Lempicki R., Yoder C., Jones E., Chow C., Metcalf J.A., Sidorov I.A., Dimitrov D.S., Polis M.A., Kovacs J.A.: Naïve T-cell dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection: effects of highly active antiretroviral therapy provide insights into the mechanisms of naïve T-cell depletion. *J. Virol.*, 2006; 80: 2665–2674
- [40] Dik W.A., Pike-Overzet K., Weerkamp F., de Ridder D., de Haas E.F., Baert M.R., van der Spek P., Koster E.E., Reinders M.J., van Dongen J.J., Langerak A.W., Staal F.J.: New insights on human T cell development by quantitative T cell receptor gene rearrangement studies and gene expression profiling. *J. Exp. Med.*, 2005; 201: 1715–1723
- [41] Dion M.L., Sékaly R.P., Cheyner R.: Estimating thymic function through quantification of T-cell receptor excision circles. *Methods Mol. Biol.*, 2007; 380: 197–213
- [42] Dion M.L., Bordi R., Zeidan J., Asaad R., Boulassel M.R., Routy J.P., Lederman M.M., Sékaly R.P., Cheyner R.: Slow disease progression and robust therapy-mediated CD4+ T-cell recovery are associated with efficient thymopoiesis during HIV-1 infection. *Blood*, 2007; 109: 2912–2920
- [43] Douek D.C., Betts M.R., Hill B.J., Little S.J., Lempicki R., Metcalf J.A., Casazza J., Yoder C., Adelsberger J.W., Stevens R.A., Baseler M.W., Keiser P., Richman D.D., Davey R.T., Koup R.A.: Evidence for increased T cell turnover and decreased thymic output in HIV infection. *J. Immunol.*, 2001; 167: 6663–6668
- [44] Douek D.C., McFarland R.D., Keiser P.H., Gage E.A., Massey J.M., Haynes B.F., Polis M.A., Haase A.T., Feinberg M.B., Sullivan J.L., Jamieson B.D., Zack J.A., Picker L.J., Koup R.A.: Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*, 1998; 396: 690–695
- [45] Ebers G.C., Kukay K., Bulman D.E., Sadovnick A.D., Rice G., Anderson C., Armstrong H., Cousin K., Bell R.B., Hader W., Paty D.W., Hashimoto S., Oger J., Duquette P., Warren S., Gray T., O'Connor P., Nath A., Auty A., Metz L., Francis G., Paulseth J.E., Murray T.J., Pryse-Phillips W., Nelson R., Freedman M., Brunet D., Bouchard J.P., Hinds D., Risch N.: A full genome search in multiple sclerosis. *Nat. Genet.*, 1996; 13: 472–476
- [46] Eguchi-Ishimae M., Eguchi M., Kempinski H., Greaves M.: NOTCH1 mutation can be an early, prenatal genetic event in T-ALL. *Blood*, 2008; 111: 376–378
- [47] Ernst B., Lee D.S., Chang J.M., Sprent J., Surh C.D.: The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity*, 1999; 11: 173–181
- [48] Fallen P.R., Duarte R.F., McGreavey L., Potter M., Ethell M., Prentice H.G., Madrigal J.A., Travers P.J.: Identification of non-naïve CD4+CD45RA+ T cell subsets in adult allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.*, 2003; 32: 609–616
- [49] Fallen P.R., McGreavey L., Madrigal J.A., Potter M., Ethell M., Prentice H.G., Guimaraes A., Travers P.J.: Factors affecting reconstitution of the T cell compartment in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.*, 2003; 32: 1001–1014
- [50] Fischer A., Hacey-Bey S., Le Deist F., Soudais C., Di Santo J.P., de Saint Basile G., Cavazzana-Calvo M.: Gene therapy of severe combined immunodeficiencies. *Immunol. Rev.*, 2000; 178: 13–20
- [51] Flores K.G., Li J., Sempowski G.D., Haynes B.F., Hale L.P.: Analysis of the human thymic perivascular space during aging. *J. Clin. Invest.*, 1999; 104: 1031–1039
- [52] Freitas A.A., Rocha B.: Population biology of lymphocytes: the flight for survival. *Annu. Rev. Immunol.*, 2000; 18: 83–111
- [53] Fry T.J., Mackall C.L.: The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. *J. Immunol.*, 2005; 174: 6571–6576
- [54] Fu Y.W., Wu de P., Cen J.N., Feng Y.F., Chang W.R., Zhu Z.L., Qiu Q.C., Zhu P.: Patterns of T-cell reconstitution by assessment of T-cell receptor excision circle and T-cell receptor clonal repertoire after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in leukemia patients – a study in Chinese patients. *Eur. J. Haematol.*, 2007; 79: 138–145
- [55] Fugmann S.D., Lee A.I., Shockett P.E., Villey I.J., Schatz D.G.: The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu. Rev. Immunol.*, 2000; 18: 495–527
- [56] Geenen V., Poulin J.F., Dion M.L., Martens H., Castermans E., Hansenne I., Moutschen M., Sékaly R.P., Cheyner R.: Quantification of T cell receptor rearrangement excision circles to estimate thymic function: an important new tool for endocrine-immune physiology. *J. Endocrinol.*, 2003; 176: 305–311
- [57] Giebel S., Dziaczkowska J., Wyczońska B., Wojnar J., Krawczyk-Kulis M., Lange A., Holowiecki J.: Lymphocyte reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation in a previously thymectomized patient – no evidence of extrathymic T-cell maturation. *Bone Marrow Transplant.*, 2007; 40: 705–706
- [58] Gomez I., Hainz U., Jenewein B., Schwaiger S., Wolf A.M., Grubeck-Loebenstein B.: Changes in the expression of CD31 and CXCR3 in CD4+ naïve T cells in elderly persons. *Mech. Ageing Dev.*, 2003; 124: 395–402
- [59] Gratwohl A., Baldomero H., Frauendorfer K., Urbano-Ispizua A., Niederwieser D., Joint Accreditation Committee of the International Society for Cellular Therapy ISCT, European Group for Blood and Marrow Transplantation EBMT: Results of the EBMT activity survey 2005 on hematopoietic stem cell transplantation: focus on increasing use of unrelated donors. *Bone Marrow Transplant.*, 2007; 39: 71–87
- [60] Grossman Z., Min B., Meier-Schellersheim M., Paul W.E.: Concomitant regulation of T-cell activation and homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004; 4: 387–395
- [61] Hakim F.T., Memon S.A., Cepeda R., Jones E.C., Chow C.K., Kastensportes C., Odom J., Vance B.A., Christensen B.L., Mackall C.L., Gress R.E.: Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults. *J. Clin. Invest.*, 2005; 115: 930–939
- [62] Hale L.P., Buckley R.H., Puck J.M., Patel D.D.: Abnormal development of thymic dendritic and epithelial cells in human X-linked severe combined immunodeficiency. *Clin. Immunol.*, 2004; 110: 63–70
- [63] Halton N.J., Jamieson B., Plunkett M., Kitchen C.M., Pham T., Krogstad P.: Thymic function and impaired maintenance of peripheral T cell populations in children with congenital heart disease and surgical thymectomy. *Pediatr. Res.*, 2005; 57: 42–48
- [64] Harley C.B., Futcher A.B., Greider C.W.: Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 1990; 345: 458–460
- [65] Hart D.P., Peggs K.S.: Current status of allogeneic stem cell transplantation for treatment of hematologic malignancies. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2007; 82: 325–329
- [66] Hassan J., Reen D.J.: Human recent thymic emigrants – identification, expansion, and survival characteristics. *J. Immunol.*, 2001; 167: 1970–1976
- [67] Haynes B.F., Markert M.L., Sempowski G.D., Patel D.D., Hale L.P.: The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection. *Annu. Rev. Immunol.*, 2000; 18: 529–560
- [68] Hazenberg M.D., Otto S.A., de Pauw E.S., Roelofs H., Fibbe W.E., Hamann D., Miedema F.: T-cell receptor excision circle and T-cell dynamics after allogeneic stem cell transplantation are related to clinical events. *Blood*, 2002; 99: 3449–3453
- [69] Hazenberg M.D., Verschuren M.C., Hamann D., Miedema F., van Dongen J.J.: T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *J. Mol. Med.*, 2001; 79: 631–640

- [70] Hochberg M.C.: The application of genetic epidemiology to systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.*, 1987; 14: 867–869
- [71] Hoelzer D., Gökbuğet N., Ottmann O., Pui C.H., Relling M.V., Appelbaum F.R., van Dongen J.J., Szczepański T.: Acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, 2002; 162–192
- [72] Hogan W.J., Storb R.: Clinical developments in reduced intensity hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2002; 2: 703–714
- [73] Honda M., Mengesha E., Albano S.: Telomere shortening and decreased replicative potential, contrasted by continued proliferation of telomerase-positive CD8+CD28(lo) T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol.*, 2001; 99: 211–221
- [74] Huang X.J., Liu D.H., Liu K.Y., Xu L.P., Chen H., Han W.: Donor lymphocyte infusion for the treatment of leukemia relapse after HLA-mismatched/haploidentical T-cell-replete hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*, 2007; 92: 414–417
- [75] Hug A., Korporal M., Schröder I., Haas J., Glatz K., Storch-Hagenlocher B., Wildemann B.: Thymic export function and T cell homeostasis in patients with relapsing remitting multiple sclerosis. *J. Immunol.*, 2003; 171: 432–437
- [76] Jeanclous E., Krolewski A., Skurnick J., Kimura M., Aviv H., Warram J.H., Aviv A.: Shortened telomere length in white blood cells of patients with IDDM. *Diabetes*, 1998; 47: 482–486
- [77] Junge S., Kloeckener-Gruissem B., Zufferey R., Keisler A., Salgo B., Fauchere J.C., Scherer F., Shalaby T., Grotzer M., Siler U., Seger R., Güngör T.: Correlation between recent thymic emigrants and CD31+ (PECAM-1) CD4+ T cells in normal individuals during aging and in lymphopenic children. *Eur. J. Immunol.*, 2007; 37: 3270–3280
- [78] Kahl C., Storer B.E., Sandmaier B.M., Mielcarek M., Maris M.B., Blume K.G., Niederwieser D., Chauncey T.R., Forman S.J., Agura E., Leis J.F., Bruno B., Langston A., Pulsipher M.A., McSweeney P.A., Wade J.C., Epler E., Bo Petersen F., Bethge W.A., Maloney D.G., Storb R.: Relapse risk in patients with malignant diseases given allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *Blood*, 2007; 110: 2744–2748
- [79] Kami M., Hamaki T., Miyakoshi S., Murashige N., Kanda Y., Tanosaki R., Takaue Y., Taniguchi S., Hirai H., Ozawa K., Kasai M.: Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for the treatment of adult T-cell leukaemia/lymphoma. *Br. J. Haematol.*, 2003; 120: 304–309
- [80] Kayser C., Alberto F.L., da Silva N.P., Andrade L.E.: Decreased number of T cells bearing TCR rearrangement excision circles (TREC) in active recent onset systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 2004; 13: 906–911
- [81] Kilpatrick R.D., Rickabaugh T., Hultin L.E., Hultin P., Hausner M.A., Detels R., Phair J., Jamieson B.D.: Homeostasis of the naive CD4+ T cell compartment during aging. *J. Immunol.*, 2008; 180: 1499–1507
- [82] Kimmig S., Przybylski G.K., Schmidt C.A., Laurisch K., Möwes B., Radbruch A., Thiel A.: Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood. *J. Exp. Med.*, 2002; 195: 789–794
- [83] Kirberg J., Berns A., von Boehmer H.: Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules. *J. Exp. Med.*, 1997; 186: 1269–1275
- [84] Koetz K., Bryl E., Spickschen K., O'Fallon W.M., Goronzy J.J., Weyand C.M.: T cell homeostasis in patients with rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 9203–9208
- [85] Koh L.P., Chao N.: Haploidentical hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 2008; 42(Suppl.1): S60–S63
- [86] Koh L.P., Rizzieri D.A., Chao N.J.: Allogeneic hematopoietic stem cell transplant using mismatched/haploidentical donors. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2007; 13: 1249–1267
- [87] Kohler S., Thiel A.: Life after the thymus CD31+ and CD31- human naive CD4+ T-cell subsets. *Blood*, 2008; w d roku
- [88] Kong F.K., Chen C.L., Six A., Hockett R.D., Cooper M.D.: T cell receptor gene deletion circles identify recent thymic emigrants in the peripheral T cell pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 1536–1540
- [89] Krejci O., van der Velden V.H., Bader P., Kreyenberg H., Goulden N., Hancock J., Schilham M.W., Lankester A., Révész T., Klingebiel T., van Dongen J.J.: Level of minimal residual disease prior to hematopoietic stem cell transplantation predicts prognosis in paediatric patients with acute lymphoblastic leukemia: a report of the Pre-BMT MRD Study Group. *Bone Marrow Transplant.*, 2003; 32: 849–851
- [90] Kurosaka D., Yasuda J., Ikeshima-Kataoka H., Ozawa Y., Yoshida K., Yasuda C., Kingetsu I., Saito S., Yamada A.: Decreased numbers of signal-joint T cell receptor excision circle-containing CD4+ and CD8+ cells in systemic lupus erythematosus patients. *Mod. Rheumatol.*, 2007; 17: 296–300
- [91] Kurosaka D., Yasuda J., Yoshida K., Yokoyama T., Ozawa Y., Obayashi Y.: Telomerase activity and telomere length of peripheral blood mononuclear cells in SLE patients. *Lupus*, 2003; 12: 591–599
- [92] Kurosaka D., Yasuda J., Yoshida K., Yoneda A., Yasuda C., Kingetsu I., Toyokawa Y., Yokoyama T., Saito S., Yamada A.: Abnormal telomerase activity and telomere length in T and B cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.*, 2006; 33: 1102–1107
- [93] Langerak A.W., Wolvers-Tettero I.L., van den Beemd M.W., van Wering E.R., Ludwig W.D., Hählen K., Necker A., van Dongen J.J.: Immunophenotypic and immunogenotypic characteristics of TCRγδ+ T cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 1999; 13: 206–214
- [94] Lewin S.R., Heller G., Zhang L., Rodrigues E., Skulsky E., van den Brink M.R., Small T.N., Kernan N.A., O'Reilly R.J., Ho D.D., Young J.W.: Direct evidence for new T-cell generation by patients after either T-cell-depleted or unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantations. *Blood*, 2002; 100: 2235–2242
- [95] Loeffler J., Bauer R., Hebart H., Douek D.C., Rauser G., Bader P., Einsele H.: Quantification of T-cell receptor excision circle DNA using fluorescence resonance energy transfer and the LightCycler system. *J. Immunol. Methods*, 2002; 271: 167–175
- [96] Luetting B., Sponholz A., Heerwagen C., Bode U., Westermann J.: Recent thymic emigrants (CD4+) continuously migrate through lymphoid organs: within the tissue they alter surface molecule expression. *Scand. J. Immunol.*, 2001; 53: 563–571
- [97] Mackall C., Fleisher T.A., Brown M.R., Andrich M.P., Chen C.C., Feuerstein I.M., Horowitz M.E., Magrath I.T., Shad A.T., Steinberg S.M., Wexler L.H., Gress R.E.: Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *N. Engl. J. Med.*, 1995; 332: 143–149
- [98] Mackall C.L., Bare C.V., Granger L.A., Sharrow S.O., Titus J.A., Gress R.E.: Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. *J. Immunol.*, 1996; 156: 4609–4616
- [99] Mackall C.L., Punt J.A., Morgan P., Faar A.G., Gress R.E.: Thymic function in young/old chimeras: substantial thymic T cell regenerative capacity despite irreversible age-associated thymic involution. *Eur. J. Immunol.*, 1998; 28: 1886–1893
- [100] Madhok A.B., Chandrasekran A., Parnell V., Gandhi M., Chowdhury D., Pahwa S.: Levels of recent thymic emigrant cells decrease in children undergoing partial thymectomy during cardiac surgery. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2005; 12: 563–565
- [101] Marchetti G., Gori A., Casabianca A., Magnani M., Franzetti F., Clerici M., Perno C.F., Monforte A., Galli M., Meroni L.: Comparative analysis of T-cell turnover and homeostatic parameters in HIV-infected patients with discordant immune-virological responses to HAART. *AIDS*, 2006; 20: 1727–1736
- [102] Marrack P., Bender J., Hildeman D., Jordan M., Mitchell T., Murakami M., Sakamoto A., Schaefer B.C., Swanson B., Kappler J.: Homeostasis of αβ TCR+ T cells. *Nat. Immunol.*, 2000; 1: 107–111
- [103] Marrack P., Kappler J., Kotzin B.L.: Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat. Med.*, 2001; 7: 899–905
- [104] McFarland R.D., Douek D.C., Koup R.A., Picker L.J.: Identification of a human recent thymic emigrant phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 4215–4220
- [105] Michie C.A., McLean A., Alcock C., Beverley P.C.: Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature*, 1992; 360: 264–265
- [106] Moses C.T., Thorstenson K.M., Jameson S.C., Khoruts A.: Competition for self ligands restrains homeostatic proliferation of naive CD4 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 1185–1190
- [107] Moulton V.R., Farber D.L.: Committed to memory: lineage choices for activated T cells. *Trends Immunol.*, 2006; 27: 261–267
- [108] Muegge K., Vila M.P., Durum S.K.: Interleukin-7: a cofactor for V(D)J rearrangement of the T cell receptor beta gene. *Science*, 1993; 261: 93–95
- [109] Myers L.A., Patel D.D., Puck J.M., Buckley R.H.: Hematopoietic stem cell transplantation for severe combined immunodeficiency in the neonatal period leads to superior thymic output and improved survival. *Blood*, 2002; 99: 872–878



- [110] Nanda N.K., Apple R., Sercarz E.: Limitations in plasticity of the T-cell receptor repertoire. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 88: 9503–9507
- [111] Newman P.J.: The biology of PECAM-1. *J. Clin. Invest.*, 1997; 99: 3–8
- [112] Nikolich-Zugich J., Slifka M.K., Messaoudi I.: The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004; 4: 123–132
- [113] Oettinger M.A., Schatz D.G., Gorka C., Baltimore D.: RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science*, 1990; 248: 1517–1523
- [114] Okamura J., Uike N., Utsunomiya A., Tanosaki R.: Allogeneic stem cell transplantation for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int. J. Hematol.*, 2007; 86: 118–125
- [115] Palomero T., McKenna K., O-Neil J., Galinsky I., Stone R., Suzukawa K., Stiakaki E., Kalmanti M., Fox E.A., Caligiuri M.A., Aster J.C., Look A.T., Ferrando A.A.: Activating mutations in NOTCH1 in acute myeloid leukemia and lineage switch leukemias. *Leukemia*, 2006; 20: 1963–1966
- [116] Patel D.D., Gooding M.E., Parrott R.E., Curtis K.M., Haynes B.F., Buckley R.H.: Thymic function after hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.*, 2000; 342: 1325–1332
- [117] Pawelec G., Barnett Y., Forsey R., Frasca D., Globerson A., McLeod J., Caruso C., Franceschi C., Fülöp T., Gupta S., Mariani E., Mocchegiani E., Solana R.: T cells and aging, January 2002 update. *Front. Biosci.*, 2002; 7: d1056–d1183
- [118] Petrie H.T.: Role of thymic organ structure and stromal composition in steady-state postnatal T-cell production. *Immunol. Rev.*, 2002; 189: 8–19
- [119] Petrie H.T., Kincade P.W.: Many roads, one destination for T cell progenitors. *J. Exp. Med.* 2005; 202: 11–13
- [120] Pham T., Belzer M., Church J.A., Kitchen C., Wilson C.M., Douglas S.D., Geng Y., Silva M., Mitchell R.M., Krogstad P.: Assessment of thymic activity in human immunodeficiency virus-negative and -positive adolescents by real-time PCR quantitation of T-cell receptor rearrangement excision circles. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2003; 10: 323–328
- [121] Piali L., Hammel P., Uherek C., Bachmann F., Gisler R.H., Dunon D., Imhof B.A.: CD31/PECAM-1 is a ligand for $\alpha\beta 3$ integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium. *J. Cell Biol.*, 1995; 130: 451–460
- [122] Ponchel F., Morgan A.W., Bingham S.J., Quinn M., Buch M., Verburg R.J., Henwood J., Douglas S.H., Masurel A., Conaghan P., Gesinde M., Taylor J., Markham A.F., Emery P., van Laar J.M., Isaacs J.D.: Dysregulated lymphocyte proliferation and differentiation in patients with rheumatoid arthritis. *Blood*, 2002; 100: 4550–4556
- [123] Ponchel F., Toomes C., Bransfield K., Leong F.T., Douglas S.H., Field S.L., Bell S.M., Combaret V., Puisieux A., Mighell A.J., Robinson P.A., Inglehearn C.F., Isaacs J.D., Markham A.F.: Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol.*, 2003; 3: 18
- [124] Poulin J.F., Sylvestre M., Champagne P., Dion M.L., Kettaf N., Dumont A., Laine M., Fontaine P., Roy D.C., Perreault C., Sékaly R.P., Cheynier R.: Evidence for adequate thymic function but impaired naive T-cell survival following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the absence of chronic graft-versus-host disease. *Blood*, 2003; 102: 4600–4607
- [125] Przybylski G.K., Kreuzer K.A., Siegert W., Schmidt C.A.: No recovery of T-cell receptor excision circles (TRECs) after non-myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is correlated with the onset of GvHD. *J. Appl. Genet.*, 2007; 48: 397–404
- [126] Radtke F., Wilson A., MacDonald H.R.: Notch signaling in T- and B-cell development. *Curr. Opin. Immunol.*, 2004; 16: 174–179
- [127] Radtke F., Wilson A., Mancini S.J., MacDonald H.R.: Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat. Immunol.*, 2004; 5: 247–253
- [128] Resino S., Seoane E., Pérez A., Ruiz-Mateos E., Leal M., Muñoz-Fernández M.A.: Different profiles of immune reconstitution in children and adults with HIV-infection after highly active antiretroviral therapy. *BMC Infect. Dis.*, 2006; 6: 112
- [129] Ribeiro R.M., de Boer R.J.: The contribution of the thymus to the recovery of peripheral naive T-cell numbers during antiretroviral treatment for HIV infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 2008; 49: 1–8
- [130] Ribeiro R.M., Perelson A.S.: Determining thymic output quantitatively: using models to interpret experimental T-cell receptor excision circle (TREC) data. *Immunol. Rev.*, 2007; 216: 21–34
- [131] Ringhoffer S., Bunjes D., Weisneth M., Wenzel P., Dohner H., Ringhoffer M.: Differential sj TREC and D β Jb-TREC determination reveals distinct types of immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 2007; 39, S28
- [132] Saitoh A., Singh K.K., Sandall S., Powell C.A., Fenton T., Fletcher C.V., Hsia K., Spector S.A.: Association of CD4+ T-lymphocyte counts and new thymic emigrants in HIV-infected children during successful highly active antiretroviral therapy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2006; 117: 909–915
- [133] Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A.: Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.*, 2004; 22: 745–763
- [134] Sarzotti M., Patel D.D., Li X., Ozaki D.A., Cao S., Langdon S., Parrott R.E., Coyne K., Buckley R.H.: T cell repertoire development in humans with SCID after nonablative allogeneic marrow transplantation. *J. Immunol.*, 2003; 170: 2711–2718
- [135] Schatz D.G., Oettinger M.A., Baltimore D.: The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell*, 1989; 59: 1035–1048
- [136] Schönland S.O., Lopez C., Widmann T., Zimmer J., Bryl E., Goronzy J.J., Weyand C.M.: Premature telomeric loss in rheumatoid arthritis is genetically determined and involves both myeloid and lymphoid cell lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 13471–13476
- [137] Seldin M.F., Amos C.I., Ward R., Gregersen P.K.: The genetics revolution and the assault on rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1999; 42: 1071–1079
- [138] Sempowski G., Thomasch J., Gooding M., Hale L., Edwards L., Ciafaloni E., Sanders D., Massey J., Douek D., Koup R., Haynes B.: Effect of thymectomy on human peripheral blood T cell pools in myasthenia gravis. *J. Immunol.*, 2001; 166: 2808–2817
- [139] Sfikakis P.P., Gourgoulis G.M., Mouloupoulos L.A., Kouvtseas G., Theofilopoulos A.N., Dimopoulos M.A.: Age-related thymic activity in adults following chemotherapy-induced lymphopenia. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2005; 35: 380–387
- [140] Shapira M.Y., Hai A.A., Tsigiritos P., Resnick I.B., Or R., Slavin S.: Hematopoietic stem cell therapy for malignant diseases. *Ann. Med.*, 2007; 39: 465–473
- [141] Shlomchik W.D.: Graft-versus-host disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 2007; 7: 340–352
- [142] Song K., Rabin R.L., Hill B.J., De Rosa S.C., Perfetto S.P., Zhang H.H., Foley J.F., Reiner J.S., Liu J., Mattapallil J.J., Douek D.C., Roederer M., Farber J.M.: Characterization of subsets of CD4+ memory T cells reveals early branched pathways of T cell differentiation in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 7916–7921
- [143] Steinmann G.G.: Changes in the human thymus during aging. *Curr. Top. Pathol.*, 1986; 75: 43–88
- [144] Steinmann G.G., Klaus B., Müller-Hermelink H.K.: The involution of the ageing human thymic epithelium is independent of puberty. A morphometric study. *Scand. J. Immunol.*, 1985; 22: 563–575
- [145] Storek J., Joseph A., Dawson M.A., Douek D.C., Storer B., Maloney D.G.: Factors influencing T-lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Transplantation*, 2002; 73: 1154–1158
- [146] Sugita J., Iwao N., Tanaka J., Kato N., Shiratori S., Wakasa K., Shigematsu A., Toubai T., Takahata M., Kondo T., Asaka M., Imamura M.: T cell receptor excision circle levels in CD94-expressing CD8 T cells during graft-versus-host disease. *Leuk. Lymphoma*, 2008; 49: 1306–1310
- [147] Szczepański T., van der Velden V.H., van Dongen J.J.: Flow-cytometric immunophenotyping of normal and malignant lymphocytes. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2006; 44: 775–796
- [148] Talvensaaari K., Clave E., Douay C., Rabian C., Garderet L., Busson M., Garnier F., Douek D., Gluckman E., Charron D., Toubert A.: A broad T-cell repertoire diversity and an efficient thymic function indicate a favorable long-term immune reconstitution after cord blood stem cell transplantation. *Blood*, 2002; 99: 1458–1464
- [149] Taub D.D., Longo D.L.: Insights into thymic aging and regeneration. *Immunol. Rev.*, 2005; 205: 72–93
- [150] Thewissen M., Somers V., Venken K., Linsen L., van Paassen P., Geusens P., Damoiseaux J., Stinissen P.: Analyses of immunosenescent markers in patients with autoimmune disease. *Clin. Immunol.*, 2007; 123: 209–218
- [151] Tough D.F., Sprent J.: Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J. Exp. Med.*, 1994; 179: 1127–1135

- [152] Touloumi G., Pantazis N., Karafoulidou A., Mandalaki T., Goedert J.J., Kostrikis L.G., Hatzakis A.: Changes in T cell receptor excision DNA circle (TREC) levels in HIV type 1-infected subjects pre- and post-highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 2004; 20: 47–54
- [153] Utsuyama M., Hirokawa K., Kurashima C., Fukayama M., Inamatsu T., Suzuki K., Hashimoto W., Sato K.: Differential age-change in the numbers of CD4+CD45RA+ and CD4+CD29+ T cell subsets in human peripheral blood. *Mech. Ageing Dev.*, 1992; 63: 57–68
- [154] van den Dool C., de Boer R.J.: The effects of age, thymectomy, and HIV infection on α and β TCR excision circles in naive T cells. *J. Immunol.*, 2006; 177: 4391–4401
- [155] van Dongen J.J., Comans-Bitter W.M., Wolvers-Tettero I.L., Borst J.: Development of human T lymphocytes and their thymus-dependency. *Thymus*, 1990; 16: 207–234
- [156] Verschuren M.C., Wolvers-Tettero I.L., Breit T.M., Noordzij J., van Wering E.R., van Dongen J.J.: Preferential rearrangements of the T cell receptor delta deleting elements in human T cells. *J. Immunol.*, 1997; 158: 1208–1216
- [157] Viret C., Wong F.S., Janeway C.A.Jr.: Designing and maintaining the mature TCR repertoire: the continuum of self-peptide: self-MHC complex recognition. *Immunity*, 1999; 10: 559–568
- [158] Vyse T.J., Todd J.A.: Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell*, 1996; 85: 311–318
- [159] Wagner U.G., Koetz K., Weyand C.M., Goronzy J.J.: Perturbation of the T cell repertoire in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 14447–14452
- [160] Weinberg K., Blazar B.R., Wagner J.E., Agura E., Hill B.J., Smogorzewska M., Koup R.A., Betts M.R., Collins R.H., Douek D.C.: Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 2001; 97: 1458–1466
- [161] Weng A.P., Ferrando A.A., Lee W., Morris J.P.4th, Silverman L.B., Sanchez-Irizarry C., Blacklow S.C., Look A.T., Aster J.C.: Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*, 2004; 306: 269–271
- [162] Weng N.P., Levine B.L., June C.H., Hodes R.J.: Regulated expression of telomerase activity in human T lymphocyte development and activation. *J. Exp. Med.*, 1996; 183: 2471–2479
- [163] Weng N.P., Levine B.L., June C.H., Hodes R.J.: Human naive and memory T lymphocytes differ in telomeric length and replicative potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92: 11091–11094
- [164] Weyand C.M., Fulbright J.W., Goronzy J.J.: Immunosenescence, autoimmunity, and rheumatoid arthritis. *Exp. Gerontol.*, 2003; 38: 833–841
- [165] Woodland D.L., Kotzin B.L., Palmer E.: Functional consequences of a T cell receptor D β 2 and J β 2 gene segment deletion. *J. Immunol.*, 1990; 144: 379–385
- [166] Wu C.J., Chillemi A., Aleya E.P., Orsini E., Neuberger D., Soiffer R.J., Ritz J.: Reconstitution of T-cell receptor repertoire diversity following T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation is related to hematopoietic chimerism. *Blood*, 2000; 95: 352–359
- [167] Wysoczanska B., Bogunia-Kubik K., Dlubek D., Jaskula E., Sok A., Drabczak-Skrzypek D., Sedzimirska M., Lange A.: Association with the presence of naive T cells in chronic myeloid leukemia patients after allogeneic human stem cell transplantation and the lower incidence of chronic graft-versus host disease and relapse. *Transplant. Proc.*, 2007; 39: 2898–2901
- [168] Wysoczanska B., Jaskula E., Duda D., Lange A.: Chronic GVHD especially at extensive stage decreases the incidence and level of TREC in MNC of HSCT patients. *Tissue Antigens*, 2006; 67: 507 (abstr. P126)
- [169] Wysoczanska B., Wolska B., Dlubek D., Drabczak-Skrzypek D., Jaskula E., Kańska K., Bernatowska E., Lange A.: Complete chimerism in CD3+ population, in spite of mixed chimerism in whole blood cells, associates with T-cells reconstitution and the presence of TREC in PBMC in children with SCID after HSCT. *Bone Marrow Transplant.*, 2006; 37(Suppl.1): S201 (abstr. P768)
- [170] Ye P., Kirschner D.E.: Measuring emigration of human thymocytes by T-cell receptor excision circles. *Crit. Rev. Immunol.*, 2002; 22: 483–497
- [171] Zhang L., Lewin S.R., Markowitz M., Lin H.H., Skulsky E., Karanicolos R., He Y., Jin X., Tuttleton S., Vesanen M., Spiegel H., Kost R., van Lunzen J., Stellbrink H.J., Wolinsky S., Borkowsky W., Palumbo P., Kostrikis L.G., Ho D.D.: Measuring recent thymic emigrants in blood of normal and HIV-1 infected individuals before and after effective therapy. *J. Exp. Med.*, 1999; 190: 725–732

