

Edyta Prokop

**„Ocena polimorfizmów TLR4 a
występowanie, typ i przebieg infekcji
oraz rokowanie po przeszczepie serca”**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Stefan Grajek

Promotor pomocniczy: dr n.med. Hanna Wachowiak-Baszyńska

I Klinika Kardiologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego

w Poznaniu

Poznań, 2018

Najważniejszej osobie, która wspierała mnie w każdej chwili mojego życia,

Mamo,

tę pracę poświęcam Tobie.

Szczególne podziękowania składam dla dwóch osób, które uwierzyły we mnie i ten projekt

Panu Profesorowi Romualdowi Ochotnemu

oraz

Panu Profesorowi Pawłowi Jagodzińskiemu.

Za pomoc w powstaniu pracy dziękuję Promotorowi Panu Profesorowi Stefanowi Grajkowi oraz
mojej Promotor Pomocniczej Doktor Hannie Wachowiak-Baszyńskiej.

1. Wstęp	6
1.1 Historia transplantacji	6
1.2 Statystyki transplantacji.....	10
1.2.1 Statystyki przeszczepów na świecie.....	10
1.2.2 Statystyki przeszczepów w Polsce.....	11
2. Przeszczep serca.....	12
2.1 Kwalifikacja do przeszczepu serca.....	12
2.2 Leczenie immunosupresyjne.....	14
2.3 Powikłania leczenia immunosupresyjnego.....	15
3. Infekcje po przeszczepie serca.....	18
4. Immunogenetyka.....	21
4.1 Odporność wrodzona i nabyta.....	21
4.2 Rodzina receptorów Toll-podobnych.....	23
4.3 Polimorfizm pojedynczego nukleotydu.....	26
4.4 Receptor Toll-like 4.....	28
4.5 Receptor Toll-like 4 i transplantacje	31
5. Cele pracy.....	32
6. Materiał i metody.....	33
7. Wyniki	37
7.1 Zależność pomiędzy SNP TLR4 a występowaniem infekcji.....	37
7.2 Zależność między SNP TLR4 a zgonem.....	41
7.3 Zależność między występowaniem różnych typów infekcji: bakteryjnej, wirusowej lub grzybiczej a wybranymi SNPs	46
8. Wyniki grupy kontrolnej.....	58
9. Dyskusja.....	65
9.1 SNP TLR4 a występowanie infekcji bakteryjnych	65
9.2 SNP TLR4 a występowanie infekcji wirusowych.....	69
9.3 SNP TLR4 a występowanie infekcji grzybiczych.....	71
10. Wnioski.....	73
11. Streszczenia.....	74
12. Piśmiennictwo.....	77

CCR5- receptor chemokiny 5 (ang. chemokine receptor 5)

CMV cytomegalowirus (ang. cytomegalovirus)

CPET test spiroergometryczny (ang. Cardiopulmonary exercise test)

DAMP molekuly związane z uszkodzeniem (ang. damage associated molecular patterns)

DC-SIGN nieintegrynowa molekula 3 specyficzna dla komórek dentrytycznych (ang. dendritic cell-specific molecule-3-grabbing non-integrin)

EBV wirus Ebstein-Barr (ang. Ebstein-Barr virus)

EDTA kwas wersenowy (ang. ethylenediaminetetraacetic acid)

HFSS skala oceny przeżycia w niewydolności serca (ang. Heart Failure Survival Score)

HHV ludzki wirus Herpes (ang. Human Herpes Virus)

HIV ludzki wirus upośledzenia odporności (ang. Human Immunodeficiency Virus)

HPV – wirus brodawczaka ludzkiego (ang. human papilloma virus)

HRM- krzywe wysokiego topnienia (ang. high-resolution melting)

HSV- wirus opryszczki (ang. *herpes simplex virus*)

TIRAP ang. toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein

HTx – przeszczep serca (ang. heart transplantation)

IL – interleukina (ang. interleukin)

ISHLT – International Society of Heart and Lung Transplantation

LDL – lipoproteina niskiej gęstości (ang. low-density lipoprotein)

LPS- lipopolisacharyd

MCP-1 - białko chemotaktyczne monocytów (ang. monocyte chemoattractant protein 1)

MyD88- Myeloid differentiation primary response 88

PAMP wzorce molekularne związane z patogenem (ang. pathogen associated molecular patterns)

PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. polymerase chain reaction)

PRA - ang. panel reactive antibody

PRR – receptory rozpoznające wzorce (ang. pattern recognition receptors)

RSV – wirus RSV (ang. respiratory syncytial virus)

SHFM – Seattle Heart Failure Model

SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism)

TAG - triglicerydy

TLR – receptory Toll-like (ang. Toll-like receptors)

TRAM cząsteczka adaptorowa dla TRIF (ang. TRIF-related adaptor molecule)

TRIF – ang. TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β

VAD - urządzenie wspomagające czynność komór (ang. ventricular assisting device)

VZV - wirus *Varicella zoster* (ang. *Varicella zoster* virus)

1. Transplantacje na świecie i Polsce

1.1 Historia transplantacji

Idea transplantologii pojawia się już w starożytności, występując w mitach wielu kultur, z dominanta Egiptu, gdzie bogowie nie tylko posiadają atrybuty zwierząt, ale *de facto* są nimi po części: Ra (bóg słońca, najwyższe bóstwo starożytnych Egipcjan) posiada głowę sokoła, Anubis (strażnik królestwa zmarłych, uczestniczy w procesie mumifikacji) – głowę szakala, a Bastet (bogini ogniska domowego)- kota. Ciekawym mitem wydaje się również poszukiwanie przez Izydę rozrzuconych po Egipcie szczątków Ozyrysa, którego poćwiartował w bratobójczej walce Set – nie znalazła jedynie jego członka, którego odtworzyła z gliny i „przeszczepiła” bogu Ozyrysowi. Sama Izyda jako jedyna nie jest przedstawiana z atrybutem zwierzęcym, posiada natomiast zdolność leczenia poprzez czary.¹ Podobne historie pojawiają się w mitach Greków, Rzymian, Arabów. Wśród nich znajduje się wzmianka o autoprzyszczepach skóry w Indiach datowanych na 800 r.p.n.e. i związana z nią pierwsza w historii rhinoplastyka.²

Chociaż pierwszy opisany przeszczep to przeszczep nerki na początku XX wieku, erę nowoczesnej transplantologii również otwiera przeszczep skóry opisany przez Gibsona w 1943 roku, a właściwie związany z nim fenomen reakcji immunologicznych, które ostatecznie dały podwaliny typowaniu antygenowemu, czyli jedną z gałęzi dzisiejszego doboru dawca-biorca i leczenia immunosupresyjnego.³ W 1953 roku z kolei opisano pierwsze przeszczepy fragmentów skóry opłaszczonych niedojrzałymi antygenowo komórkami, które nie immunizowały organizmu biorcy - w tym wypadku myszy. Pozwoliło to odkryć jak wytworzyć tolerancję przeszczepu.⁴ Kamieniem milowym w transplantologii okazało się jednak wprowadzenie immunosupresji. W 1960 roku pierwszą próbę takiego leczenia przeprowadził z 6-merkaptopuryną Joseph Murray, jednocześnie George Hitchings opracował jej mniej nefrotoksyczną pochodną - azatioprynę. Pacjent na takiej terapii przeżył 36 dni, zgon nastąpił z powodu zatrucia organizmu - dawki leków były wciąż testowane.⁵ Azatiopryna wraz ze steroidoterapią (kortyzonem) weszły jako wieloletni standard leczenia podtrzymującego immunosupresję dzięki Thomasowi Starzlowi i Thomasowi Marchioro. Do leczenia z czasem weszły także globuliny antylimfocytarne i antytymocytarne, surowica

antylimfocytna i antytymocytna, a także - co stanowiło spory krok naprzód - cyklosporyna A. Lek ten opracowano w laboratorium Jeana Borela w 1978 roku. Pionierskie prace Roya Calne'a i Davida White'a pokazały jak znacząco wydłuża ona życie biorców.⁶ Dobra prasa wokół transplantologii związana z wydłużeniem przeżycia pacjentów po przeszczepach wpłynęła pozytywnie na odkrycie kolejnych leków. W 1984 roku odkryto takrolimus, w 1995 roku - kwas mykofenolowy, w 1999 roku syrolimus.⁷

Przeszczepy narządowe stanowią część historii sprzed ery immunologii transplantacyjnej, bowiem pierwsze próby przeszczepiania nerek datuje się na rok 1906 i przypisuje Jaboulay'owi i Carrelowi - odkrywcom techniki zespolenia naczyniowego. Jaboulay przeszczepił 2 nerki - jedną kozią, jedną świńską, obaj pacjenci zmarli w wyniku niewydolności przeszczepionych narządów. Należy jednak mieć na uwadze, że w owych czasach niewydolność nerek zawsze kończyła się zgonem, gdyż nie istniała jeszcze dializoterapia.⁸ Nerki ludzkie wykorzystano w przeszczepach pierwszy raz w 1936 roku w Kijowie - Jurij Voronoj przeszczepił nerki 6 biorcom hospitalizowanym z powodu ostrej niewydolności nerek, próby te zakończyły się zgonem tych pacjentów w krótkim odstępie czasu. Nie istniała wówczas żadna sugestia dotycząca doboru dawców, ani nie opracowano specjalnej techniki chirurgicznej przeszczepiania nerek.⁹ Pierwszy przeszczep nerki w 1950 roku zwieńczony sukcesem, bo dziesięciomiesięcznym przeżyciem przeszczepionego narządu i 5-letnim przeżyciem pacjentki został dokonany w Little Company of Mary Hospital w Evergreen Park w USA.¹⁰ Problem niezgodności immunologicznej sprytnie wyeliminowano dzięki donacjom pomiędzy bliźniętami już 2 lata później. W Bostonie Joseph Murray, John Hartwell Harrison oraz John P. Merrill dowodzili zespołem przeszczepiającym braci Herrick. Biorca - Richard Herrick przeżył z przeszczepioną nerką 8 lat, a sam Murray otrzymał w 1990 roku za to Nagrodę Nobla.¹¹ W Wielkiej Brytanii pierwszy przeszczep nerki z sukcesem został przeprowadzony przez zespół Michaela Woodruffa w październiku 1960 roku w Edynburgu.¹² Pomimo zawirowań politycznych, pierwszy przeszczep nerki w Polsce wykonano dość szybko w stosunku do pionierskiego zabiegu w USA, bo już w styczniu 1966 roku. W Warszawie zespół Jana Nielubowicza i Tadeusza Orłowskiego wykonał przeszczepienie nerki u 18-latki. Zabieg był krótki, nerka od zmarłego dawcy szybko podjęła swoją funkcję, a pacjentka przeżyła zabieg. Zmarła w wyniku ostrej martwicy

trzustki na skutek sterydoterapii 7 miesięcy po przeszczepie. W tym samym roku zespół Wiktora Brossa przeprowadził pierwszy w Polsce przeszczep nerki od żywego dawcy.¹³

Pierwszy przeszczep wątroby wykonano w 1963 roku (zespół Thomasa Starzl w Denver w USA), jednak dopiero w 1967 roku przeszczepiony przez ten sam zespół pacjent przeżył rok po zabiegu. W latach 70-tych śmiertelność związana z tą procedurą wynosiła 25% i zminimalizowało ją dopiero odkrycie cyklosporyny A. Dziś 80% biorców wątroby przeżywa zabieg oraz rok po nim.¹⁴

Przeszczepianie bardzo szybko przyjęło się w hematologii. Już w 1956 po radioterapii podano komórki szpiku pacjentowi E. Donnalla Thomasa - przeszczepione komórki pochodziły od bliźniaka biorcy.¹⁵ W 1968 roku uznano przeszczep szpiku jako metodę leczenia nie tylko białaczek, ale także wrodzonych zaburzeń odporności - pierwszy przeszczep tego typu wykonał "ojciec współczesnej immunologii" Robert Good.¹⁶ Kolejnym krokiem było podanie komórek szpiku pacjentom niespokrewnionym w 1973 roku.¹⁷ Dzięki inicjatywom Rooda z Holandii w 1989 roku powstaje organizacja Bone Marrow Donors Worldwide, umożliwiająca powiązanie dawców szpiku z niespokrewnionymi biorcami na całym świecie, pełen taki zasięg jako niezależna fundacja uzyskała jednakowoż dopiero w 2015 roku.¹⁸

Zakres transplantacji w ciągu kilkunastu lat stopniowo się rozszerzył. Po pierwszym sukcesie Jamesa Hardy'ego, który przeszczepił płuca w 1963 roku - pacjent przeżył 18 dni¹⁹, podejmowano próby przeszczepiania jednego lub obu płuc, ale z racji odrzucania i problemów z oskrzelami (głównie ich obliteracją) za pierwszy udany przeszczep jednego płuca uważa się ten wykonany w Toronto przez Joela Coopera dopiero w 1983 roku. Również on przeszczepił z sukcesem zaledwie trzy lata później oba płuca.²⁰ W transplantacji płuc krokiem w przyszłość pozostał jednak przeszczep płuc i serca jako pojedynczej procedury. Reitz i współpracownicy z Uniwersytetu Stanforda stworzyli od podstaw program przeszczepów płuc i serca jako formę leczenia pacjentów z chorobami naczyń płucnych. Pierwszy łączony zabieg wykonali w 1981 roku na psach.²¹ Polski program przeszczepu płuc rozpoczęło Śląskie Centrum Chorób Serca w Zabrzu. Marian Zembala rozpoczął od przeszczepienia serca i płuc w 2001 roku, w 2003 roku przeszczepiono pojedyncze płuco, a w 2005 roku - dwa płuca.²²

W historii pierwszy przeszczep trzustki z 1966 wykonał William D. Kelly - zabieg o tyle interesujący, iż przeszczepiono jednocześnie nie tylko trzustkę, ale także dwunastnicę i nerkę.²³

Pierwszy przeszczep serca (HTx) wykonano w Kapsztadzie w 1967 roku. Dokonał tego zespół Christiana Barnarda u 54-letniego pacjenta po kilkukrotnych zawałach serca - Louisie Washkanskim. Pacjent był w takim stanie ogólnym w którym posiadając dzisiejszą wiedzę prawdopodobnie zdyskwalifikowano by go z HTx - poza cukrzycą i aktywnym paleniem papierosów, miał też miażdżycowo zmienione naczynia obwodowe, masywne obrzęki kończyn dolnych ze zmianami troficznymi do owrzodzeń włącznie. Jego dawcą była młoda kobieta po masywnym urazie czaszkowo-mózgowym - Denise Darvall, której zgon stwierdzono według ówczesnych kryteriów. Sama procedura przebiegła sprawnie, a przebieg pooperacyjny monitorowano i leczono w trojaki sposób: utrzymując dostateczny rzut serca (elektrolity, digoksyna, isoprenalina), leczeniem immunosupresyjnym (hydrokortyzon, prednizon, azatiopryna, actinomycyna C, naświetlanie), zapobieganie infekcjom (codzienna higiena pacjenta i personelu oraz antybiotykoterapia celowana). Po 14 dniach stan pacjenta gwałtownie się pogorszył, stwierdzono obrzęk płuc, ale jeszcze nie wiadomo czy jest to związane z odrzucaniem, czy z infekcją. Ostatecznie pacjent zmarł 18 dni po transplantacji serca.^{24, 25} Barnard zmodyfikował w tym czasie technikę operacyjną tak, by wycięcie serca dawcy przebiegało od żyły głównej dolnej do uszka lewego przedsionka dzięki czemu oszczędzono węzeł zatokowy. Technikę tę stosuje się do dziś w wielu ośrodkach transplantacyjnych. Co więcej – drugi biorca przeżył 19 miesięcy, a zmarł z powodu zaawansowanej choroby wieńcowej. Entuzjazm związany z sukcesem Barnarda spowodował, że w 1968 przeprowadzono aż 102 podobne operacje, ale dwuletnie przeżycie odnotowano jedynie u 10 pacjentów. Podobnie było do 1970 roku - łącznie na przełomie tych lat przeszczep serca otrzymało 166 pacjentów, 19 z nich przeżyło 2 lata. W 1973 roku opracowano przeszczep heterotopowy. Przeszczepiono 49 pacjentów tą metodą, trzech z pięciu pacjentów przeżyło 10 lat. Przeprowadzono w Kapsztadzie także interesujący zabieg - dwaj 14-letni chłopcy otrzymali przeszczep najpierw heterotopowy, potem ortotopowy. Heterotopowe przeszczepy ostatecznie zarzucono, dały jednak doświadczenie pod postacią doboru wielkości serca między dawcą a biorcą i proporcji koniecznych w tych wymiarach w wypadku nadciśnienia płucnego. W 1977 roku padł pomysł ksenotransplantacji podyktowany koniecznością wykonania zabiegu u

pacjenta z dramatycznie szybką deterioracją stanu ogólnego. Przeprowadzono dwa nieudane przeszczepy międzygatunkowe - dwaj pacjenci otrzymali serca szympanów²⁶. Hipotermia opracowana w laboratorium Barnarda pozwoliła na przechowywanie serc *ex vivo* - badania przeprowadzono na sercach małpich - do 48 godzin. Po pierwszych obserwacjach zaprojektowano urządzenie do hipotermicznej perfuzji²⁶. Dzięki tej metodzie w 1984 roku stworzono szansę transportu serca z miejsca pobrania do miejsca transplantacji, nie ograniczając już doboru dawców i biorców do pojedynczego ośrodka. Pierwszego przeszczepu serca w Polsce dokonał zespół Jana Molla w 1969 roku, ale pacjent zabiegu nie przeżył.²⁷ Z racji nagonki politycznej i dziennikarskiej przerwano prace nad polskim programem transplantacji serca na wiele lat. Pierwszy transplantacyjny sukces to zasługa zespołu Zbigniewa Religi, w Zabrze w 1985 roku. Jako ciekawostkę warto także podkreślić, że jednemu z jego zabiegów przyglądał się "National Geographic" - po przeszczepie serca w 1987 roku zostało wykonane zdjęcie Zbigniewa Religi, które obiegło świat i w ostatecznym rozrachunku stało się jednym ze stu najbardziej rozpoznawalnych zdjęć tego magazynu w historii wydawnictwa.²⁸

1.2 Statystyki transplantacji

1.2.1 Statystyki przeszczepów na świecie

Od 1996 roku dane dotyczące donacji i przeszczepów zbiera International Registry in Organ Donation and Transplantation (IRODaT). Jest to rejestr prowadzony na podstawie danych zebranych z 99 krajów na całym świecie, stworzony z myślą o przetwarzaniu danych dotyczących transplantacji w sposób dla naukowców przystępny, z otwartym dostępem online. Na swojej witrynie informuje na bieżąco o liczbie wykonanych przeszczepów, dzieli je na podgrupy związane z przeszczepianiem poszczególnych organów, a także pozwala na dostęp do wybranych lat spośród dostępnych ram czasowych. IRODaT oferuje także możliwość przejrzania graficznie w formie tabel lub wykresów kołowych danych z przeszczepów narządowych w kolejnych latach. Dane zsumowane do roku 2013 wskazują, że w latach 1996-2013 IRODaT zarejestrował 38710 donacji we wszystkich obserwowanych krajach.²⁹ Kolejną organizacją monitorującą proces donacji i transplantacji jest Global Observatory on Donation and Transplantation, współpracująca ściśle z WHO. Według ich danych w 2013 roku przeszczepiono łącznie 117733 organów, co stanowiło

wzrost o 2.6% w stosunku do poprzedniego roku, ale i tak zaspokoilo mniej niz 10% zapotrzebowania globalnego. Zbierane dane dotycza przeszczepow nerki, watroby, serca, pluc, trzustki i jelita cienkiego. Na podstawie danych z GODT w roku 2013 na calym swiecie przeszczepiono 6270 serc. GODT podaje rowniez informacje, ktore kraje najbardziej angazuja sie w proces transplantacji narzadow. Pierwszych piec miejsc zajmuja kolejno Norwegia, USA, Hiszpania, Austria i Belgia. Polska zajmuje trzydziesta pozycje.³⁰

1.2.2 Statystyki przeszczepow w Polsce

Centrum koordynujacym proces donacji, pobran i przeszczepow w Polsce jest Centrum Organizacyjno-Koordinacyjne Do Spraw Transplantacji "Poltransplant". Rokrocznie publikuje on biuletyn informujacy szczegolowo o przebiegu transplantacji w Polsce, w tym liczbie dawcow rzeczywistych, alokacji organow i ich wykorzystaniu w poszczegolnych ośrodkach przeszczepiajacych. Biuletyn podzielono na stosowne sekcje ukazujace proces transplantacji poszczegolnych organow. Wedlug danych w Biuletynie w 2015 roku przeprowadzono w Polsce 1514 przeszczepow, w tym 101 przeszczepow serc. Na liście aktywnej w 2015 roku oczekiwalo na przeszczep serca w Polsce 364 pacjentow, z czego 254 osoby zgloszono w omawianym roku, zmarlo 61 pacjentow z tej listy. W woj. Wielkopolskim na przeszczep serca oczekuja 32 osoby, z czego 26 zostalo zgloszonych w samym 2015 roku, zmarlo 7 potencjalnych biorcow. Na przestrzeni lat 1996-2015 przeszczepiono w naszym kraju laczenie we wszystkich ośrodkach 1917 serc. Z uwagi na spora medialnosc zagadnienia, kwestie obserwacyjne (lepszy dobór dawcow i biorcow, monitorowanie schematow leczenia) oraz statystyczne Poltransplant informuje takze o przezywalnosc i poszczegolnych procedur. Dla przeszczepu serca przezywanie dziesieciolatnie wynosi 47% na podstawie danych zgromadzonych za lata 1996-2015. Piętnastolecie nowych serc uczci 32% biorcow tego przeszczepu.³¹

2. Przeszczep serca

Przepisy regulujące przeszczepianie narządów funkcjonują na mocy ustawy przyjętej przez Sejm w 2005, tzw. Ustawy Transplantacyjnej z kolejnymi nowelizacjami. Określa ona zasady pobierania do przeszczepu, przechowywania i samego przeszczepiania narządów, tkanek i komórek. Według artykułu 5.1 wyżej wymienionej ustawy obowiązuje zgoda domniemana na pobranie, czyli potencjalny dawca nie wyraził za życia sprzeciwu wobec dawstwa. Sprzeciw można wyrazić w formie podpisanego własnoręcznie oświadczenia, oświadczenia ustnego, które poświadczy dwóch świadków lub wpisu w centralnym rejestrze sprzeciwów na pobranie komórek, tkanek i narządów ze zwłok ludzkich. Dawcą narządów, tkanek i komórek może być osoba żywa jak i zmarła.³²

2.1 Kwalifikacja do przeszczepu serca

Przeszczep serca (HTx) stanowi ostateczny krok w terapii schyłkowej niewydolności serca, w której wyczerpano wcześniej wszystkie terapeutyczne możliwości - w tym pełną farmakoterapię i elektroterapię.³³ Kryteria kwalifikacji biorców zostały opracowane przez International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT) w 2005 roku, a - po weryfikacji - podane do wiadomości publicznej w 2006 roku³⁴, a w 2016 opublikowano ich aktualizację w oparciu o aktualne wytyczne towarzystw kardiologicznych, w tym leczenia niewydolności serca.^{35,36}

Kwalifikacja do przeszczepu serca stanowi proces wieloetapowy. Pierwszym etapem jest ocena zaawansowania niewydolności serca według klasyfikacji NYHA - do przeszczepu kwalifikowani są pacjenci w III i IV klasie czynnościowej. Ogólna ocena ich kondycji kardiologicznej na podstawie wywiadu: częstość rehospitalizacji z powodu zaostrzeń niewydolności serca, nawracające zaburzenia rytmu odporne na leczenie, niestabilna choroba wieńcowa bez możliwości rewaskularyzacji z niską frakcją wyrzucania lewej komory (<20%).

Ważnym standardem jest test spiroergometryczny (CPET), w którym określa się wpływ maksymalnego zużycia tlenu jako czynnika predykcyjnego. Wartość V_{O_2} poniżej 14 ml/kg/min niezależnie od wszczepionego kardiowertera-defibrylatora lub urządzenia resynchronizującego (z funkcją resynchronizacji lub bez niej) stanowi istotną wartość predykcyjną.³⁵ Wartość tę utrzymano w grupie chorych z nietolerancją beta-blokerów, zmodyfikowano natomiast w

przypadku leczenia beta-blokerami do poniżej 12 ml/kg/min i u osób otyłych do 19 ml/kg/min. Dla chorych poniżej 50 roku życia kryterium stanowi nieprzekroczenie 50% wartości należnej pochłaniania tlenu. Kolejną daną dostarcza RER >1.05 i osiągnięcie progu beztlenowego na optymalnej farmakoterapii. Ten parametr ocenia się przy teście maksymalnym, w wypadku submaksymalnego jako ekwiwalent używany jest VE/V_{co2} i nachylenie krzywej wynoszące >35.

Wraz z CPET pacjent powinien być oceniony pod kątem przeżycia w oparciu o skalę Heart Failure Survival Score (HFSS) - ryzyko zgonu umiarkowane lub duże oraz Seattle Heart Failure Model (SHFM) <80%.

Badaniem niezbędnym w kwalifikacji do HTx jest cewnikowanie prawostronne serca, umożliwiające ocenę ciśnień w krążeniu płucnym. Powinno być wykonywane co 3-6 miesięcy, a jeżeli opór płucny przekracza 3j Wooda wskazane jest przeprowadzenie testu odwracalności o ile skurczowe ciśnienie tętnicze przekracza 85 mmHg. Przy braku odwracalności, pacjent powinien być monitorowany, należy zintensyfikować terapię diuretykami, lekami inotropowo dodatnimi i wazodilatacyjnymi z ponowną oceną inwazyjną po 24-48h. Jeśli po tym czasie nie osiągnie się zadowalających wyników, rekomendowane jest rozważenie założenia urządzenia wspomagającego pracę lewej komory i ponowny pomiar ciśnień w cewnikowaniu prawostronnym po 3-6 miesiącach, aby ocenić odwracalność nadciśnienia płucnego.

W ocenie stanu ogólnego biorcy ważne jest ponadto odniesienie się do chorób współistniejących, ocena/wykluczenie ognisk zakażenia, ewentualnej choroby nowotworowej, a także ocena ewentualnej obecności przeciwciał preformowanych przeciw antygenom HLA, których stwierdzenie wskazuje na zwiększone ryzyko ostrego/nadostrego odrzucania przeszczepu. Oznacza się w tym celu Panel Reactive Antibody (PRA)

Przeciwwskazaniami do przeszczepu serca są:

- ✧ Otyłość z BMI > 35kg/m²
- ✧ Nieodwracalne nadciśnienie płucne
- ✧ Cukrzyca źle kontrolowana (hemoglobina glikowana >7.5%) lub z udokumentowanym uszkodzeniem narządowym

- ✧ Niewydolność nerek z eGFR < 40ml/kg m.c./min. (III stadium przewlekłej choroby nerek)
- ✧ Istotne zaburzenia wentylacji wynikające z przewlekłej choroby płuc
- ✧ Nieodwracalna niewydolność wątroby
- ✧ wiek powyżej 70 roku życia
- ✧ Zaawansowana osteoporoza
- ✧ Zaawansowana i objawowa choroba naczyniowa ośrodkowego układu nerwowego
- ✧ Uzależnienie od alkoholu i nikotyny
- ✧ Nierokowanie współpracy z zespołem medycznym
- ✧ Zaburzenia psychiczne wpływające na współpracę z zespołem medycznym

Pacjent może zostać zdyskwalifikowany czasowo w przypadku: aktywnej infekcji, aktywnej choroby wrzodowej żołądka, uchyłkowatość jelit w stadium zapalnym lub przekroczenia BMI.³⁶

W Polsce funkcjonują dwie listy oczekujących: pilna i planowa. Zakwalifikowani na listę pilną są pacjenci wymagający mechanicznego wspomagania krążenia, stałego wlewu amin presyjnych/milrinonu, z opornymi na leczenie zaburzeniami rytmu serca oraz z ostrą niewydolnością przeszczepionego serca. Pilne kwalifikacje należy aktualizować w odstępach cotygodniowych.

Dobór dawcy oparty jest o kryteria zgodności w zakresie grupy krwi w układzie AB0, masy ciała (dopuszczalna różnica w masach ciała między dawcą i biorcą do 20-25%), a także przewidywany czas oczekiwania oraz pilność transplantacji.³⁷

2.2 Leczenie immunosupresyjne

Terapię immunosupresyjną po HTx można podzielić na okres pierwszych 12 miesięcy po zabiegu oraz terapię podtrzymującą po tym czasie. Zadaniem podstawowym lekarza opiekującego się pacjentem po HTx jest prowadzenie immunosupresji w sposób wykluczający odrzucenie przeszczepu. Aby zapoznać się ze stopniem odrzucania wykonuje się biopsje według ściśle określonego protokołu: co tydzień przez pierwszy miesiąc, co dwa tygodnie w drugim miesiącu i pod koniec trzeciego miesiąca po przeszczepie oraz dalej co 3 miesiące aż do końca pierwszego roku po transplantacji serca.³⁸ Wyniki klasyfikuje się na podstawie obrazu histologicznego według

ISHLT w klasy od 0-IV.³⁹ Schemat ten bywa modyfikowany w różnych ośrodkach transplantacyjnych w zależności od doświadczeń ośrodka.

Ryzyko ostrego odrzucania jest mniejsze po upływie dwunastu miesięcy od transplantacji. Z reguły w tym okresie redukuje się leczenie immunosupresyjne, w tym często przechodzi się ze schematu trójlekowego na dwulekowy z eliminacją glikokortykosteroidów.

Lekami immunosupresyjnymi stosowanymi w leczeniu pacjentów po HTx są: inhibitory kalcyneuryny (cyklosporyna A, takrolimus), inhibitory białka mTOR (ewerolimus, syrolimus), inhibitory dehydrogenazy inozynomonofosforanu – inhibitory podziałów komórkowych (mykofenolan mofetylu - prolek przekształcany do kwasu mykofenolowego, azatiopryna), glikokortykosteroidy (prednizon, deksametazon) i statyny (atorwastatyna, simwastatyna, rosuwastatyna). Uważa się, że na leczeniu przynajmniej jednym lekiem immunosupresyjnym pacjent musi pozostać do końca życia, najlepiej na podwójnej terapii.

Dawkowanie inhibitorów kalcyneuryny i dehydrogenazy inozynomonofosforanu zależne jest od ich stężeń we krwi, które są monitorowane podczas wizyt kontrolnych. Zakres stężeń terapeutycznych dla dawkowania takrolimusu 5-20ng/ml. Poziom cyklosporyny A powinien znajdować się w przedziale 100-400ng/ml. Stężenie terapeutyczne kwasu mykofenolowego powinno wynosić powyżej 1.5µg/ml (jako stężenie początkowe); lepszy jest pomiar pola pod krzywą AUC z wartościami terapeutycznymi 30-60. Dawki glikokortykosteroidów ustala się indywidualnie w oparciu o biopsje i kliniczne cechy ewentualnego odrzucania przeszczepu. Statyny są dawki w zależności od stężeń cholesterolu niskiej gęstości (LDL) i trójglicerydów (TAG) w ramach zapobiegania chorobie wieńcowej w przeszczepionym sercu,⁴⁰ zmniejszają one także epizody ostrego odrzucania.⁴¹

2.3 Powikłania leczenia immunosupresyjnego

Powikłania leczenia immunosupresyjnego wynikają zarówno z działań niepożądanych jak i z konsekwencji obniżenia odporności – zwłaszcza infekcje, jak i rozwój nowotworów. Zbyt słaba immunosupresja grozi ostrym odrzucaniem oraz odrzuceniem przewlekłym prowadzącym do niewydolności przeszczepionego narządu.

Opis możliwych działań niepożądanych leków ma obowiązek zamieścić na ulotce każdy producent leku, jeśli dane działanie niepożądane zostało bodaj jednokrotnie zareportowane. Oczywiście nie są one identyczne w wypadku każdej substancji stosowanej w leczeniu immunosupresyjnym, warto jednak skonfrontować działania niepożądane z najczęściej stosowanymi lekami. Takrolimus wywołuje najczęściej: drżenia mięśniowe, bóle głowy, biegunkę, nudności, zaburzenie czynności nerek, hiperglikemię, cukrzycę (nasila tę skłonność stosowanie go wraz ze glikokortykosteroidami), hiperkaliemię, nadciśnienie tętnicze, bezsenność; posiada także pełne spektrum zaburzeń ze strony układu pokarmowego, rozmaitych chorób skóry i zaburzeń psychicznych (z objawami wytwórczymi włącznie). Mykofenolan mofetylu powoduje z kolei bardzo często powikłania infekcyjne jak: posocznica, kandydoza przewodu pokarmowego, zakażenie dróg moczowych, zakażenie wirusem opryszczki zwykłej, półpasiec, a także istotne odchylenia w badaniach laboratoryjnych jak leukopenia, małopłytkowość, niedokrwistość, poza tym także: wymioty, ból brzucha, biegunka, nudności. Działania niepożądane związane z zastosowaniem glikokortykosteroidów, głównie prednizonu, to osteoporoza, nadciśnienie tętnicze, hirsutyzm u kobiet oraz supresja produkcji kortyzolu i wynikające z tego zaburzenia. Wszystkie z wyżej wymienionych leków w opisie producentów mogą prowadzić do zaburzeń funkcji nerek, zwłaszcza w stosowaniu skojarzonym.

Najpoważniejszym powikłaniem, które utrzymuje się zarówno w pierwszym roku po HTx jak i później, jest jednak zwiększona skłonność do infekcji bakteryjnych, wirusowych i grzybiczych, wynikająca z zastosowania wielolekowej terapii immunosupresyjnej. Do typu infekcji predysponuje: rodzaj przeszczepianego narządu, wiek biorcy w momencie przeszczepu, szczepy kolonizujące biorcę oraz nierozpoznane infekcje u dawcy, kwestie zakażeń okołoperacyjnych i związanych z koniecznością użycia respiratora u dawcy, zaburzenia funkcjonalne związane z zaburzeniami ukrwienia u biorcy i wreszcie ekspozycja na patogeny.⁴²

Innym powikłaniem istotnym zwłaszcza w późnym okresie po HTx jest zwiększona skłonność do nowotworów. U pacjentów leczonych immunosupresyjnie pewne typy nowotworów występują częściej niż w populacji ogólnej. Zwiększona jest skłonność do nowotworów z komórek rzadkich, jak np. mięsak Kaposiego czy guz z komórek Merckla. Czerniak u osób po przeszczepach pojawia się częściej oraz ma bardziej agresywny przebieg, często występuje postać narządowa. Zwiększone

jest ryzyko zwłaszcza w skojarzeniu z leczeniem azatiopryną i u pacjentów narażonych na ekspozycję na światło słoneczne (stąd rekomendacja stosowania kremów blokujących promieniowanie UV).⁴³ Osobny problem stanowi również potransplantacyjna choroba limfoproliferacyjna (PTLD), gdzie istotą skuteczności leczenia jest wczesne wykrycie procesu rozrostowego.⁴⁴

Odległym powikłaniem transplantacji jest również patologia naczyń przeszczepionego narządu, szczególnie dotkliwa dla biorców serc. Odnerwione serce nie boli, dlatego często pierwszym objawem waskulopatii może być zawał i związana z nim niewydolność graftu. Sama zaś waskulopatia ma podłoże immunologiczne, wynika głównie z przerostu śródbłonna, a zahamowanie czynników jego wzrostu przedłuża trwałość przeszczepionego serca.⁴⁵

3. Infekcje po przeszczepie serca

Zakażenia po przeszczepach narządów unaczynionych to istotny problem diagnostyczny i leczniczy. Szacuje się, że są przyczyną zgonów ok. 1/4 pacjentów poddanych procedurze. Generalnie przyjmuje się trzy okresy, w których można spodziewać się określonego typu infekcji. W pierwszym miesiącu po transplantacji uważa się, że ryzyko infekcji po przeszczepie dotyczy przede wszystkim samej procedury. W okresie 2-6 miesięcy po przeszczepie spodziewamy się głównie zakażeń oportunistycznych. W okresie po pół roku od transplantacji i później zakażenia mają etiologię takie jak populacyjnie.

Infekcje w pierwszym miesiącu po przeszczepieniu to głównie infekcje bakteryjne związane z zabiegiem chirurgicznym. Ponadto może istnieć ryzyko przeniesienia infekcji od dawcy do biorcy narządu. Sprzyja temu niedokrwienie i związane z nim uszkodzenie narządu, krwawienie, zanieczyszczenie narządu w czasie transportu i procedury przeszczepu, a za krytyczny dla wystąpienia infekcji uważa się czas 3 miesięcy od daty przeszczepu narządu unaczynionego.⁴⁶

W wypadku przeszczepu serca, gdzie antygeny dawca-biorca muszą odpowiadać w zakresie jedynie układu AB0, a czasu na przeszczep jest mało ciężko wykluczyć wszystkie możliwe patogeny. Infekcje można swobodnie podzielić na te pochodzące od dawcy – sprzed HTx, te wynikłe z niedokrwienia narządu i zwiększenia przez to podatności na infekcje – w trakcie HTx oraz te nabyte po HTx w związku z immunosupresją i zwiększoną podatnością biorcy.

Patogenów, które można przenieść z narządem jest wiele. Wyklucza się więc u dawcy te najczęstsze: m.in. czynną infekcję bakteryjną, infekcję CMV, EBV, Toxoplasma, wirusy hepatotropowe, HIV, Mycobacterium tuberculosis.

Istotna w przypadku serca wydaje się kwestia infekcji bakteryjnych, głównie Staphylococcus aureus i Pseudomonas aeruginosa – po HTx mogą powodować sepsę w okresie krótkim oraz tworzyć kolonie na zespoleniach. Problem infekcji o tym podłożu stanowi fakt, że w dużej mierze polegamy na wywiadzie rodzinnym, czasem od lekarza pierwszego kontaktu i podstawowych badaniach laboratoryjnych. Nie jest przeciwwskazaniem do przeszczepienia infekcja kiłą u dawcy – rzadko raportowano przeszczepienie Treponema pallidum, natomiast wymaga pełnego leczenia penicylliną

w dawce należącej po przeszczepieniu organu pochodzącego od dodatniego dawcy. W przypadku pozytywnego wywiadu u dawcy w związku z zakażeniem *Staphylococcus aureus* i bakteriami Gram-ujemnymi należy podjąć antybiotykoterapię w przeciągu pierwszych 14 dni od przeszczepu.

Wirusowe zakażenia pochodzące od dawcy często determinują losy samej transplantacji. O ile infekcja CMV, EBV, *Toxoplasma gondii* nie wyklucza ani nie odracza przeszczepu niezależnie od układu dawca-biorca, o tyle każda z nich wymaga podjęcia natychmiastowego leczenia w krótkim okresie po transplantacji. Szczególną uwagę zwraca CMV, ponieważ seropozytywny dawca i seronegatywny biorca mogą doprowadzić do sytuacji, w której biorca rozwinię tkankową bądź nawracającą formę infekcji CMV, także tę oporną na leczenie gancyklowirem. Pacjenci będący biorcami od dodatniego dawcy wymagają wzmożonego monitorowania w zakresie rozwoju infekcji CMV i wdrożenia szybkiego leczenia w zakresie terapii wyprzedzającej. W wypadku HIV-dodatnich dawców – odrzuca się takiego dawcę, zaś HIV-dodatni biorcy otrzymują HIV-ujemny narząd przy dobrej kontroli wirerii. Wirus HCV podobnie, z tym, że u dodatniego biorcy kryterium stanowi pilność przeszczepu – w przypadku pozytywnego dawcy dopuszcza się go, o ile transplantacja musi być wykonana w trybie pilnym. Sprawę komplikuje wirus HBV: odrzuca się dawców HBsAg+, HBcAb, IgM+, HBcAb IgG+ (z ujemnym HBsAg, dodatni jest do zaakceptowania) z dodatnimi przeciwciałami niezależnie od przeciwciał biorcy, natomiast HBsAb+ dopuszcza się niezależnie od przeciwciał biorcy. Odrzuca się dawców podejrzanych o infekcje wirusowe układu nerwowego. Uwagę w ostatnim czasie zwrócił w Europie wirus do tej pory endemiczny dla Japonii, Karaibów i niektórych krajów afrykańskich – HTLV-I, ponieważ pojawił się u pacjentów w Hiszpanii, w Polsce podobny przypadek nie był raportowany i nie ma rutynowej kontroli tego patogenu u dawców przed transplantacją.

Infekcje w czasie procedury wynikają głównie z zastosowania roztworów płuczających narządy dawcy. Potencjalnym źródłem zakażenia dla serca może pozostawać także lód używany do transportu. Aby zminimalizować czas niedokrwienia, redukując tym samym kwestię osłabienia żywotności organu, należy ograniczyć czas trwania procedury. Nadzieją dla serc wydaje się obecnie testowana maszyna firmy TransMedic, pozwalająca przewozić bijące, ogrzewane do temperatury ciała, „żyjące” serca na długie dystanse (wykluczy to kolejny problem – konieczność ograniczenia

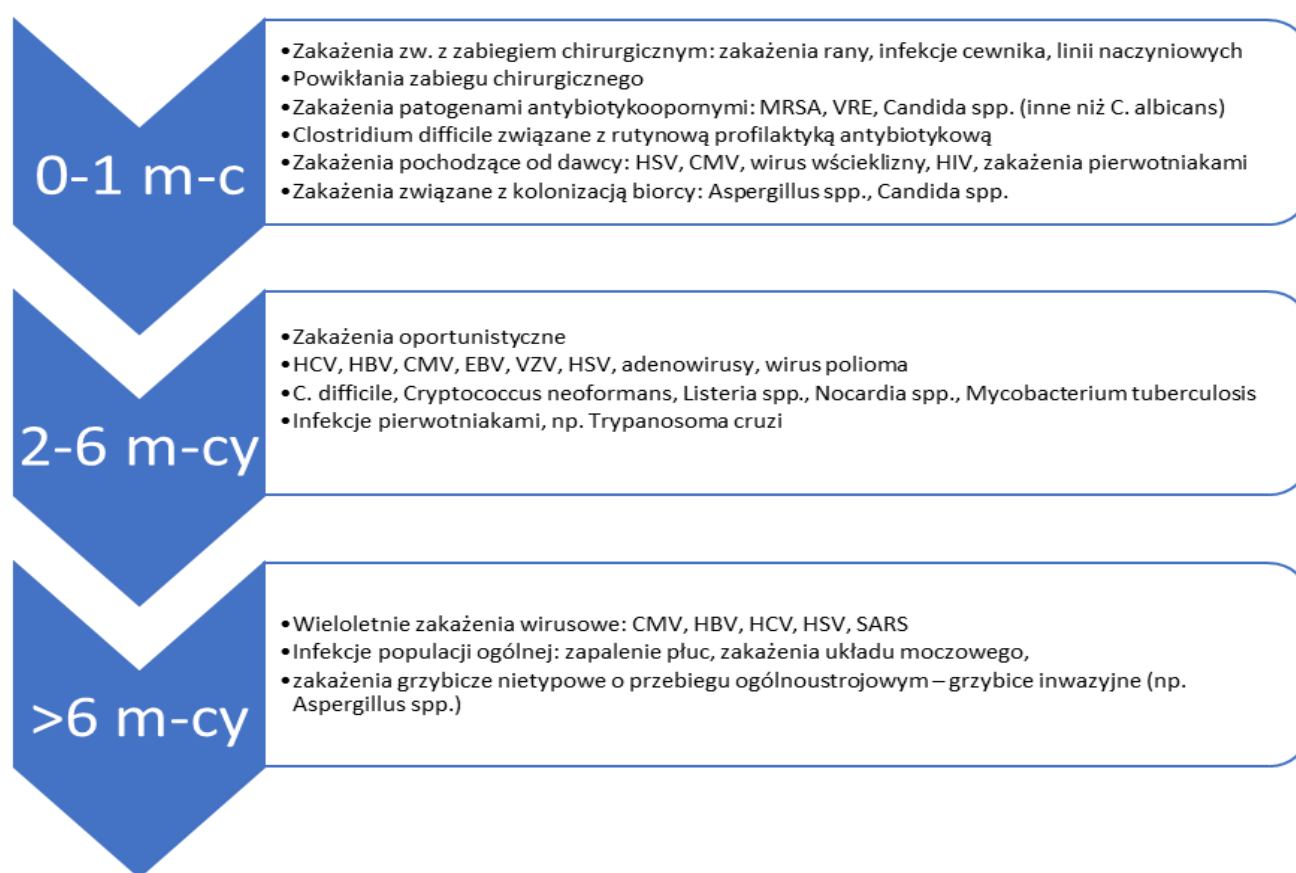
dawców do tych będących w zakresie kilku godzin od miejsca przeszczepiania, zwiększając zasięg o 100% - do 12 godzin).⁴⁷

Jeśli chodzi o kwestię infekcji po przeszczepie pozostaje kwestia profilaktyki – noszenie masek, unikanie kontaktu z chorymi członkami rodziny, unikanie potencjalnych źródeł infekcji (np. masowe imprezy, publiczny transport) oraz szybkie podjęcie leczenia w wypadku ich wystąpienia. Istotną kwestią jest także jak wyglądał okres bezpośrednio poprzedzający przeszczep – czy pacjent był wspomagany urządzeniem wspomagającym czynność komór, dializowany, posiadał cewniki donaczyniowe. Generalnie zainfekowanie każdej z tych dróg nie stanowi przeciwwskazania do przeszczepu, o ile jest pod osłoną antybiotykoterapii. W wypadku przeszczepu serca zainfekowane urządzenia wspomagające komory (VAD – ventricular assisting device) nie stanowią przeciwwskazania do przeszczepienia, zakładając całkowite usunięcie układu i włączenie leczenia celowanym antybiotykiem. Poza tym, pacjenci z niewydolnością serca w schyłkowym stadium choroby są narażeni także na zakażenia układu oddechowego. Pacjentów kontroluje się też pod kątem gruźlicy, aspergilozy i – na terenach endemicznych – zakażeń pasożytniczych oraz wymienionych już wyżej zakażeń wirusowych. Aby wzmocnić odporność na niektóre choroby zaleca się szczepienia przed przeszczepem, aby w miarę możliwości „nauczyć” układ odpornościowy reagować na szczepy dzikie zanim się go osłabi immunosupresją. Sugerowane są także metody prewencji farmakologicznej. Według wytycznych ISHLT zalecane są 3 preparaty w ramach terapii uniwersalnej: gancyklowir (prewencja CMV), biseptol (prewencja zakażenia *Pneumocystis*) oraz flukonazol bądź worikonazol w wybranych przypadkach (prewencja grzybic).⁴⁸

Drugim okresem zakażeń są zakażenia oportunistyczne, pojawiające się 2 miesiące po przeszczepie do pół roku od zabiegu. Zakażenia te nie dają objawów u osób immunokompetentnych, bądź będą miały zdecydowanie łagodny przebieg, natomiast osoby o obniżonej odporności – czy to w sposób planowy, jak w przypadku leczenia immunosupresyjnego, czy z powodu chociażby AIDS lub wieku – rozwiną pełnoobjawową chorobę inwazyjną. Do typowych dla tego okresu należą zakażenia CMV, *Pneumocystis jirovecii*, *Aspergillus spp.*, *Nocardia spp.*, *Toxoplasma gondii*, i *Listeria monocytogenes*. W tym okresie pojawiają się także zakażenia od dawcy, np. wirusami CMV i EBV u biorcy serologicznie ujemnego.

Trzeci okres, który mogą determinować wykrywane patogeny to okres zakażeń populacyjnych, tj. dla danej populacji typowych. Najczęściej zapadają na pneumokokowe zapalenia płuc, infekcje układu moczowego oraz infekcja *Haemophilus influenzae*. W pół roku po przeszczepie pojawi się też oportunistyczne, latentne zakażenie wirusem Herpes, najczęściej pod postacią opryszczki. Infekcje oportunistyczne w tym okresie stanowią niewielki odsetek i są zazwyczaj wynikiem przewlekłej wzmożonej immunosupresji związanej z odrzucaniem narządu.⁴⁹

Patogeny odpowiedzialne za infekcje różnią się w zależności od czasu upływającego od przeszczepu. Ta zależność została przedstawiona na rycinie 1.



Rycina 1. Rodzaje patogenów w zależności od czasu, jaki upłynął od przeszczepu narządu unaczynionego. Na podstawie Special Issue: The American Society of Transplantation Infectious Diseases Guidelines 3rd Edition, Marzec 2013, Tom 13, Numer s4, strony 1–371, Wytyczne leczenia są opracowane przez ISHLT⁵⁰ i American Society of Transplantation.⁵¹

Jednym z tych najbardziej wszechobecnych ludzkich systemów jest układ odpornościowy, którego komórki włączone są w większość procesów organizmu. Immunogenetyka- poszukująca podstaw działania lub ewentualnie podstaw wadliwego działania tego układu - stanowić zaczęła więc nie lada wyzwanie dla naukowców, głównie z uwagi na mnogość białek mogących brać udział w procesie chorobowym. Badanie układu HLA, cytokin, chemokin oraz ich receptorów- oraz mechanizmów ich współdziałania i wzajemnego oddziaływania zaowocowało doniesieniami o wpływie genetyki układu odpornościowego na takie choroby jak rak żołądka, choroba Alzheimera czy młodzieńcze zapalenie stawów.⁵²

Dla transplantologii układ ten jest kluczowy. Określenie profili genetycznych dawców i biorców pozwala w większości przypadków na ich dobranie, uniknięcie odrzucania i zahamowanie niszczących przeszczepiony organ procesów immunologicznych.

Immunogenetyka w przeszczepach serca organicza się (do tej pory) do dwóch ostatnich z wyżej wymienionych, bowiem dobór dawców odbywa się w oparciu głównie o grupy krwi ABO. Wynika to z krótkiego akceptowalnego czasu zimnego niedokrwienia pobranego narządu. Odrzucanie przeszczepu może mieć formę humoralną, czyli zależną od przeciwciał, oraz komórkową. Odrzucanie komórkowe bazuje na funkcji limfocytów T cytotoksycznych i koreluje z uszkodzeniem przeszczepionego serca.

4.1. Odporność wrodzona i nabyta

Odkrycie dwóch mechanizmów immunologicznych - wrodzonych i nabytych - spowodowało, że od początkowe myślenie o ludzkiej odporności przesunęło się znacznie dalej niż na początku. Pomimo, że wrodzona odporność była początkowo uważana za prostą, niespecyficzną, okazało się, że jest odpornością immunologiczną pierwszorzędową i koordynuje wszystkie procesy immunologiczne w organizmie człowieka. Nabyte mechanizmy, których nasz układ odpornościowy uczy się zwłaszcza w pierwszym w okresie życia, bardziej specyficzne, antygenowe wydają się być dobrze kontrolowanym efektem wrodzonej odporności. Obydwa mechanizmy dzielą wzorce cząsteczkowe

i komórkowe, tworząc synergiczną, skuteczną barierę dla patogenów atakujących dowolny ludzki system lub tkankę.

Do odporności wrodzonej zalicza się 4 rodzaje podstawowych mechanizmów:

- wydzielanie cytokin prozapalnych przez aktywowane fagocyty
- wydzielanie czynników chemotaktycznych dla limfocytów
- prezentacja antygenów przez makrofagi
- pobudzanie limfocytów poprzez nieswoiste białka (np. defensyny)

4.2 Rodzina receptorów Toll-podobnych

Toll-podobne receptory (TLR - Toll-like receptors) są receptorami rozpoznającymi wzorce (PRR – pattern recognition receptors) wrodzonej odporności odpowiedzialnej za pierwszą linię obrony gospodarza przed bakteriami, grzybami, wirusami i pasożytami. Pojęcie PRR autorstwa Janeway jako części wzorców molekularnych związanych z patogenami (PAMP – pathogen associated molecular patterns), które razem z wzorcami molekularnymi związanymi z uszkodzeniem (DAMP – damage associated molecular patterns) identyfikują zarówno patogeny wchodzące do organizmu człowieka, jak i reagują na stres lub zmiany wywołane urazami. Wśród wzorców rozpoznawanych przez PAMPs są obecne wirusowe i bakteryjne kwasy nukleinowe, mannan, zymosen i inne, podczas gdy DAMPs są szeroko reprezentowane przez składniki gospodarza, takie jak histony, kryształy kwasu moczowego lub cytochromu C. PRR uważa się obecnie za rozpoznające struktury molekularne i wiążące je z wrodzoną i nabytą odpowiedzią immunologiczną. Rodzina PRR obejmuje receptory typu Nod-like, receptory RIG-1, receptory Toll-podobne, receptory lektynopodobne typu C i receptory cytozolowego DNA, wśród których najlepiej zbadane są receptory Toll-2. Ostatnio odkryto, że receptory typu Toll są kluczowe, ponieważ indukują i modulują ekspresję cytokin zapalnych, chemokin i interferonów. Do tej pory rozpoznano 10 receptorów Toll-like u ludzi i 12 u myszy, przy czym jako jedyny *TLR10* występuje jedynie u ludzi, a jest nieobecny u myszy. Rozmieszczenie poszczególnych z nich w komórkach i tkankach pozostaje nierównomierne i zależy od potrzeb układu odpornościowego. *TLR1* i *TLR2* oraz *TLR 4-6* rozpoznają części otoczki bakteryjnej, są białkami błonowymi, a *TLR4-5* występują też wewnątrz komórki – w niektórych tkankach. *TLR3* i *TLR7-9* rozpoznają obce kwasy nukleinowe,

przekraczające barierę błony komórkowej, stanowiąc część endosomów⁵³. Lokalizację tkankową, komórkową oraz ligandy dla poszczególnych TLR występujących u ludzi przedstawia tabela nr 1.⁵⁴

Tabela 1: Rodzina receptorów Toll-podobnych u ludzi (⁵⁵)

<i>TLR</i>	Lokalizacja komórkowa	Naturalne ligandy	Rozpoznawane patogeny	Ekspresja w tkankach i komórkach
<i>TLR1</i>	zwnętrzkomórkowa	lipopeptydy triacylowe	bakterie	<ul style="list-style-type: none"> • każdy narząd i tkanka • monocyty, macrofagi, komórki dendrytyczne, leukocyty, Komórki: B, T i NK
<i>TLR2</i>	zwnętrzkomórkowa	lipoproteiny, peptydoglikan, zymosan i mannan	bakterie	<ul style="list-style-type: none"> • mózg, serce, płuca, śledziona • makrofagi, komórki dendrytyczne i granulocyty
<i>TLR3</i>	przedział endolizosomalny	dsRNA	dsRNA	<ul style="list-style-type: none"> • łożysko, trzustka • komórki dendrytyczne, komórki: T i NK
<i>TLR4</i>	zwnętrzkomórkowo, przedział endolizosomalny	LPS, RSV and MMTV fuzja białek, mannany, glikoinozotofosfora n <i>Trypanosoma</i> spp.	Gram-ujemne bakterie i wirusy	<ul style="list-style-type: none"> • śledziona • limfocyty obwodowe, komórki B i T, komórki dendrytyczne, monocyty, makrofagi granulocyty
<i>TLR5</i>	zwnętrzkomórkowa	flagellina	bakterie	<ul style="list-style-type: none"> • jajniki i prostata • limfocyty obwodowe i monocyty

<i>TLR</i>	Lokalizacja komórkowa	Naturalne ligandy	Rozpoznawane patogeny	Ekspresja w tkankach i komórkach
<i>TLR6</i>	zewnątrzkomórkowa	diacylopeptydy, LTA and zymosan	bakterie	<ul style="list-style-type: none"> • grasica, śledziona, płuca • monocyty I komórki B
<i>TLR7</i>	przedział endolizosomalny	GU-bogate ssRNA i krótkie dsRNA	wirusy, bakterie	<ul style="list-style-type: none"> • płuca, łożysko, śledziona, migdałki, węzły chłonne • monocyty, komórki B i komórki dendrytyczne
<i>TLR8</i>	przedział endolizosomalny	GU-bogate ssRNA, krótkie dsRNA i bakteryjne RNA	wirusy, bakterie	<ul style="list-style-type: none"> • płuca, łożysko, śledziona, szpik kostny, węzły chłonne • komórki nabłonkowe, limfocyty obwodowe
<i>TLR9</i>	przedział endolizosomalny	CpG DNA and hemozoina <i>Plasmodium</i> spp.	wirusy, bakterie, niektóre pierwotniaki	<ul style="list-style-type: none"> • śledziona, szpik kostny, węzły chłonne • limfocyty obwodowe, komórki B i komórki dendrytyczne
<i>TLR10</i>	Brak danych	Brak danych	Brak danych	<ul style="list-style-type: none"> • śledziona, grasica, węzły chłonne, migdałki • komórki B

Tabela opisująca kompartment komórkowy, typ komórek, w których występują poszczególne TLR oraz ich ligandy.

4.3. Polimorfizm pojedynczego nukleotydu

O istnieniu genów wiemy od kilkudziesięciu lat, ale dopiero zmapowanie genomu (czyli określenie lokalizacji poszczególnych genów całego DNA) człowieka w ramach Human Genome Project pozwoliło dzięki na tworzenie badań genetycznych o zasięgu genomowym, tzw. „genome-wide association studies” (GWAS). Pozwoliło także na celowane badania genetyczne w kierunku konkretnych chorób i cech. Sam projekt zajął naukowcom z całego świata 13 lat i dał szansę tysiącom innych na wykrycie podłoża i rozpoczęcie genoterapii wielu chorób.

DNA to skręcona nić złożona z deoksyrybozy – pentozy, grupy fosforanowej oraz komplementarnych względem siebie zasad azotowych: adeniny, guaniny (puryny), cytozyny i tyminy (pirymidyny). Zasady te łącznie z deoksyrybozą tworzą deoksynukleozydy, odpowiednio dA, dG, dC i T. Pojedyncza zasada, deoksyryboza i grupa fosforanowa stanowią nukleotyd. Nić DNA zazwyczaj tworzą dwa łańcuchy biegnące do siebie antyrównolegle (koniec 5' pierwszej nici łączy się z końcem 3' drugiej nici) nazywaną wówczas dsDNA (double-strain DNA), ale może być złożony tylko z jednego łańcucha (ssDNA – single-strain DNA). Kierunek skrętu determinuje czy helisa jest prawo- czy lewoskrętna. Reszty cukrowe i fosforanowe, połączone ze sobą wiązaniem 5'-3' fosfodiestrowym, znajdują się zewnątrz w helisie, natomiast puryny i pirymidyny skierowane są do wewnątrz i tworzą komplementarne pary zasad połączone wiązaniami wodorowymi według schematu: puryna-pirymidyna, czyli A-T i C-G. Ilościowy pomiar zawartości poszczególnych zasad azotowych określa tzw. reguła Chargaffa, w której ilość puryn jest równa ilości pirymidyn. W ludzkim genomie jest 29.3% adeniny, 30% komplementarnej do niej tyminy, 20% cytozyny i 20.7% guaniny. Układ A-T i C-G pozostaje stały, a długość danego genu mierzy się parami zasad, czyli liczbą nukleotydów składającą się na fragment DNA, który ten gen zajmuje. Długość całego ludzkiego genomu to 3000Mpz (milion par zasad).⁵⁶

Polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP) jest istnieniem w danej populacji allelu lub alleli, czyli form genu, odmiennej od występującej najczęściej – tej przyjętej jako prawidłowa- i szacuje się, że jest to najczęstsza forma zmienności genetycznej. SNP to od 0.01% do 1% allel inny od dominującego w populacji, w zależności od genu. Dotyczy różniących się pomiędzy sobą genów

ludzkich –zmian mogących pozostać niemymi, wzmacniać lub osłabiać funkcje białek organizmu lub nawet całkowicie je zmieniać. Każdy SNP może być potencjalnie chorobotwórczy. Przykładami chorób o udowodnionym podłożu SNP w genach są np.: mukowiscydoza, miażdżyca, choroba Parkinsona, choroba Alzheimera, czy anemia sierpowata. Każdy taki polimorfizm po zmapowaniu genomu posiada swoje locus w genomie i numer referencyjny (numer rs), dzięki któremu jest możliwe ustanowienie go swoistym markerem genetycznym i poszukiwanie u osobników badanego gatunku. Umożliwia to wyszukiwanie SNPs oraz porównywanie wyników między ośrodkami. Pozostawia także dodatkową opcję – SNPs dziedziczą się w blokach, tzw. “haplotypach”, co oznacza, że badając jeden można łatwo określić występowanie kolejnych – na podstawie HapMap. Mapowanie ich dodatkowo ułatwia to, że w całym genomie jest ich dużo, a u ludzi oddalone są od siebie o 11-300pb, nie wszystkie lokalizują się w genach zaś w DNA niekodującym, stąd są czasem używane znaczenia konkretnych regionów w chromosomach.

Technikami biologii molekularnej, które wykorzystuje się do analizy SNPs są: PCR, HRM.⁵⁷

Kardiogenetyka obecnie koncentruje się głównie wokół tematyki dziedziczenia, zwiększonej skłonności i częstości występowania choroby niedokrwiennej serca, kardiomiopatii oraz zaburzeń rytmu. Pojawia się także w literaturze wiele odniesień do korelacji między nadciśnieniem tętniczym a różnymi wariantami dziedziczenia, w tym SNPs. Biorąc pod uwagę wrodzoną odporność, na szczególne zainteresowanie z racji swojej wszechobecności zasługuje rodzina TLR. Jeżeli wziąć pod uwagę *TLR4*, również przebadano wiele możliwych wariantów powiązań występowania, śmiertelności oraz genotypu. Sun i współpracownicy wskazuje, na dużej kohorcie 848 pacjentów, korelację choroby wieńcowej i *TLR4* SNP rs10116253, oznaczając ten wariant jako ochronny⁵⁸. Duża metaanaliza, włączająca ponad 35 tysięcy pacjentów z 40 różnych badań, wykazała natomiast, że niektóre z SNPs mogą stanowić biomarkery miażdżycy i związanej z nią chorób sercowo-naczyniowych, głównie choroby wieńcowej⁵⁹.

Jeśli wziąć pod uwagę choroby infekcyjne, również, z uwagi na mechanizm działania *TLR4* i jego ligandy, pojawia się szereg prac dotyczących genotypu tego receptora i np. zwiększonej zapadalności na niektóre zakażenia bądź wskazania wariantów ochronnych. Wg Jabłońskiej i wsp. taki wariant *TLR4* to Asp299Gly rs4986791, który działał protekcyjnie w wypadku zakażenia

wirusem CMV – zmorą wielu pacjentów po transplantacji serca⁶⁰. Interesująca praca dotycząca trądu i jego przebiegu korelująca ciężkość tego przebiegu z dwoma SNPs *TLR4* (rs1927914, rs1927911) ukazała się w kwietniu 2017 za sprawą Santany i wsp. Wykazano, iż dzięki przesterowaniu produkcji odpowiednich cytokin i chemokin zapalnych modulują one odpowiedzią immunologiczną na *Mycobacterium leprae*⁶¹.

W transplantacjach serc opisano dotychczas niewiele SNPs. Badania te toczą się głównie w obrębie układu odpornościowego, co oczywiste z punktu widzenia jego istotności w terapii immunosupresyjnej, ale pojawia się także wiele prac dotyczących tematów obocznych, choć równie istotnych, np. otyłości u pacjentów po przeszczepach narządów unaczynionych. Duże badanie wieloośrodkowe w Szwajcarii, włączające jako badanie genomowe (GWAS – genome wide association study) 156 osób po przeszczepach płuc, wątroby, nerek, udowodniło wpływ genotypu na występowanie otyłości właśnie. Przebadano łącznie aż 129 wariantów, udowadniając jasno, że genetyka w wypadku leczenia immunosupresantami także wpływa na przybieranie na wadze⁶². W przeszczepach nerek wykazano istotne różnice w przeżyciu graftu w SNPs forkhead box-3 – białka regulującego działanie limfocytów T – przebadane warianty rs3761548 A/C, rs2280883 C/T, jak się okazało zwiększają istotnie czas przeżycia przeszczepu⁶³.

W przeszczepach serc, szwajcarskie badanie wieloośrodkowe, dotyczące SNPs receptorów adrenergicznych na grupie 41 pacjentów β 1-AR Ser49Gly (rs1801252), β 1-AR Arg389Gly (rs1801253), β 2-AR Arg16Gly (rs104271), β 2-AR Gln27Glu (rs1042714), and β 2-AR Thr164Ile (rs1800888) pokazało ich ważną rolę w aktywacji układu współczulnego, a co za tym idzie – ich wpływ na wydolność fizyczną pacjentów po HTx⁶⁴. Metaanaliza 5 badań, również głównie wieloośrodkowych, śledząca wnikliwie 3 geny dla cytokin zapalnych- kachektyny alfa, beta1-c10 i beta1-c25 (odpowiednio TNF α -308, TGF β 1-c10 oraz TGF β 1-c25) pokazała ich istotną rolę w odrzucaniu przeszczepu⁶⁵.

4.4 Receptor Toll-like 4

TLR4 należy do PRR, jest uważany za białko transbłonowe, pojawiają się jednak prace dowodzące niezbiecie, że lokalizacja komórkowa zależy od tkanki, np. w komórkach nabłonka jelitowego lokalizuje się w aparacie Golgiego⁶⁶. Początkowo *TLR4* był traktowany jedynie jako ligand dla

lipopolisacharydu bakteryjnego (LPS - lipopolisaccharide), lokując *TLR4* w odporności wrodzonej jedynie jako odpowiedź na infekcje Gram-negatywnymi bakteriami. Zakres kompetencji tego receptora jednak rozszerzał się wraz z kolejnymi odkryciami. Stewart i wsp. identyfikuje aktywację *CD36-TLR4-TLR6* jako wspólny mechanizm molekularny, w wyniku którego stymulowane zostają sterylne stany zapalne miażdżycy i amyloidu-beta i sugerują nowy model heterodimeryzacji TLR wywoływany przez sygnalizację koreceptorową⁶⁷. *TLR4* stał się też nadzieją na terapię celowaną w nowotworach dzięki swojej funkcji jako struktury molekularne związane z uszkodzeniem (DAMP - danger associated molecular pattern) – komórki dendrytyczne w trakcie chemio- lub radioterapii wymagają sygnalizacji poprzez *TLR4-MyD88* w celu skutecznego przetwarzania i prezentacji krzyżowej antygeny z umierających komórek nowotworowych pacjentek z rakiem piersi – zależnie od genotypu u myszy pozbawionych funkcji *TLR4* nawrót choroby następował szybciej po radioterapii i chemioterapii u pacjentów z prawidłowym allelem *TLR4*⁶⁸.

Istnieją różne mechanizmy działania *TLR4*. Wspólnie z MyD88 (Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88) i TIRAP (TIR Domain-Containing Adaptor Protein) razem z CD14 reaguje na LPS prowadząc do produkcji NF-kappaB i dalej – cytokin prozapalnych. Natomiast wspólnie z TRIF (TIR-domain-containing adaptor inducing interferon- β) i TRAM (TRIF-related Adaptor Molecule) prowadzi do produkcji interferonów klasy pierwszej, w tym interferonu- α i interferonu- β .

W ostatnim czasie zwrócono uwagę, że nie za każdym razem *TLR4* reaguje prawidłowo, słusznie szukając przyczyny jego błędnej reakcji w genetyce. Jako najczęstszą formę zmienności SNPs *TLR4* również zostały wzięte pod uwagę. Badania nie dotyczą jedynie infekcji, ale także nowotworów oraz chorób o podłożu zapalnym, np. miażdżycy czy astmy.

Badania dotyczące infekcji i SNPs *TLR4* zahaczają o najcięższe przypadki, w tym sepsę. Kumpf i wsp. raportują badania genetyczne na grupie 949 pacjentów operowanych w oddziałach chirurgii ogólnej oraz kardiochirurgii - *TLR4* oraz TIRAP/Mal zostały prześledzone pod kątem SNPs rs4986790 - Asp299Gly i rs4986791 - Thr399Ile. Wykazano pozytywną korelację – ciężkość przebiegu zakażenia pojawia się w grupie pacjentów z w/w. SNPs częściej, te warianty genetyczne zostały znalezione u 172 pacjentów⁶⁹. Wpływ genotypu na sepsę badano również u 598 pacjentów

włączonych do badania przez zespół amerykański pod egidą Shalhub i wsp.. 147 z nich rozwinęło powikłaną sepsę, stanowiąc 25% chorych włączonych do tego badania. Na podstawie badanego SNP *TLR4* A896G wykazano, że ten polimorfizm działa z kolei ochronnie – pacjenci, u których wystąpił znacząco rzadziej rozwijali powikłania sepsy⁷⁰. Losy powiązania sepsy i SNPs rs4986790 - Asp299Gly i rs4986791 - Thr399Ile Liu i wsp. śledziło 277 badań do stycznia 2016, nie wykazując korelacji pomiędzy nimi, a zwiększoną zapadalnością na sepsę⁷¹.

Choroby o podłożu zapalnym również znajdują swoje odzwierciedlenie w badaniach SNPs *TLR4*. Z badanych SNPs w astmie oskrzelowej genotyp TT rs1927914 oraz GG variantu rs10983755 i rs1927907 są silnie powiązane z ciężkością przebiegu astmy, chociaż nie mają wpływu na jej wystąpienie. Co więcej, wskazano, że allel C genotypu rs1927914 oraz allel A rs10983755 i rs1927907 ma działanie ochronne jeśli wziąć pod uwagę ciężkość choroby⁷². Jeden ze SNPs badanych w w/w. badaniu - rs10983755 - został zbadany na populacji chińskiej i dowiedziono jego powiązania z występowaniem choroby wieńcowej na grupie 424 pacjentów⁷³. Dermatolodzy prześledzili również SNP wariant rs4986790, znajdując jego pozytywne powiązanie z występowaniem niektórych typów łuszczycy oraz łuszczycowego zapalenia stawów⁷⁴.

Interesujące na tle powyższych wydają się również badania mające głębokie tło immunologiczne nad różnymi typami nowotworów, takimi jak nowotwór żołądka, jajnika czy piersi. *TLR4* w literaturze onkologicznej został do tej pory szeroko opisany, zwłaszcza w podejrzanym tle infekcyjnym – jak w raku żołądka (zakażenie *H. pylori*) czy szyjki macicy (zakażenie wirusem HPV). W raku piersi Koreańczycy przebadali 8 genów na obecność ponad 116 SNPs, znajdując powiązanie dla *TLR4* rs7045953 i długości przeżycia pacjentek – ten wariant stanowi, według badaczy, wariant ochronny, tj. pacjentki posiadające ten polimorfizm przeżyły dłużej pomimo tej samej terapii, co grupa kontrolna dla tego SNP⁷⁵. Ostra białaczka szpikowa, przebadana na grupie 62 polskich pacjentek, pod kątem genów powiązanych ze szlakiem NF-kappaB, a tym *TLR4* rs4986790; rs4986791 nie wykazała powiązania z tymi wariantami *TLR4*, natomiast dała pozytywny wynik jeśli chodzi o *TLR9*⁷⁶. Dane z innego badania sugerują natomiast wpływ genotypu, w tym genotypu *TLR4* na przebieg choroby oraz wrażliwość na metody terapii szpiczaka mnogiego⁷⁷. Wiele prac, zarówno na populacji kaukaskiej, jak również azjatyckich wskazało silną korelację z występowaniem raka przewodu pokarmowego. Rosyjskie badania nad rs4986791

wskazują go jako czynnik zwielfokrotniający prawdopodobieństwo raka odbytnicy⁷⁸. Trzy SNPs *TLR4* (rs1927914, rs4986790, rs4986791) zbadane na populacji indyjskiej również wykazały zwiększone ryzyko występowania raka żołądka w następstwie chronicznego zakażenia *H. pylori* oraz choroby wrzodowej żołądka⁷⁹.

4.5 Receptor Toll-like 4 i transplantacje

Badań w zakresie transplantacji serca, SNPs *TLR4* w ujęciu infekcji nie ma w literaturze światowej wcale. Najwięcej danych z zakresu transplantacji i SNPs *TLR4* oraz samego *TLR4* i jego roli pojawia się w artykułach hematologicznych dotyczących transplantacji szpiku.

Niemieccy badacze infekcji po przeszczepie szpiku śledzili SNPs 1063A/G (D299G) and 1363C/T (T399I) *TLR4* pod względem większej zapadalności na inwazyjną aspergilozę, wykazując, iż podane warianty – jeśli wystąpią zarówno u dawcy jak i biorcy - wpływają istotnie na większe ryzyko występowania aspergilozy u tych pacjentów⁸⁰.

Jeśli chodzi o przeprowadzone badania nad *TLR4* w transplantologii, pojawiają się dane również dla narządów unaczynionych. Na populacji tunezyjskiej przebadano 209 biorców nerek w kontekście SNP *TLR4* Asp299Gly oraz przeżycia graftu, nefropatii graftu i ostrego odrzucania przeszczepionego narządu, nie znajdując powiązania między wyżej wymienionymi a SNP⁸¹. Duże amerykańskie badanie na aż 738 pacjentach po przeszczepie wątroby, w którym przeprowadzono analizę aż 37 wariantów *TLR4* wskazało, że niektóre z nich – w zależności od pochodzenia pacjentów wpływały na przeżycie graftu⁸².

5. Cele pracy

Celem pracy jest ocena, czy wybrane polimorfizmy genów kodujących białka *TLR4*: *TLR4* rs10983755 A/G, rs4986791 C/T, rs4986790 A/G, rs10759932 C/T, rs1927911 C/T, rs11536889 C/G, rs12377632 C/T wpływają na występowanie infekcji i pogarszają rokowanie u pacjentów po HTX.

Ponadto zadano pytanie czy istnieje zależność typu zakażenia (bakteryjne, wirusowe, grzybicze) i jego współistnienie z konkretnym SNP *TLR4*.

Na podstawie analizy przyczyn zgonów pacjentów po przeszczepach serca przeprowadzanych w Szpitalu Klinicznym Przemienienia Pańskiego można wysnuć wniosek, iż infekcje są wiodącą przyczyną. Na 39 pacjentów przeszczepionych w latach 2010-2017 przeżyło do tej pory 23 pacjentów. 3 biorców zmarło na nowotwory, 2 na powikłania sercowo-naczyniowe, 2 w obrazie niewydolności wielonarządowej, a aż 9 z powodu infekcji. Liczba ta przekracza więc sumę zgonów z innych przyczyn, stąd pytanie, czy istnieją genetyczne podstawy zwiększonej zapadalności na zakażenia, które są potencjalnie śmiertelne dla biorców przeszczepów serc. W ramach niniejszej pracy oceniono także powiązanie między genotypem a zapadalnością na poszczególne typy infekcji oraz wpływ samego genotypu na przeżycie pacjentów – zwłaszcza pod kątem genotypów ochronnych.

6. Materiał i metoda

Badanie miało charakter prospektywny i retrospektywny jednocześnie. Zgodę na niniejszy projekt badawczy wyraziła Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Prospektywnie dokonano analizy materiału genetycznego pobranego od pacjentów oraz obserwacji zapadalności na infekcje u pacjentów poddanych HTx podczas trwania badania. Retrospektywnie przeanalizowano dane pacjentów będących już po HTx w momencie wyrażenia zgody na udział w badaniu. Uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu nr 870/15 z dn. 01.10.2015 oraz ze zmianami nr 578/16 w dn. 05.05.2016.

Kryteria włączenia stanowiło:

- przebycie procedury HTx w Klinice Kardiologii i Transplantologii w latach 2010-2016
- wyrażenie pisemnej zgody na udział.

Z udziału wyłączono pacjentów, którzy nie mogli zgody wyrazić z uwagi na stan zdrowia.

Do badania włączono 24 pacjentów, w tym 18 mężczyzn i 6 kobiet przeszczepionych w Klinice Kardiologii i Transplantologii, a pozostających pod kontrolą I Kliniki Kardiologii Szpitala Klinicznego Przemienienia Pańskiego Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu w latach 2010-2016. Udział probantów w badaniu poprzedziła pisemna zgoda na pobranie i analizę materiału genetycznego oraz opracowanie danych klinicznych w oparciu o dostępną dokumentację medyczną. Okres obserwacji wynosił rok po przeszczepie. Probandzi mieli średnio 50 lat (wiek w grupie od 30 do 65 lat) podczas włączenia do badania oraz 47 lat średnio w momencie przeszczepu (rozpiętość wieku dla niniejszej grupy badanej to 26 – 62 lata). Większość badanych stanowili mężczyźni – 18 mężczyzn do 6 kobiet. Chorobą podstawową, która doprowadziła do konieczności leczenia transplantacją serca były: u 10 pacjentów -kardiomiopatia rozstrzeniowa, 4 -kardiomiopatia przerostowa, 10 – uszkodzenie mięśnia związane z chorobą wieńcową. Okres po transplantacji w momencie włączenia do badania wynosił od 6 miesięcy do 7 lat. Wszyscy pacjenci

włączeni do badania pozostawali na leczeniu immunosupresyjnym mikofenolanem mofetilu oraz takrolimusem, a także steroidami w pierwszym okresie oraz przy stwierdzonym odrzucaniu podczas biopsji protokolarnych. Każdy z probantów miał włączoną uniwersalną profilaktykę zakażeń, wynikającą z zaleceń ISHLT, tj. biseptol, flukonazol i acyklowir. Inne leczenie wynikało ze stanu ogólnego pacjentów i dotyczyło chorób towarzyszących (nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, zaburzenia funkcji tarczycy sprzed HTx) oraz chorób wynikłych z zastosowania leczenia immunosupresyjnego - w szczególności steroidoterapii (cukrzyca posteroïdowa, zaburzenia rytmu serca). Zakażenia w okresie objętym badaniem leczono zgodnie z zaleceniami ISHLT, czyli wg posiewu lub danych laboratoryjnych zakażenia grzybiczego (galaktomannan, posiew) i wirusowego (badania jakościowe i ilościowe DNA/RNA wirusów z krwi).

Najczęściej występującymi patogenami były bakterie z grupy *Streptococcus* spp., w tym *S. pneumoniae*, *S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis*, *S. gamma haemolyticus*. Poza nimi czynnikiem etiologicznym infekcji wśród pacjentów były: różne szczepy *Staphylococcus* spp. (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. capitis* oraz infekcje mieszanymi typami), *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Actinomyces odontolyticus*, *Enterococcus hirae*, *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas putida*, *Leuconostoc citreum*, *Klebsiella oxytoca*, *Kocuria rosea*, *Proteus mirabilis*. Wśród zakażeń wirusowych dominowały infekcje CMV oraz *Herpes viridae*, 1 pacjent zachorował na grypę o domniemanej etiologii wirusa AH1N1. Zakażenia grzybicze miały etiologię *Aspergillus* spp. lub *Candida* spp., z istotną przewagą zakażeń kropidlakami (5 stwierdzonych aspergilloz, 2 kandydozy).

Spośród 24 badanych pacjentów, w toku obserwacji 6 zmarło. W tym: 2 pacjentów z powodu powikłań infekcyjnych (inwazyjna aspergiloza, mieszane zakażenie bakteryjno-grzybicze), 2 osoby z powodu nowotworu (rak żołądka, rak płaskonabłonkowy płuc), 2 z powodu powikłań naczyniowych (udar mózgu, pęknięty tętniak aorty brzusznej).

Od 24 pacjentów pobrano 8ml krwi obwodowej na EDTA. Krew następnie zamrożono w temperaturze -20° C w warunkach laboratoryjnych. W kolejnym kroku materiał został przetransportowany do Katedry Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego im.

K. Marcinkowskiego w Poznaniu celem dalszej analizy. Próbka krwi każdego z pacjentów została poddana identycznej procedurze i zbadana pod kątem występowania siedmiu wariantów *TLR4*.

Grupę kontrolną stanowiło 94 zdrowych dawców krwi dobranych pod względem wieku i płci, których materiał pozyskano z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w celu porównania częstości występowania badanych wariantów w populacji ogólnej.

Badane SNPs: rs10983755 A/G, rs4986791 C/T, rs4986790 A/G, rs10759932 C/T, rs1927911 C/T, rs11536889 C/G, rs12377632 C/T.

DNA genomowe z krwi obwodowej zostało wyizolowane przy użyciu metody wysalania i następnie wykorzystane do dalszych analiz. Metoda ta polega na otrzymaniu oczyszczonego DNA przy pomocy precypitacji białek za pomocą wysokich stężeń soli. 2.5 ml krwi pełnej pobranej na EDTA w pierwszym kroku jest zmieszane z 7.5 ml buforu lizującego (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 M Tris/HCl, pH=7.4) w probówkach stożkowych o pojemności 15 ml i inkubowane przez 60 minut na lodzie. Próbki zostały następnie odwirowane 2000 x g przez 15 min w 4°C, a wytworzony osad ponownie rozpuszczony w 2.5 ml schłodzonego buforu lizującego. Po dokładnym wymieszaniu próbka zostaje ponownie odwirowana (2000 x g przez 15 min w 4°C). Powyższą czynność powtarzano przynajmniej trzykrotnie, aż do uzyskania białego osadu. Do otrzymanego tą drogą osadu dodaje się 1.25 ml buforu SE (75 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH=8.0), a następnie 125 µl 10% SDS oraz 6.25 µl proteinazy K (20 mg/ml). Roztwór został dokładnie wymieszany i poddany inkubacji przez 16 godzin w temp. 55°C. W kolejnym kroku, otrzymany lizat był ekstrahowany z wykorzystaniem 0.357 ml nasyconego NaCl (5 M). Wytrącone białko pozostające na dnie probówki pozostawiono, natomiast supernatant zawierający DNA został przeniesiony do nowej probówki stożkowej. Otrzymane DNA wytrącono w 2,5 objętości absolutnego etanolu (96%) w temperaturze pokojowej, następnie przemywane 70% etanolem i poddane wirowaniu celem otrzymania osadu DNA, który jest rozpuszczany w sterylnej wodzie destylowanej^{83 84}.

SNPs zostały poddane genotypowaniu z wykorzystaniem techniki wysokiej rozdzielczości analizy krzywych topnienia (HRM) z wykorzystaniem aparatury LightCycler 480 system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) oraz mieszaniny reakcyjnej dla real-time PCR LightCycler® 480 High Resolution Melting Master (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Łączuchowa

reakcja polimerazy została przeprowadzona w następujących warunkach: wstępna denaturacja w 95°C przez 15 min, następnie 55 cykli: 95°C przez 10 sekund i 60°C przez 10 sekund, z etapem końcowej elongacji w 72°C przez 15 sekund. Amplifikowane fragmenty DNA poddano następnie wysokiej rozdzielczości analizie krzywych topnienia z rosnącą temperaturą w przedziale 80–95°C z przyrostem równym 0.1°C/2 sekundy.

Dane dotyczące infekcji pacjentów uzyskano z dokumentacji medycznej oraz na podstawie wyników badań laboratoryjnych (bakteriologicznych, mikologicznych i genetycznych ilościowych i jakościowych potwierdzających wiremię).

Po otrzymaniu wyników, zostały one wprowadzone do bazy danych programu Microsoft Excel. Obliczenia wykonano przy pomocy programu firmy StatSoft, Inc. (2014) STATISTICA (data analysis software system), version 12 oraz programu Cytel Studio version 10.0.0 (Jan 16,2013). Użyto testów: χ^2 z poprawką Pearsona, Fishera-Freemana-Haltona oraz testu dokładnego Fishera. Istotność różnic i zależności sprawdzana była na poziomie $\alpha = 0,05$.

Pomimo szerokich kryteriów włączenia, istotnym ograniczeniem metody była stosunkowo niewielka grupa probantów, wynikała z liczby przeprowadzonych w okresie badania przeszczepów w ośrodku. Brak dawców, stanowiący globalny problem transplantologii, zgodnych dla pacjentów na liście oczekujących Kliniki Kardiochirurgii i Transplantologii spowodował mniejszą niż zakładana pierwotnie liczbę biorców. Ponadto z uwagi na konieczność wyrażenia świadomej zgody materiał genetyczny mógł być pobrany tylko od osób, które pozytywnie przeszły pierwszy okres pooperacyjny, co wykluczyło z badania osoby, które zmarły w krótkim okresie po HTx. Z tej przyczyny analiza statystyczna została dostosowana do małej grupy, z wynikłymi z takiej analizy ograniczeniami metod statystycznych, pomimo dostosowania testów do niewielkiej grupy statystycznej.

7. Wyniki

Infekcję rozpoznano u 17 spośród analizowanych pacjentów, w tym: u 13 badanych – infekcję bakteryjną, 12 – wirusową, a u 6 – grzybiczą. Dla żadnego zbadanego w niniejszej analizie SNP nie wykazano, iż jego występowanie wiąże się ze zwiększoną zapadalnością na zakażenia. Wykazano natomiast, że istnieje powiązanie niektórych SNPs ze zwiększoną zapadalnością na infekcje grzybicze. W badanej grupie ukazała się także zależność między trzema SNPs a zgonem, co więcej bez związku z infekcją, tj. nie wykazano związku jednego z nich z żadną infekcją żadnego typu w wypadku jednego z nich. Może oznaczać to, że jest on pretendentem do roli niezależnego genetycznego czynnika ryzyka zgonu w tej grupie badanej.

7.1 Zależność wybranych SNPs od występowania infekcji po Htx

Badane SNPs: rs10983755 A/G, rs4986791 C/T, rs4986790 A/G, rs10759932 C/T, rs1927911 C/T, rs11536889 C/G, rs12377632 C/T nie korelowały z występowaniem infekcji generalnie. Nie wykazano istotności statystycznej dla żadnego polimorfizmu.

Tabela 2. Wynik analizy genetycznej SNP rs10983755 A/G.

rs10983755 A/G			
	Infekcja po Htx nie	Infekcja po Htx tak	Probantów Razem
Wariant GG	4	10	14
%z zaistniałej infekcji (tak lub nie)	57,14%	58,82%	
%probantów	28,57%	71,43%	
Wariant AG	3	3	6
%z zaistniałej infekcji (tak lub nie)	42,86%	17,65%	
%probantów	50,00%	50,00%	

rs10983755 A/G			
	Infekcja po Htx nie	Infekcja po Htx tak	Probantów Razem
Wariant AA	0	4	4
%z zaistniałej infekcji (tak lub nie)	0,00%	23,53%	
%probantów	0,00%	100,00%	
Ogół	7	17	24

Test Fishera Freemana Haltona wykazał istotność statystyczną na poziomie $p=0,32$. Nie występuje istotna zależność pomiędzy genotypem, a występowaniem infekcji dla tego SNP.

Tabela 3. Wynik analizy genetycznej SNP rs4986791 C/T.

rs4986791 C/T	Infekcja po Htx		Probantów Razem
	nie	tak	
Wariant CC	4	14	18
%z zaistniałej infekcji (tak lub nie)	57,14%	82,35%	
%probantów	22,22%	77,78%	
Wariant CT	3	3	6
%z zaistniałej infekcji (tak lub nie)	42,86%	17,65%	
%probantów	50,00%	50,00%	
Ogół	7	17	24

Test dokładny Fishera wykazał istotność statystyczną $p= 0,31$. Nie występuje istotna zależność pomiędzy genotypem, a występowaniem infekcji dla tego SNP.

Tabela 4. Wynik analizy genetycznej SNP rs4986790 A/G.

rs4986790 A/G	Infekcja po Htx		Probantów
	nie	tak	Razem
Wariant AA	4	14	18
%z zaistniałej infekcji (tak lub nie)	57,14%	82,35%	
%probantów	22,22%	77,78%	
Wariant AG	3	3	6
%z zaistniałej infekcji (tak lub nie)	42,86%	17,65%	
%probantów	50,00%	50,00%	
Ogół	7	17	24

Test dokładny Fishera wykazał istotność statystyczną na poziomie $p= 0,31$. Nie występuje istotna zależność pomiędzy genotypem, a występowaniem infekcji dla tego SNP.

Tabela 5. Wynik analizy genetycznej SNP rs10759932 C/T.

rs10759932 C/T	Infekcja po Htx		Probantów
	nie	tak	Razem
Wariant TT	5	11	16
%z zaistniałej infekcji (tak lub nie)	71,43%	64,71%	
%probantów	31,25%	68,75%	
Wariant CT	2	6	8
%z zaistniałej infekcji (tak lub nie)	28,57%	35,29%	
%probantów	25,00%	75,00%	
Ogół	7	17	24

Test dokładny Fishera wykazał istotność statystyczną na poziomie $p= 1$. Nie występuje istotna zależność pomiędzy genotypem, a występowaniem infekcji dla tego SNP.

Tabela 6. Wynik analizy genetycznej SNP rs 1927911 C/T.

rs1927911 C/T			
	Infekcja po Htx nie	Infekcja po Htx tak	Probantów Razem
Wariant CC	4	5	9
%z zaistniałej infekcji (tak lub nie)	57,14%	29,41%	
%probantów	44,44%	55,56%	
Wariant CT	3	9	12
% z zaistniałej infekcji (tak lub nie)	42,86%	52,94%	
%probantów	25,00%	75,00%	
Wariant TT	0	3	3
% z zaistniałej infekcji (tak lub nie)	0,00%	17,65%	
%probantów	0,00%	100,00%	
Ogół	7	17	24

Test Fishera Freemana Haltona $p=0,48$. Nie występuje istotna zależność pomiędzy genotypem, a występowaniem infekcji dla tego SNP.

Tabela 7. Wynik analizy genetycznej SNP rs11536889 C/G.

rs11536889 C/G			
	Infekcja po Htx nie	Infekcja po Htx tak	Probantów Razem
Wariant GG	7	16	23
%z zaistniałej infekcji (tak lub nie)	100,00%	94,12%	
%probantów	30,43%	69,57%	

rs11536889 C/G	Infekcja po Htx		Probantów
	nie	tak	Razem
Wariant CG	0	1	1
%z zaistniałej infekcji (tak lub nie)	0,00%	5,88%	
%probantów	0,00%	100,00%	
Ogół	7	17	24

Test dokładny Fishera wykazał istotność statystyczną na poziomie $p= 1$. Nie występuje istotna zależność pomiędzy genotypem, a występowaniem infekcji dla tego SNP.

Tabela 8. Wynik analizy genetycznej SNP rs12377632 C/T.

rs12377632 C/T	Infekcja po Htx		Probantów Razem
	nie	tak	
Wariant TT	5	11	16
%z zaistniałej infekcji (tak lub nie)	71,43%	64,71%	
%probantów	31,25%	68,75%	
Wariant CT	2	6	8
%z zaistniałej infekcji (tak lub nie)	28,57%	35,29%	
%probantów	25,00%	75,00%	
Ogół	7	17	24

Test dokładny Fishera wykazał istotność statystyczną na poziomie $p= 1$. Nie występuje istotna zależność pomiędzy genotypem, a występowaniem infekcji dla tego SNP.

7.2 Zależność między występowaniem wybranych SNPs a zgonem

Trzy spośród badanych polimorfizmów istotnie częściej występują w korelacji ze zgonem. Są to: SNPs rs12377632, rs10983755 i rs1927911, Co więcej – dwa ostatnie są czynnikiem ryzyka

infekcji grzybiczej i zgonu, natomiast SNP rs12377632 stanowi niezależny od infekcji czynnik zgonu po HTx.

Tabela 9. Wynik analizy genetycznej SNP rs10983755 A/G.

rs10983755 A/G			
	Zgon nie	Zgon tak	Probantów Razem
Wariant GG	12	2	14
%z zaistniałej sytuacji klinicznej (tak lub nie)	63,16%	40,00%	
%probantów	85,71%	14,29%	
Wariant AG	6	0	6
%z zaistniałej sytuacji klinicznej (tak lub nie)	31,58%	0,00%	
%probantów	100,00%	0,00%	
Wariant AA	1	3	4
%z zaistniałej sytuacji klinicznej (tak lub nie)	5,26%	60,00%	
%probantów	25,00%	75,00%	
Ogół	19	5	24

Testem Fishera Freemana Haltona stwierdzono istotną zależność pomiędzy genotypami a zgonem $p=0,01$. Najwięcej zgonów jest dla wariantu AA, który może stanowić genetyczny czynnik ryzyka zgonu. Najmniej pacjentów z wariantem GG zmarło w toku badania, co może sugerować ten wariant jako wariant ochronny, tj. jego zidentyfikowanie w genomie mogłoby nasuwać wniosek, że pacjent posiadający wariant GG rokuje dłuższe przeżycie niż pacjenci z innymi wariantami tego SNP.

Tabela 10. Wynik analizy genetycznej SNP rs12377632 C/T.

rs4986791 C/T			
	Zgon nie	Zgon tak	Probantów Razem
Wariant CC	13	5	18
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	68,42%	100,00%	
%probantów	72,22%	27,78%	
Wariant CT	6	0	6
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	31,58%	0,00%	
%probantów	100,00%	0,00%	
Ogół	19	5	24

Test dokładny Fishera $p=0,28$. W badanej grupie nie wykazano istotnej zależności pomiędzy genotypem a zgonem.

Tabela 11. Wynik analizy genetycznej SNP rs4986790 A/G.

rs4986790 A/G			
	Zgon nie	Zgon tak	Probantów Razem
Wariant AA	13	5	18
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	68,42%	100,00%	
%probantów	72,22%	27,78%	
Wariant AG	6	0	6
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	31,58%	0,00%	
%probantów	100,00%	0,00%	
Ogół	19	5	24

Test dokładny Fishera $p=0,28$. W badanej grupie nie zaobserwowano istotnej zależności pomiędzy genotypem a zgonem.

Tabela 12. Wynik analizy genetycznej SNP rs10759932 C/T.

Rs10759932 C/T			
	Zgon nie	Zgon tak	Probantów Razem
Wariant TT	14	2	16
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	73,68%	40,00%	
%probantów	87,50%	12,50%	
Wariant CT	5	3	8
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	26,32%	60,00%	
%probantów	62,50%	37,50%	
Ogół	19	5	24

Test dokładny Fishera $p=0.29$. W badanej grupie nie wykazano istotnej zależności pomiędzy genotypem a zgonem.

Tabela 13. Wynik analizy genetycznej SNP rs1927911 C/T.

rs1927911 C/T			
	Zgon nie	Zgon tak	Probantów Razem
Wariant CC	8	1	9
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	42,11%	20,00%	
%probantów	88,89%	11,11%	
Wariant CT	11	1	12
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	57,89%	20,00%	
%probantów	91,67%	8,33%	
Wariant TT	0	3	3
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	0,00%	60,00%	
%probantów	0,00%	100,00%	
Ogół	19	5	24

Testem Fishera Freemana Haltona stwierdzono istotną zależność pomiędzy genotypami a zgonem $p=0,002$. Najwięcej zgonów jest dla wariantu TT, który może stanowić genetyczny czynnik ryzyka. Z kolei wariant CT mógłby zostać uznany za wariant ochronny, jako że w grupie pacjentów posiadających ten wariant SNP rs1927911 C/T zgonów było najmniej.

Tabela 14. Wynik analizy genetycznej SNP rs11536889 C/G.

rs11536889 C/G			
	Zgon nie	Zgon tak	Probantów Razem
Wariant GG	18	5	23
% z zaistniałej sytuacji klinicznej	94,74%	100,00%	
% probantów	78,26%	21,74%	
Wariant CG	1	0	1
% z zaistniałej sytuacji klinicznej	5,26%	0,00%	
% probantów	100,00%	0,00%	
Ogół	19	5	24

Test dokładny Fishera $p=1$. Nie wykazano istotnej zależności pomiędzy genotypem a zgonem w badanej grupie dla żadnego wariantu tego SNP.

Tabela 15. Wynik analizy genetycznej SNP rs1927911 C/T.

Rs12377632 C/T			
	Zgon nie	Zgon tak	Probantów Razem
Wariant TT	15	1	16
% z zaistniałej sytuacji klinicznej	78,95%	20,00%	
% probantów	93,75%	6,25%	
Wariant CT	4	4	8
% z zaistniałej sytuacji klinicznej	21,05%	80,00%	
% probantów	50,00%	50,00%	
Ogół	19	5	24

Testem Fishera stwierdzono istotną zależność pomiędzy genotypami a zgonem $p=0,03$. Najwięcej

zgonów w badanej grupie jest dla wariantu CT, który może stanowić genetyczny czynnik ryzyka. Wariant TT mógłby zostać uznany za wariant ochronny, gdyż w grupie pacjentów posiadających ten wariant powyższego SNP TLR4 odsetek zgonów był najniższy.

7.3 Zależność między występowaniem różnych typów infekcji: bakteryjnej, wirusowej lub grzybiczej a wybranymi SNPs

Na podstawie analizy statystycznej wykazano istotność dla dwóch spośród siedmiu przebadanych SNP: rs10983755 i rs1927911 - są one potencjalnymi czynnikami ryzyka infekcji grzybiczej u pacjentów po HTx, bowiem te genotypy prezentowali częściej badani pacjenci z wywiadem grzybicy w porównaniu z pacjentami bez zakażenia grzybiczego. Podobnej istotności nie wykazano dla żadnego SNP w występowaniu infekcji ani bakteryjnej ani wirusowej.

Tabela 16. Wynik analizy genetycznej SNP rs10983755 A/G.

rs10983755 A/G	Infekcja	Infekcja	Probantów Razem
	Bakteryjna nie	Bakteryjna tak	
Wariant GG	7	7	14
% z zaistniałej sytuacji klinicznej	70,00%	50,00%	
% probantów	50,00%	50,00%	
Wariant AG	3	3	6
% z zaistniałej sytuacji klinicznej	30,00%	21,43%	
% probantów	50,00%	50,00%	
Wariant AA	0	4	4
% z zaistniałej sytuacji klinicznej	0,00%	28,57%	
% probantów	0,00%	100,00%	
Ogół	10	14	24

Test dokładny Fishera $p = 0,17$. Nie wykazano istotnej zależności pomiędzy genotypem a infekcją bakteryjną dla niniejszego SNP w badanej grupie.

Tabela 17. Wynik analizy genetycznej SNP rs10983755 A/G.

rs10983755 A/G	Infekcja	Infekcja	Probantów Razem
	Wirusowa nie	Wirusowa tak	
Wariant GG	8	6	14
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	72,73%	46,15%	
%probantów	57,14%	42,86%	
Wariant AG	2	4	6
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	18,18%	30,77%	
%probantów	33,33%	66,67%	
Wariant AA	1	3	4
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	9,09%	23,08%	
%probantów	25,00%	75,00%	
Ogół	11	13	24

Test chi kwadrat z poprawką Pearsona $p=0,41$. Na grupie badanej nie wykazano istotnej zależności pomiędzy genotypem a infekcją wirusową.

Tabela 18. Wynik analizy genetycznej SNP rs10983755 A/G.

rs10983755 A/G	Infekcja	Infekcja	Probantów Razem
	Grzybicza nie	Grzybicza tak	
Wariant GG	13	1	14
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	72,22%	16,67%	
%probantów	92,86%	7,14%	
Wariant AG	5	1	6
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	27,78%	16,67%	
%probantów	83,33%	16,67%	

rs10983755 A/G	Infekcja	Infekcja	Probantów Razem
	Grzybicza nie	Grzybicza tak	
Wariant AA	0	4	4
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	0,00%	66,67%	
%probantów	0,00%	100,00%	
Ogół	18	6	24

Testem Fishera stwierdzono istotną zależność pomiędzy SNP a infekcją grzybiczą $p=0,002$. Najwięcej zgonów jest dla wariantu GG, który na podstawie przebadanej grupy może stanowić genetyczny czynnik ryzyka.

Tabela 19. Wynik analizy genetycznej SNP rs4986791 C/T.

Rs4986791 C/T	Infekcja	Infekcja	Probantów Razem
	Bakteryjna nie	Bakteryjna tak	
Wariant CC	8	10	18
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	80,00%	71,43%	
%probantów	44,44%	55,56%	
Wariant CT	2	4	6
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	20,00%	28,57%	
%probantów	33,33%	66,67%	
Ogół	10	14	24

Test dokładny Fishera $p=1$. Nie wykazano istotnej zależności pomiędzy genotypem a infekcją bakteryjną.

Tabela 20. Wynik analizy genetycznej SNP rs4986791 C/T.

rs4986791 C/T	Infekcja		Probantów Razem
	Wirusowa nie	Wirusowa tak	
Wariant CC	7	11	18
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	63,64%	84,62%	
%probantów	38,89%	61,11%	
Wariant CT	4	2	6
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	36,36%	15,38%	
%probantów	66,67%	33,33%	
Ogół	11	13	24

Test dokładny Fishera $p=0,36$. Nie wykazano istotnej zależności pomiędzy genotypem a infekcją wirusową.

Tabela 21. Wynik analizy genetycznej SNP rs4986791 C/T.

rs4986791 C/T	Infekcja		Probantów Razem
	Grzybicza nie	Grzybicza tak	
Wariant CC	13	5	18
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	72,22%	83,33%	
%probantów	72,22%	27,78%	
Wariant CT	5	1	6
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	27,78%	16,67%	
%probantów	83,33%	16,67%	
Ogół	18	6	24

Test dokładny Fishera $p=1$. Nie wykazano w grupie badanej istotnej zależności pomiędzy genotypem a infekcją grzybiczą.

Tabela. 22. Wynik analizy genetycznej SNP rs4986790 A/G.

rs4986790 A/G			
	Inf. Bakteryjna nie	Inf. Bakteryjna tak	Probantów w Razem
Wariant AA	8	10	18
% z zaistniałej sytuacji klinicznej	80,00%	71,43%	
% probantów	44,44%	55,56%	
Wariant AG	2	4	6
% z zaistniałej sytuacji klinicznej	20,00%	28,57%	
% probantów	33,33%	66,67%	
Ogół	10	14	24

Test dokładny Fishera $p=1$. Nie wykazano w grupie badanej istotnej zależności pomiędzy genotypem a infekcją bakteryjną.

Tabela 23. Wynik analizy genetycznej SNP rs4986790 A/G.

rs4986790 A/G			
	Infekcja wirusowa nie	Infekcja wirusowa tak	Probantów Razem
Wariant AA	7	11	18
% z zaistniałej sytuacji klinicznej	63,64%	84,62%	
% probantów	38,89%	61,11%	
Wariant AG	4	2	6
% z zaistniałej sytuacji klinicznej	36,36%	15,38%	
% probantów	66,67%	33,33%	
Ogół	11	13	24

Test dokładny Fishera $p=0,36$. Nie wykazano w grupie badanej istotnej zależności pomiędzy genotypem a infekcją bakteryjną.

Tabela 24. Wynik analizy genetycznej SNP rs4986790 A/G.

rs4986790 A/G	Infekcja grzybicza		Probantów
	nie	tak	Razem
Wariant AA	13	5	18
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	72,22%	83,33%	
%probantów	72,22%	27,78%	
Wariant AG	5	1	6
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	27,78%	16,67%	
%probantów	83,33%	16,67%	
Ogół	18	6	24

Test dokładny Fishera $p=1$. Na badanej grupie nie wykazano istotnej zależności pomiędzy genotypem a infekcją grzybiczą.

Tabela 25. Wynik analizy genetycznej SNP rs10759932 C/T.

rs10759932 C/T	Infekcja bakteryjna		Probantów
	nie	tak	Razem
Wariant TT	8	8	16
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	80,00%	57,14%	
%probantów	50,00%	50,00%	
Wariant CT	2	6	8
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	20,00%	42,86%	
%probantów	25,00%	75,00%	
Ogół	10	14	24

Test dokładny Fishera $p=0,39$. Nie wykazano w badanej grupie istotnej zależności pomiędzy genotypem a infekcją bakteryjną.

Tabela 26. Wynik analizy genetycznej SNP rs10759932 C/T.

rs10759932 C/T	Infekcja wirusowa		Probantów Razem
	nie	tak	
Wariant TT	6	10	16
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	54,55%	76,92%	
%probantów	37,50%	62,50%	
Wariant CT	5	3	8
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	45,45%	23,08%	
%probantów	62,50%	37,50%	
Ogół	11	13	24

Test dokładny Fishera $p=0,39$. W badanej grupie nie wykazano istotnej zależności pomiędzy genotypem a infekcją wirusową.

Tabela 27. Wynik analizy genetycznej SNP rs10759932 C/T.

rs10759932 C/T	Infekcja grzybicza		Probantów Razem
	nie	tak	
Wariant TT	13	3	16
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	72,22%	50,00%	
%probantów	81,25%	18,75%	
Wariant CT	5	3	8
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	27,78%	50,00%	
%probantów	62,50%	37,50%	
Ogół	18	6	24

Test dokładny Fishera $p=0,36$. W badanej grupie nie wykazano istotnej zależności pomiędzy genotypem a infekcją wirusową.

Tabela 28. Wynik analizy genetycznej SNP rs1927911 C/T.

Rs 1927911 C/T	Infekcja bakteryjna		Probantów Razem
	nie	tak	
Wariant CC	5	4	9
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	50,00%	28,57%	
%probantów	55,56%	44,44%	
Wariant CT	5	7	12
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	50,00%	50,00%	
%probantów	41,67%	58,33%	
Wariant TT	0	3	3
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	0,00%	21,43%	
%probantów	0,00%	100,00%	
Ogół	10	14	24

Test Fishera Freemana Haltona $p=0,38$. Nie wykazano w badanej grupie zależności między genotypem a infekcją bakteryjną.

Tabela 29. Wynik analizy genetycznej SNP rs1927911 C/T.

Rs 1927911 C/T	Infekcja wirusowa		Probantów Razem
	nie	tak	
Wariant CC	4	5	9
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	36,36%	38,46%	
%probantów	44,44%	55,56%	
Wariant CT	6	6	12
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	54,55%	46,15%	
%probantów	50,00%	50,00%	

Rs 1927911 C/T	Infekcja wirusowa		Probantów Razem
	nie	tak	
Wariant TT	1	2	3
% z zaistniałej sytuacji klinicznej	9,09%	15,38%	
% probantów	33,33%	66,67%	
Ogół	11	13	24

Test chi kwadrat z poprawką Pearsona $p=0,87$. W badanej grupie nie wykazano zależności między genotypem a infekcją wirusową.

Tabela 30. Wynik analizy genetycznej SNP rs1927911 C/T.

rs1927911 C/T	Infekcja grzybicza		Probantów Razem
	nie	tak	
Wariant CC	8	1	9
% z zaistniałej sytuacji klinicznej	44,44%	16,67%	
% probantów	88,89%	11,11%	
Wariant CT	10	2	12
% z zaistniałej sytuacji klinicznej	55,56%	33,33%	
% probantów	83,33%	16,67%	
Wariant TT	0	3	3
% z zaistniałej sytuacji klinicznej	0,00%	50,00%	
% probantów	0,00%	100,00%	
Ogół	18	6	24

Testem Fishera Freemana Haltona stwierdzono istotną statystycznie zwiększoną zapadalność na infekcje grzybicze $p=0,016$. Najwięcej zgonów wykazano dla wariantu TT, który może stanowić genetyczny czynnik ryzyka.

Tabela 31. Wynik analizy genetycznej SNP rs11536889 C/G.

rs11536889 C/G	Infekcja bakteryjna		Probantów
	nie	tak	Razem
Wariant GG	10	13	23
% z zaistniałej sytuacji klinicznej	100,00%	92,86%	
% probantów	43,48%	56,52%	
Wariant CG	0	1	1
% z zaistniałej sytuacji klinicznej	0,00%	7,14%	
% probantów	0,00%	100,00%	
Ogół	10	14	24

Test dokładny Fishera $p=1$. W badanej grupie nie wykazano zależności między genotypem a infekcją bakteryjną.

Tabela 32. Wynik analizy genetycznej SNP rs11536889 C/G.

rs11536889 C/G	Infekcja wirusowa		Probantów
	nie	tak	Razem
Wariant GG	11	12	23
% z zaistniałej sytuacji klinicznej	100,00%	92,31%	
% probantów	47,83%	52,17%	
Wariant CG	0	1	1
% z zaistniałej sytuacji klinicznej	0,00%	7,69%	
% probantów	0,00%	100,00%	
Ogół	11	13	24

Test dokładny Fishera $p=1$. W badanej grupie nie wykazano zależności między genotypem a infekcją wirusową.

Tabela 33. Wynik analizy genetycznej SNP rs11536889 C/G.

rs11536889 C/G	Infekcja grzybicza		Probantów
	nie	tak	Razem
Wariant GG	17	6	23
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	94,44%	100,00%	
%probantów	73,91%	26,09%	
Wariant CG	1	0	1
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	5,56%	0,00%	
%probantów	100,00%	0,00%	
Ogół	18	6	24

Test dokładny Fishera $p=1$. W badanej grupie nie wykazano zależności między genotypem a infekcją grzybiczą.

Tabela 34. Wynik analizy genetycznej SNP rs12377632 C/T.

Rs12377632 C/T	Infekcja bakteryjna		Probantów
	nie	tak	Razem
Wariant TT	8	8	16
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	80,00%	57,14%	
%probantów	50,00%	50,00%	
Wariant CT	2	6	8
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	20,00%	42,86%	
%probantów	25,00%	75,00%	
Ogół	10	14	24

Test dokładny Fishera $p=0,39$. W badanej grupie nie wykazano zależności między genotypem a infekcją bakteryjną.

Tabela 35. Wynik analizy genetycznej SNP rs12377632 C/T.

Rs12377632 C/T	Infekcja wirusowa		Probantów Razem
	nie	tak	
Wariant TT	6	10	16
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	54,55%	76,92%	
%probantów	37,50%	62,50%	
Wariant CT	5	3	8
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	45,45%	23,08%	
%probantów	62,50%	37,50%	
Ogół	11	13	24

Test dokładny Fishera $p=0,39$. W badanej grupie nie wykazano zależności między genotypem a infekcją wirusową.

Tabela 36. Wynik analizy genetycznej SNP rs12377632 C/T.

Rs12377632 C/T	Infekcja grzybicza		Probantów Razem
	nie	tak	
Wariant TT	14	2	16
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	77,78%	33,33%	
%probantów	87,50%	12,50%	
Wariant CT	4	4	8
%z zaistniałej sytuacji klinicznej	22,22%	66,67%	
%probantów	50,00%	50,00%	
Ogół	18	6	24

Test dokładny Fishera $p=0,13$. Nie wykazano w grupie badanej zależności między genotypem a infekcją grzybiczą.

8. Wyniki grupy kontrolnej

Występowanie badanych wariantów w grupie kontrolnej dobranej pod względem wieku i płci spośród zdrowych dawców krwi było zbliżone do występowania wariantów w grupie badanej.

Tabela 37. Występowanie wariantu AA SNP rs10983755 A/G w grupie kontrolnej

Klasa	Rs10983755 A/G Wariant AA				
	Płec	Liczba	Łącznie Liczba	Procent	Łącznie Procent
0	k	11	11	68,75000	68,7500
1	k	5	16	31,25000	100,0000
0	m	60	60	76,92308	76,9231
1	m	18	78	23,07692	100,0000

Tabela 38. Występowanie wariantu AG SNP rs10983755 A/G w grupie kontrolnej

Klasa	Rs10983755 A/G Wariant AG				
	Płec	Liczba	Łącznie Liczba	Procent	Łącznie Procent
0	k	12	12	75,00000	75,0000
1	k	4	16	25,00000	100,0000
0	m	45	45	57,69231	57,6923
1	m	33	78	42,30769	100,0000

Tabela 39. Występowanie wariantu GG SNP rs10983755 A/G w grupie kontrolnej

Klasa	rs10983755 A/G Wariant GG				
	Płec	Liczba	Łącznie Liczba	Procent	Łącznie Procent
0	k	9	9	56,25000	56,2500
1	k	7	16	43,75000	100,0000

Klasa	rs10983755 A/G Wariant GG				
	Płec	Liczba	Łącznie Liczba	Procent	Łącznie Procent
0	m	51	51	65,38462	65,3846
1	m	27	78	34,61538	100,0000

Tabela 40. Występowanie wariantu TT SNP rs4986791 C/T w grupie kontrolnej

Klasa	rs4986791 C/T Wariant TT				
	Płec	Liczba	Łącznie Liczba	Procent	Łącznie Procent
0	k	16	16	100,0000	100,0000
0	m	78	78	100,0000	100,0000

Tabela 41. Występowanie wariantu CT SNP rs4986791 C/T w grupie kontrolnej

Klasa	rs4986791 C/T Wariant CT				
	Płec	Liczba	Łącznie Liczba	Procent	Łącznie Procent
0	k	15	15	93,75000	93,7500
1	k	1	16	6,25000	100,0000
0	m	70	70	89,74359	89,7436
1	m	8	78	10,25641	100,0000

Tabela 42. Występowanie wariantu CC SNP rs4986791 C/T w grupie kontrolnej

Klasa	rs4986791 C/T Wariant CC				
	Płec	Liczba	Łącznie Liczba	Procent	Łącznie Procent
0	k	1	1	6,25000	6,2500
1	k	15	16	93,75000	100,0000
0	m	8	8	10,25641	10,2564

Klasa	rs4986791 C/T Wariant CC				
	Płec	Liczba	Łącznie Liczba	Procent	Łącznie Procent
1	m	70	78	89,74359	100,0000

Tabela 43. Występowanie wariantu GG SNP rs4986790 A/G w grupie kontrolnej

Klasa	rs4986790 A/G Wariant GG				
	Płec	Liczba	Łącznie Liczba	Procent	Łącznie Procent
0	k	16	16	100,0000	100,0000
0	m	78	78	100,0000	100,0000

Tabela 44. Występowanie wariantu AG SNP rs4986790 A/G w grupie kontrolnej

Klasa	Rs4986790 A/G Wariant AG				
	Płec	Liczba	Łącznie Liczba	Procent	Łącznie Procent
0	k	15	15	93,75000	93,7500
1	k	1	16	6,25000	100,0000
0	m	70	70	89,74359	89,7436
1	m	8	78	10,25641	100,0000

Tabela 45. Występowanie wariantu AA SNP rs4986790 A/G w grupie kontrolnej

Klasa	rs4986790 A/G Wariant AA				
	Płec	Liczba	Łącznie Liczba	Procent	Łącznie Procent
0	k	1	1	6,25000	6,2500
1	k	15	16	93,75000	100,0000
0	m	8	8	10,25641	10,2564
1	m	70	78	89,74359	100,0000

Tabela 46. Występowanie wariantu CC SNP rs10759932 C/T w grupie kontrolnej

Klasa	rs10759932 C/T Wariant CC				
	Płec	Liczba	Łącznie Liczba	Procent	Łącznie Procent
0	k	15	15	93,75000	93,7500
1	k	1	16	6,25000	100,0000
0	m	77	77	98,71795	98,7179
1	m	1	78	1,28205	100,0000

Tabela 47. Występowanie wariantu CT SNP rs10759932 C/T w grupie kontrolnej

Klasa	rs10759932 C/T Wariant CT				
	Płec	Liczba	Łącznie Liczba	Procent	Łącznie Procent
0	k	15	15	93,75000	93,7500
1	k	1	16	6,25000	100,0000
0	m	54	54	69,23077	69,2308
1	m	24	78	30,76923	100,0000

Tabela 48. Występowanie wariantu TT SNP rs10759932 C/T w grupie kontrolnej

Klasa	rs10759932 C/T Wariant TT				
	Płec	Liczba	Łącznie Liczba	Procent	Łącznie Procent
0	k	2	2	12,50000	12,5000
1	k	14	16	87,50000	100,0000
0	m	25	25	32,05128	32,0513
1	m	53	78	67,94872	100,0000

Tabela 49. Występowanie wariantu TT SNP rs1927911 C/T w grupie kontrolnej

Klasa	rs 1927911 C/T Wariant TT				
	Płec	Liczba	Łącznie Liczba	Procent	Łącznie Procent
0	k	9	9	56,25000	56,2500
1	k	7	16	43,75000	100,0000
0	m	47	47	60,25641	60,2564
1	m	31	78	39,74359	100,0000

Tabela 50. Występowanie wariantu CT SNP rs1927911 C/T w grupie kontrolnej

Klasa	rs1927911 C/T Wariant CT				
	Płec	Liczba	Łącznie Liczba	Procent	Łącznie Procent
0	k	11	11	68,75000	68,7500
1	k	5	16	31,25000	100,0000
0	m	45	45	57,69231	57,6923
1	m	33	78	42,30769	100,0000

Tabela 51. Występowanie wariantu CC SNP rs1927911 C/T w grupie kontrolnej

Klasa	rs1927911 C/T Wariant CC				
	Płec	Liczba	Łącznie Liczba	Procent	Łącznie Procent
0	k	10	10	62,50000	62,5000
1	k	6	16	37,50000	100,0000
0	m	64	64	82,05128	82,0513
1	m	14	78	17,94872	100,0000

Tabela 52. Występowanie wariantu CC SNP rs11536889 C/G w grupie kontrolnej

rs11536889 C/G Wariant CC					
----------------------------------	--	--	--	--	--

Klasa	Płeć	Liczba	Łącznie	Procent	Łącznie
			Liczba		Procent
0	k	16	16	100,0000	100,0000
0	m	76	76	97,43590	97,4359
1	m	2	78	2,56410	100,0000

Tabela 53. Występowanie wariantu CG SNP rs11536889 C/G w grupie kontrolnej

Klasa	rs11536889 C/G Wariant CG				
	Płeć	Liczba	Łącznie	Procent	Łącznie
			Liczba		Procent
0	k	13	13	81,25000	81,2500
1	k	3	16	18,75000	100,0000
0	m	67	67	85,89744	85,8974
1	m	11	78	14,10256	100,0000

Tabela 54. Występowanie wariantu GG SNP rs11536889 C/G w grupie kontrolnej

Klasa	rs11536889 C/G Wariant GG				
	Płeć	Liczba	Łącznie	Procent	Łącznie
			Liczba		Procent
0	k	3	3	18,75000	18,7500
1	k	13	16	81,25000	100,0000
0	m	13	13	16,66667	16,6667
1	m	65	78	83,33333	100,0000

Tabela 55. Występowanie wariantu CC SNP rs123996329 C/T w grupie kontrolnej

Klasa	rs12377632 C/T Wariant CC				
	Płeć	Liczba	Łącznie	Procent	Łącznie
			Liczba		Procent
0	k	14	14	87,50000	87,5000

Klasa	rs12377632 C/T Wariant CC				
	Płec	Liczba	Łącznie Liczba	Procent	Łącznie Procent
1	k	2	16	12,50000	100,0000
0	m	69	69	88,46154	88,4615
1	m	9	78	11,53846	100,0000

Tabela 56. Występowanie wariantu CT SNP rs123996329 C/T w grupie kontrolnej

Klasa	rs12377632 C/T Wariant CT				
	Płec	Liczba	Łącznie Liczba	Procent	Łącznie Procent
0	k	7	7	43,75000	43,7500
1	k	9	16	56,25000	100,0000
0	m	43	43	55,12821	55,1282
1	m	35	78	44,87179	100,0000

Tabela 57. Występowanie wariantu TTSNP rs123996329 C/T w grupie kontrolnej

Klasa	rs12377632 C/T Wariant TT				
	Płec	Liczba	Łącznie Liczba	Procent	Łącznie Procent
0	k	11	11	68,75000	68,7500
1	k	5	16	31,25000	100,0000
0	m	44	44	56,41026	56,4103
1	m	34	78	43,58974	100,0000
			0	0,00	0,00

Mimo postępu w transplantologii nadal istnieje problem infekcji związanych z przebiegiem leczenia immunosupresyjnego po przeszczepie. Patogeneza zapadalności jest różna, zależna np. od warunków środowiskowych, stanu ogólnego pacjenta przed transplantacją, wcześniejszych powikłań przebiegu choroby i tych związanych z zabiegiem, ale wciąż nieznaną pozostaje np. mechanizm genetyczny. W literaturze dane na temat tej zależności u pacjentów po przeszczepach są nieliczne, a z całą pewnością nie dotyczą elementów zawartych w niniejszej pracy. Zdając sobie sprawę z tego faktu, pomimo niewielkiej liczby przebadanych probantów, praca nosi znamiona pionierskiej.

Rola *TLR4* w mechanizmie rozpoznawania infekcji i reakcji na zakażenie nie ulega deprecjacji wraz z nowymi odkryciami – wręcz przeciwnie, nowe mechanizmy działania są poznawane w ujęciu wielu chorób, czasem z pozoru niezwiązanych z układem odpowiedzi na zakażenie. Za przykład powyższego mogą służyć badania nad rolą receptora w odrzucaniu narządów przeszczepionych.

Głównym problem stanowi jednak narażenie pacjenta poprzez leczenie immunosupresyjne na patogeny i nadmierna wobec tego leczenia ciężkość przebiegu infekcji, wymagająca niemal zawsze hospitalizacji i leczenia antybiotykami o najsilniejszym działaniu przeciwdrobnoustrojowym, intensywnym leczeniu przeciwwirusowym i przeciwgrzybiczym, a nierzadko – połączeniem wszystkich tych terapii naraz wobec nakładania się infekcji.

9.1 SNP *TLR4* a infekcje bakteryjne

Rola *TLR4* w rozpoznawaniu bakteryjnego lipopolisacharydu (LPS) nie wymaga już badań, ciekawi natomiast udział tego receptora w korelacji do infekcji patogenami nieposiadającymi tej struktury.

W niniejszej pracy, co interesujące, nie wykazano powiązania między SNP *TLR4* a infekcją bakteryjną, nawet jeśli patogeny posiadały osłonkę lipopolisacharydową. Każdy z pacjentów z niniejszej grupy badanej miał wykonane posiewy krwi i zgodnie z zaleceniami ISHLT wdrożono celowaną antybiotykoterapię, w związku z tym ocena czy jest to patogen zawierający LPS czy nie wymagała jedynie oceny retrospektywnej. Nie wykazano korelacji z jakąkolwiek infekcją

bakteryjną w powiązaniu z żadnym z siedmiu przebadanych SNP. Oczywiście można podnieść, iż jakakolwiek prawidłowość w badanej grupie, złożonej z 24 pacjentów może zostać podważona, natomiast sam fakt niezaistnienia takowej korelacji zastanawia.

Podobne wyniki otrzymali autorzy opisujący dość dużą kohortę 265 pacjentów, aczkolwiek znacznie łatwiejszą do pozyskania - po pierwszej transplantacji nerki. Badano SNPs *TLR2*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR5* i *TLR9*, w tym tylko dwa warianty *TLR4* (D299G, rs4986790; T399I, rs4986791). SNP *TLR4* w powyższych wariantach w tym badaniu nie wpływał na częstość infekcji, wykazano natomiast rolę całego układu TLR w przebiegu infekcji oraz odrzucaniu przeszczepu, a także istotnych powikłań sercowo-naczyniowych u biorców⁸⁵. Powikłania sercowo-naczyniowe również w niniejszej grupie badanej stanowiły istotny odsetek zgonów.

Znacznie bardziej skomplikowaną procedurę przyjęto natomiast u biorców i dawców szpiku. Grupę badaną stanowiło 77 par biorca-dawca, przebadanych tak jak w powyższym przypadku także pod kątem dwóch SNPs *TLR4* (D299G, rs4986790; T399I, rs4986791). Grupę podzielono pod względem ryzyka – infekcji bakterią Gram-ujemną we krwi po stronie dawcy, infekcji po stronie biorcy lub obu, uznając infekcję po stronie dawcy jako podwyższone ryzyko, a infekcję u obu w danej parze za istotne ryzyko zgonu z powodu zakażenia. 9 par oceniono jako ryzykowne z punktu widzenia genetycznego. W grupie zagrożonej najbardziej, 15 zgonów spowodowanych było infekcją, natomiast podobną liczbę, bo 14 z powodów niezwiązanych było z infekcjami. W związku z powyższym również nie wykazano zwiększonego występowania tych wariantów w grupie poddanej przeszczepowi szpiku⁸⁶.

Co ciekawe dane dotyczące ekspresji samego receptora w infekcji bakterijnej związanej z sepsą, zaawansowaną sepsą oraz wstrząsem septycznym również nie pozostają spójne. Mechanizm sepsy i wstrząsu septycznego wciąż nie są dobrze poznane, stąd pojawiła się potrzeba, aby wytłumaczyć niektóre mechanizmy immunologiczne, mogące za nimi stać. Istotny wydaje się fakt nadmiernej aktywacji *TLR4* w odpowiedzi na pojawienie się we krwi LPS. Wraz ze wzrostem stężenia LPS, zwłaszcza Gram-ujemnych bakterii, rośnie ekspresja *TLR4*. To z kolei wpływa na aktywację odpowiedzi komórkowej, tj. limfocytów i makrofagów, ponieważ zwiększone stężenia *TLR4* zwiększają przepuszczalność naczyń krwionośnych i przenikanie makrofagów do tkanek.⁸⁷

Podobnej reakcji, patrząc retrospektywnie, na grupie pacjentów po HTx można by przypisać co najmniej dwa ze zgonów w bazie niniejszego eksperymentu.

Sama ekspresja receptora nie była przedmiotem badań na grupie naszych biorców, nie można jednak pominąć jej w kontekście wiedzy ogólnej. Wiedza na dzień dzisiejszy opisana w literaturze pokazuje, jak sama ekspresja *TLR4* może za kilka lat stać się czytelnym markerem laboratoryjnym, a może nawet histopatologicznym.

Za przykład badań, w których ekspresja *TLR4* wyizolowanego z krwi 41 pacjentów w porównaniu do 17 zdrowych pacjentów grupy kontrolnej nie pozostaje inna może posłużyć analiza Brunialtiego i współpracowników. Nie wykazali oni nadmiernej ekspresji *TLR4* jako markera, mogącego w przyszłości służyć ocenie stopnia i progresji zakażenia bakteryjnego. Zasugerowano w tym badaniu co więcej, że sama regulacja odpowiedzią zapalną przebiega na szlakach wewnątrzkomórkowych, niezależnie od *TLR4* i – co jeszcze istotniejsze – niezależnie czy bodźcem był bakteryjny LPS czy inna cząsteczka aktywująca układ odpornościowy.⁸⁸

Z drugiej strony pojawia się wiele doniesień na temat istotnie wyższej ekspresji *TLR4* w stanach septycznych niż w kontroli. Opisano to w grupie 10 pacjentów w sepsie i 5 zdrowych ochotnikach, od których pobrano krew, a następnie przeprowadzono na niej testy *ex vivo*. Wykazano, że pobudzenie *TLR4* LPS zmniejsza jego ekspresję w monocytach 2godziny po indukcji LPS, niezależnie od reprezentacji antygenowej, tj. zarówno monocyty CD14^{dim}CD16⁺ jak i CD14⁺CD16⁻ reagują na LPS tak samo i prowadzi to do identycznej produkcji cytokin zapalnych w odpowiedzi na bakteryjną infekcję bakterią otoczkową – w krótkim okresie od zadziałania bodźca. Po 20h natomiast istotnie mniejszą ekspresję miał *TLR4* na powierzchni CD14⁺CD16⁻ niż w wypadku tych drugich. W przypadku kontroli nie stwierdzono podobnych zależności. Pozwoliło to wysnuć wniosek, że *TLR4* moduluje odpowiedź immunologiczną inaczej w zależności od stymulowanej komórki.⁸⁹

Powyższe dane literaturowe stanowią preludeum do dalszych badań w tym kierunku, wykazują jednak jak bardzo potrzebne jest szukanie znaczników infekcji w układzie odpornościowym na poziomie receptorów, a nie jedynie samych białek ostrej fazy we krwi. Pozwolę sobie na przypuszczenie, iż badanie ekspresji *TLR4* pozwoli za parę lat nie eksperymentalnie – jak do tej

pory – ale na skalę komercyjną monitorować przebieg zakażeń bakteryjnych, zwłaszcza u pacjentów skomplikowanych, np. w sepsie lub po przeszczepach (ze szczególnym uwzględnieniem osób na immunosupresji przewlekłej).

Jeśli chodzi o SNPs w sepsie dane pozostają równie niespójne. Feterowski i wsp. nie doszukanali się korelacji między wariantem rs4986790 lub rs4986791 a sepsą wywołaną wieloczynnikową infekcją. Nakada wraz z zespołem z kolei deprecjonuje rolę *TLR4* jeżeli chodzi o przebieg kliniczny u 194 będących w stanie krytycznym Japończyków badanych pod kątem tych wariantów oraz 214 osób z grupy kontrolnej. Wyniki dla *TLR4* nie wykazały tutaj istotności korelacji ciężkości przebiegu w zależności od SNPs vs. allel dziki. Everett i wsp. nie udowodnili również, że allel rs4986790 zwiększa zapadalność na gorączkę Q, której czynnikiem etiologicznym jest *Coxiella burnetti*. Ten wariant nie został także powiązany z sepsą w badaniach Jessen i wsp. na 319 pacjentach będących albo w stanie sepsy (74%), albo ciężkiej sepsy (19%), albo wstrząsu septycznego (7%). Z drugiej jednak strony Barber i wsp. dwukrotnie wykazał korelację rs4986790 i zakażenia związanego z poparzeniem. Co więcej Shalhub i wsp. uznali ten allel za allel ochronny dla zapadania na sepsę.⁹⁰ Allel rs10759932 nie zwiększa natomiast predyspozycji do sepsy.⁹⁰ Nie wpływa także na zwiększoną zapadalność na zakażenia u noworodków, co stanowi bezcenną informację dotyczącą roli SNP *TLR4* w początku życia człowieka.⁹¹

Interesująca praca Mansura pokazuje także inny wariant tego receptora jako czynnik predykcyjny rozwoju niewydolności nerek w przebiegu sepsy - rs11536889 stanowi wariant ryzyka wystąpienia wykrzepiania naczyniowego w obrębie nerek podczas sepsy, zaburza proces krzepnięcia oraz wskazuje na ryzyko uszkodzenia wątroby⁹².

Powyższe eksperymenty idą więc dalej w sprawdzaniu *TLR4* jako markera, kładąc nacisk na warianty genetyczne, mogące sprzyjać lub supresjonować zakażenie. Dzisiaj daleko futurystyczne pozostaje myślenie o leczeniu zakażeń w kategoriach genoterapii jako modulatora przebiegu zakażenia, ale dzięki szybkiemu postępowi biologii molekularnej liczę, że już za paręnaście lat umożliwi to pierwsze tego typu próby. Udowodnienie istnienia wariantów ochronnych w obrębie *TLR4* pozwala zaprojektować metodę genoterapii już teraz, z użyciem konkretnych polimorfizmów, a później na „podmianienie” w genomie formy wadliwej na protekcyjną, jednakże jej

wprowadzenie do leczenia wymaga wielu lat testów na modelach zwierzęcych. Pomijając fakt, że badania genetyczne samych stuprocentowo pewnych wariantów ochronnych, w obliczu danych sprzecznych z małych badań, wciąż trwają, selekcja samych polimorfizmów może zająć, niestety, nawet dekadę.

Poszukując w literaturze, praktycznie brak danych o infekcjach (niezależnie od czynnika etiologicznego) po przeszczepie w powiązaniu ze SNP *TLR4* dla rs10983755 – jedyne doniesienia dotyczą zakażenia *Helicobacter pylori*, na grupie chińskich pacjentów, natomiast brak danych dla populacji europejskiej.⁹³ Podobnie brak danych o infekcjach dla rs12377632, istnieje jednak jego powiązanie z odpowiedzią zapalną. Oba te polimorfizmy zostały przebadane w niniejszej pracy, w dodatku dla znacznie bardziej pustoszących organizm zakażeń niż *H. pylori*.

Warto też podkreślić wariant rs1927911 jako predysponujący do zakażenia gruźlicą. Przebadano pod kątem występowania wariantów genetycznych *TLR4* ponad 200 pacjentów i ponad 300 osób z grupy kontrolnej, wykazując, że rs1927911 oraz rs5030725 były w jednym bloku wg HapMapy i pacjenci je posiadający częściej mieli gruźlicę, niż osoby z genotypem rs7869402 i rs1927906 (które również wg HapMap dziedziczą się wspólnie).⁹⁴

9.2 SNP *TLR4* a infekcje wirusowe

Zakażenie cytomegalowirusem (CMV) jest bardzo powszechne w populacji i waha się między 30 a 97%. U osób z prawidłową odpornością nie wywołuje choroby i zazwyczaj przebiega bezobjawowo, stąd screening dawców i biorców przed przeszczepem. Dopóki bowiem pacjent pozostaje immunokompetentny, tj. nie włączono mu immunosupresji, zakażenie nie wymaga żadnego leczenia, jednak w momencie wdrożenia leczenia po HTx, CMV staje się główną przyczyną zgonów u biorców przeszczepu. Stąd wynika konieczność zastosowania profilaktyki pierwotnej u biorców organu od dawcy dodatkiego. Obecność CMV stwierdzają specyficzne testy serologiczne, które w przypadku choroby CMV wykonywane są cyklicznie celem oceny progresji leczenia.⁵¹ W literaturze brak jednak istotnych danych dotyczących korelacji występowania konkretnych SNPs *TLR4* i choroby CMV. Według danych z niniejszego badania taka korelacja nie występuje, co o tyle dziwi, że wykazano wpływ niektórych wariantów TLR (*TLR8* i *TLR9*) oraz innych molekuł związanych z odpowiedzią komórkową (receptor chemokiny 5 -chemokine receptor 5 (CCR5),

białko chemotaktyczne monocytów - monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), interleukina (IL) 10, dendritic cell-specific molecule-3-grabbing non-integrin (DC-SIGN), IL-28B) na CMV po przeszczepie szpiku kostnego⁹⁵. Jeśli zaś chodzi o badania nad organami unaczynionymi, w szczególności nad biorcami serc – brak danych dotyczących SNP *TLR4*.

Wirus RSV (respiratory syncytial virus) również nie czyni istotnych spustoszeń u osób immunokompetentnych, bo objawia się jedynie katarem, bólem gardła i kaszlem. U dzieci, osób starszych i osób z obniżoną odpornością powoduje jednak znacznie cięższy przebieg choroby, doprowadzając do zapalenia oskrzeli, oskrzelików oraz płuc. Zapalenie płuc u biorcy HTx może skończyć się śmiertelnie, ponieważ u osób niekompetentnych immunologicznie infekcje RSV stanowią wrota dla zapaleń płuc o podłożu bakteryjnym i grzybiczym. Sezonowość tego typu zakażeń pozostaje bliźniacza w stosunku do populacji ogólnej, różnica polega jednak na rodzaju i spectrum objawów – u biorców przeszczepów często pierwszym objawem zakażenia będzie duszność, zmniejszona tolerancja wysiłku i zmiany w spirometrii. SNP *TLR4* przebadane na kohortach przeszczepionych pacjentów to rzadkość w literaturze. Częściej badane są dzieci pod kątem genetycznej predyspozycji do tego wirusa. Udowodniono, że warianty rs4986790 oraz rs4986791 wpływają istotnie na ciężkość przebiegu zakażenia, bowiem dzieci posiadające te warianty przechodziły infekcję RSV najciężej. W innym badaniu wykazano, że wynika to z upośledzonego transportu receptora do błony komórkowej – jego wysokie stężenie utrzymuje się w cytoplazmie komórki, ale ekspresja na powierzchni komórki pozostaje znikoma, dlatego nie może on w pełni zareagować na RSV.⁹⁶

Wirusy hepatotropowe mogą również powikłać okres po HTx. Aby tego uniknąć prowadzi się screening biorców i dawców pod kątem infekcji. W Arabii Saudyjskiej przeprowadzono istotne badanie dotyczące HCV – 450 pacjentów i 600 osób z ze zdrowej kontroli przepadano pod kątem SNP *TLR4*: rs4986790-GG i rs4986791-TT nie występowały w ogóle u osób zakażonych HCV.

Dane dotyczące infekcji HCV ani HBV i występowania konkretnych SNPs u biorców serc właściwie nie istnieją. Podobnie Herpes viridae 1 i 2 (HSV 1 i HSV2), varicella zoster virus (VZV), BK polyomavirus, EBV, HHV6 (Human Herpes Virus), HPV (Human Papilloma Virus), parvovirus B19, adenoviridae.

W niniejszym badaniu nie wykazano współistnienia żadnego z siedmiu badanych SNP i infekcji wirusowych, ale jest to pierwsza tego typu dana w literaturze.

9.3 SNP *TLR4* a infekcje grzybicze

Zakażenia grzybicze u biorców przeszczepów narządów unaczynionych nie są rzadkością z uwagi na zaburzenie naturalnych barier przeciwko tym zakażeniom. Tę barierę stanowią: integralność błon śluzowych i skóry wraz z fizjologiczną florą bakteryjną, aktywność limfocytów T (nie dopuszcza do kolonizacji sporów grzyba oraz zapobiega rozwojowi zakażeń powierzchniowych), aktywność fagocytów (w tym neutrofilii, monocytów, komórek dendrytycznych aktywowanych przez limfocyty T oraz komórki śródbłonna naczyń). Lecząc immunosupresyjnie pacjentów wyłączamy głównie odporność komórkową, czyli 2 z 3 mechanizmów obrony przed grzybicą, jakie człowiek naturalnie posiada.

Infekcje pierwotne stanowią mniejszy odsetek w stosunku do infekcji wtórnych do zakażeń bakteryjnych, w tym sepsy oraz do zakażeń wirusowych. Można wyróżnić 3 postaci kliniczne takiej grzybicy: powierzchowną (błony śluzowe, skóra, paznokcie), zakażenia narządowe (z uwagi na immunosupresję szybka progresja choroby do postaci uogólnionej) oraz zakażenia inwazyjne (wynikłe z sepsy i jej powikłań oraz leczenia immunosupresyjnego). Zakażenia grzybicze pojawiają się na każdym z 3 etapów przebiegu leczenia po przeszczepie serca. W pierwszym miesiącu po HTx są one związane z kolonizacją przed zabiegiem (*Aspergillus* spp.) lub uodpornieniem na leki (*Candida* spp.). Gdy zostaje zakończone leczenie profilaktyczne, pojawia się zwiększona zapadalność na *Cryptococcus* oraz *Pneumocystis*, a po roku od przeszczepu występują zakażenia kropidlakowe i *Nocardia*, typowe dla zapaleń płuc i zakażeń układu moczowego.⁹⁷

Aspergiloza stanowi istotny problem pacjentów po przeszczepach narządów klatki piersiowej – stanowi 70-90% zakażeń grzybiczych. Jest to zakażenie kropidlakami *Aspergillus fumigatum*, *flavus* and rzadziej wywołane *A. terreus*, *nidulans* bądź *Niger*. Z uwagi na obniżoną przy pomocy leków immunosupresyjnych odporność często przybiera formę inwazyjną, tj. atakuje organy, w tym ośrodkowy układ nerwowy, czyniąc w organizmie biorcy ogromne spustoszenia. Jest to ułatwione dzięki zwiększonemu powinowactwu do śródbłonna, powodującemu tętniaki grzybicze, zapalenie naczyń, a w konsekwencji utratę funkcji danego organu – także przeszczepionego. Leczenie

aspergilozy to proces szalenie długotrwały, wielomiesięczny, wymagający podawania leków przeciwgrzybiczych przede wszystkim w warunkach szpitalnych oraz poddawany regularnej kontroli w badaniach obrazowych.⁹⁸

Spośród przebadanych 7 SNP *TLR4* tylko rs 10983755 wykazał istotne statystycznie powiązanie z infekcją grzybiczą w wariancie genetycznym GG ($p= 0.002$) oraz rs1927911 w wariancie CC ($p=0.016$). Warto podkreślić, że spośród badanych probantów tylko 1 osoba nie miała aspergilozy, reszta – miała inwazyjną aspergilozę na dożylnym, wielotygodniowym leczeniu vorikonazolem.

Jest to o tyle ciekawy wynik, że w badaniu na biorcach allogenicznego przeszczepu szpiku udowodniono zwiększone występowanie inwazyjnej aspergilozy, gdy u biorcy lub dawcy pojawiał się wariant rs4986790 lub rs4986791⁹⁹, które to SNP zupełnie nie wykazały związku z zakażeniem grzybiczym w ogóle w niniejszej analizie.

1. Polimorfizmy *TLR4* rs10983755 A/G, rs4986791 C/T, rs4986790 A/G, rs10759932 C/T, rs1927911 C/T, rs11536889 C/G, rs12377632 C/T w badanej grupie nie wpłynęły na występowanie infekcji, ale dwa spośród nich - rs10983755 i rs1927911 – mogą stanowić czynnik ryzyka infekcji grzybiczej i zgonu.
2. SNP rs12377632 może stanowić niezależny od infekcji czynnik zgonu po HTx

Cele pracy: Infekcje są jedną z wiodących przyczyn zgonu po przeszczepie serca (HTx). Celem niniejszej pracy była ocena powiązania wybranych polimorfizmów pojedynczego genu (SNPs) receptora Toll-like 4 (TLR4) w związku z występowaniem, typem i przebiegiem infekcji oraz rokowaniem po HTx.

Materiał i metody: Do badania włączono 24 pacjentów po przeszczepie serca w Klinice Kardiologii i Transplantologii, hospitalizowanych w I Klinice Kardiologii w latach 2010-2016, od których pobrano krew. Wyizolowano DNA i przeprowadzono analizę materiału genetycznego używając analizy krzywych topnienia o wysokiej rozdzielczości (HRM) dla wariantów rs10983755 A/G, rs4986791 C/T, rs4986790 A/G, rs10759932 C/T, rs1927911 C/T, rs11536889 C/G, rs12377632 C/T. Dane dotyczące infekcji uzyskano retrospektywnie w oparciu o historie chorób pacjentów włączonych do badania. Całość materiału poddano analizie statystycznej.

Wyniki: Nie wykazano powiązania pomiędzy wybranymi SNPs a występowaniem infekcji ogólnie, natomiast pacjenci z wariantami rs10983755 GG oraz rs1927911 CC istotnie częściej zapadali na zakażenia grzybicze. Pacjenci z wariantami AA i TT powyższych SNPs oraz z wariantem rs12377632 CT mieli istotnie gorsze rokowanie w porównaniu z pozostałymi pacjentami.

Wnioski: Polimorfizmy TLR4 rs10983755 A/G, rs4986791 C/T, rs4986790 A/G, rs10759932 C/T, rs1927911 C/T, rs11536889 C/G, rs12377632 C/T w grupie badanej nie wpłynęły na występowanie infekcji, ale dwa spośród nich - rs10983755 i rs1927911 – mogą być możliwym czynnikiem ryzyka infekcji grzybiczej i zgonu, pomimo nieskorelowania z występowaniem infekcji ogólnie. SNP rs12377632 stanowi niezależny od infekcji czynnik zgonu po HTx.

Słowa kluczowe: przeszczep serca, infekcje, polimorfizm pojedynczego genu, receptor Toll-like 4

“Assessment of TLR4 SNPs and prevalence, type and history of the infections and outcome after heart transplantation “

Abstract

Background: Post-transplant infections are one of the major cause of mortality after heart transplantation (HTx). The aim of the study was to find possible linkage between chosen single nucleotide polymorphisms (SNPs) of Toll-like receptor 4 (TLR-4) and prevalence of infections, type of infection and outcome after HTx.

Material and Methods: Blood samples derived from 24 patients subjected to HTx during 2010-2016 in Clinic of Cardiac Surgery and Transplantation and under control of I Clinic of Cardiology were taken. Then DNA was isolated and analyzed using high resolution melting (HRM) method according to the toll-like receptor 4 SNPs: rs10983755 A/G, rs4986791 C/T, rs4986790 A/G, rs10759932 C/T, rs1927911 C/T, rs11536889 C/G, rs12377632 C/T. Clinical data were derived retrospectively from patients' medical history. Then the statistical analysis was performed.

Results: There was no correlation between analyzed SNPs and the prevalence of infections generally. Statistically important increased prevalence of fungal infection was expressed among patients with rs10983755 GG variant and rs1927911 CC variant. Patients presenting above SNPs AA and TT alleles respectively and rs 12377632 CT allele had poorer outcome than the other patients in the investigated group.

Conclusion: Post-transplant infections after HTx are not related to SNPs : rs10983755 A/G, rs4986791 C/T, rs4986790 A/G, rs10759932 C/T, rs1927911 C/T, rs11536889 C/G, rs12377632 C/T

prevalence. Patients with rs10983755 GG variant and rs1927911 CC variant are more susceptible to fungal infections. Increased death rates were noted among patients with rs10983755 AA variant, rs1927911 TT variant and rs12377632 CT variant.

Keywords: heart transplantation, infections, single nucleotide polymorphism, Toll-like receptor 4

- ¹ Lipińska J, Marciniak M, *Mitologia starożytnego Egiptu*, Warszawa 1980, s.171 -182, s. 196-217
- ² Singhal GD, Singh LM, Singh KP, *Diagnostic considerations in ancient Indian surgery : based on Nidāna-Sthāna of Susruta-Saṁhitā*, Varanasi : Chaukhamba Surbharati Prakashan, 2006
- ³ Gibson T, Medawar PB. The fate of skin homografts in man. *J Anat.* 1943;77:299
- ⁴ Billingham RE, Brent L, Medawar PB. “Actively acquired tolerance” of foreign cells. *Nature.* 1953;172:603.
- ⁵ Fox RC, Swazey JP, *The Courage to Fail: A Social View of Organ Transplants and Dialysis*, 2001, 2nd edition, ebook, s. 50
- ⁶ Li JJ, Corey EJ, *Drug Discovery: Practices, Processes, and Perspectives*, ebook, s.374
- ⁷ Grabley S, Thiericke R, *Drug Discovery From Nature*, ebook, s. 11-14
- ⁸ Morris PJ. Transplantation—a medical miracle of the 20th century. *N Engl J Med* 2004;351:2678-80
- ⁹ Matevossian E, Surgeon Yurii Voronoy (1895–1961) – a pioneer in the history of clinical transplantation: in Memoriam at the 75th Anniversary of the First Human Kidney Transplantation, *Transplant International* 22, 2009: 1132–1139.
- ¹⁰ Petechuk D., *Organ transplantation*. 2006, Greenwood Publishing Group. s. 11.
- ¹¹ National Public Radio, *Transplant Pioneers Recall Medical Milestone*, December 20, 2004, transkrypt programu radiowego:
<https://www.npr.org/templates/story/story.php?storyId=4233669&t=1544262798389>, Dostęp online z dn. 29.05.2016
- ¹² Hakim N, Kessaris N, Papalois V, Canelo R. *Living Related Transplantation*, World Scientific, 2004 s. 39
- ¹³ *Nauka w Polsce, Przed 50 laty odbył się pierwszy w Polsce przeszczep nerki*, 2016. Dostęp online:
<http://naukawpolsce.pap.pl/aktualnosci/news%2C408173%2Cprzed-50-laty-odbyl-sie-pierwszy-w-polsce-przeszczep-nerki.html> na dzień 29.01.2016
- ¹⁴ A. Zarrinpar, R.W. Busuttil, *Liver transplantation: past, present and future*, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 10 (2013), pp. 434–440
- ¹⁵ E. Donnell Thomas, Harry L. Lochte, Jr., Wan Ching Lu, et al., *Intravenous Infusion of Bone Marrow in Patients Receiving Radiation and Chemotherapy*, *N Engl J Med* 1957; 257:491-496
- ¹⁶ Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, et al., *Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency*, *Lancet.* 1968 Dec 28;2(7583):1366-9.
- ¹⁷ Speck B, Zwaan FE, van Rood JJ, et al. *Allogeneic bone marrow transplantation in a patient with aplastic anemia using a phenotypically HL-A-identical unrelated donor*, *Transplantation.* 1973 Jul;16(1):24-8.
- ¹⁸ *Bone Marrow Donors Worldwide*, <https://www.bmdw.org/bmdw/about-bmdw> dostęp na dzień 29.05.16
- ¹⁹ Hardy JD; Webb WR; Dalton Jr. ML, et al. *Lung Homotransplantation in Man*, *JAMA: the Journal of the American Medical Association* 1963, 186: 1065–74.
- ²⁰ Toronto Lung Transplant Group, *Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis*. *N Engl J Med.* 1986 May 1; 314(18):1140-5.
- ²¹ Reitz BA, Wallwork JL, Hunt SA, et al., *Heart-lung transplantation: successful therapy for patients with pulmonary vascular disease* *N Engl J Med.* 1982 Mar 11; 306(10):557-64.
- ²² Śląskie Centrum Chorób Serca, strona internetowa Instytutu, dostęp na dzień 29.05.2016
- ²³ Kelly WD, Lillehei RC, Merkel FK, et al., *Allotransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy*, *Surgery* 61 (6) 1967: 827–37. PMID 5338113.
- ²⁴ Barnard CN, *A Human Cardiac Transplant: An Interim Report of a Successful Operation Performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town*, *SA Medical Journal*, 1967

-
- ²⁵ Brink JG, Hassoulas J, The first human heart transplant and further advances in cardiac transplantation at Groote Schuur Hospital and the University of Cape Town, *Cardiovasc J Afr.* 2009 Feb; 20(1): 31–35.
- ²⁶ Wicomb WN, Cooper DK, Novitzky D, et al., Cardiac transplantation following storage of the donor heart by a portable hypothermic perfusion system, *Ann Thorac Surg.* 1984 Mar; 37(3):243-8.
- ²⁷ Dziadkowiak A, Historia PTK. Wybitne postacie PTK. Jan Witold Moll., www.ptkardio.pl, dostęp na dzień 26.05.2016
- ²⁸ Truth Inside Of You, Doctor's photo that schocked the whole world, <https://www.truthinsideofyou.org/doctors-photo-shocked-world>, 23.06.2014. Dostęp na dzień 26.05.2016
- ²⁹ International Registry in Organ Donation and Transplantation, baza online, dostęp na dzień 01.06.2016
- ³⁰ Global Observatory on Donation and Transplantation, https://view.publitas.com/ont/20151215_basic_slides_2013_con_datos_de_libya_de_2011/page/16 dostęp na dzień 01.06.2016
- ³¹ Centrum Organizacyjno-Koordynacyjne Do Spraw Transplantacji “Poltransplant”, *Biuletyn* 2016, dostęp online na dzień 01.06.2016
- ³² Dz. U. Nr 169 poz. 1411
- ³³ Ponikowski P et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J.* (2016 May 20)
- ³⁴ Mehra MR, Kobashigawa J, Starling R, et al. Listing criteria for heart transplantation: International Society for Heart and Lung Transplantation guidelines for the care of cardiac transplant candidates 2006. *J Heart Lung Transplant* 2006;25:1024-42
- ³⁵ De Marco T, Wolfel E, Feldman AM, et al. Impact of cardiac resynchronization therapy on exercise performance, functional capacity, and quality of life in systolic heart failure with QRS prolongation: COMPANION trial sub-study. *J Card Fail* 2008;14:9-18.
- ³⁶ Mehra MR, Canter CE, Hannan MM, et al., The 2016 International Society for Heart Lung Transplantation listing criteria for heart transplantation: A 10-year update. *J Heart Lung Transplant.* 2016 Jan;35(1):1-23. doi: 10.1016/j.healun.2015.10.023.
- ³⁷ Cierpka L, Durlik M et al., *Transplantologia Kliniczna. Przeszczepy narządowe.* 2015, s. 265-266
- ³⁸ Cierpka L, Durlik M et al., *Transplantologia Kliniczna. Przeszczepy narządowe.* 2015, s. 339-341
- ³⁹ Billingham M, Kobashigawa JA, The revised ISHLT heart biopsy grading scale. *J Heart Lung Transplant.* 2005 Nov;24(11):1709.
- ⁴⁰ Cierpka L, Durlik M et al., *Transplantologia Kliniczna. Przeszczepy narządowe.* 2015, s. 344-345
- ⁴¹ Durlik M, Cierpka L, *Zasady leczenia immunosupresyjnego* 2015, s. 346-7
- ⁴² Green M, Introduction: Infections in Solid Organ Transplantation. *American Journal of Transplantation*, 2013, 13: 3–8. doi: 10.1111/ajt.12093
- ⁴³ Robbins, Hilary A. et al. Melanoma Risk and Survival among Organ Transplant Recipients, *The Journal of investigative dermatology* 2015, 135.11: 2657–2665. PMC. Web. 17 June 2016.
- ⁴⁴ Evens, Andrew M. et al., Multicenter Analysis of 80 Solid Organ Transplantation Recipients With Post-Transplantation Lymphoproliferative Disease: Outcomes and Prognostic Factors in the Modern Era, *Journal of Clinical Oncology* 2010, 28.6: 1038–1046. PMC. Web. 17 June 2016.
- ⁴⁵ Chatur S, Wong BW, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor reduces cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant.* 2016 May 6. pii: S1053-2498(16)30115-2. doi: 10.1016/j.healun.2016.04.011. [Epub ahead of print]

-
- ⁴⁶ Green M, Introduction: Infections in Solid Organ Transplantation. *American Journal of Transplantation*, 2013, 13: 3–8. doi:10.1111/ajt.12093
- ⁴⁷ Clinical Trials, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02323321> dostęp na dzień 16.05.2017 g. 13:00
- ⁴⁸ Fischer, S. A., Lu, K. and the AST Infectious Diseases Community of Practice, Screening of Donor and Recipient in Solid Organ Transplantation. *American Journal of Transplantation*, 2013, 13: 9–21. doi:10.1111/ajt.12094
- ⁴⁹ Snyderman DR; Epidemiology of Infections after Solid-Organ Transplantation, *Clin Infect Dis* 2001; 33 (Supplement_1): S5-S8. doi: 10.1086/320897
- ⁵⁰ The ISHLT Guidelines For The Care of Heart Transplant Recipients, *J Heart Lung Transplant*, 2010, vol. 29 s. 914-957
- ⁵¹ Special Issue American Society of Transplantation, Infectious Diseases, Guidelines 3rd Edition, *American Journal of Transplantation*, 2013, s. 1-1371,
- ⁵² Hill AVS, Immunogenetics and genomics, *Lancet* 2001; 357: 2037–41
- ⁵³ Blasius, A.L., and Beutler, B., Intracellular toll-like receptors. *Immunity* 32, 305–315, (2010)
- ⁵⁴ Broz P, Monack DM, Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens, *Nature Reviews Immunology* 13, 551–565 (2013) doi:10.1038/nri3479
- ⁵⁵ Broz P, Monack DM, Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens, *Nature Reviews Immunology* 13, 551–565 (2013) doi:10.1038/nri3479
- ⁵⁶ Bansal M, DNA structure: Revisiting the Watson-Crick double helix, *Current Science*, 2003, 85 (11), s. 1556-1563.
- ⁵⁷ Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, et al. *An Introduction to Genetic Analysis*, 7th edition, New York: W. H. Freeman; 2000. ISBN-10: 0-7167-3520-2, s. 133, 404,
- ⁵⁸ Sun D, Sun L, Xu Q, et al. Promoter Polymorphism of Toll-Like Receptor 4 is Associated with a Decreased Risk of Coronary Artery Disease: A Case-Control Study in the Chinese Han Population. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 2017;23:276-284. doi:10.12659/MSM.899587.
- ⁵⁹ Xie X, Shi, X, Liu M, The Roles of TLR Gene Polymorphisms in Atherosclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis of 35,317 Subjects. *Scand J Immunol*, 2017, 86: 50–58. doi:10.1111/sji.12560
- ⁶⁰ Jabłońska A, Paradowska E, Studzińska M, et al. Relationship between toll-like receptor 2 Arg677Trp and Arg753Gln and toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphisms and cytomegalovirus infection, *International Journal of Infectious Diseases*, Volume 25, 2014, Pages 11-15, ISSN 1201-9712, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2014.04.001>, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S120197121401474X>)
- ⁶¹ Santana N de L, Rêgo JL, Oliveira JM, et al. Polymorphisms in genes TLR1, 2 and 4 are associated with differential cytokine and chemokine serum production in patients with leprosy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2017;112(4):260-268. doi:10.1590/0074-02760160366.
- ⁶² Saigi-Morgui N, Quteineh L, Bochud P-Y, et al. Weighted Genetic Risk Scores and Prediction of Weight Gain in Solid Organ Transplant Populations. Scherag A, ed. *PLoS ONE*. 2016;11(10):e0164443. doi:10.1371/journal.pone.0164443.
- ⁶³ Park H, Lee N, In JW, et al. Association of Foxp3 Polymorphism With Allograft Outcome in Kidney Transplantation, *Ann Lab Med*. 2017 Sep;37(5):420-425. doi: 10.3343/alm.2017.37.5.420.
- ⁶⁴ Métrich M, Mehmeti F, Feliciano H, et al. Adrenergic Receptor Polymorphism and Maximal Exercise Capacity after Orthotopic Heart Transplantation. Lionetti V, ed. *PLoS ONE*. 2016;11(9):e0163475. doi:10.1371/journal.pone.0163475.
- ⁶⁵ Yongcharoen S, Rattanasiri S, McDaniel DO, et al. Meta-Analysis of Cytokine Gene Polymorphisms and Outcome of Heart Transplantation. *BioMed Research International*. 2013;2013:387184. doi:10.1155/2013/387184.
- ⁶⁶ Hornef MW, Normark BH, Vandewalle A, et al., Intracellular Recognition of Lipopolysaccharide

-
- by Toll-like Receptor 4 in Intestinal Epithelial Cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 2003; 198(8):1225-1235. doi:10.1084/jem.20022194.
- ⁶⁷ Stewart C.R., Stuart L.M., Wilkinson K. et al., CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer, *Nat. Immunol.* 11:155-161(2010)
- ⁶⁸ Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al., Toll-like receptor 4–dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nature medicine*. 2007 Sep 1;13(9):1050-9.
- ⁶⁹ Kumpf O, Giamarellos-Bourboulis EJ, Koch A, et al. Influence of genetic variations in TLR4 and TIRAP/Mal on the course of sepsis and pneumonia and cytokine release: an observational study in three cohorts. *Critical Care*. 2010;14(3):R103. doi:10.1186/cc9047.
- ⁷⁰ Shalhub S, Junker CE, Imahara SD, et al. Variation in the TLR4 gene influences the risk of organ failure and shock post-trauma: a cohort study. *The Journal of trauma*. 2009;66(1):115-123. doi:10.1097/TA.0b013e3181938d50.
- ⁷¹ Liu R, Mo Y-Y, Wang H-L, et al. The relationship between toll like receptor 4 gene rs4986790 and rs4986791 polymorphisms and sepsis susceptibility: A meta-analysis. *Scientific Reports*. 2016;6:38947. doi:10.1038/srep38947.
- ⁷² Zhang Q, Qian FH, Zhou LF, et al. Polymorphisms in Toll-Like Receptor 4 Gene Are Associated With Asthma Severity but not Susceptibility in a Chinese Han Population, *J Investig Allergol Clin Immunol* 2011; Vol. 21(5): 370-377
- ⁷³ Sun D, Sun L, Xu Q, et al., Promoter Polymorphism of Toll-Like Receptor 4 is Associated with a Decreased Risk of Coronary Artery Disease: A Case-Control Study in the Chinese Han Population. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 2017;23:276-284. doi:10.12659/MSM.899587.
- ⁷⁴ Smith RL, Hébert HL, Massey J, et al. Association of Toll-like receptor 4 (TLR4) with chronic plaque type psoriasis and psoriatic arthritis. *Archives of Dermatological Research*. 2016;308:201-205. doi:10.1007/s00403-016-1620-4.
- ⁷⁵ Lee J, Choi J, Chung S, et al. Genetic Predisposition of Polymorphisms in HMGB1-Related Genes to Breast Cancer Prognosis in Korean Women. *Journal of Breast Cancer*. 2017;20(1):27-34. doi:10.4048/jbc.2017.20.1.27.
- ⁷⁶ Rybka, J., Gębura, K., Wróbel, T., et al., Variations in genes involved in regulation of the nuclear factor – κ B pathway and the risk of acute myeloid leukaemia. *Int J Immunogenet*, 2016, 43: 101–106. doi:10.1111/iji.12255
- ⁷⁷ Bagratuni T, Terpos E, et al. (2016), TLR4/TIRAP polymorphisms are associated with progression and survival of patients with symptomatic myeloma. *Br J Haematol*, 172: 44–47. doi:10.1111/bjh.13786
- ⁷⁸ Kutikhin AG, Yuzhalin AE, Volkov AN, et al. Correlation between genetic polymorphisms within IL-1B and TLR4 genes and cancer risk in a Russian population: a case-control study, *Tumour Biol*. 2014 May;35(5):4821-30. doi: 10.1007/s13277-014-1633-6. Epub 2014 Jan 21.
- ⁷⁹ Loganathan R, Nazeer M, Goda V, et al., Genetic variants of TLR4 and TLR9 are risk factors for chronic *Helicobacter pylori* infection in South Indian Tamils, *Hum Immunol*. 2017 Feb;78(2):216-220. doi: 10.1016/j.humimm.2016.12.002. Epub 2016 Dec 16.
- ⁸⁰ M. Koldehoff, D.W. Beelen, A.H. Elmaagacli. Increased susceptibility for aspergillosis and post-transplant immune deficiency in patients with gene variants of TLR4 after stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis* 2013; 15: 533–539.
- ⁸¹ Krichen H, Gorgi Y, Dhaouadi T, et al., Toll-Like Receptor 4 and CD14 Gene Polymorphisms in Tunisian Kidney Transplantation, *Transplantation Proceedings*, Volume 45, Issue 10, 2013, Pages 3472-3477, ISSN 0041-1345, <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2013.09.003>. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041134513009135>)
- ⁸² Oetting WS, Guan W, Schladt DP, et al. Donor Polymorphisms of TLR4 Associated with Graft Failure in Liver Transplant Recipients. *Liver transplantation : official publication of the American*

Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society. 2012;18(12):1399-1405. doi:10.1002/lt.23549.

⁸³ Carpi FM, Di Pietro F, Vincenzetti S, et al., Human DNA extraction methods: patents and applications. *Recent Pat DNA Gene Seq.* 2011;5(1):1–7.

⁸⁴ Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.

⁸⁵ Krüger B, Banas MC, Walberer A, et al. A comprehensive genotype–phenotype interaction of different Toll-like receptor variations in a renal transplant cohort, *Clinical Science* Dec 2010, 119 (12) 535-544; DOI: 10.1042/CS20100190

⁸⁶ Mensah NY, Peteriongo P, Steinhertz p, et al. Toll-Like Receptor 4 Polymorphisms and Risk of Gram-Negative Bacteremia after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *A Prospective Pilot Study, Biology of Blood and Marrow Transplantation* , Volume 15 , Issue 9 , 1130 - 1133

⁸⁷ Leon CG, Tory R, Jia J, et al., Discovery and development of toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists: a new paradigm for treating sepsis and other diseases. *Pharmaceutical research.* 2008 Aug 1;25(8):1751-61.

⁸⁸ Brunialti MK, Martins PS, de Carvalho HB, et al., TLR2, TLR4, CD14, CD11B, and CD11C expressions on monocytes surface and cytokine production in patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Shock.* 2006 Apr 1;25(4):351-7.

⁸⁹ Skinner NA, MacIsaac CM, Hamilton JA, et al., Regulation of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 on CD14dimCD16+ monocytes in response to sepsis-related antigens. *Clinical & Experimental Immunology.* 2005 Aug 1;141(2):270-8.

⁹⁰ Wang H, Wei Y, Zeng Y, et al. The association of polymorphisms of TLR4 and CD14 genes with susceptibility to sepsis in a Chinese population. *BMC Medical Genetics.* 2014;15:123. doi:10.1186/s12881-014-0123-4.

⁹¹ Zhou JG, Zhang JP, Lee BH, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms in gram-negative bacterial infections of Han Chinese neonates. *American journal of perinatology.* 2015 Mar;32(04):363-70.

⁹² Mansur A, Gruben L von, Popov AF, et al. The regulatory toll-like receptor 4 genetic polymorphism rs11536889 is associated with renal, coagulation and hepatic organ failure in sepsis patients. *Journal of Translational Medicine.* 2014;12:177. doi:10.1186/1479-5876-12-177.

⁹³ Li P, He CY, Sun LP, et al. Effect of the -2081G/A polymorphism of the TLR4 gene and its interaction with *Helicobacter pylori* infection on the risk of gastric cancer in Chinese individuals. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2014 Sep;18(9):610-5. doi: 10.1089/gtmb.2014.0047..

⁹⁴ Zaki HY, Leung KH, Yiu WC, Gasmelseed N, Elwali NE, Yip SP. Common polymorphisms in TLR4 gene associated with susceptibility to pulmonary tuberculosis in the Sudanese. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease.* 2012 Jul 1;16(7):934-40.

⁹⁵ Blyth E, Withers B, Clancy L, et al. CMV-specific immune reconstitution following allogeneic stem cell transplantation. *Virulence.* 2016;7(8):967-980. doi:10.1080/21505594.2016.1221022.

⁹⁶ Johansson C, Respiratory syncytial virus infection: an innate perspective. *F1000Research.* 2016;5:2898. doi:10.12688/f1000research.9637.1.

⁹⁷ Fishman, J. A. and the AST Infectious Diseases Community of Practice (2009), Introduction: Infection in Solid Organ Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation*, 9: S3–S6. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02887.x

⁹⁸ Albano L, Bretagne S, Mamzer-Bruneel MF, et al. French Mycosis Study Group. Evidence that graft-site candidiasis after kidney transplantation is acquired during organ recovery: a multicenter study in France. *Clinical Infectious Diseases.* 2009 Jan 15;48(2):194-202.

⁹⁹ Koldehoff M, Beelen DW, Elmaagacli AH, Increased susceptibility for aspergillosis and post-transplant immune deficiency in patients with gene variants of TLR4 after stem cell transplantation. *Transplant Infectious Disease.* 2013 Oct 1;15(5):533-9.