

Odpowiedź immunologiczna na przeszczep allogeniczny

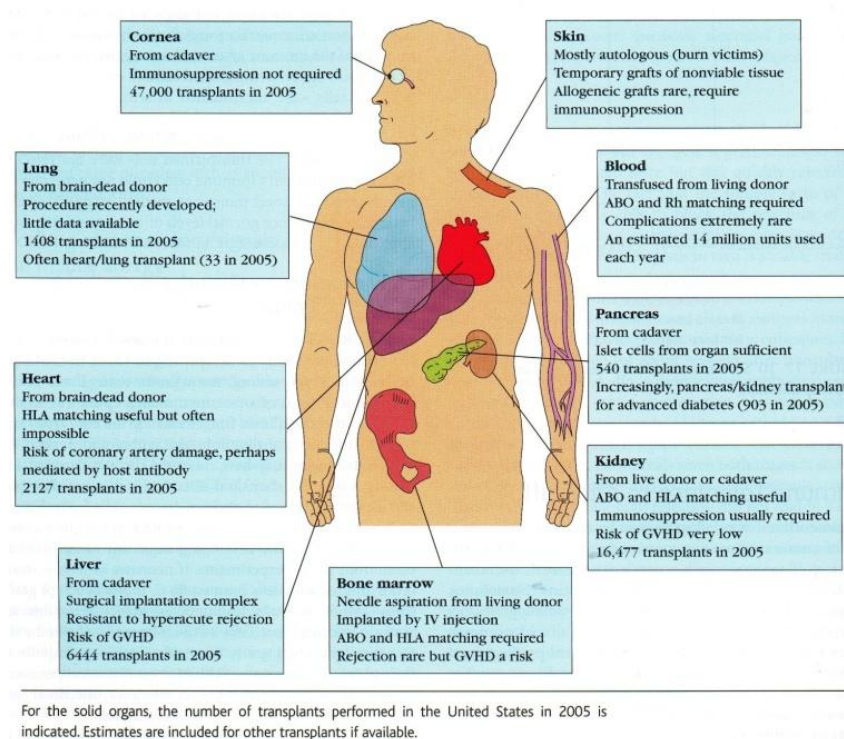
Grażyna Korczak-Kowalska
Zakład Immunologii
Instytut Biologii Funkcjonalnej i Ekologii
Wydział Biologii UW



Transplantacja narządów jest metodą z wyboru

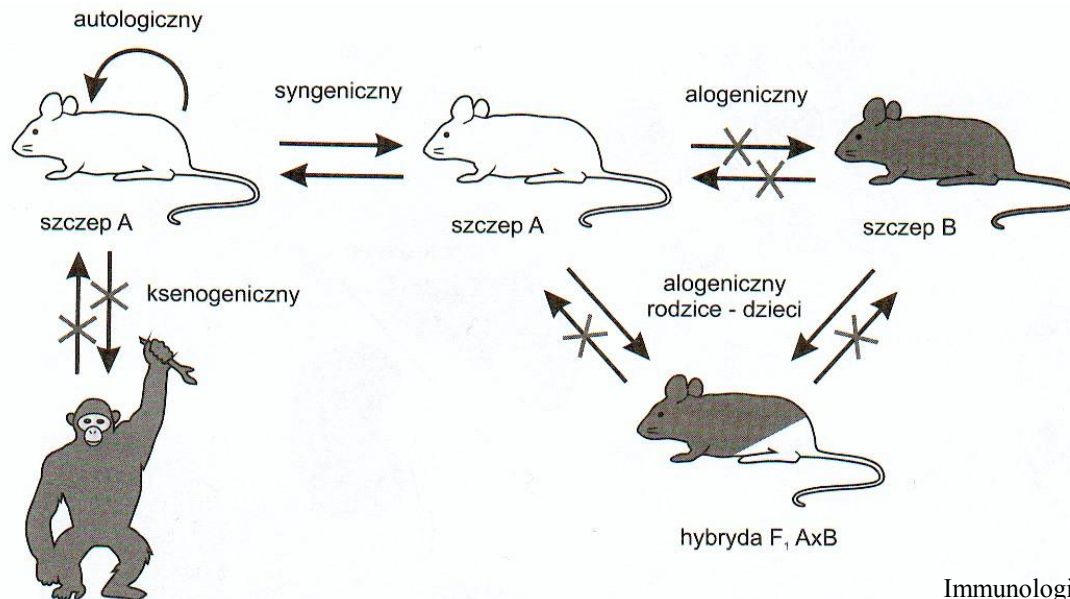
leczenia chorych z krańcową niewydolnością narządów,

pozwalającą na przeżycie chorych i poprawę jakości ich życia.

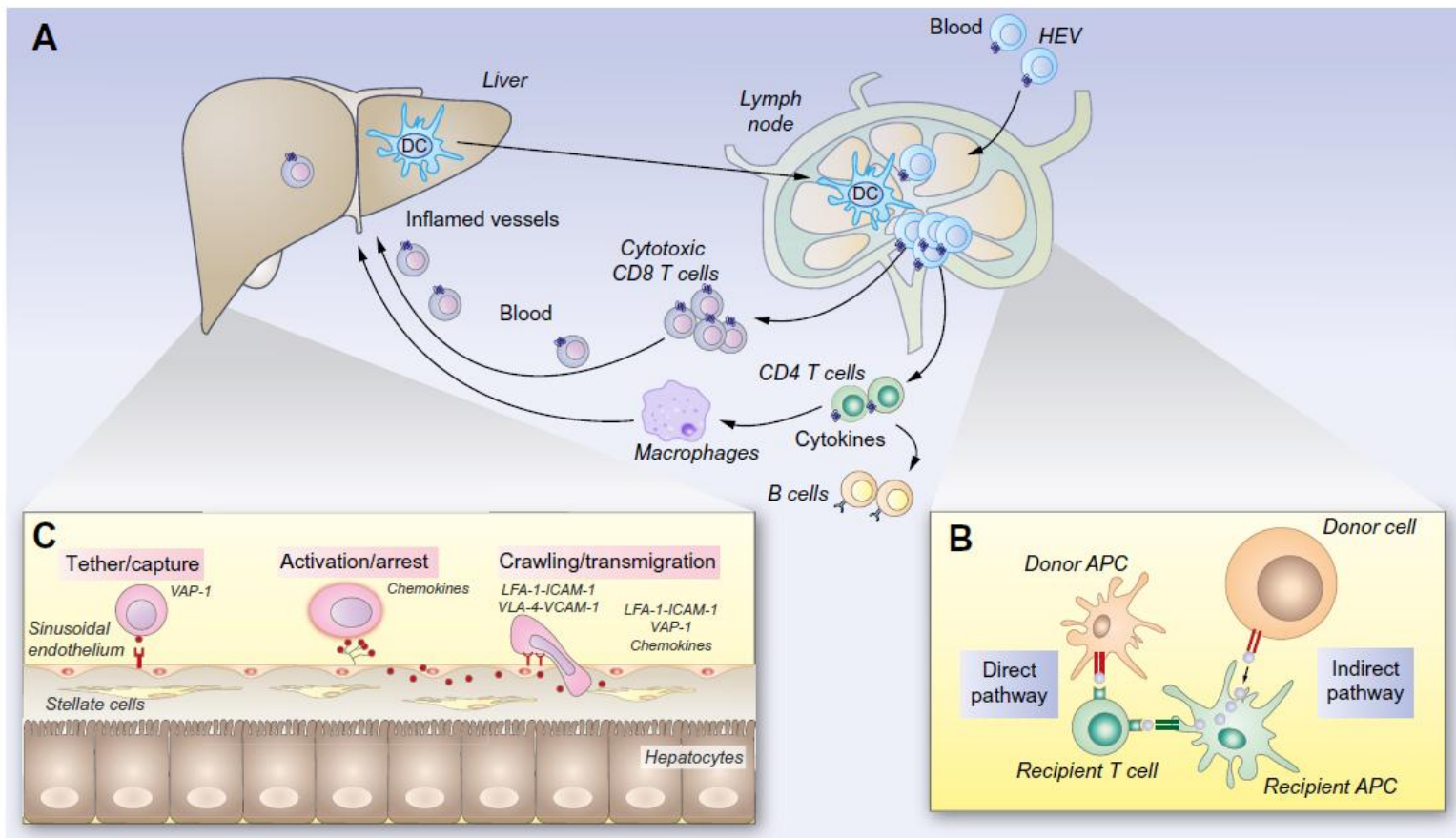


Ze względu na różnice genetyczne między dawcą i biorcą wyróżniamy następujące rodzaje przeszczepów:

- **autologiczne** (dokonywane w obrębie tego samego organizmu),
- **izogeniczne-syngeniczne** (dokonywane pomiędzy osobnikami tego samego gatunku, identycznymi genetycznie),
- **allogeniczne** (dokonywane pomiędzy osobnikami tego samego gatunku, różnymi genetycznie),
- **ksenogeniczne** (dokonywane pomiędzy osobnikami różnych gatunków).



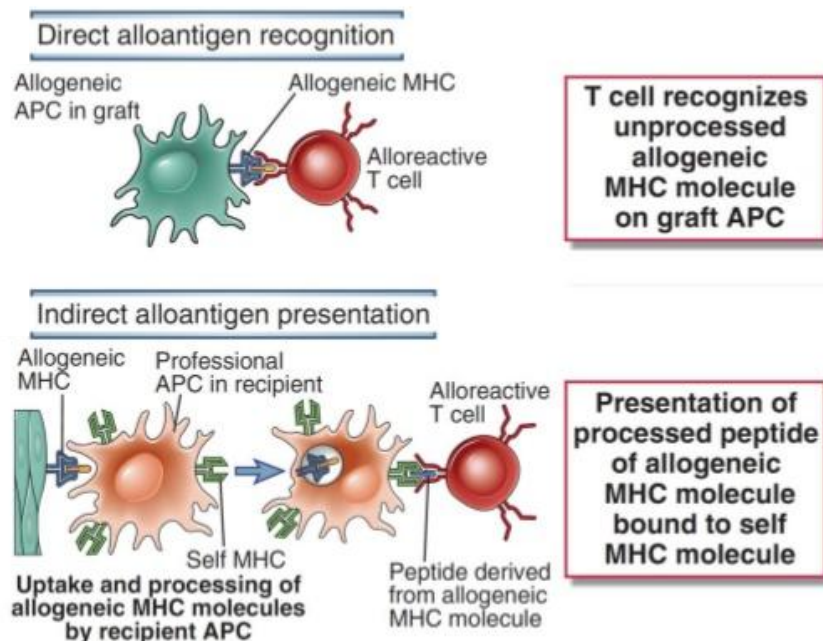
Odpowiedź immunologiczna na przeszczep allogeniczny



Odrzucanie przeszczepu związane jest głównie z nabytą odpornością.

Bezpośrednie i pośrednie rozpoznanie alloantygeny.

Allogeniczne cząsteczki MHC przeszczepu mogą być prezentowane limfocytom T biorcy dwiema głównymi drogami: bezpośrednią i pośrednią.



Bezpośrednie rozpoznanie: limfocyty T biorcy mogą rozpoznawać nienaruszone (nieprzetworzone) cząsteczki MHC przeszczepu.

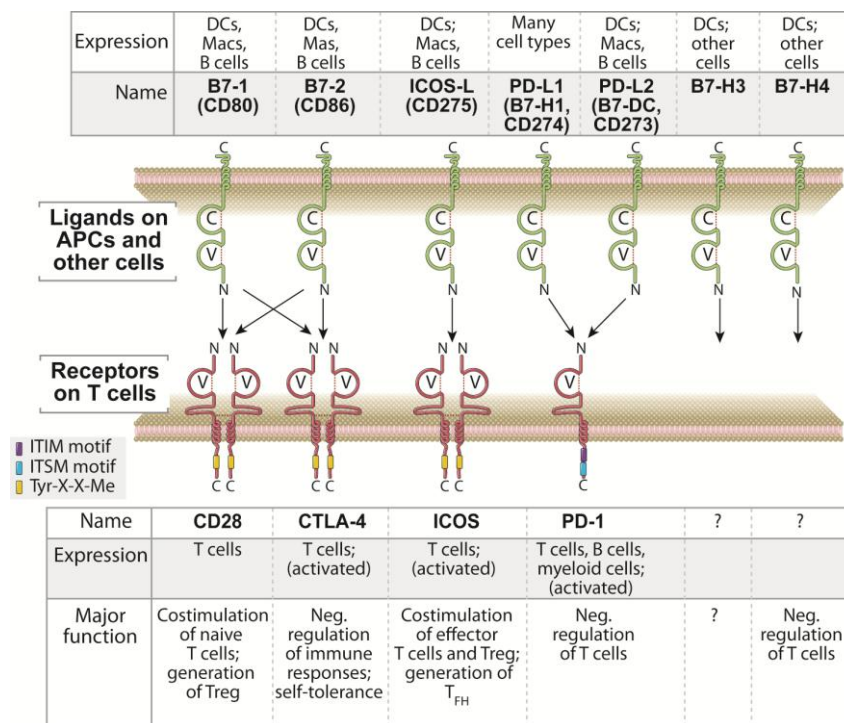
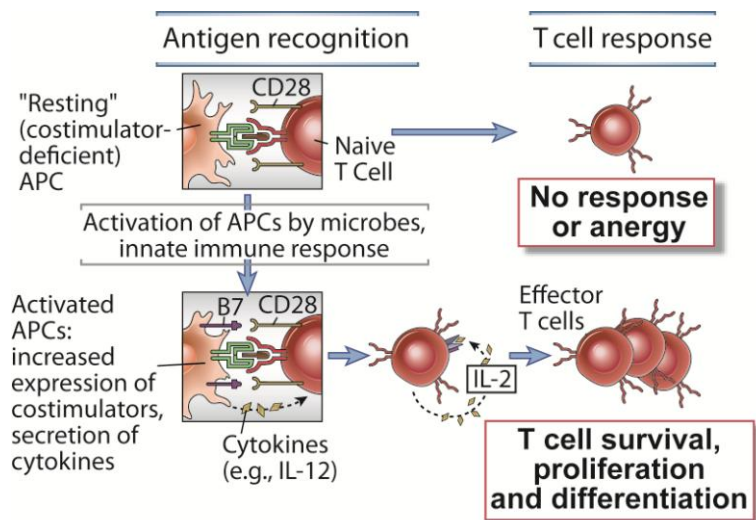
Pośrednie rozpoznanie: limfocyty T biorcy rozpoznają cząsteczki MHC przeszczepu w kontekście własnych cząsteczek MHC.

Abbas A.K. et al., Cellular and molecular immunology Ed 8^h

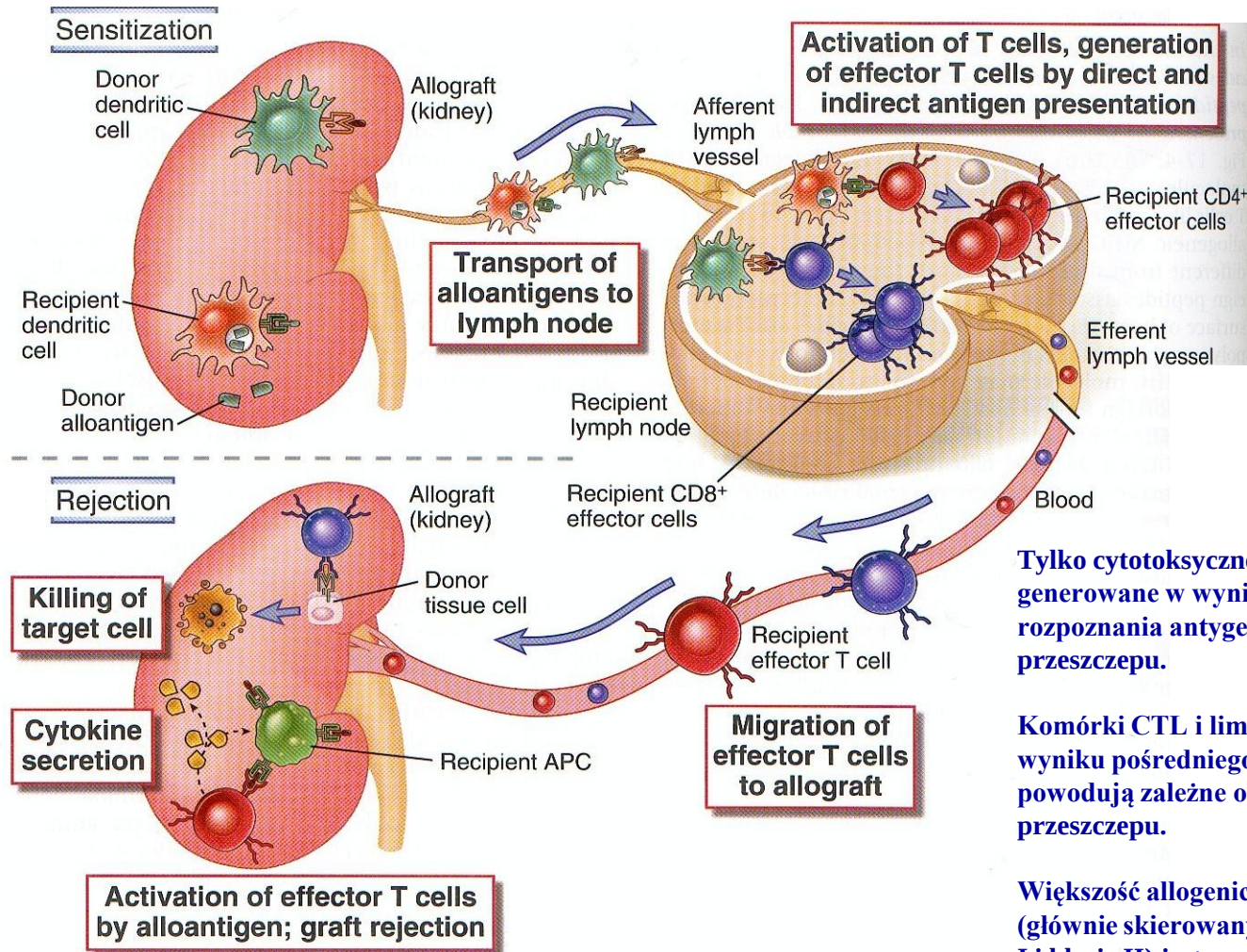
Limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ rozpoznają główne i „słabe” alloantygeny przeszczepu. Główne antygeny zgodności tkankowej rozpoznawane są bezpośrednio przez limfocyty Th i Tc (alloreaktywność).

Rola cząsteczek kostymulujących w aktywacji limfocytów T

Do aktywacji limfocytów T potrzebny jest sygnał kostymulujący dostarczany przez cząsteczki B7 obecne na komórkach APC.



Aktywacja allogenicznych limfocytów T

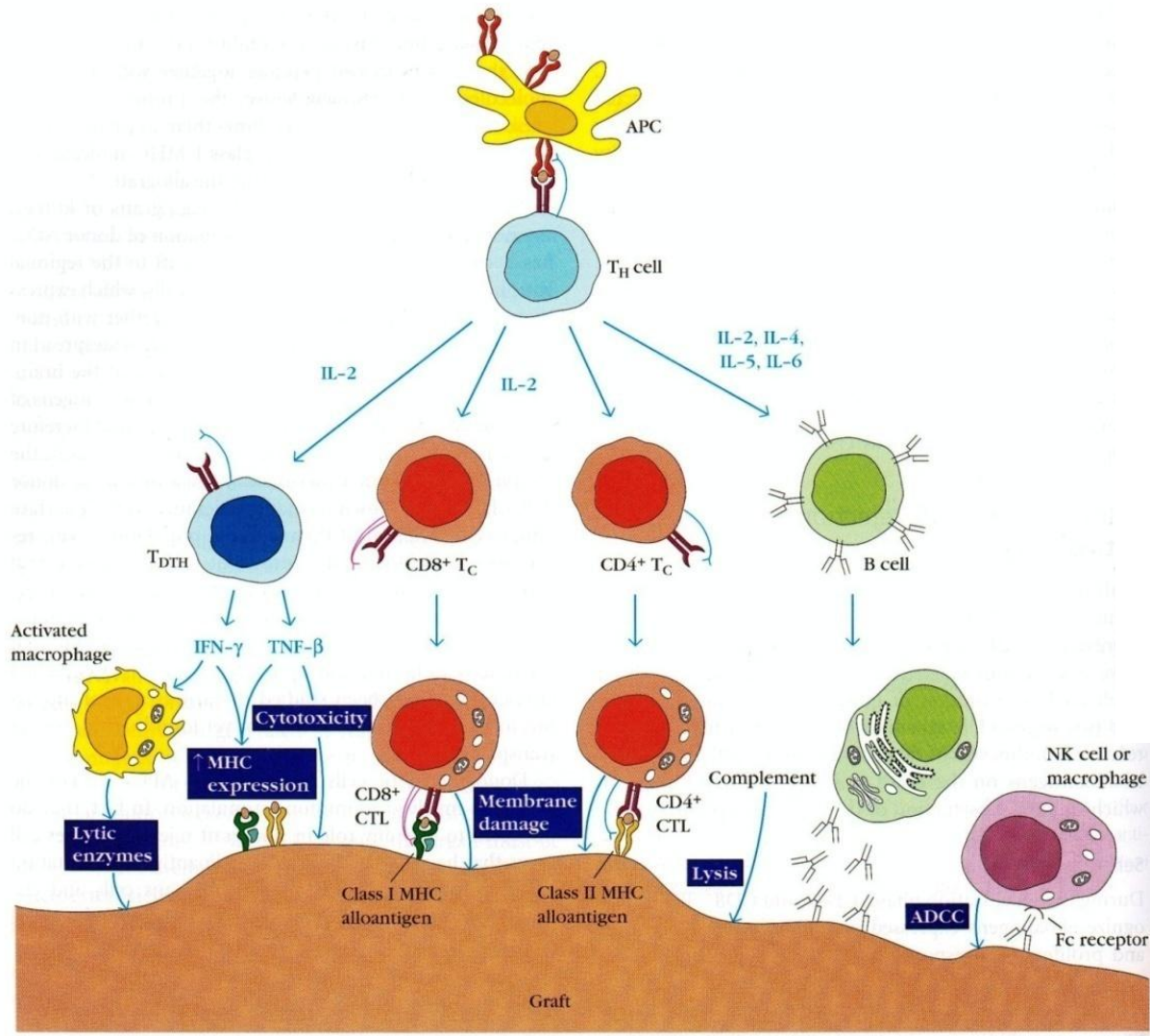


Tylko cytotoksyczne limfocyty T (CTL) generowane w wyniku bezpośredniego rozpoznania antygeny mogą zabijać komórki przeszczepu.

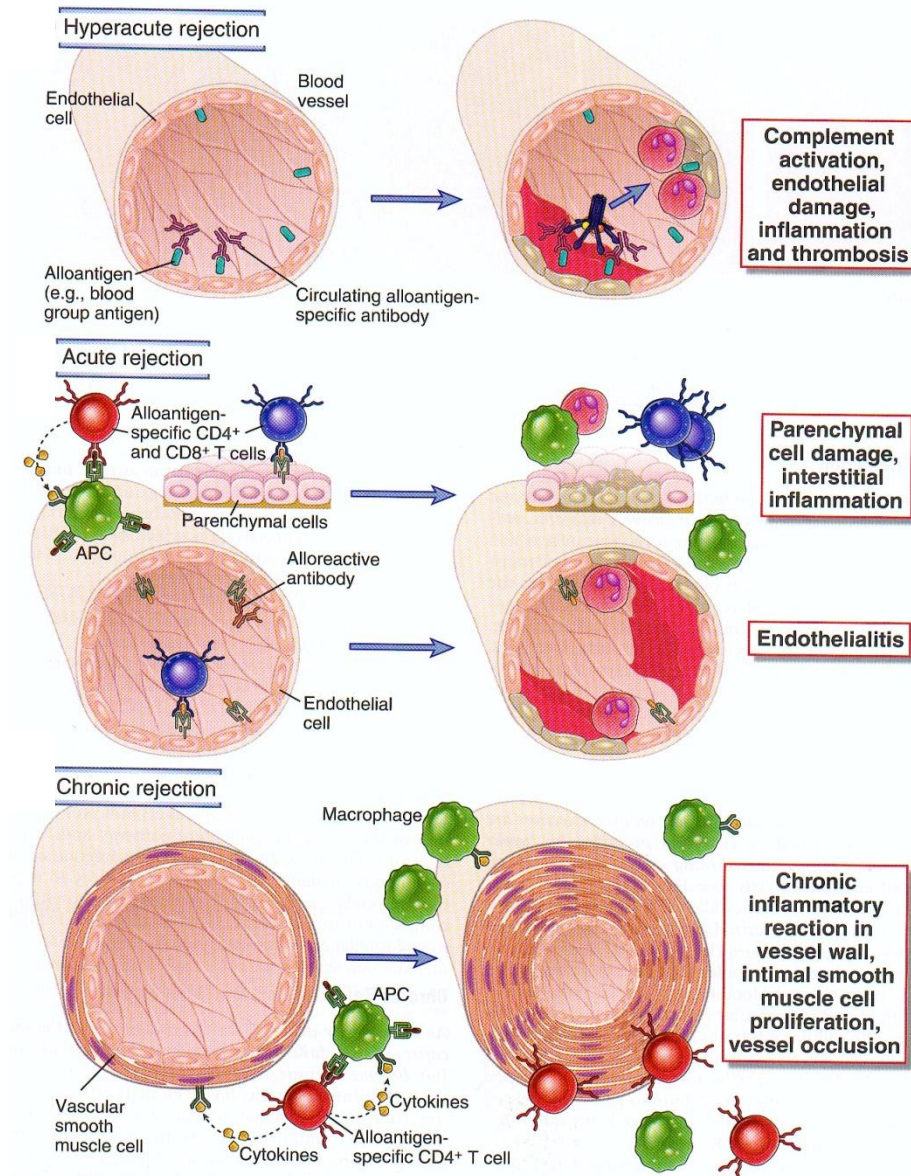
Komórki CTL i limfocyty Th generowane w wyniku pośredniego rozpoznania antygeny powodują zależne od cytokin uszkodzenie przeszczepu.

Większość allogenicznych przeciwciał (głównie skierowanych przeciwko MHC klasy I i klasie II) jest produkowana przez limfocyty B we współpracy z limfocytami Th.

Aktywacja allogenicznych limfocytów T



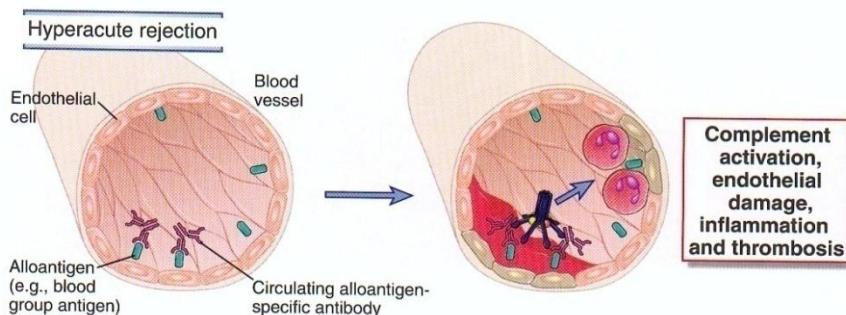
Mechanizmy odrzucania przeszczepu



Odrzucanie przeszczepu, ze względu na zmiany histopatologiczne i czas podzielono na:

- **nadostre** (zachodzi w ciągu pierwszych 24 h po transplantacji)
- **ostre** (rozpoczyna się w pierwszych tygodniach po transplantacji)
- **Przewlekłe** (rozpoczyna się po kilku miesiącach/ latach po transplantacji).

Mechanizmy odrzucania przeszczepu

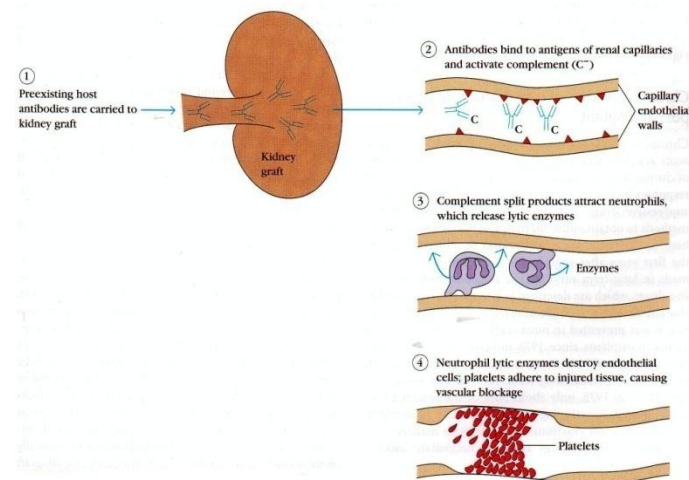


Nadostre odrzucanie

Nadostre odrzucanie charakteryzuje zakrzepowa niedrożność naczyń przeszczepu, która zaczyna się w ciągu minut/ godzin po zespoleniu naczyń krwionośnych do naczyń przeszczepu.

Spowodowane jest obecnością przeciwciał w krążeniu biorcy, które łączą się z antygenami śródbłonna dawcy.

Przylączenie przeciwciała do śródbłonna przeszczepu aktywuje układ dopełniacza. Przeciwciała i produkty aktywacji układu dopełniacza indukują szereg zmian w śródbłonku przeszczepu oraz aktywację płytek krwi, które prowadzą do zakrzepicy wewnątrznaczyniowej.

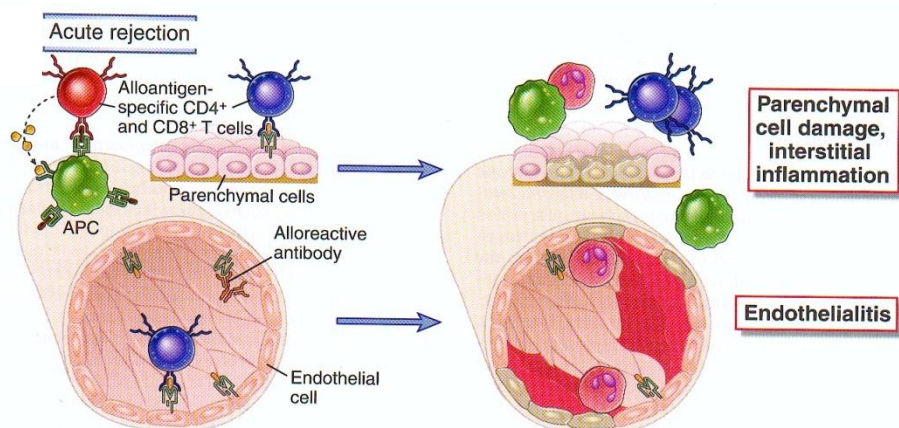


Mechanizmy odrzucania przeszczepu

Ostre odrzucanie

Ostre odrzucanie związane jest z uszkodzeniem naczyń i miększu przeszczepu nerki przez aktywowane limfocyty T i przeciwciała. Rozpoczyna się kilka dni-tygodni-lat po transplantacji.

Wyróżniono dwa typy ostrego odrzucania: **ostre odrzucanie komórkowe** i **ostre odrzucanie humoralne**.



Ostre odrzucanie komórkowe

Głównym mechanizmem jest zapalenie powodowane przez cytokiny produkowane przez limfocyty Th1 i Th17 oraz niszczenie komórek miększu i śródbłónka przez komórki CTL.

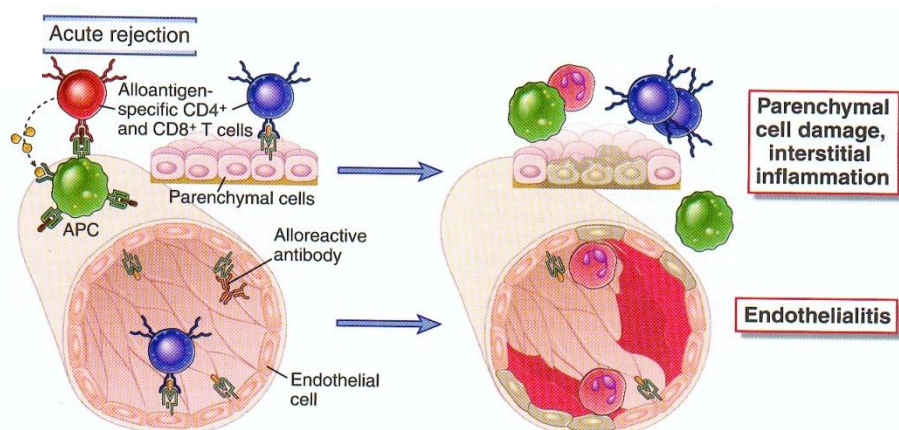
W obrazie histopatologicznym widoczne są limfocyty T CD4+ i CD8+CTL oraz makrofagi. Nacieki te mogą obejmować kanaliki, z towarzyszącą nekrozą kanalików naczyń krwionośnego oraz nekrozą ściany naczyń włosowatych i małych tętnic.

Mechanizmy odrzucania przeszczepu

Ostre odrzucanie

Ostre odrzucanie związane jest z uszkodzeniem naczyń i mięszu przeszczepu nerki przez aktywowane limfocyty T i przeciwciała. Rozpoczyna się kilka dni-tygodni-lat po transplantacji.

Wyróżniono dwa typy ostrego odrzucania: **ostre odrzucanie komórkowe** i **ostre odrzucanie humoralne**.



Ostre odrzucanie humoralne

Przeciwciała allogeniczne mogą powodować ostre odrzucanie przeszczepu przez łączenie się z alloantygenami (głównie HLA) na komórkach śródbłonka naczyniowego, powodując uszkodzenie naczyń i zakrzepicę wewnątrznacyniową, co prowadzi do niszczenia przeszczepu.

Przylączenie alloprzeciwciał do śródbłonka indukuje aktywację układu dopełniacza, co prowadzi do lizy komórek, napływu i aktywacji neutrofilów oraz tworzenia zakrzepu.

Alloprzeciwciała mogą również wiązać się z receptorem Fc na neutrofilach i komórkach NK, co powoduje niszczenie komórek śródbłonka.

Główne zmiany histopatologiczne to ostre zapalenie kłębuszków i wewnątrzewkowych kapilar.

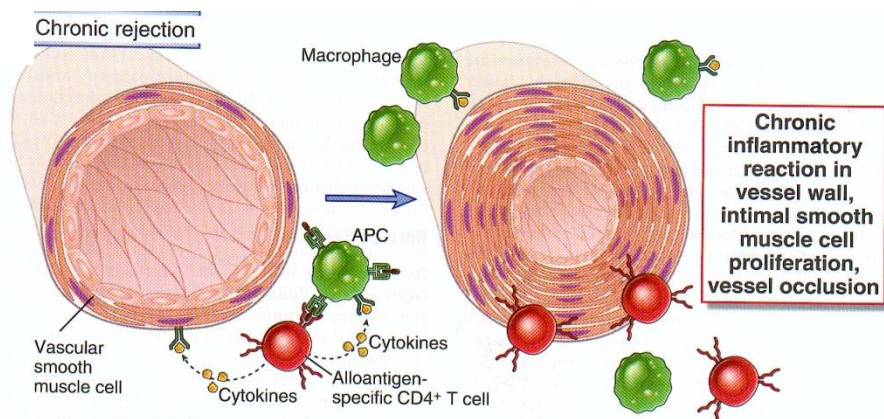
Mechanizmy odrzucania przeszczepu

Przewlekłe odrzucanie przeszczepu

Może rozwijać się w czasie miesięcy lub lat. Może być poprzedzone ostrym odrzucaniem. Przewlekłe odrzucanie różnych narządów może być związane z różnymi patologicznymi zmianami. W przypadku nerek i serca, przewlekłe odrzucanie jest związane z zamknięciem naczyń i śródmiąższowym zwłóknieniem.

Główne zmiany patologiczne w przewlekłym odrzucaniu przeszczepów unaczynionych to zamknięcie tętnicy, będące wynikiem proliferacji komórek mięśni gładkich błony (aktywowane limfocyty T wydzielają cytokiny, które stymulują proliferację komórek) i utraty przeszczepu w wyniku uszkodzenia niedokrwiennego.

Śródmiąższowe zwłóknienie, obserwowane w przewlekłym odrzucaniu, może być również odpowiedzią na uszkodzenie komórek mięszu powodowane przez powtarzające się ostre odrzucania, okołooperacyjnego niedokrwienia, działania toksycznego leków immunosupresyjnych i przewlekłych infekcji wirusowych.



Zapobieganie odrzuceniu przeszczepu

Typowanie tkankowe

Immunosupresja

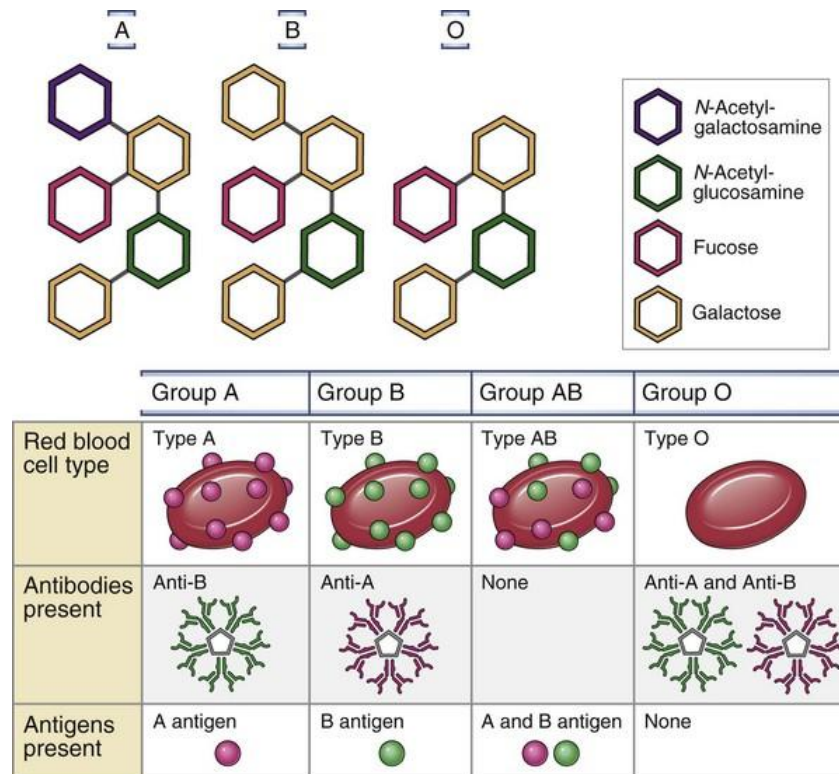
Tolerancja transplantacyjna

Typowanie tkankowe, dobór optymalnego dawcy i biorcy:

- **antygeny grupowe krwi AB0**
- **identyfikacja antygenów HLA**
- **próba krzyżowa- analiza przeciwciał w surowicy biorcy**

Antygeny grupowe krwi AB0

Antygeny te znajdują się na erytrocytach, komórkach nabłonkowych, komórkach śródbłónka.



W surowicy występują "naturalnie" przeciwciała skierowane przeciwko antygenom układu AB0 nieobecnym na krwinkach:

- przeciwciała **anty-A** występują u osoby z **grupą krwi B**
- przeciwciała **anty-B** występują u osoby z **grupą krwi A**
- przeciwciała **anty-A i anty-B** występują u osoby z **grupą krwi 0**

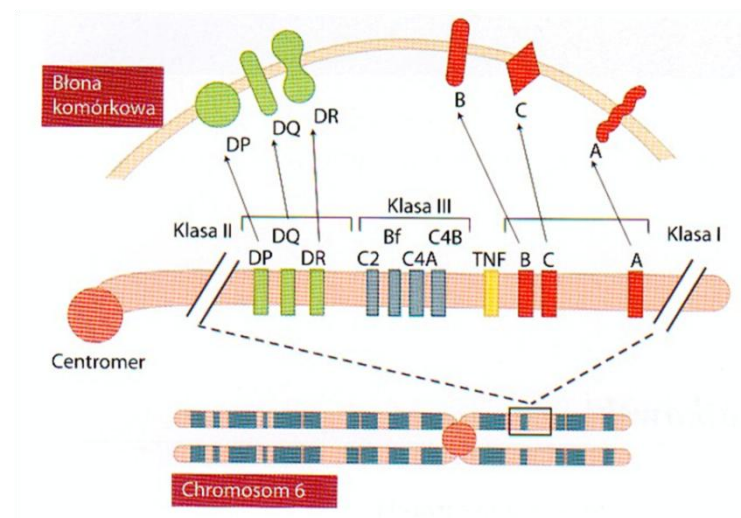
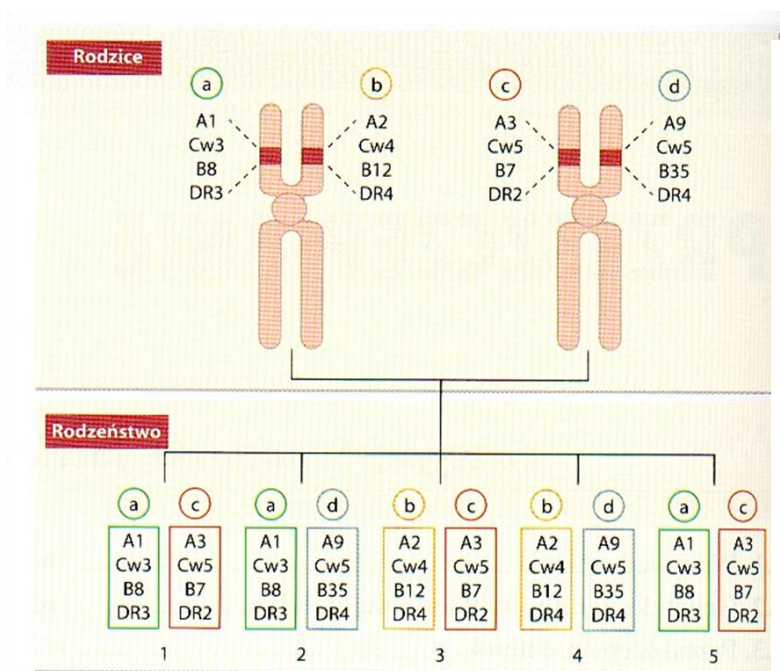
Powstają prawdopodobnie dzięki stymulacji powszechnie występującymi w przyrodzie związkami podobnymi do antygenów grupowych AB0.

Główny układ zgodności tkankowej człowieka

Cząsteczki odpowiedzialne za silne odrzucanie przeszczepu należą do głównego układu zgodności tkankowej – MHC (u człowieka nazywane HLA).

Silne antygeny zgodności tkankowej - cząsteczki MHC.

Słabe antygeny zgodności tkankowej - inne niż MHC, antygeny polimorficzne.



Przeszczepienie narządu rodzica dziecku daje 50% zgodności w zakresie HLA, natomiast między rodzeństwem już tylko 25% zgodności.

Haplotypy oznaczono jako a, b, c, d. Szansa, że obydwój z rodzeństwa będą mieli identyczne pary haplotypów wynosi 1:4.

Identyfikacja antygenów HLA

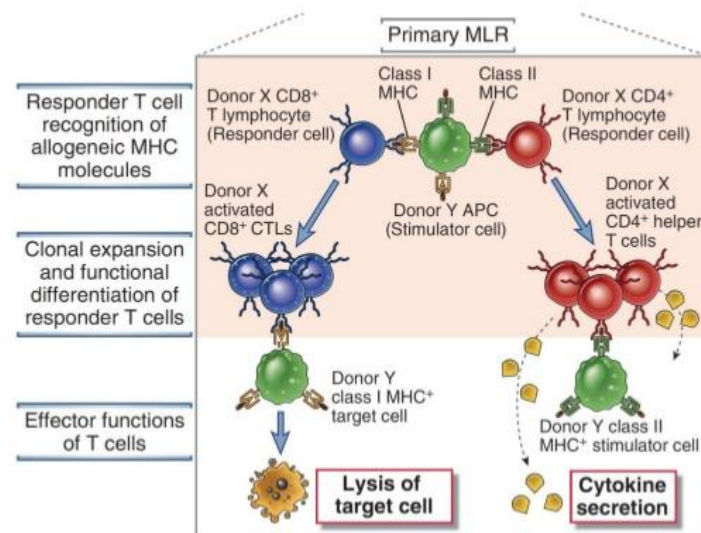
Metoda serologiczna. Typowanie HLA biorcy i dawcy przeszczepu wykonuje się stosując przeciwciała znakujące komórki.

W jednym z najczęściej stosowanych testów stosuje się przeciwciała cytotoksyczne (zwykle mAb) skierowane przeciwko poszczególnym HLA. Zasada testu opiera się na obecności antygenów HLA na powierzchni komórki. Do zawiesiny limfocytów B (na nich znajdują się antygeny HLA klasy I i II) dodawane są swoiste przeciwciała cytotoksyczne. Przyłączenie się przeciwciał do powierzchniowych HLA w obecności dopełniacza powoduje zabicie limfocyta B.

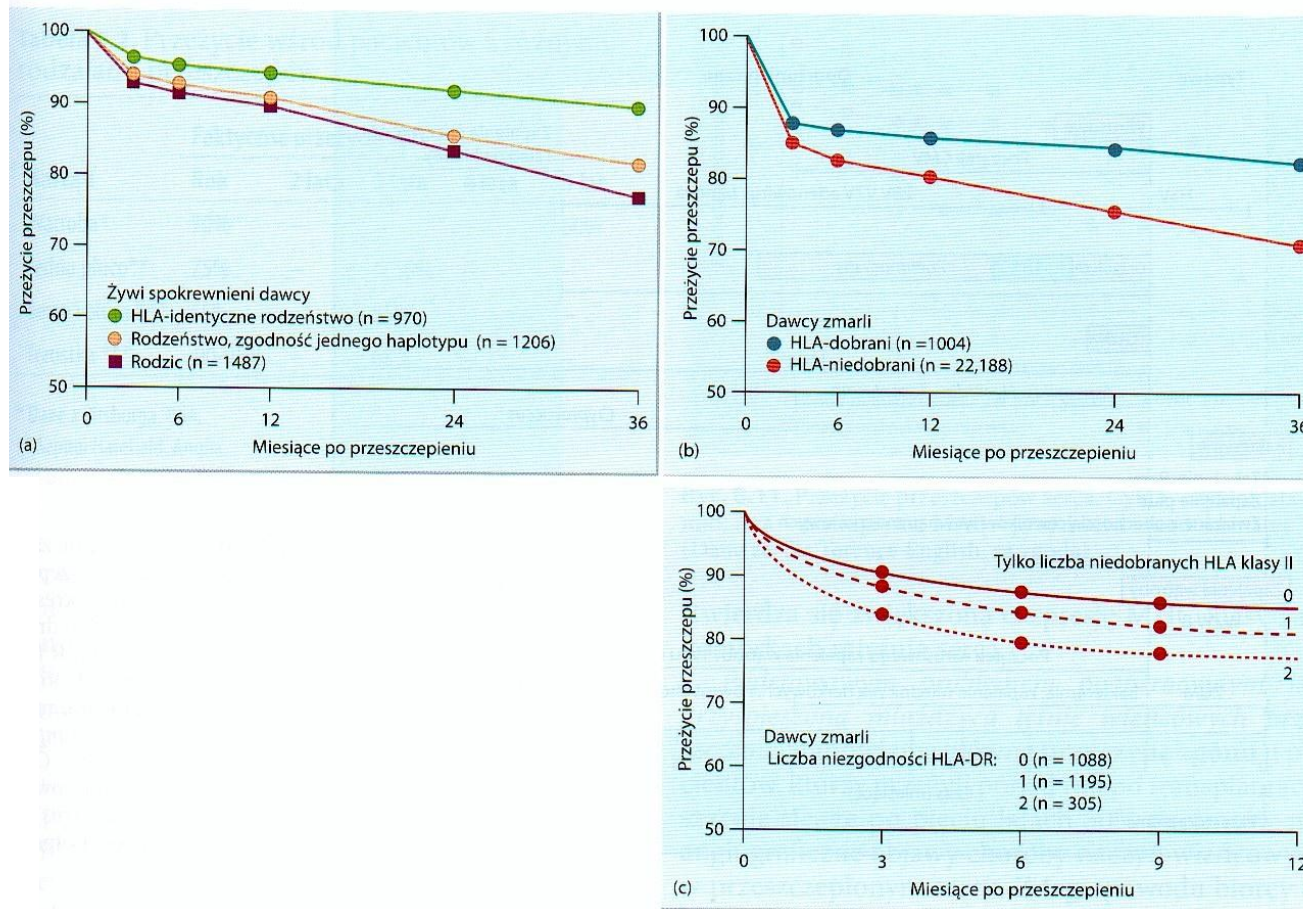
Wynik testu oceniany jest za pomocą mikroskopu. Stosując zestaw przeciwciał można określić większość antygenów HLA.

Metody molekularne. Wiele laboratoriów wykonujących typowanie tkankowe w celu oceny antygenów HLA stosuje metody biologii molekularnej. Opierają się one na polimorfizmie długości fragmentów restrykcyjnych (**RFLP**) oraz reakcji łańcuchowej polimerazy (**PCR**). W technikach tych określa się sekwencje nukleotydów genów dla HLA.

Typowanie tkankowe można również wykonywać stosując mieszaną hodowlę limfocytów (**MLC**), w której identyfikuje się głównie antygeny HLA-DR.

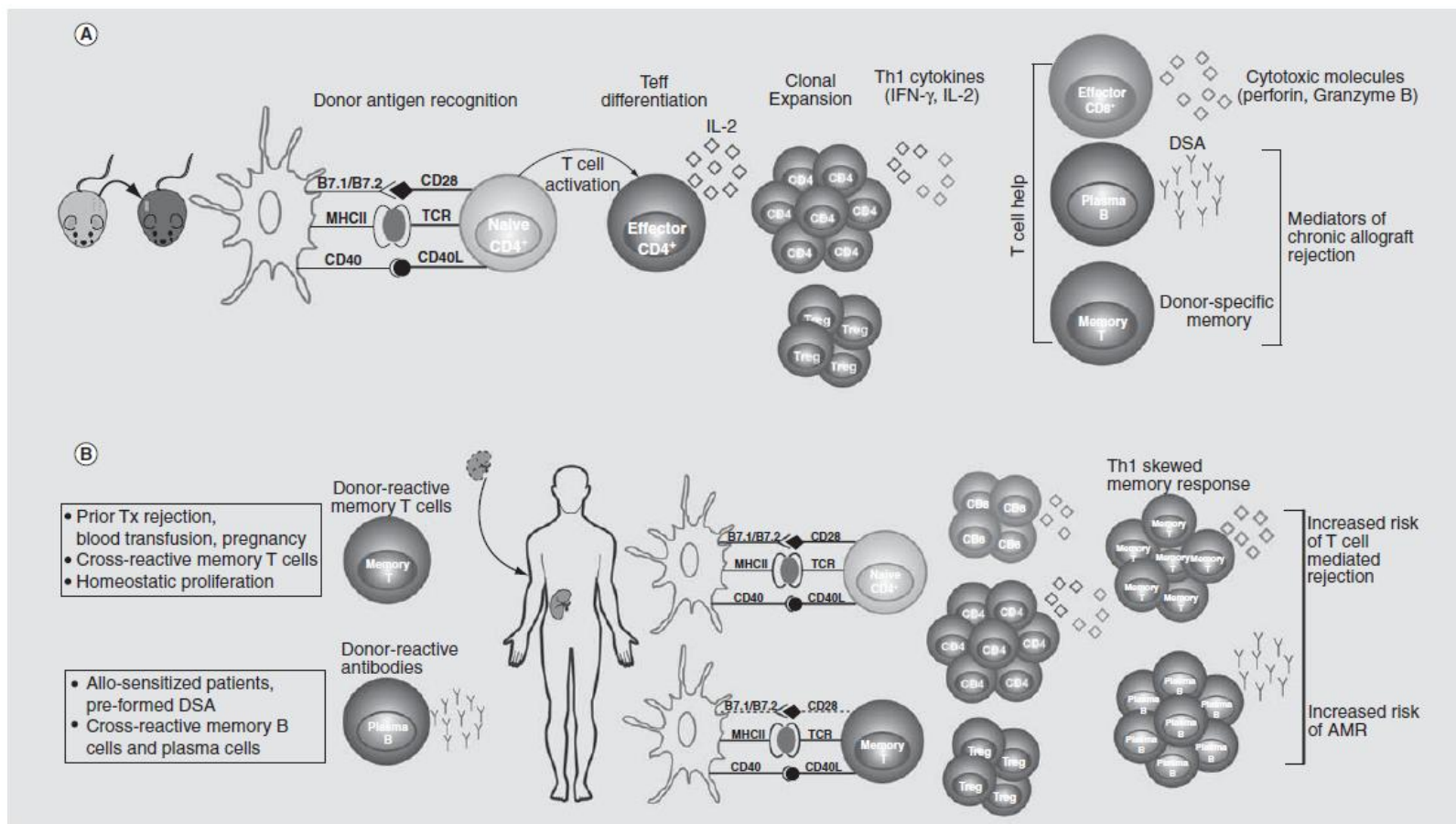


Wpływ doboru HLA na przeżycie alloprzeszczepów nerkowych



- (a) Wpływ doboru immunologicznego na przeszczepy od dawców żywych spokrewnionych.
- (b) Wpływ doboru immunologicznego na przeszczepy od dawców zmarłych.
- (c) Wpływ różnego stopnia niezgodności w zakresie HLA-DR na przeżycie przeszczepów od dawców zmarłych.

Odpowiedź immunologiczna na przeszczep allogeniczny



Govender L. et al. (2014) Expert Rev Clin Immunol, 10(9):1197-212.

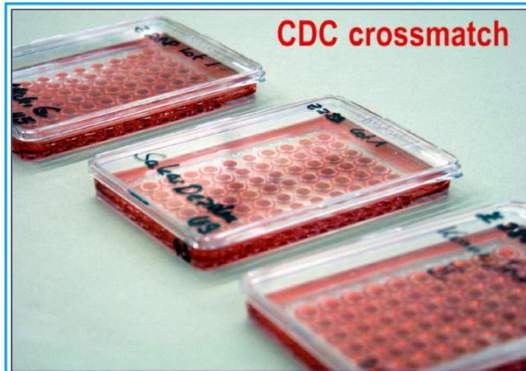
Przyczyny uczulenia antygenami HLA:

- transfuzje
- ciążę
- wcześniejsze transplantacje

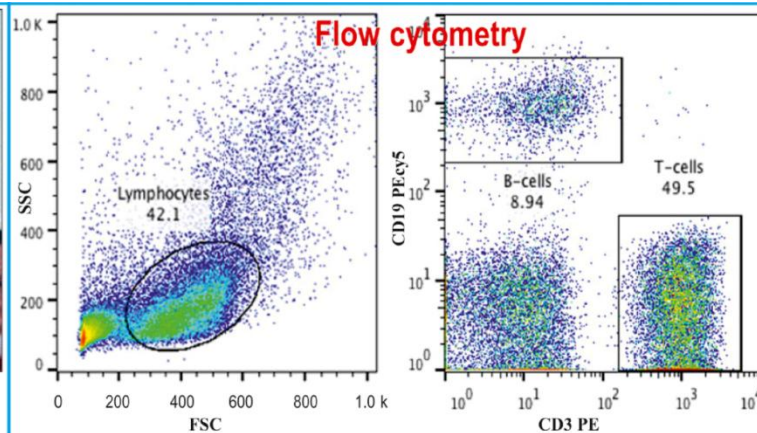
Odsetek reaktywności surowicy biorcy z panelem (**PRA**) jest miarą jego uczulenia antygenami HLA.

Próba krzyżowa

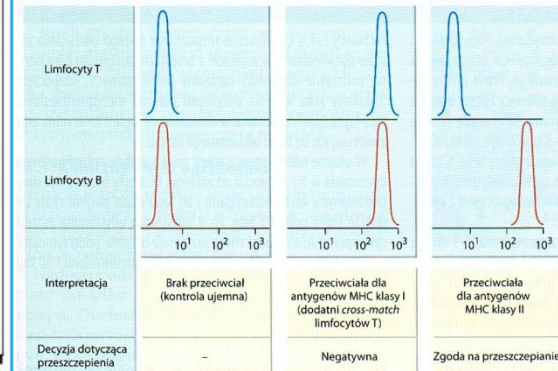
Próbkę krzyżową wykonuje się w celu sprawdzenia czy w surowicy biorcy znajdują się przeciwciała skierowane przeciwko cząsteczkom HLA dawcy.



- Low sensitivity and specificity
- No distinction between IgG and IgM antibodies
- False positivity due to the detection of non-HLA antibodies/autoantibodies or high background reading due to spontaneous cell death
- Cumbersome procedure; time-consuming
- Detection of complement-fixing antibodies only
- Dependent on cell surface expression of HLA antigen

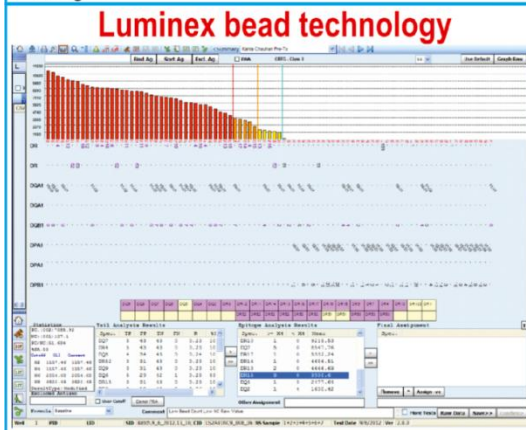


- More sensitive than CDC
- False positivity due to nonspecific binding of immunoglobulins to Fc receptors or detection of non-HLA antibodies
- Optimal channel shift an issue
- Difficult to standardize due to variability among cytometers, fluorochromes, antiglobulin reagents and variation in cell to serum ratio



Chapel H., Haeney M., et al., *Immunologia kliniczna*, 2009.

Schematyczne przedstawienie wykrywania przeciwciał w próbie krzyżowej (cross-match), wykonanej metodą cytometrii przepływowej u biorców przeszczepów nerek.



- Highly sensitive; semi-quantitative and enables precise definition of anti-HLA antibodies
- Detection and characterization of anti-MICA antibodies
- Lack of consensus on optimum MFI cut-offs
- Questionable utility as a stand alone test for antibody detection
- Problems of false positivity due to exposure to cryptic epitopes and reaction to denatured HLA molecules
- Problems of false negativity
- Remains susceptible to the interferences caused by substances inherent to serum or by exogenous substances
- Disparities in relative antigen quantity across the different bead formats and among different HLA molecules
- Do not cover the whole diversity of HLA alleles

Mehra N.K. et al. *Int J Immunogenetics*, 2016, 43:351-368.

Warunki powodzenia przeszczepienia nerki: kwalifikacja dawcy/biorcy.

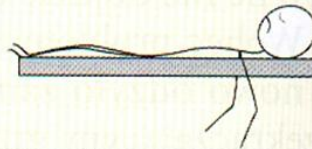
Od żywego spokrewnionego dawcy



- Dawca ma dwie czynne nerki
- Brak możliwości przeniesienia choroby
- Brak anomalii naczyń krwionośnych
- Stabilny stan psychiczny
- Bardzo dobry stan zdrowia

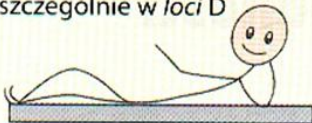
Od dawcy zmarłego

- Dobra czynność nerek
- Brak zakażenia (kliniczne objawy posocznicy, HIV)
- Wykluczenie złośliwej choroby nowotworowej lub choroby układowej (cukrzyca, nadciśnienie)
- Krótki czas ciepłego niedokrwienia



Kwalifikacja biorcy

- Zgodny w układzie AB0 (nieidentyczny)
- Ujemny *cross-match* surowicy z limfocytami T dawcy
- Dobór w układzie HLA – najlepszy z możliwych, szczególnie w *loci D*



Identyfikacja antygenów HLA:

- metoda serologiczna
- metody molekularne
 - PCR-SSP (sequence-specific priming)
 - PCR-SSOP (sequence-specific oligonucleotide probes)
 - sekwencjonowanie genomu.

Próba krzyżowa (*cross-match*):

- test mikrocytotoksyczny (CDC-XM)
- cytometria przepływowa
- Luminex.

Immunosupresja

Stan zmniejszonej lub zahamowanej odpowiedzi immunologicznej:

- eliminacja limfocytów
- zablokowanie krążenia limfocytów
- zablokowanie szlaków przekazywania sygnału.

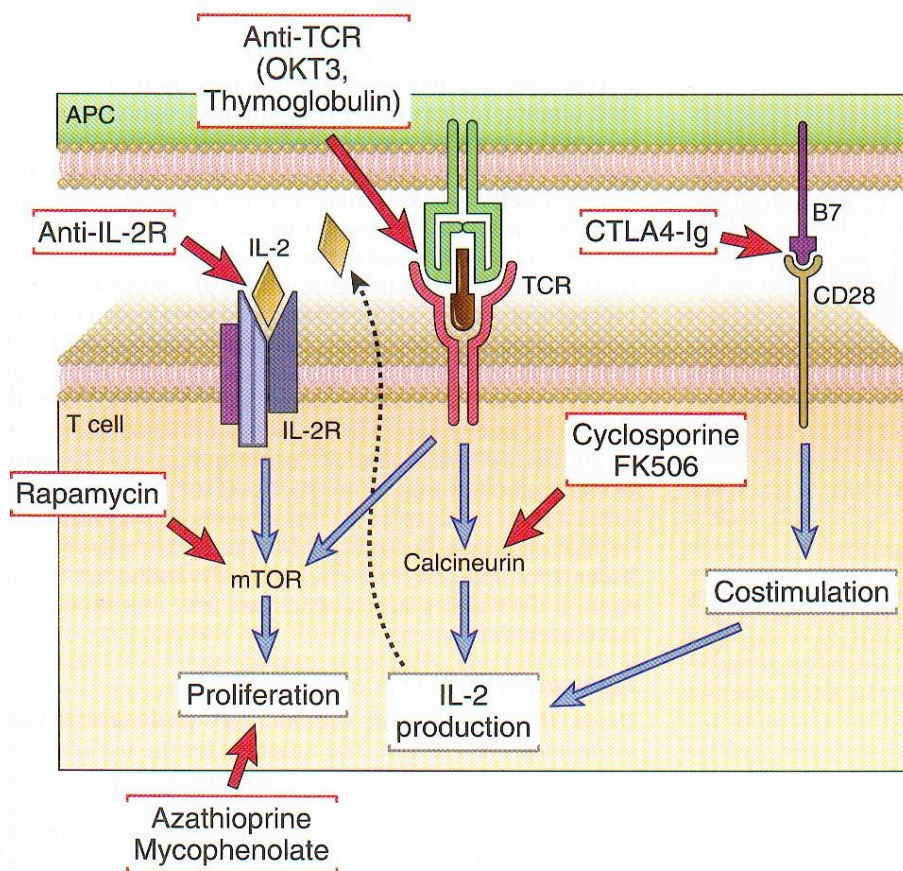
Ze względu na sposób wywoływania immunosupresję możemy podzielić na:

Fizyczną:

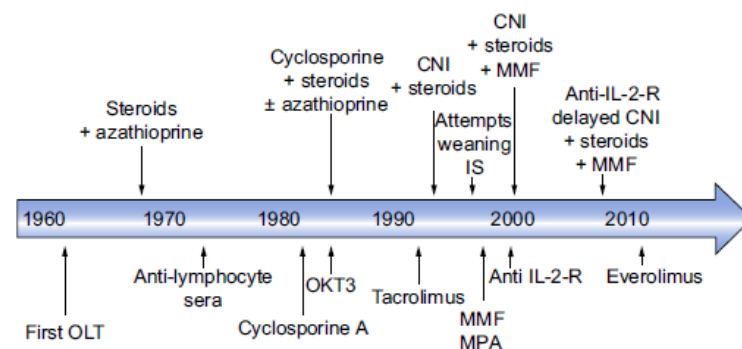
- operacyjne usunięcie niektórych narządów limfatycznych
- drenaż przewodu piersiowego
- napromieniowanie całego biorcy lub jego tkanki limfatycznej promieniami jonizującymi.

Farmakologiczną:

- glikokortykosteroidy
- inhibitory małocząsteczkowe (inhibitory kalcyneuryny, inhibitory kinazy mTOR, inhibitory syntezy DNA, inne)
- przeciwciała monoklonalne, poliklonalne, białka fuzyjne.



Abbas A.K. et al., Cellular and molecular immunology Ed 9th

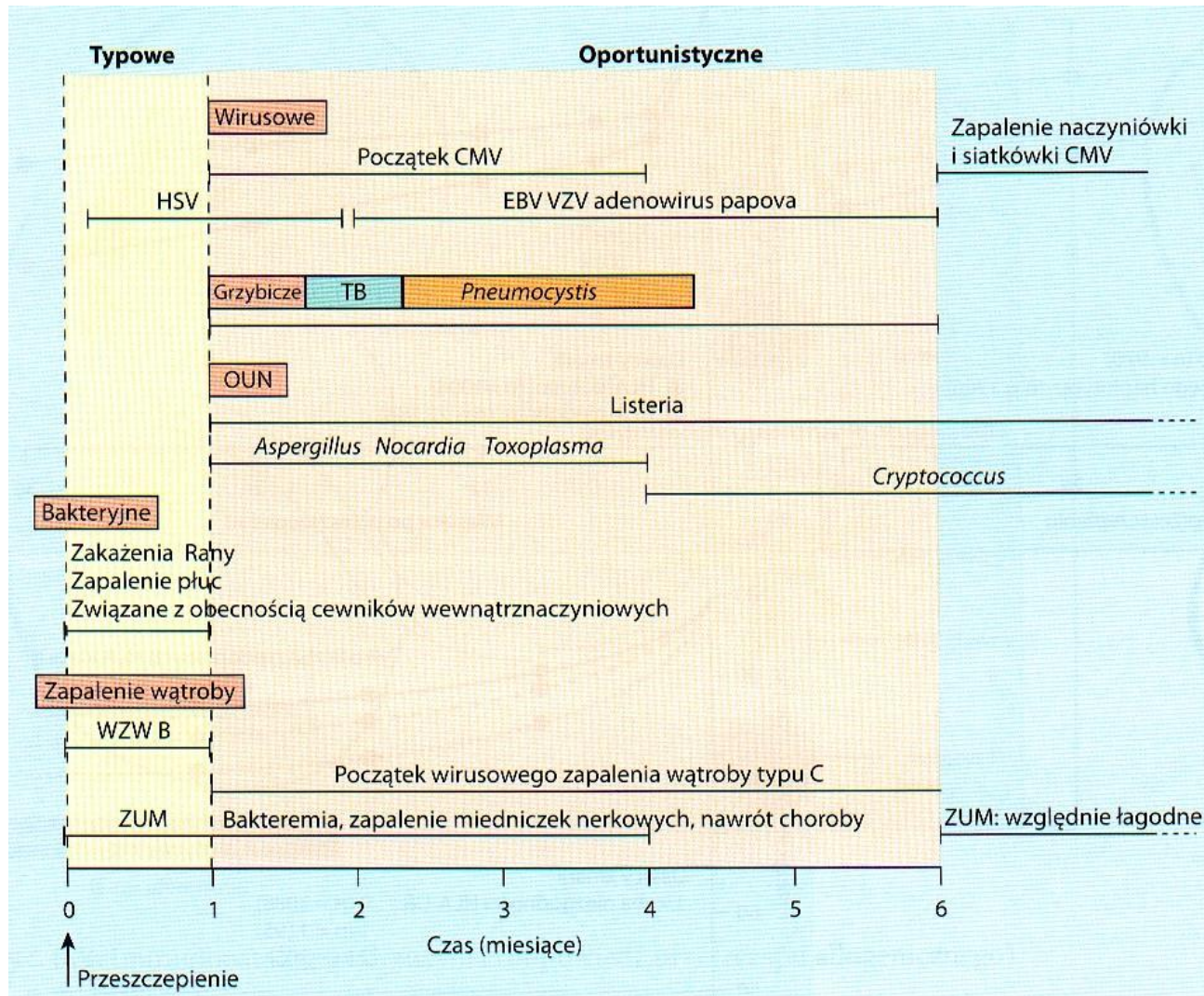


Adams D.H. et al. (2015) Journal of Hepatology, 62:S170-S185.

Efekty uboczne działań leków immunosupresyjnych:

- działanie nieswoiste, większa podatność na rozwój infekcji i nowotworów,
- inhibitory kalcyneuryny (nefrotoksyczność, neurotoksyczność, zaburzenia metaboliczne, nadciśnienie, rozwój cukrzycy, hiperlipidemia).

Występowanie zakażeń u biorców przeszczepów nerek w zależności od okresu po przeszczepieniu



ZUM- zakażenia układu moczowego
HSV (Herpes Simple virus)- wirus opryszczki
OUN- ośrodkowy układ nerwowy
VZV (Varicell-zoster virus)- wirus ospy wietrznej i półpaśca.

Tolerancja transplantacyjna

Czy osiągnięcie stanu tolerancji transplantacyjnej jest możliwe?

W celu zwiększenia długości i jakości życia chorych po transplantacji komórek i narządów, niezbędne jest ograniczenie terapii opartych na lekach immunosupresyjnych.

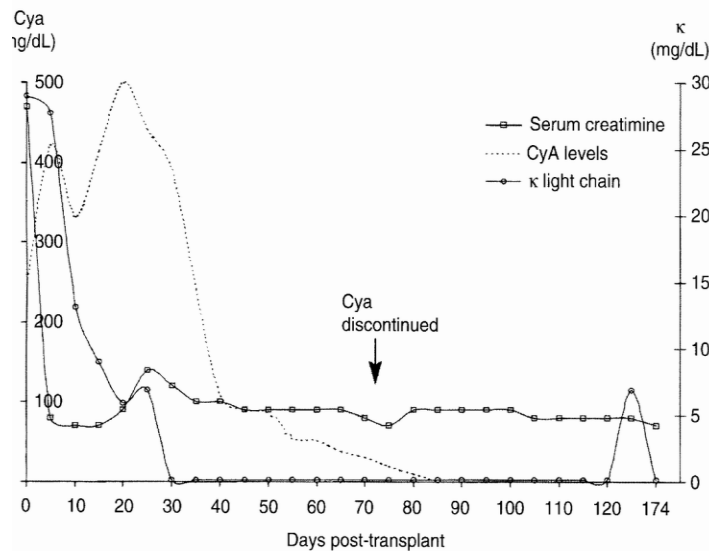


Fig. 2. Following combined bone marrow/renal transplantation, cyclosporine was discontinued at day 72, with maintenance of good renal transplant function and absence of light chain nephropathy, reflecting successful bone marrow transplantation as well. Reprinted from Spitzer, et al. Combined histocompatibility leukocyte antigen-matched donor bone marrow and renal transplantation for multiple myeloma with end stage renal disease: the induction of tolerance through mixed lymphohematopoietic chimerism. *Transplantation* 1999;68:480-484.

Immunological Reviews 196/2003

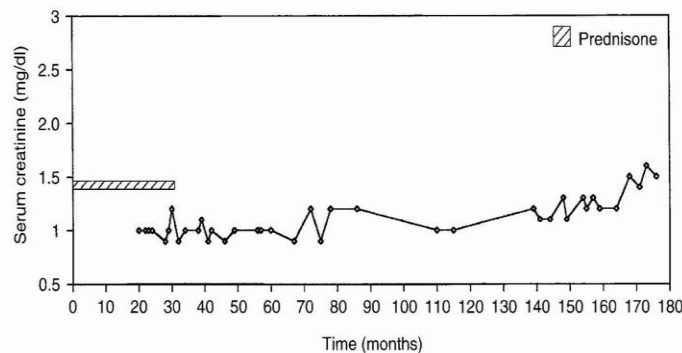


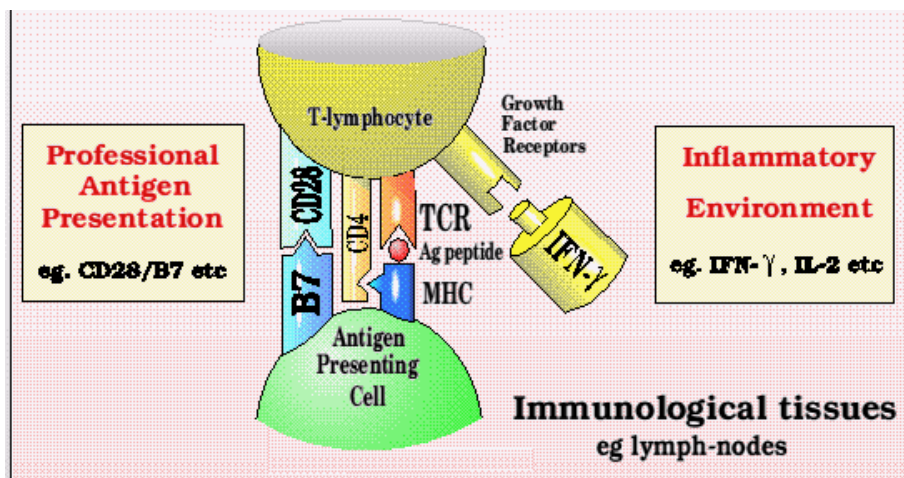
Fig. 5. More than 12 years following suspension of all immunosuppressive medications, this patient induced by total lymphoid irradiation maintains good graft function. Reprinted from

Strober, et al. Clinical transplantation tolerance twelve years after prospective withdrawal of immunosuppressive drugs: studies of chimerism and anti-donor reactivity. *Transplantation* 2000;69:1549-1554.

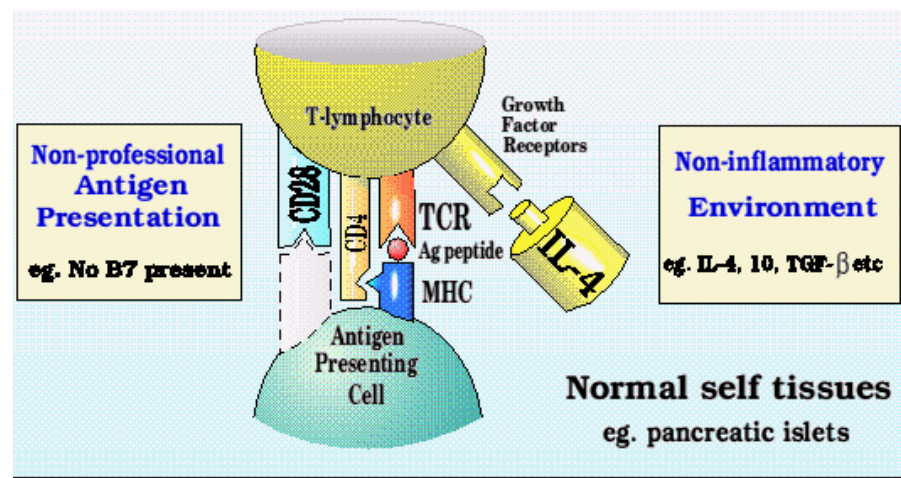
Przypadki wieloletniego przeżycia przeszczepu bez immunosupresji:

- niektórzy chorzy, u których odstawiono leki immunosupresyjne z powodów medycznych (przewlekłe infekcje wirusowe i nowotwory),
- niektórzy chorzy, którzy sami odstawili leki immunosupresyjne,
- niektórzy chorzy po transplantacji wątroby uczestniczący w programach odstawiania leków immunosupresyjnych,
- niektórzy chorzy po transplantacji nerki leczeni zgodnie z protokołami rozwoju tolerancji.

Aktywacja



Tolerancja



<http://users.path.ox.ac.uk/~scobbold/tig/tolg2.html>

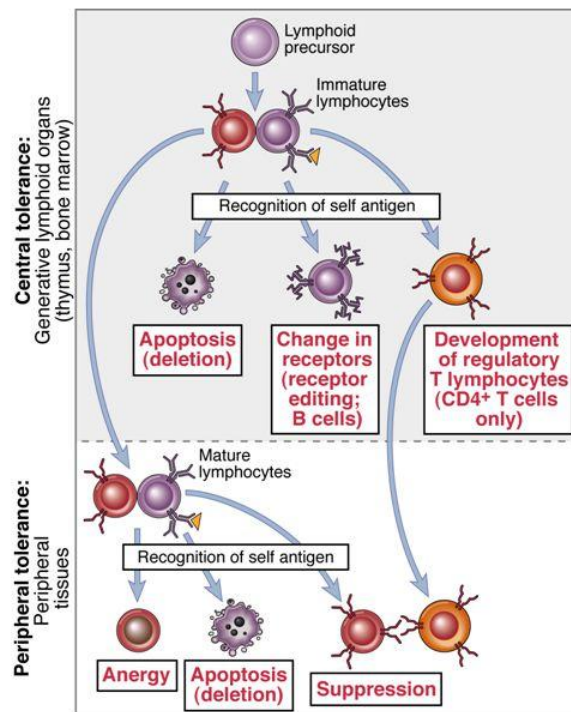
Główne czynniki decydujące o aktywacji bądź tolerancji

- Typ komórki prezentującej antygen
- Dostępność sygnałów kostymulujących
- Środowisko – obecność cytokin prozapalnych lub przeciwzapalnych
- Liczba limfocytów rozpoznających antygen
- Powinowactwo receptora do antygeny
- Stężenie antygeny
- Stadium różnicowania limfocytu
-

Tolerancja immunologiczna

- układ odpornościowy nie rozwija odpowiedzi immunologicznej tylko na określony antygen(y),
- odpowiedź immunologiczna na inne antygeny pozostaje prawidłowa,
- nie jest wymagana egzogenna immunosupresja.

Tolerancja centralna i obwodowa



From Abbas, Lichtman and Pillai. Cellular and Molecular Immunology 6th ed, 2007

Immunoregulacja: aktywny proces, w którym jedna populacja komórek kontroluje lub reguluje aktywność innej populacji.

Komórki regulatorowe:

- limfocyty T CD4+ (Treg, Th1, Th2, Th3, Tr1, Th17, Th9, Th22, Tfh),
- limfocyty CD8+ (CD8+CD28-, CD8+CD25+),
- komórki TCR+CD4-CD8-,
- komórki dendrytyczne (tol DC),
- komórki NKT,
- limfocyty Breg,
- makrofagi regulatorowe (Mreg),
- mieloidalne komórki supresorowe (MDSC)
- mezenchymalne komórki podścieliska (MSC).

Komórki regulatorowe kontrolujące odpowiedź immunologiczną na przeszczep (zapobieganie odrzucania przeszczepu, GVHD)

Limfocyty:

- limfocyty T CD4+
- limfocyty T CD8+
- limfocyty T CD4-CD8-
- limfocyty T $\gamma\delta$
- limfocyty B regulatorowe
- komórki NKT

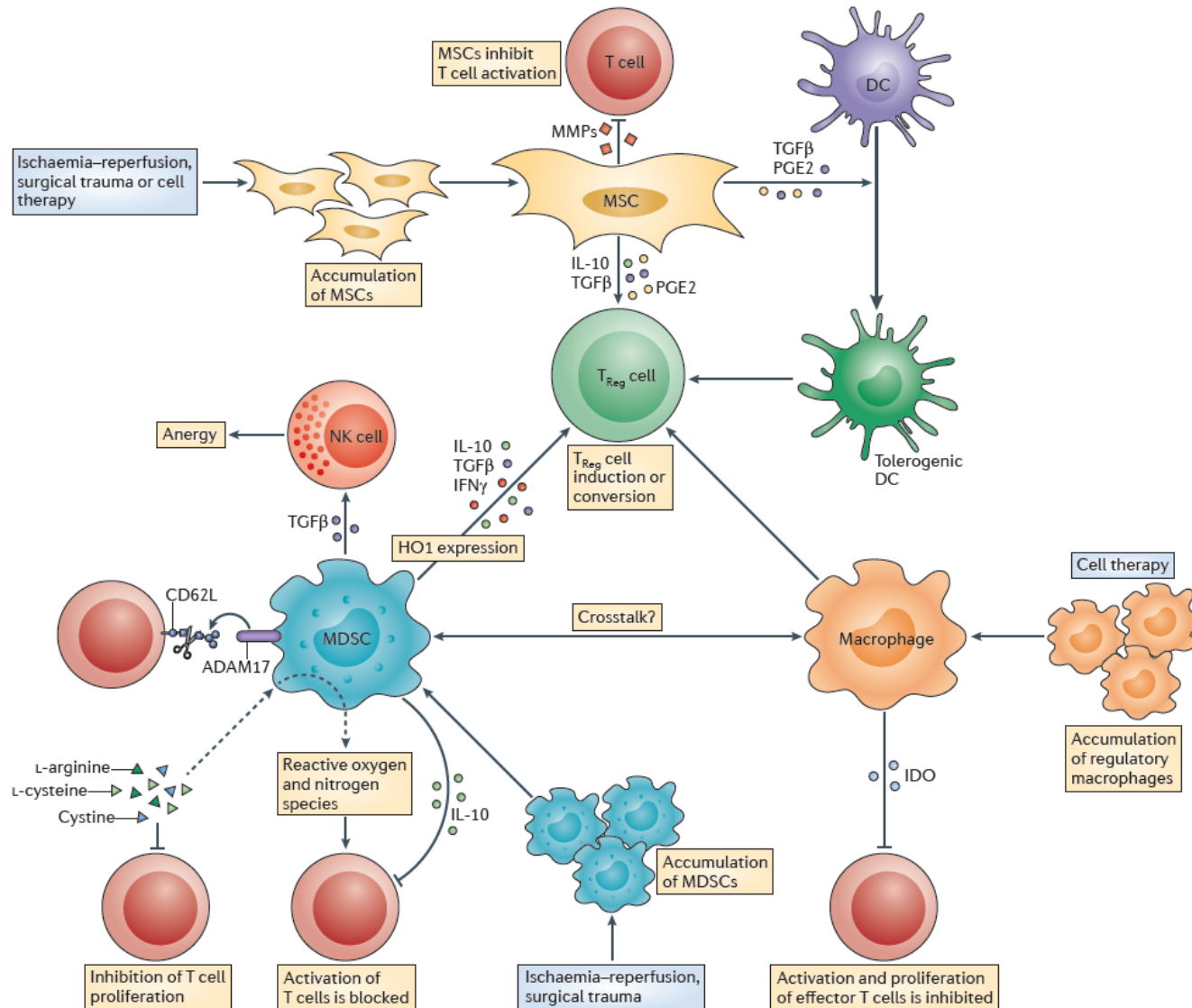
Makrofagi regulatorowe

Tolerogenne komórki dendrytyczne (tol DC)

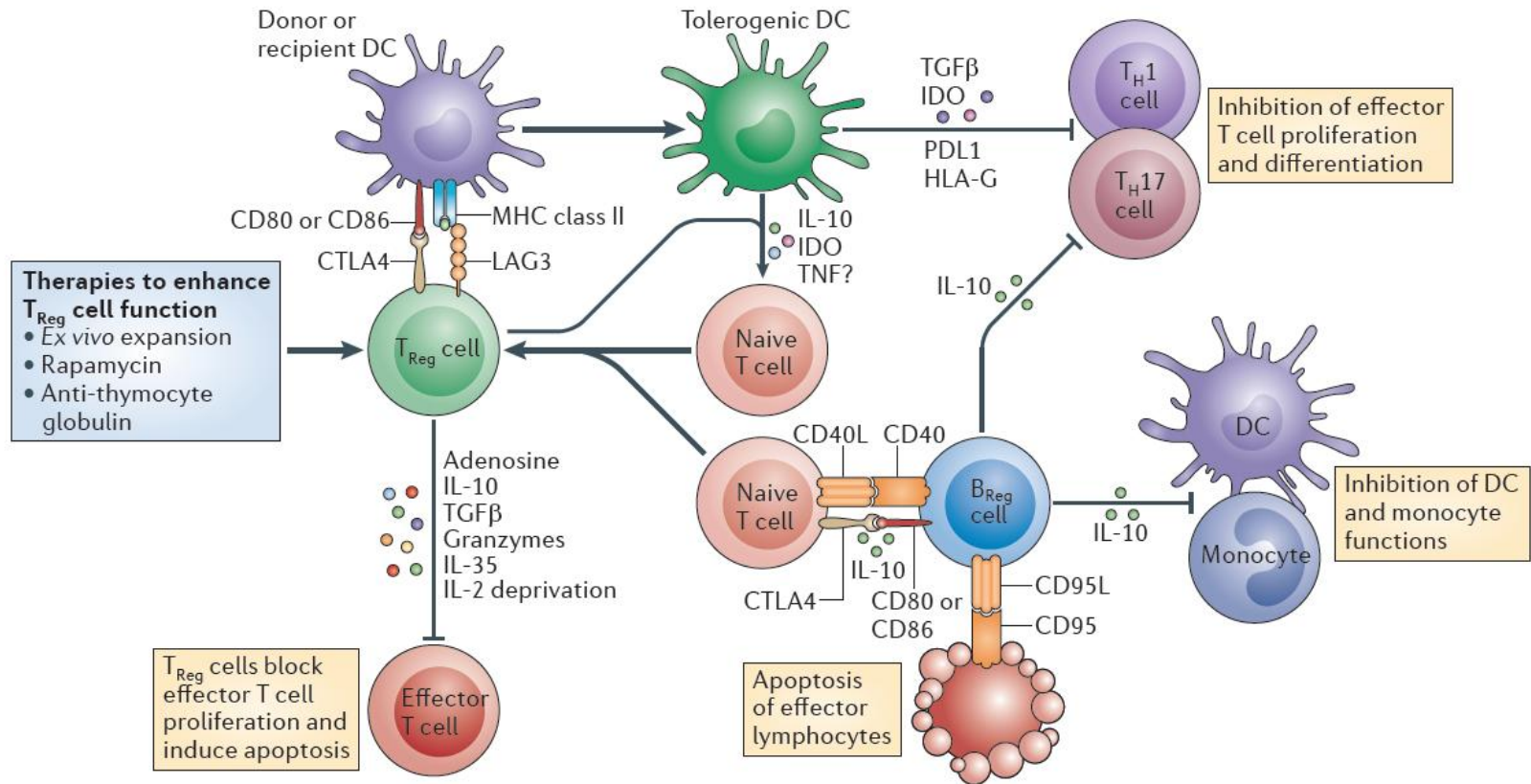
Mieloidalne komórki supresorowe (MDSC)

Mezenchymalne komórki podścieliska (MSC)

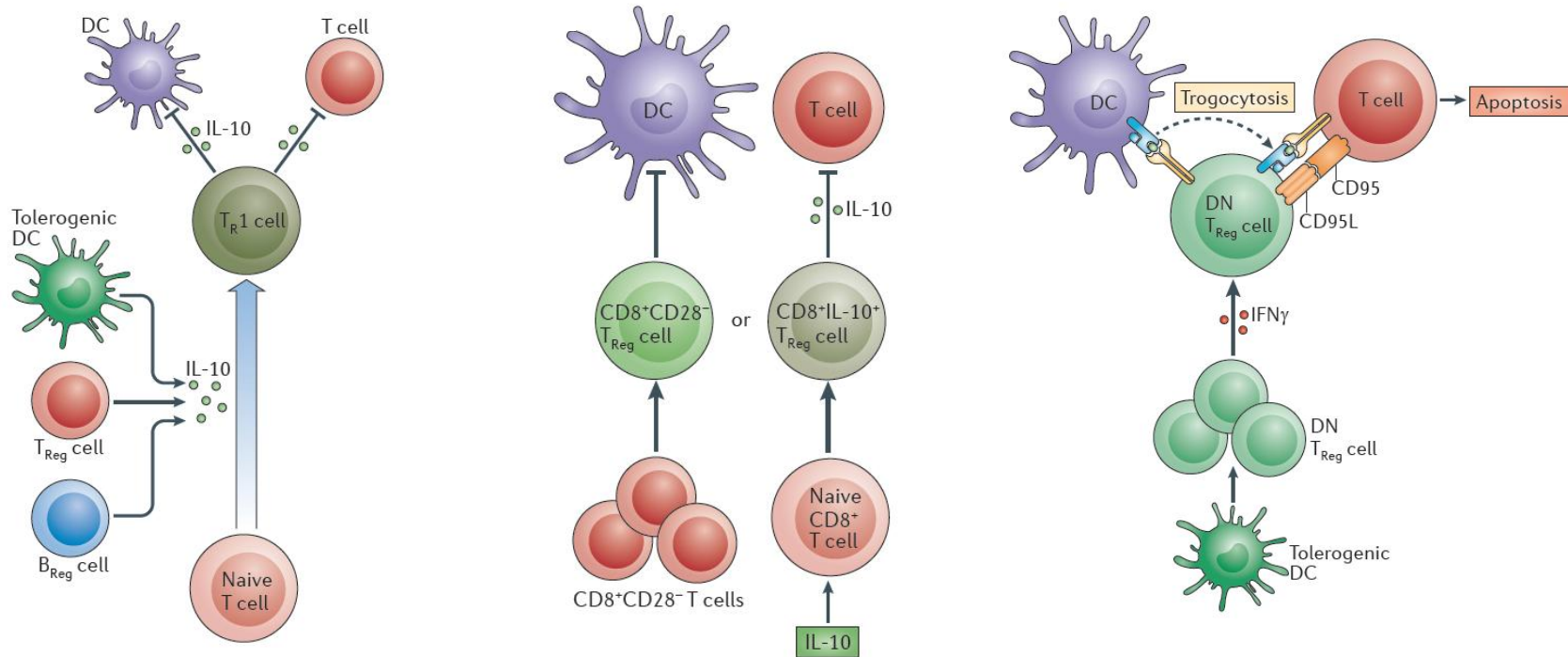
Komórki regulatorowe odporności wrodzonej w odpowiedzi na przeszczep



Komórki regulatorowe odporności nabytej w odpowiedzi na przeszczep



Komórki regulatorowe odporności nabytej w odpowiedzi na przeszczep



Tolerancja transplantacyjna, metody doświadczalne

- Tolerancja noworodkowa: podawanie antygenów transplantacyjnych przyszłego dawcy w życiu płodowym lub noworodkowym
- Podawanie antygenów transplantacyjnych do grasicy w celu wywołania delecji określonych klonów limfocytów T
- Podawanie antygenów transplantacyjnych drogą pokarmową w celu wywołania tolerancji pokarmowej
- Wywołanie mikrochimeryzmu przez napromieniowanie biorcy promieniami jonizującymi w dużej dawce i podanie mu komórek krwiotwórczych (np. szpik) przyszłego dawcy.

Kierunki rozwoju tolerancji transplantacyjnej w klinice

- **Eliminacja limfocytów T i B.**
- **Blokada sygnału kostymulacji.**
- **Rozwój mikrochimeryzmu.**
- **Stosowanie terapii komórkowej.**

Eliminacja limfocytów T i B

Terapia indukcyjna we wczesnym okresie po transplantacji, w celu hamowania ostrego odrzucania przeszczepu poprzez eliminację limfocytów (głównie T) swoistych dla alloantygenów:

- przeciwciało monoklonalne **Basiliximab** (Łączy się z łańcuchem α (CD25) receptora dla IL-2),
- przeciwciało monoklonalne **Alemtuzumab** (Łączy się z CD52, która ulega ekspresji na limfocytach T i B),
- **ATG** (przeciwciała skierowane przeciwko limfocytom T).

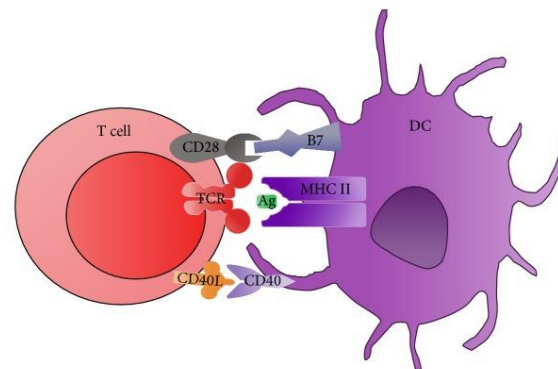
Rozwój tolerancji transplantacyjnej zachodzi w czasie odnawiania populacji limfocytów T.

Blokada sygnału kostymulacji

Przeciwciała monoklonalne:

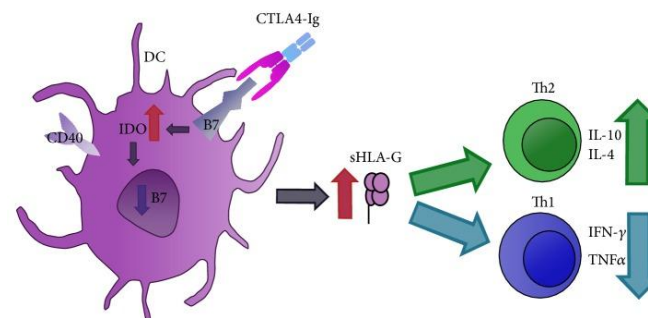
anti-CD80 (B7-1)

anti-CD86 (B7-2)



Białko fuzyjne:

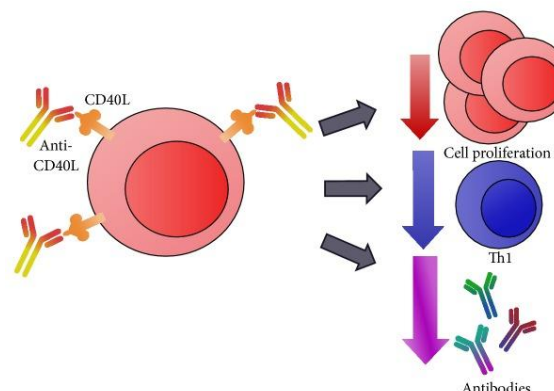
CTLA-4-Ig (belatacept)



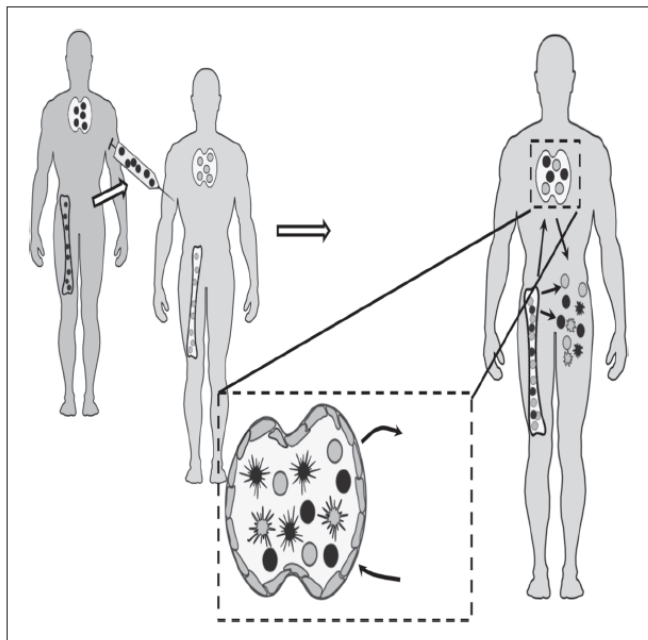
Przeciwciała monoklonalne:

anti-CD154 (anti-CD40L)

anti-CD40



Rzów mikrochimeryzmu

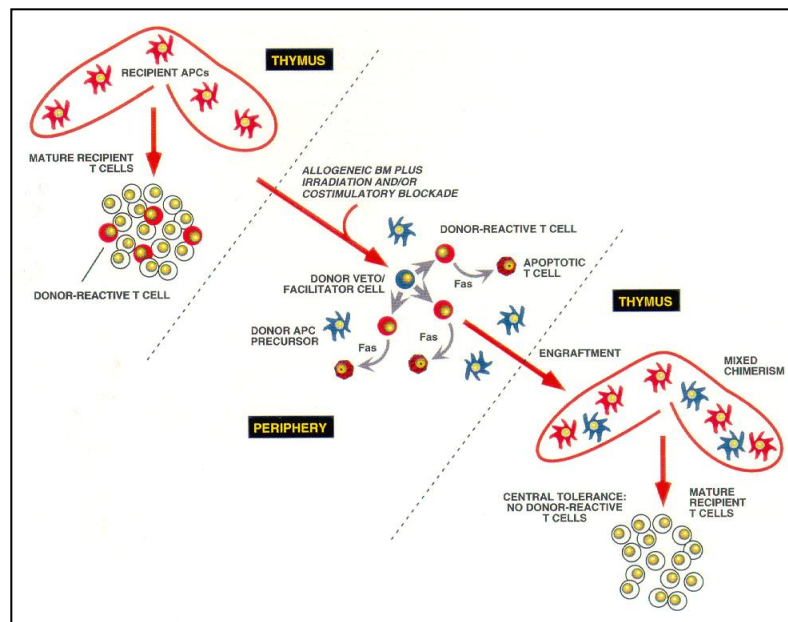


Chorym poddanym wcześniejszej terapii:

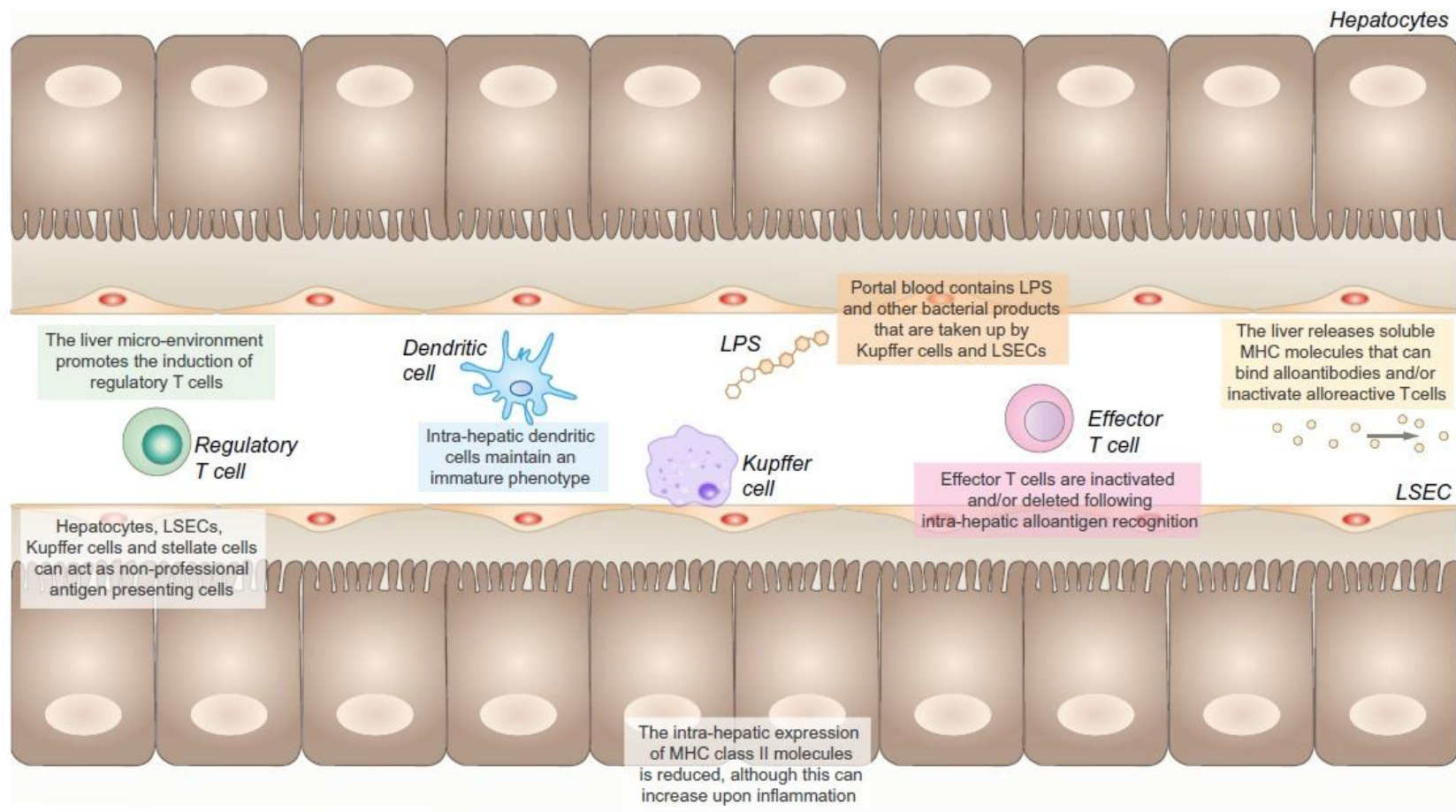
- mieloablacyjnej (całkowite zniszczenie hemopoezy biorcy za pomocą radioterapii lub chemioterapii),
- niemieloablacyjne przeszczepienie szpiku (podanie immunosupresji)

przeszczepiane są komórki szpiku dawcy narządu.

Następnie u biorcy wykonywany jest przeszczep narządu.



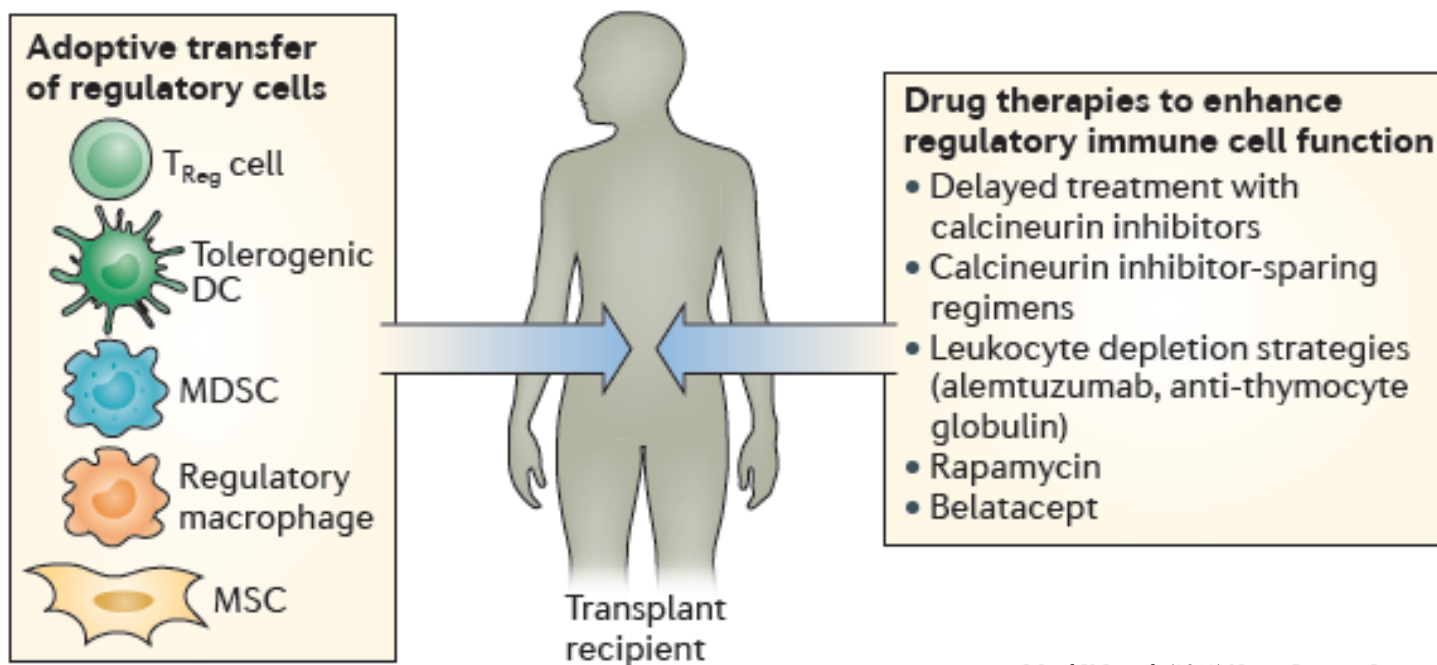
Tolerancja przeszczepu wątroby



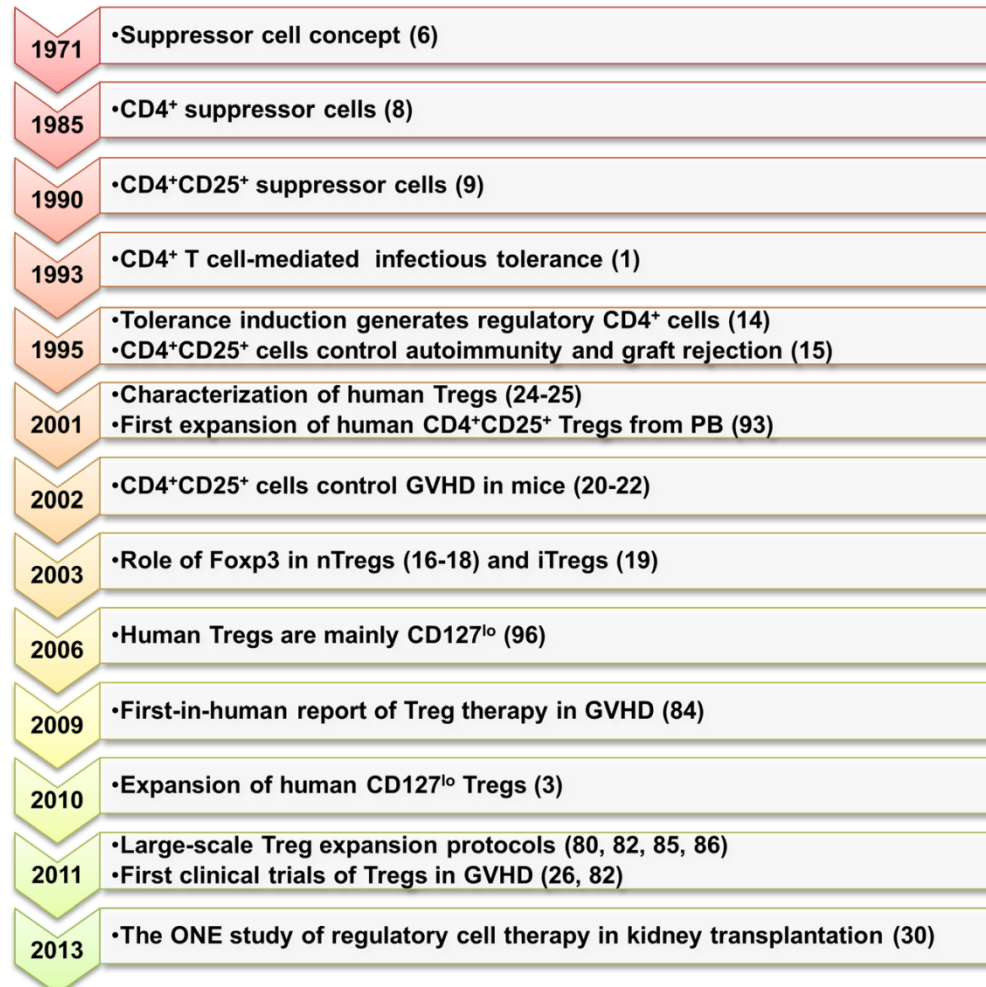
Terapia komórkowa

Obiecujące są terapie z udziałem komórek regulatorowych, które mogą pozwolić na obniżenie podawania leków immunosupresyjnych.

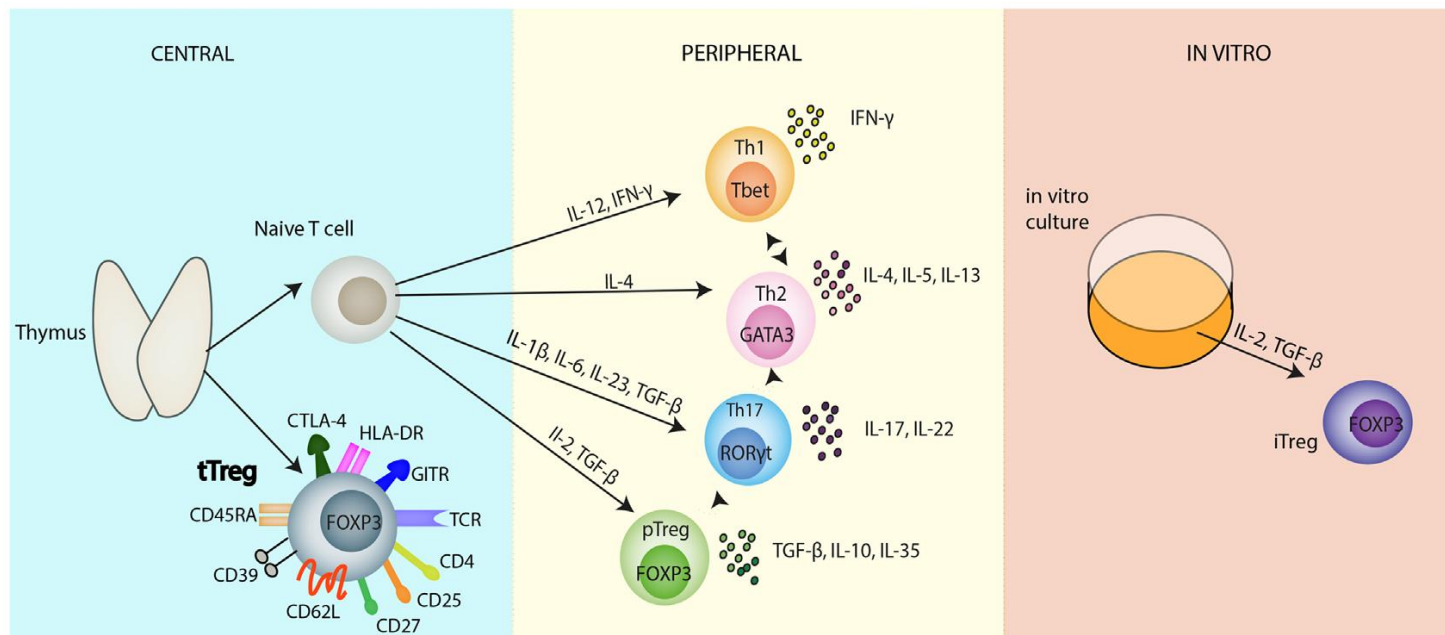
- adoptywny transfer komórek regulatorowych
- generowanie komórek regulatorowych *in vivo*.



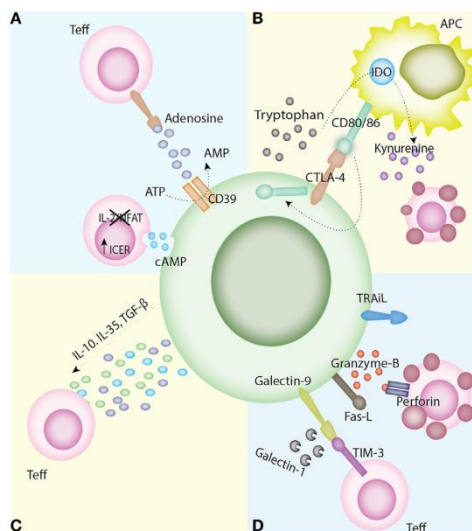
Bilingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. Nature, 1953, 172:603-606.



Limfocyty T regulatorowe (Treg)



CD4⁺CD25⁺⁺FOXP3⁺CD45RA⁺ (spoczynkowe Treg)
CD4⁺CD25⁺⁺⁺FOXP3^{high}CD45RA⁻ (aktywowane Treg)



Działanie supresyjne Treg:

- Zakłócanie szlaków metabolicznych
- Wpływ na dojrzewanie i funkcję komórek APC
- Synteza cytokin supresyjnych
- Indukowanie apoptozy komórek efektorowych

Wykorzystanie limfocytów Treg do celów terapeutycznych

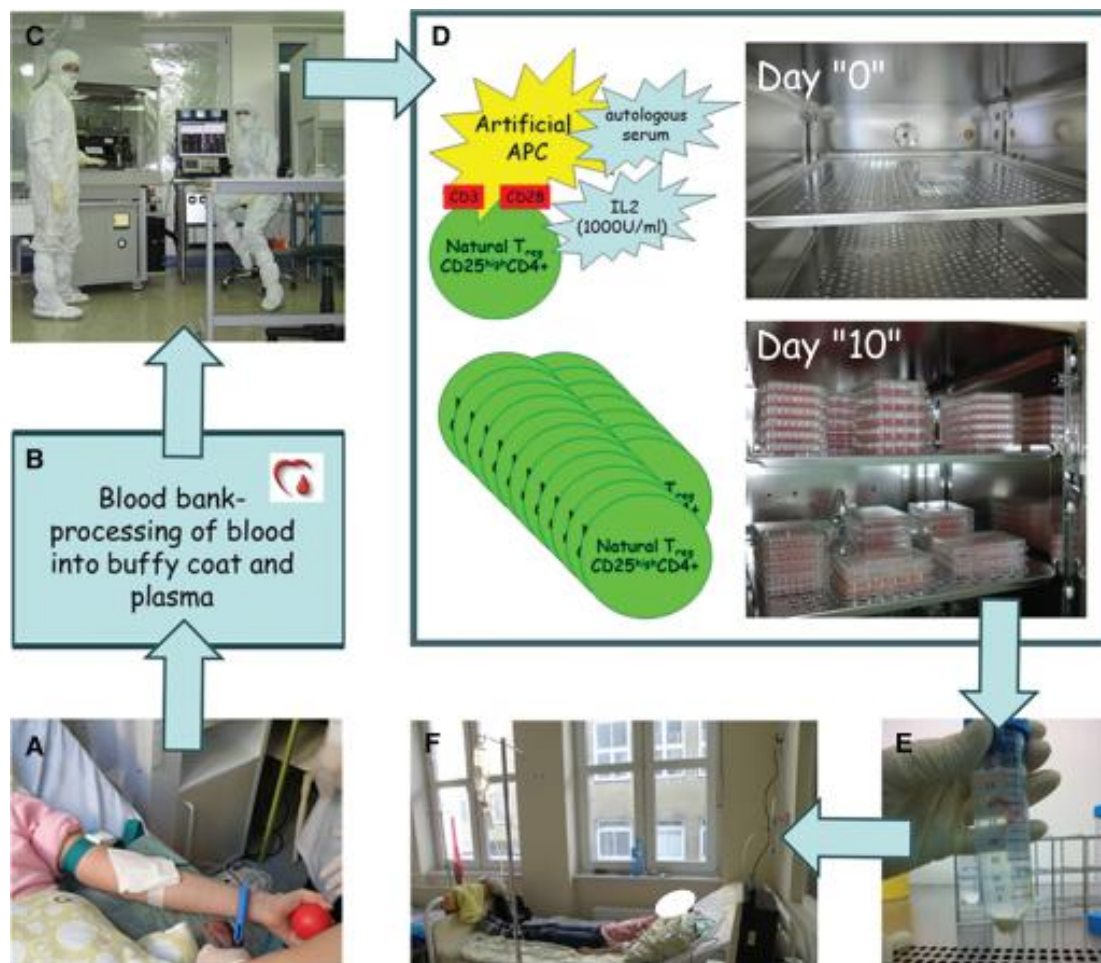
- Indukowane alloantygenem iTreg

Limfocyty T biorcy stymulowane są allogenicznymi komórkami APC dawcy (suboptymalna aktywacja DC, niska ekspresja TCR, IL-2, TGF- β , kwas retinowy, rapamycyna).

- Poliklonalna ekspansja nTreg

Zwiększa się *ex vivo* liczebność nTreg biorcy, izolowanych z krwi obwodowej i podaje dożylnie biorcy przeszczepu.

Przygotowanie limfocytów Treg do celów terapeutycznych



Cząsteczki pozwalające na izolację limfocytów Treg do celów terapeutycznych:

CD4
CD25^{high}
CD127^{low}
FOXP3

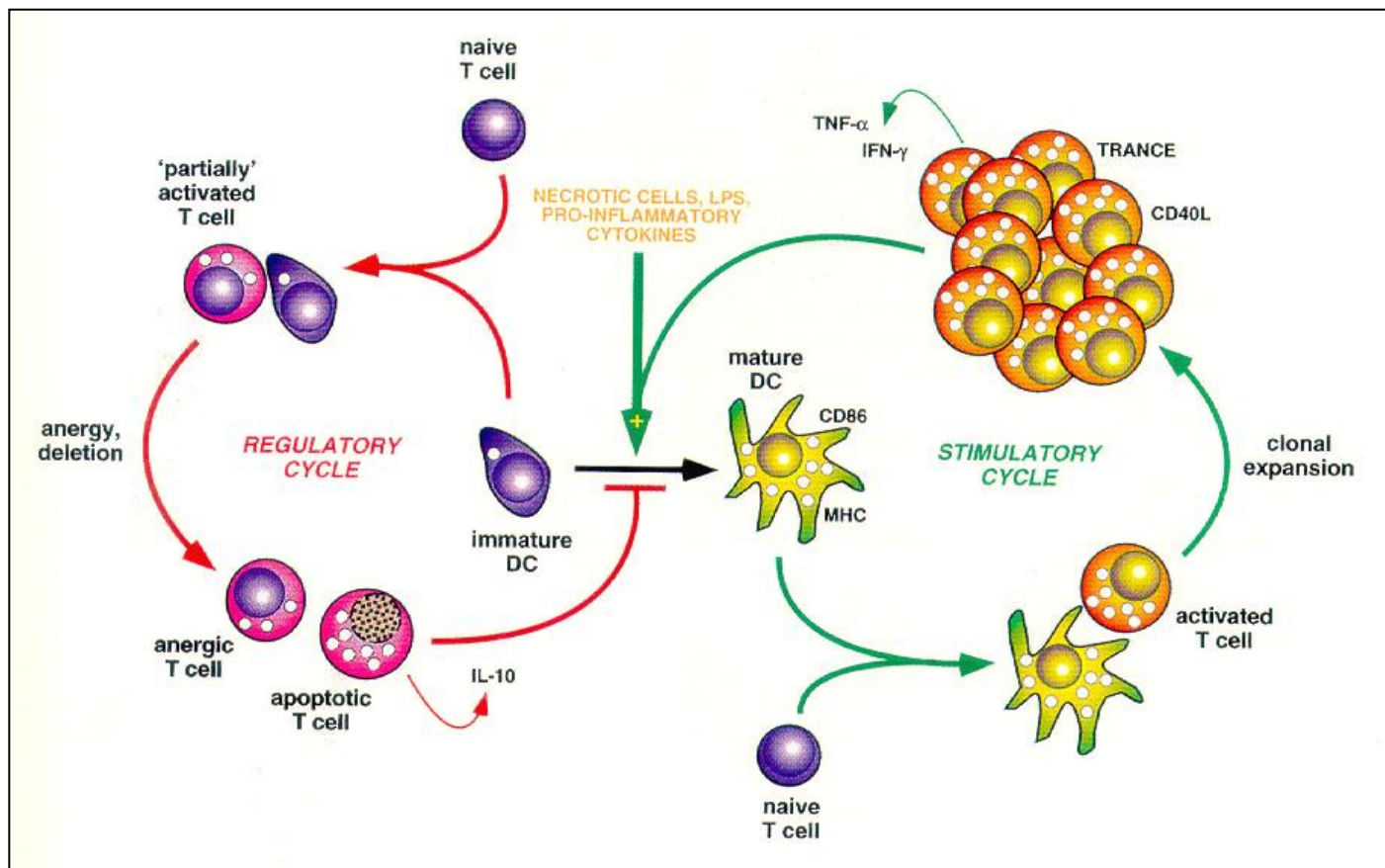
Marek-Trzonkowska N. et al. (2013) Pediatric Diabetes, 14:322-332.

nTreg są namnażane w odpowiednich laboratoriach, zgodnie z obowiązującymi protokołami, po usunięciu limfocytów T CD8⁺ i zwiększeniu liczby CD25⁺ (stymulacja za pomocą kulek opłaszczonych przeciwciałami anti-CD3/anti-CD28 w obecności rekombinowanej IL-2).

Do środowiska dodawany jest sirolimus (rapamycyna) w celu obniżenia wzrostu komórek innych, niż limfocyty T.

Komórki dendrytyczne (DC)

Apoptotyczne i będące w anergii limfocyty T hamują dojrzewanie komórek dendrytycznych (hamują ekspresję cząsteczek MHC oraz kostymulujących) prowadząc do rozwoju stanu tolerancji



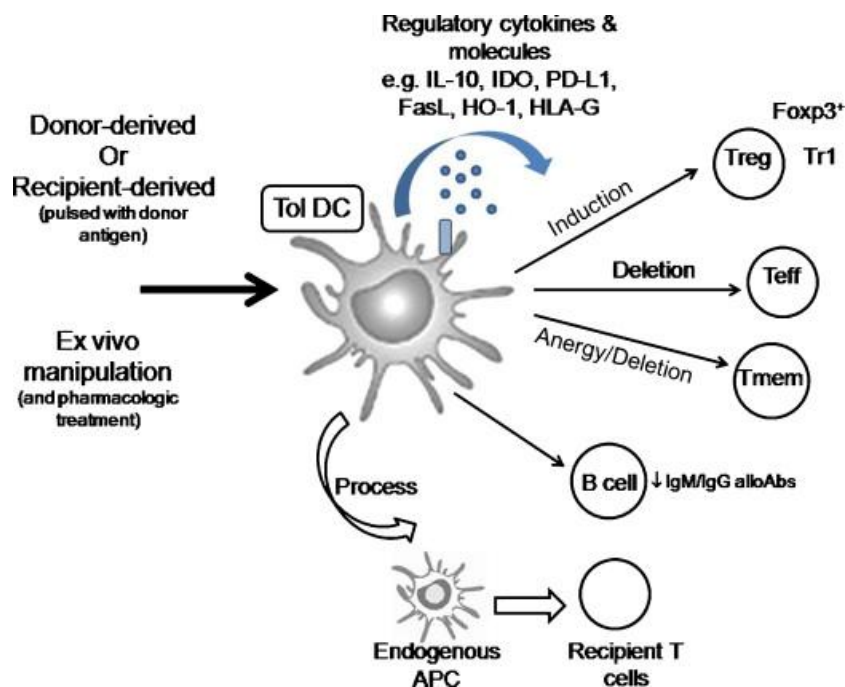
- **mieloidalne DC (mDC):** Lin⁻/MHCII⁺/CD11c⁺/CD123⁻ (IL-3R α)/BDCA-1⁺

W reakcji zapalnej, po aktywacji receptorów TLR, po pochłonięciu antygeny (patogenów, allo-Ag) mDC migrują do wtórnych narządów limfatycznych i indukują odpowiedź swoistą.

- **plazmacytoidalne (pDC):** Lin⁻/MHCII⁺/CD11c⁻/CD123⁺/BDCA-2⁺ i Ig-like transkrypt 7⁺

pDC rozpoznają kwasy nukleinowe (mikroorganizmów i własne) i syntetyzują IFN- α .

Tolerogenne komórki dendrytyczne (tolDC) w terapii



Oslabienie zdolności komórek APC (głównie komórek DC) do stymulowania limfocytów T:

- strategie generowania niedojrzałych „tolerogennych” DC
- działanie czynników farmakologicznych (rapamycyna, dexametazon, witamina D3)
- inkubacja DC z IL-10 i TGF- β

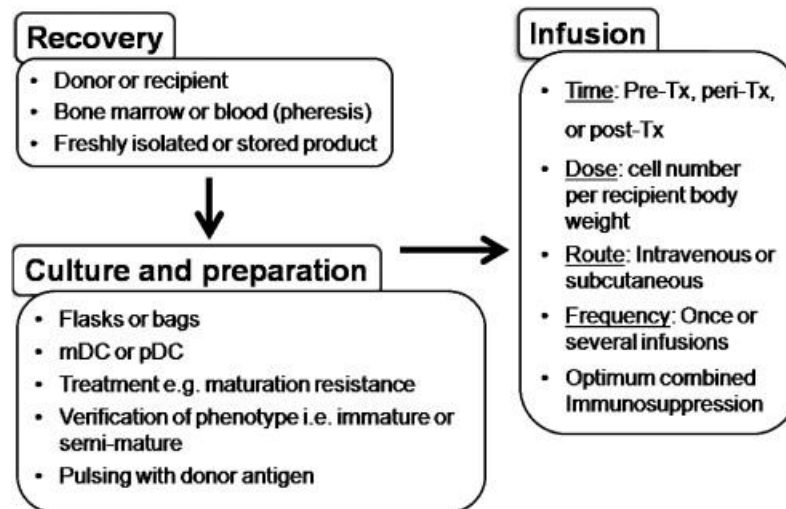


Table 2. Use of regulatory cell therapy in transplantation

Cell type	Cell product	No. pat	Clinical condition	Outcome	Center	
GVHD, graft versus host disease; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; IS, immunosuppressive drugs; TAIC, transplant acceptance-inducing cells; UCB, umbilical cord blood; UCBT, umbilical cord blood transplantation.						
Hematopoietic stem cell transplantation						
Treg	Sorted and expanded donor Treg	2	GVHD treatment; bone marrow (pat 1) or HSCT (pat 2) from HLA-matched sibling	Pat 1 reduction in IS, pat 2 temporary clinical improvement	Gdańsk	
Treg	CliniMACS isolated third party UCB-derived and expanded Treg	23	GVHD prevention; double UCBT	A decrease in the incidence of acute GVHD	Minnesota	
Treg	Freshly isolated (CliniMASC) donor Treg	28	GVHD prevention; HLA-haploidentical HSCT; cells infused at the time of HSCT without additional IS	Improved immunoreconstitution with low incidence of GVHD	Perugia	
Treg	Freshly isolated donor Treg	9	SCT; cells infused after cessation of GVHD prophylaxis	Ongoing; Therapy appears safe and feasible	Regensburg	
Tr1	Alloantigen-specific donor Tr1	12	GVHD prevention; HLA-haploidentical HSCT	Ongoing; Therapy appears safe and feasible	Milan	

Cell type	Cell product	No. pat	Clinical condition	Outcome	Center
Kidney transplantation					
TAIC	Donor TAIC	1	Deceased-donor	Safe and feasible; reduction in IS to low-dose tacrolimus monotherapy	Kiel/Regensburg
TAIC	Donor TAIC	12	Deceased-donor	Safe and feasible; reduction in IS but no clear clinical benefit	Kiel/Regensburg
TAIC	Donor TAIC	5	Living-donor	In 4/5 pat IS minimization to low-doses tacrolimus, but increased incidence of acute rejection	Kiel/Regensburg
Mreg	Donor Mreg	2	Living-donor	Both patients tapered to low-dose tacrolimus within 24 weeks after transplantation and maintained stable graft function at 3 years post tx	Regensburg

Treg	CliniMACS isolated, recipient Treg, expanded with rapamycin	4×10	Living-donor	Recruiting	London Oxford Berlin Regensburg
Treg	Allontigen-reactive Treg	10	Living-donor	Recruiting	San Francisco
Tr1	Alloantigen-specific donor Tr1	10	Living-donor	Recruiting	Milan
Mreg	Donor Mreg	10	Living-donor	Recruiting	Regensburg
TolDC	Recipient GM-tolDC generated with low-dose GM-CSF	10	Living-donor	Recruiting	Nantes

Pacjenci leczenia Treg muszą otrzymywać wcześniej immunosupresję farmakologiczną.

Pytania związane z wykorzystaniem limfocytów Treg w terapii:

- liczba,
- czas podania (zależnie od stosowanej terapii immunosupresyjnej)
- jedna dawka czy więcej,
- nTreg czy iTreg,
- Teff ↔ Treg,
- jak długo przed transplantacją należy rozpocząć procedurę przygotowania Treg (zależnie czy będą to nTreg czy iTreg, czy zamrażać Treg i jak długo przechowywać),
- ile krwi należy/można pobrać do wyizolowania wyjściowej populacji Treg (350 ml)?

Bezpieczeństwo terapii z użyciem limfocytów Treg

- W terapii narządowych przeszczepów stosowane są autologiczne Treg.
- W terapii GVHD allogeniczne Treg.
- Czystość podawanych preparatów Treg (jak dużo komórek o działaniu prozapalnym/non-Treg).
- Ocena bezpieczeństwa terapii (możliwość infekcji cytomegalowirusem, wirusem Epstein-Barr i wirusem BK/poliomawirus).
- Należy przeprowadzić dłuższe obserwacje, obejmujące większą liczbę chorych.

Etapy rozwoju tolerancji transplantacyjnej:

Indukcja

Funkcjonalna ignorancja

Tolerancja

Miejsca immunologicznie uprzywilejowane:

- przednia komora oka
- jądro
- mózg

Mechanizmy:

- obecność barier (krew-mózg, krew-jądro) utrudniających napływ limfocytów
- limfocyty T regulatorowe/ supresorowe
- lokalne wytwarzanie cytokin supresyjnych: IL-10 i TGF- β
- wysoka ekspresja cząsteczek FasL na komórkach obecnych w tych miejscach

HISTORIA PRZESZCZEPÓW NARZĄDOWYCH U LUDZI

1954– pierwsze przeszczepienie nerki (od brata bliźniaka)

1963 – pierwsza próba przeszczepu wątroby

1966 – pierwsze jednoczesne przeszczepienie nerki i trzustki

1967 – pierwsze udane przeszczepienie wątroby

1967 – pierwsze przeszczepienie serca

1981 – pierwsze jednoczesne przeszczepienie serca i płuca

1998 – pierwsze przeszczepienie przedramienia

2005 – pierwsze przeszczepienie fragmentu twarzy ze zwłok

2008 – pierwsze udane przeszczepienie ponad 80% powierzchni twarzy wraz z podniebieniem, nosem, policzkami, powieką

2010 – pierwszy udany przeszczep całej twarzy

Przeszczepy wielonarządowe

POLSKA

1965 – pierwsza próba przeszczepienia nerki pobranej ze zwłok

1966 – pierwsze udane przeszczepienie nerki ze zwłok

1968 – pierwsze przeszczepienie nerki pobranej od żywego dawcy

1988 – pierwsze udane jednoczasowe przeszczepienie nerki i trzustki

2004 – pierwsze udane przeszczepienie trzustki u osoby z uprzednio przeszczepioną nerką

1969 – pierwsza próba przeszczepienia serca

1985 – pierwsze udane przeszczepienie serca

2001 – pierwsze udany jednoczasowe przeszczepienie płuc i serca

2003 – pierwsze przeszczepienie jednego płuca

2005 – pierwsze przeszczepienie obu płuc

POLSKA

1987 – pierwsze przeszczepienie wątroby

1990 – pierwsze udane przeszczepienie wątroby u dziecka

1994 – pierwsze udane przeszczepienie wątroby u dorosłego

1999 – pierwsze przeszczepienie części wątroby od żywego dawcy

2006 – pierwszy przeszczepienie wątroby i jelita

2008 – pierwsze przeszczepienie wysepek trzustkowych w układzie auto- i allogenicznym

2006 – pierwsze przeszczepienie ręki

2013- pierwsze całkowite przeszczepienie twarzy

Przeszczepianie szpiku i komórek krwiotwórczych

Przeszczepy komórek krwiotwórczych:

- przeszczepy szpiku
- przeszczepy komórek macierzystych .

Przeszczepy szpiku:

- autologiczny
- syngeniczny
- allogeniczny.

Przeszczepy komórek macierzystych:

- izolowane z krwi obwodowej (po uprzedniej "mobilizacji" po podaniu G-CSF, GM-CSF)
- izolowane z krwi pępowinowej.

Rodzaje transplantacji szpiku

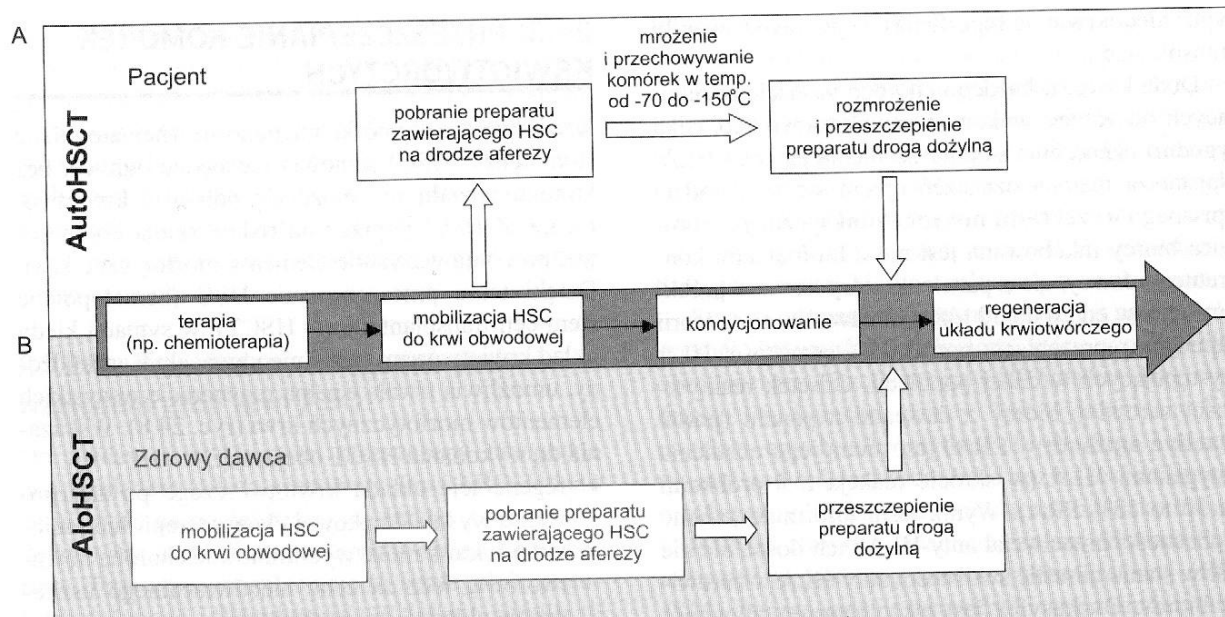
Transplantacja szpiku autologicznego (autotransplantacja)

- Pobranie własnego szpiku lub komórek krwiotwórczych z krwi,
- Przechowanie komórek w niskiej temperaturze (rzędu -196 stopni C),
- poddanie chorego silnemu leczeniu kondycjonującemu (cytostatyki, napromienienie RTG, leki immunosupresyjne) niszczącemu resztkową masę nowotworu
- retransplantacja własnych komórek krwiotwórczych pobranych z krwi lub szpiku.

Zaletą tej metody jest szeroka dostępność, stosunkowo niska częstość powikłań i możliwość zastosowania u ludzi starszych.

Wadą jest brak przeciwnowotworowego działania przeszczepionych komórek i co za tym idzie możliwość częstszych nawrotów niż po allotransplantacji.

Jest wiele odmian autoprzeszczepu.



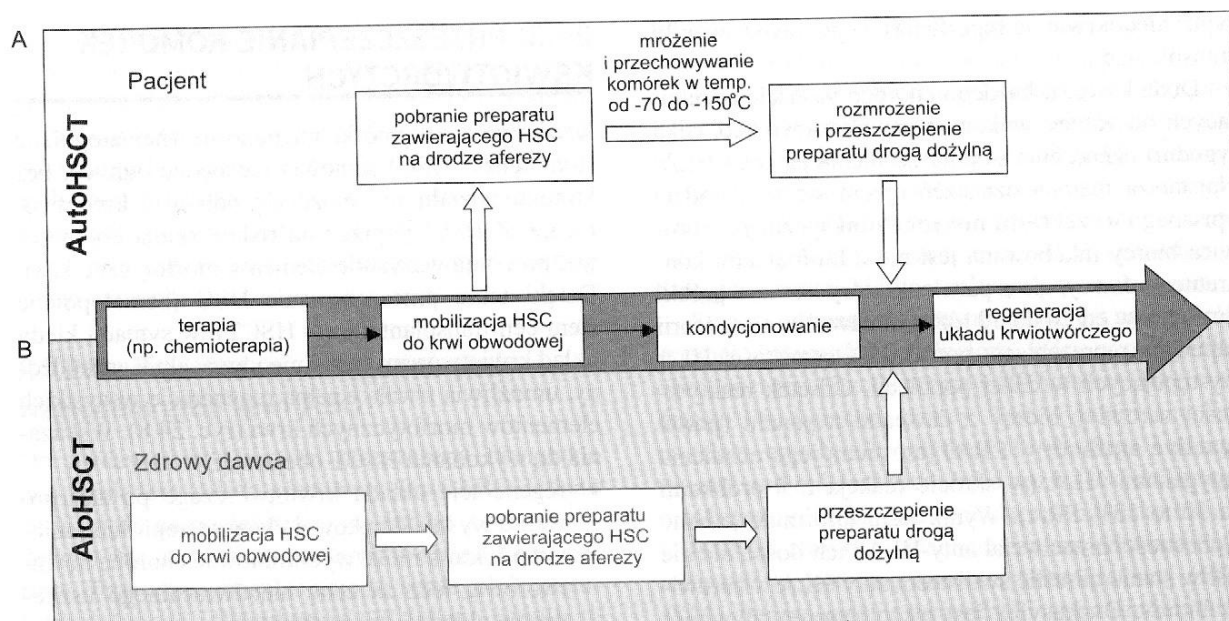
Rodzaje transplantacji szpiku

Transplantacja szpiku allogenicznego (allotransplantacja)

Polega na przeszczepieniu szpiku od zgodnego w zakresie HLA dawcy, którym może być rodzeństwo (dawca optymalny) lub dawca niespokrewniony (alternatywny).

Prawdopodobieństwo zgodności z rodzeństwem wynosi tylko 25%. Oznacza to, że 3/4 potrzebujących nie ma dawcy rodzinnego i wymaga znalezienia dawcy alternatywnego.

Prawdopodobieństwo znalezienia dawcy nie spokrewnionego jest małe, rzędu 1:10-100 tysięcy, a proces poszukiwania wymaga specjalistycznej organizacji i jest kosztowny. Obecnie na całym świecie liczba dobrowolnych dawców przekracza znacznie 10 milionów.



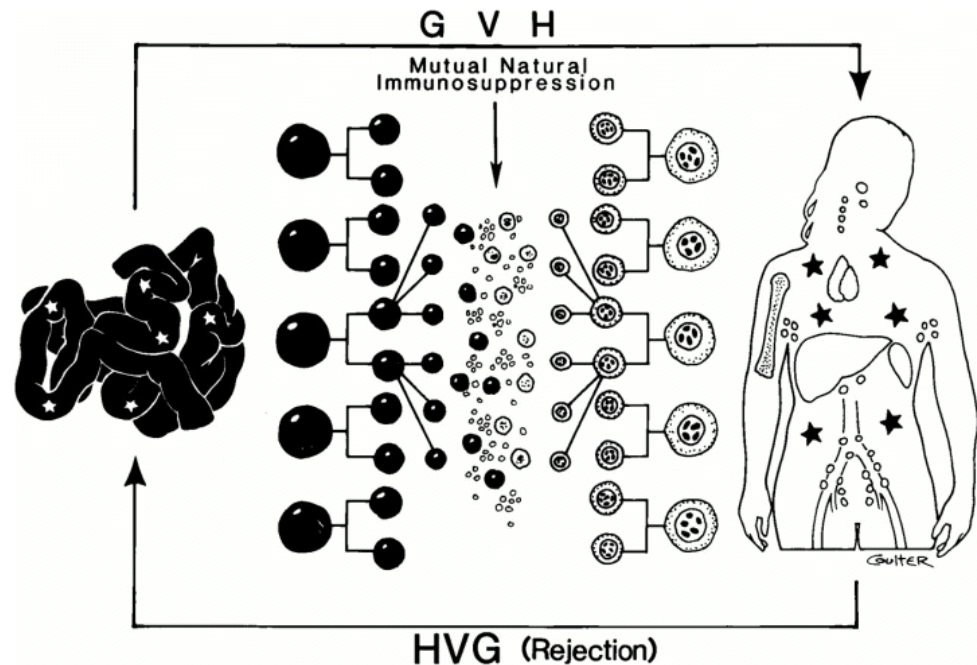
Wskazania do transplantacji szpiku i komórek krwiotwórczych

- Nowotwory z grupy wysokiego ryzyka takie jak: białaczka przewlekła szpikowa, białaczki ostre, niektóre postacie szpiczaka plazmocytowego, chłoniaków nieziarnicznych, ziarnicy złośliwej.
- Nienowotworowe zaniki szpiku, a mianowicie ciężka anemia aplastyczna, popromienne i toksyczne uszkodzenia szpiku.
- Wrodzone defekty immunologiczne, metaboliczne i anemie.
- W ciężkich postaciach chorób autoimmunizacyjnych. Ustalenie wskazań wymaga poza szczegółowym rozpoznaniem, uwzględnienia fazy choroby, wieku pacjenta i stanu biologicznego.

GVH: przeszczep przeciwno gospodarzowi

Jest to częste powikłanie po transplantacji komórek macierzystych lub po transplantacji szpiku kostnego od innej osoby w układzie allogenicznym.

Leukocyty obecne w przeszczepionym materiale rozpoznają antygeny biorcy jako obce i rozwijają odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciwko jego komórkom.



Darrell J., et al., Transfusion. 2001, 41 : 419-430.

Muszą być spełnione 3 kryteria:

- W przeszczepie znajdują się żywe i funkcjonalne komórki układu odpornościowego dawcy.
- Biorca i dawca są niezgodni w zakresie HLA.
- Biorca ma obniżoną odporność i nie może zniszczyć lub funkcjonalnie zablokować przeszczepione leukocyty.

Wyróżniane są dwie formy GvH:

- **ostra** (zwykle w ciągu pierwszych 100 dni po transplantacji) wiąże się z powikłaniami i wyższą śmiertelnością
- **przewlekła** (zwykle występuje po 100 dniach od transplantacji) wpływa niekorzystnie na dalsze przeżycie przeszczepu.

Dziękuję za uwagę