

Received: 2005.09.07
Accepted: 2006.02.21
Published: 2006.03.14

Tolerancja immunologiczna po przeszczepieniu nerki

Immune tolerance after renal transplantation

Magdalena Krajewska, Wacław Weyde, Marian Klinger

Klinika Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej Akademii Medycznej we Wrocławiu

Streszczenie

Postęp leczenia immunosupresyjnego przez zmniejszenie częstości ostrego odrzucania poprawił krótkoterminowe przeżycie przeszczepów nerek. Nie uległo natomiast poprawie długoterminowe przeżycie przeszczepów, do utraty których dochodzi w późnym okresie po przeszczepieniu w wyniku waskulopatii i przewlekłego odrzucania. Tolerancja immunologiczna oznacza brak aktywności immunologicznej wobec określonych antygenów, przy sprawnej odpowiedzi immunologicznej na pozostałe. Badania indukcji tolerancji immunologicznej w stosunku do antygenów dawcy przeszczepu, czyli tolerancji transplantacyjnej są obecnie intensywnie prowadzone, a ich celem jest opracowanie metod leczenia, które pozwolą zapobiegać przewlekłemu odrzucaniu przeszczepionego narządu. W opracowaniu dokonano przeglądu współczesnego stanu wiedzy na temat tolerancji transplantacyjnej. Omówiono odpowiedź układu odpornościowego na alloantygeny i scharakteryzowano mechanizmy powstawania tolerancji immunologicznej, w tym delecję klonalną, anergię klonalną, z którą jest związane zjawisko mikrochimerizmu oraz aktywną supresję, zachodzącą dzięki populacji limfocytów regulatorowych. Podkreślono rolę komórek dendrytycznych w procesie indukcji i utrzymania stanu tolerancji. Przedstawiono metody wywoływania tolerancji u biorców przeszczepu nerki, a także stosowane w praktyce klinicznej testy oceny tolerancji transplantacyjnej. Obecnie w celu maksymalnego zmniejszenia ryzyka odrzucenia narządu stosowana jest optymalizacja doboru biorców, ale być może już w niedalekiej przyszłości możliwa będzie terapia genowa. Jednak przed wprowadzeniem takiego postępowania do badań klinicznych, muszą zostać określone optymalne warunki terapii oraz ocena ryzyka w badaniach na zwierzętach.

Słowa kluczowe: tolerancja • przeszczepienie nerki

Summary

Progress in immunosuppressive therapy has improved short-term survival of renal allografts by decreasing the frequency of acute rejections. However, the long-term survival of renal grafts has not improved. Transplanted kidneys are lost in the late period after transplantation as a result of vasculopathy and chronic rejection. Immunological tolerance means the lack of immunological activity towards certain antigens while the response towards others remains correct. The induction of immunological tolerance of donor antigens (transplant tolerance) is examined intensively to work out treatment methods which will allow prevention of chronic allograft rejection. The paper includes an overview of current knowledge on allograft tolerance. Immune response to alloantigens is described and the mechanisms of immunological tolerance induction (including clonal deletion, anergy connected with the microchimerism phenomenon, and active suppression caused by regulatory lymphocytes) are characterized. The role of dendritic cells in the process of inducing and maintaining tolerance is highlighted. Tolerance-inducing strategies in renal transplant recipients and clinically applied evaluation methods are presented. At present, optimizing recipient matching is used to decrease the risk of graft rejection. Hopefully, gene therapy will be possible in the near future. However, before introducing such a procedure into clinical studies, optimal therapy conditions and risk evaluation must be defined in tests on animals.

Key words: tolerance • renal transplantation

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/8940.pdf

Word count: 3052

Tables: –

Figures: 1

References: 43

Adres autorki: dr n. med. Magdalena Krajewska, Katedra i Klinika Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej AM, ul. Traugutta 57/59, 50-417 Wrocław; e-mail: magda@softstar.pl

Postęp leczenia immunosupresyjnego doprowadził w ciągu ostatnich lat do znacznego zmniejszenia częstości ostrego odrzucania i poprawił krótkoterminowe przeżycia przeszczepów nerek, natomiast długotrwałe przeżycia przeszczepów nie uległy istotnej zmianie. Przyczyną utraty przeszczepu po upływie roku jest w większości przypadków przewlekłe odrzucanie i waskulopatia [6].

Tolerancja immunologiczna oznacza brak aktywności immunologicznej wobec określonych antygenów, przy sprawnej odpowiedzi immunologicznej na pozostałe. Badania indukcji tolerancji immunologicznej w stosunku do antygenów dawcy przeszczepu, czyli tolerancji transplantacyjnej są obecnie intensywnie prowadzone, ponieważ istnieje potrzeba zmniejszenia chorobowości spowodowanej immunosupresją, znoszącą reaktywność immunologiczną przeciw wszystkim antygenom i zmniejszającą odporność przeciwwązkową i przeciwnowotworową, ale również dlatego, aby opracować metody leczenia, które zapobiegą przewlekłemu odrzucaniu.

ODPOWIEDŹ UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO NA ANTYGENY PRZESZCZEPU

W pierwszym etapie komórki dendrytyczne dawcy obecne w przeszczepie zasiedlają regionalny węzeł chłonny biorcy i bezpośrednio prezentują antygeny dawcy komórkom układu odpornościowego biorcy. Mechanizm ten odgrywa znaczącą rolę w indukowaniu odpowiedzi na przeszczep we wczesnym okresie. Usunięcie komórek dendrytycznych z narządu przed zabiegiem przeszczepienia hamuje wystąpienie reakcji odrzucania. Obecnie są prowadzone próby perfundowania nerek przed przeszczepieniem przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko CD45, antygenowi który jest obecny na komórkach dendrytycznych.

Po przetworzeniu antygenów przez komórki prezentujące antygen do krótkich peptydów umieszczonych w rowku cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej (MHC) antygeny są rozpoznawane przez limfocyty T. Rozpoznanie antygeny odbywa się przez jego związanie z receptorem limfocyty (TCR). Komórki mięszone przeszczepionego narządu mają na swojej powierzchni MHC klasy I i mogą aktywować limfocyty CD8+. Ponieważ jednak nie wykazują na swojej powierzchni ekspresji cząsteczek rodziny B7, nie dostarczają tzw. drugiego sygnału niezbędnego do aktywacji limfocytów. Po przeszczepieniu komórki prezentujące antygen (APC) dawcy ulegają wymianie na APC biorcy wywodzące się z komórek macierzystych szpiku i to one prezentują peptydy pochodzące od dawcy w mechanizmie prezentacji pośredniej. Warunkiem aktywacji limfocyty jest jego bezpośredni kontakt z komórką prezentującą na

cząsteczkach MHC swoisty dla niego antygen. W czasie tego kontaktu limfocyt musi otrzymać co najmniej dwa sygnały – pierwszy pochodzący z rozpoznania antygeny przez receptor TCR, drugi z tzw. cząstek kostymulujących. Najważniejszą rolę w kostymulacji odgrywają interakcje receptorów CD28, CD2 na powierzchni limfocyty z cząsteczkami B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), CD48 (LFA-3) na powierzchni komórki prezentującej antygen [31].

Po dostarczeniu obydwu sygnałów w limfocycie T dochodzi do aktywacji kalcineuryny zależnej od jonów wapnia oraz do aktywacji kinaz białkowych zależnych od mitogenu (MAP). Kalcineuryna defosforyluje w cytoplazmie czynnik jądrowy aktywowanych limfocytów T powodując jego przemieszczenie do jądra komórkowego, wiązanie ze swoistą sekwencją DNA i aktywację promotorów genów cytokin (IL-2, INF- γ). Kinaza białkowa MAP aktywuje inne czynniki transkrypcyjne (np. Jun i Fos). Interleukina 2 (IL-2) oraz inne czynniki wzrostowe przekazują tzw. trzeci sygnał, pobudzający cykl komórkowy. Jednym z głównych enzymów biorących udział w przekazywaniu sygnału trzeciego jest enzym TOR (target of rapamycin). Kontroluje on translację mRNA białek regulatorowych cyklu komórkowego [19].

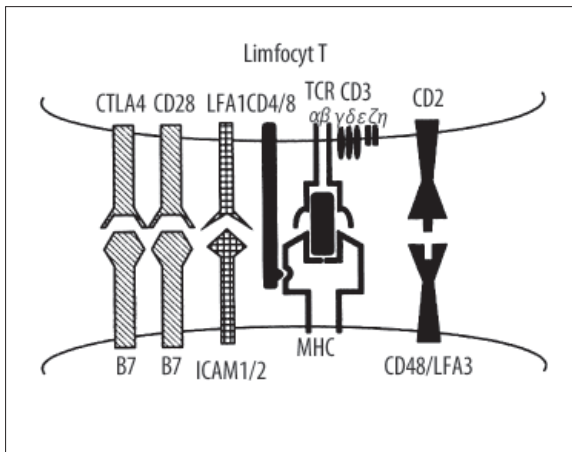
MECHANIZMY POWSTAWANIA TOLERANCJI IMMUNOLOGICZNEJ

Do czynników, które mają wpływ na wywołanie tolerancji należą charakter i dawka antygeny, sposób jego podania oraz dojrzałość układu immunologicznego. W kontekście rozwoju tolerancji transplantacyjnej istotne jest, że stopień podobieństwa do antygenów własnych determinuje zdolność antygeny do wywołania tolerancji lub odporności. Im większe podobieństwo do antygenów własnych, tym łatwiejsza jest indukcja tolerancji [35].

Czasem udaje się uzyskać tolerancję na antygeny po jego podaniu doustnym, ale próby „nauczania” tolerancji przez podawanie drogą pokarmową antygenów transplantacyjnych dawcy pozostają na razie w sferze teorii [24]

SEKWESTRACJA ANATOMICZNA

W procesie powstawania tolerancji immunologicznej uczestniczy kilka mechanizmów. Pierwszym z nich jest sekwestracja anatomiczna polegająca na istnieniu w organizmie miejsc, w których przeszczepy łatwiej się przyjmują. Należą do nich łożysko, OUN, przednia komora oka i jądro [15]. Jest to spowodowane utrudnionym dostępem antygenów i limfocytów wynikającym z obecności barier anatomicznych (np. krew-mózg), ale także małą liczbą komórek dendrytycznych, niską ekspresją cząstek MHC, aktywnością limfocytów T regulatorowych/supresorowych, lo-



Ryc. 1. Komórka prezentująca antygen

kalnym wytwarzaniem cytokin (IL-10, TGF- β) i wreszcie stałą ekspresją APO-1/FasL (ligandu białka APO-1/Fas). Występowanie cząsteczek FasL powoduje zabijanie naciekających te miejsca aktywowanych limfocytów wykazujących ekspresję cząsteczki Fas [17]. Sekwestracja anatomiczna nie ma znaczenia przy przeszczepianiu nerki.

DELECCJA KLONALNA

W rozwoju tolerancji transplantacyjnej istotna jest delecja klonalna. Proces ten polega na zachodzącej w grasicy eliminacji limfocytów autoreaktywnych. W 1960 r. za teorię delecji klonalnej zakładającą niszczenie limfocytów reagujących na własne antygeny w wyniku kontaktu z własnym antygenem Burnet i Medawar otrzymali Nagrodę Nobla. Istnieją dane, że delecja klonalna odbywa się również w tkankach poza grasicą i wywołuje tolerancję na antygeny dawcy [35]. Bezpośrednio odpowiedzialne za proces nazywany śmiercią komórki indukowaną aktywacją (AICD) są interakcje Fas/FasL (CD95/CD95L) [16].

ANERGIA KLONALNA

Trzeci mechanizm uczestniczący w powstawaniu tolerancji to anergia klonalna. Gdy po wywołaniu sygnału dla limfocyta T zablokowaniu ulegnie kostymulacja np. CD40 - CD40L, nie dojdzie ani do proliferacji ani do wytwarzania IL-2 [8]. Anergia limfocyta spowoduje również zablokowanie receptora interleukiny 2 – CD25 [35]. Należy jednak pamiętać, że przy indukcji tolerancji tym sposobem zachodzi krzyżowa reakcja IL-15 z receptorem, a także o tym, że blokowanie CD25 nigdy nie jest pełne [27].

Aktywacja limfocytów dziewiczych, czyli takich, które nie zetknęły się jeszcze z antygenem, prowadzi do ekspresji dodatkowego receptora – CTLA-4, wykazującego większe powinowactwo do B7 niż CD28. Wiązanie CTLA-4 (obecnego na limfocycie T) i B7 (na APC) powoduje przekazanie limfocytowi T sygnału negatywnego prowadzącego do zahamowania aktywności [8]. Stosowanie przeciwciała anti-CD 154 i CTLA4-Ig wywoływało długotrwałą tolerancję na antygeny. Anti-CD154 (anty CD40 ligand) wycofano z badań na ludziach ze względu na zwiększoną częstość występowania zakrzepicy i większą niż pierwotnie zakładano częstość ostrych odrzuceń [39]. Obecnie

prowadzone są badania z przeciwciałem humanizowanym anti-B7 drugiej generacji – LEA29Y [40].

Na modelach doświadczalnych wykazano, że tolerogenny efekt blokady kostymulacji jest zwiększany przez indukcję apoptozy w odpowiadających limfocytach T. Inhibitory kalcineuryny zmniejszają ten efekt przez blokowanie indukcji sygnału apoptycznego, podczas gdy rapamycyna promuje apoptozę i poprawia tolerancję przeszczepu. Apoptozę aktywowanych limfocytów T promuje również mykofenolan mofetilu [2].

Z anergią klonalną jest związane zjawisko mikrochimerizmu. Według Starzla [33], który jest twórcą teorii mikrochimerizmu, koniecznym warunkiem utrzymywania tolerancji transplantacyjnej jest stała obecność komórek dawcy w węzłach chłonnych biorcy. Komórki dendrytyczne znajdujące się w przeszczepianym narządzie migrują po zabiegu do obwodowych narządów limfatycznych. Obecność tych komórek została potwierdzona w badaniach biorców przeszczepów. Uważa się, że przeszczep wątroby stanowiący bogate źródło tych komórek łatwiej niż inne narządy indukuje stan tolerancji. Istnieją jednak również inne mechanizmy, m.in. uwalnianie znacznych ilości wolnych cząsteczek MHC, blokujących receptory limfocytów i wydzielenie przez wątrobę substancji o nieswoistym działaniu immunosupresyjnym. Na znaczenie mikrochimerizmu wskazują wyniki doświadczeń, w których uzyskuje się przedłużenie czasu przeżycia narządu przeszczepionego łącznie z przetoczeniem szpiku dawcy. Być może podobną rolę spełniają przetoczenia krwi. W przeszłości jako procedurę przygotowania do przeszczepu stosowano przetoczenie krwi od dawcy narządu (DTS – donor specific transfusion). Nie potwierdzono jednak korzystnego wpływu takiego postępowania na wyniki przeszczepiania w sytuacji stosowania leków immunosupresyjnych o dużej skuteczności. U części biorców przeszczepów nie znajduje się komórek dawcy poza przeszczepionym narządem. Znaczenie mikrochimerizmu jest nadal dyskutowane m.in. dlatego, że opisywano odrzucenia przeszczepionego narządu u pacjentów, u których stwierdzano jego obecność, a biorcy, u których go nie wykazywano nie odrzucali przeszczepu [5].

AKTYWNA SUPRESJA

Kolejnym mechanizmem uczestniczącym w powstawaniu tolerancji jest aktywna supresja, która zachodzi dzięki populacji limfocytów regulatorowych/supresorowych (Treg/sup). Populacja limfocytów Treg/sup jest zróżnicowana. Należą do nich limfocyty Th2 wydzielające m.in. IL-4 i wykazujące swoje funkcje hamujące szczególnie wobec limfocytów Th1 i odpowiedzi typu komórkowego. Na podobnej zasadzie limfocyty Th1 hamują aktywność limfocytów Th2 i odpowiedź humoralną.

Ważne funkcje regulatorowe spełniają także limfocyty Th3 wytwarzające transformujący czynnik wzrostu (TGF- β), limfocyty Tr1 wydzielające IL-10 i TGF- β , limfocyty T CD8+CD28-, niektóre limfocyty cytotoksyczne, limfocyty T β δ , NKT i inne subpopulacje [4,41].

W rozwoju tolerancji transplantacyjnej podstawową rolę spełniają naturalnie występujące limfocyty o fenotypie

CD4+CD25+, stanowiące jak się obecnie uważa fenotypowo i funkcjonalnie odrębną populację limfocytów T (5–10% limfocytów T obwodowych). Efekt supresorowy tych komórek zależy prawdopodobnie od bezpośredniego kontaktu z komórkami docelowymi. Ich właściwości supresyjne mogą być jednak również skutkiem wytwarzania cytokin, ponieważ komórki te wykazują intensywną ekspresję błonowych postaci TGF- β [25]. Stwierdzano obecność limfocytów regulatorowych z ekspresją utajonych postaci TGF- β w tkance śródmiąższowej okołocewkowej przeszczepionych nerek małp, u których występowała tolerancja. Nie wykazano ich obecności gdy dochodziło do załamania się stanu tolerancji, a w późno odrzucanych nerkach były zastępowane przez nacieki z komórek TGF- β negatywnych. Zdaniem autorów pracy można uznać, że obecność nacieków z komórek regulatorowych z ekspresją latentnych postaci TGF- β jest wskaźnikiem stanu tolerancji [21]. Ukazały się także doniesienia wskazujące, że do działania supresyjnego tej grupy komórek konieczne jest także wytwarzanie IL-10 [18].

Komórki regulatorowe wykazują konstytutywnie na swojej powierzchni ekspresję m.in. hamujących receptorów kostymulujących (CTLA-4 i PD-1), GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor), OX40 czyli CD134, niektórych receptorów chemokinowych i CD103 należącą do tzw. homing receptors [9, 26]. Wykazują również ekspresję czynnika transkrypcyjnego Foxp3, który spełnia istotną rolę w powstawaniu i funkcjonowaniu tych komórek [7]. Rolę tego czynnika potwierdzono klinicznie, gdy wykazano, że mutacja genu Foxp3 upośledzając funkcje regulatorowe prowadzi do ciężkich chorób autoimmunologicznych, zapalnych i alergicznych [18]. Potencjalnie użytecznym powierzchniowym markerem komórek regulatorowych jest neuropilina 1 [36]. Rola tych molekuł nie jest do końca poznana, istnieją jednak dane, że np. ligand GITR (GITR-L) znosi hamujące działanie komórek regulatorowych. GIRT-L jest obecny na wielu komórkach APC i prawdopodobnie regulacja jego ekspresji umożliwi kontrolę nad komórkami, z którymi reaguje. Być może interwencje terapeutyczne w układ GIRT/GIRT-L pozwolą wpływać na mechanizmy supresji zależne od tych komórek [22].

Teoretycznie istnieją dwie możliwości wykorzystania naturalnie występujących komórek regulatorowych w indukcji tolerancji na przeszczep nerki. Jedną z nich polega na kontrolowaniu komórek innych niż regulatorowe przez redukcję ich liczby lub blokowanie ich działania, aby powstał stan immunologiczny ułatwiający spontaniczną ekspansję naturalnych, swoistych dla antygenów komórek regulatorowych. Zadanie to spełnia podawanie przeciwciał monoklonalnych lub leków immunosupresyjnych przez krótki okres. Drugim sposobem indukcji tolerancji z użyciem komórek regulatorowych jest izolacja tych komórek od biorcy, stymulacja ich *ex vivo* komórkami dawcy i podanie ich biorcy przed zabiegiem przeszczepienia. Jest to teoretycznie możliwe jedynie przy przeszczepianiu od dawców żywych. Bardziej realistyczne wydaje się obecnie stworzenie leków lub środków o charakterze szczepionek, które powodowałyby ekspansję tych komórek *in vivo* [41]. Limfocyty Treg mogą indukować powstawanie innych regulatorowych limfocytów T, co umożliwi przeniesienie tolerancji z jednego osobnika na drugiego. Jest to tzw. typ tolerancji infekcyjnej. Prowadzone są badania dotyczące wykorzystania tego zjawiska w wywołaniu tolerancji transplantacyjnej. Limfocyty regulatorowe

działają nie tylko na inne limfocyty T hamując ich proliferację i ekspresję cytokin, ale istnieją dane, że wpływają hamująco również na komórki prezentujące antygen. W miejscu, gdzie rozwija się odpowiedź immunologiczna, hamują nieswoiście odpowiedź również na inne antygeny, a nie tylko na ten, który pobudził jej powstanie. Istotne jest również to, że wprowadzenie limfocytów T w stan anergii i aktywacja limfocytów regulatorowych nie są procesami niezależnymi, ponieważ niektóre wprowadzone w stan anergii limfocyty T aktywnie hamują odpowiedź innych limfocytów, zachowując się jak limfocyty regulatorowe [35].

Wiedza na temat komórek regulatorowych stale się powiększa, ale nadal bez odpowiedzi pozostają pytania o sposób w jaki komórki te otrzymują sygnał hamujący i współpracują z innymi regulatorowymi limfocytami T i komórkami dendrytycznymi, a także wiele innych.

INDUKCJA TOLERANCJI TRANSPLANTACYJNEJ

Tolerancję immunologiczną stosunkowo łatwo można wywołać metodami doświadczalnymi przez podanie antygenów transplantacyjnych przeszłego dawcy w życiu płodowym lub noworodkowym. Jest to tzw. tolerancja noworodkowa, zależna od niedojrzałości komórek. Innym sposobem jest podanie antygenów transplantacyjnych do grasiccy celem wywołania delecji określonych klonów limfocytów T [28]. Rozwój takiej tolerancji utrudniają niektóre leki immunosupresyjne [3]. Tolerancję immunologiczną można również spowodować przeszczepieniem szpiku i wywołaniem całkowitego chimeryzmu hematopoetycznego. Zniszczenie układu krwiotwórczego i immunologicznego biorcy i podanie biorcy szpiku przeszłego dawcy indukuje rozwój tolerancji na alloprzeszczep nerki od tego samego dawcy bez konieczności leczenia immunosupresyjnego. Metoda ta nie może być stosowana w klinice ze względu na duże ryzyko związane z leczeniem mieloablacyjnym. Ograniczenie stanowi także występowanie często letalnej choroby przeszczep przeciw gospodarzowi (GVH). Podejmowane są próby wywołania mieszanego chimeryzmu hematopoetycznego przez zastosowanie kondycjonowania niemieloablacyjnego. Ta strategia postępowania została po raz pierwszy zastosowana u człowieka w 1998 r. Dotąd leczeniem objęto niewielką grupę chorych ze schyłkową niewydolnością nerek w przebiegu szpiczaka mnogiego. Chorzy ci poddani byli leczeniu niemieloablacyjnemu, a następnie transplantacji szpiku allogenicznego i rozwinęli tolerancję na przeszczep nerki. Należy zwrócić uwagę, że prawie u wszystkich chorych przeszczep był dobrany od HLA identycznych dawców rodzinnych [14]. Taki dawca nie jest dostępny dla większości pacjentów, dlatego istnieje potrzeba opracowania możliwych do zastosowania w klinice niemieloablacyjnych protokołów, które mogłyby być bezpiecznie użyte u pacjentów z niezgodnościami w zakresie HLA. Prowadzone są próby wywołania mieszanego chimeryzmu z użyciem poli- i monoklonalnych przeciwciał antylimfocytarnych podawanych w czasie dostarczania antygenów dawcy w postaci transfuzji krwi dawcy, a także minimalne kondycjonowanie promieniowaniem jonizującym elementów szpiku dawcy i biorcy. Do najbardziej skutecznego leczenia indukcyjnego należy obecnie stosowanie humanizowanego monoklonalnego przeciwciała skierowanego przeciwko cząsteczce CD52 – alemtuzumabu lub poliklonalnych przeciwciał antytymocytarnych w dużych dawkach.

Równie skuteczne, ale znacznie mniej bezpieczne jest naświetlanie tkanki limfoidalnej (TLI). Obiecujące są wyniki przeszczepiania wraz z narządem komórek CD34+ (komórki macierzyste szpiku) dawcy [34,38]. Nie wiadomo jednak, czy indukcja mieszanego makrochimeryzmu (termin oznaczający obecność we krwi obwodowej więcej niż 5% komórek hematopoetycznych pochodzących od dawcy) jest wystarczająca do utrzymania długo trwającego, samopodtrzymującego się stanu tolerancji [14].

Ostatnio w procesie indukcji i utrzymywania stanu tolerancji podkreślana jest rola komórek dendrytycznych [29]. W zróżnicowanej populacji komórek dendrytycznych występuje również populacja komórek niedojrzałych, w tym komórki Langerhansa i śródmiąższowe komórki dendrytyczne. Zarówno dojrzałe jak i niedojrzałe komórki dendrytyczne indukują proliferację swoistych dla antygenów limfocytów CD4+, ale tylko dojrzałe promują ich różnicowanie w wytwarzające cytokiny komórki efektorowe [23]. Mechanizmy, dzięki którym komórki dendrytyczne wpływają na regulację odpowiedzi immunologicznej nie są znane. Wśród nich prawdopodobne są upośledzenie funkcji allostymulującej komórek dendrytycznych spowodowane ich niepełną dojrzałością, selektywna blokada molekuł kostymulacyjnych i wpływ na wytwarzanie cytokin – IL-10 i TGF-β. Prowadzone są obecnie próby indukcji tolerancji podawaniem kondycjonowanych *in vitro* lub niedojrzałych komórek dendrytycznych [3,20].

Precyzyjne mechanizmy powodujące powstanie, a następnie utrzymywanie się stanu tolerancji ciągle nie są poznane, wiadomo jednak z całą pewnością, że jest to skomplikowany, podlegający wielu regulacjom, wielostopniowy proces. Przyjęto obecnie, że w wyniku odpowiedzi komórkowej na przeszczep niezgodny w zakresie HLA dochodzi do rekrutacji bardzo dużej liczby klonów komórkowych. Ograniczenie ich liczby ma podstawowe znaczenie w fazie indukcji tolerancji [23]. Natomiast utrzymywanie stanu tolerancji w okresie późniejszym zależy od samoregulującego się mechanizmu immunologicznego aktywnie nadzorującego alloagresywną odpowiedź limfocytów T, tu podkreślana jest rola aktywacji komórek regulatorowych [42]. Tak więc powodzenie przeszczepu, jego odrzucenie lub rozwój tolerancji zależy od równowagi między komórkami cytotoksycznymi i regulatorowymi

Ukazało się opracowanie strategii, której celem było wybiórcze usunięcie aktywowanych cytotoksycznych limfocytów T przy oszczędzeniu sieci immunoregulacyjnej. Zakładając, że IL-2 wyzwala AICD (indukowana aktywacją śmierć komórki) i promuje apoptozę proliferujących limfocytów T, podczas gdy IL-15 przeciwstawia się temu sygnałowi i chroni komórki przed PCD (pasywna śmierć komórki), zastosowano w modelu doświadczalnym agonistę IL-2 (fuzyjne białko IL-2/Fc), antagonistę IL-15 (fuzyjne białko IL-15/Fc) oraz rapamycynę (blokowanie proliferacji) i uzyskano ograniczenie wczesnej ekspansji aktywowanych limfocytów T przy zachowanej zależności od komórek CD4+CD25+ sieci immunoregulacji [43].

METODY OCENY TOLERANCJI TRANSPLANTACYJNEJ

Przeprowadzenie badań tolerancji na ludziach jest ze zrozumiętych względów bardzo trudne. Niewielka liczba pa-

cientów, którzy przerwali immunosupresję i mimo to nie utracili nerki w przebiegu odrzucania stanowi rzadki kliniczny przykład tolerancji immunologicznej, który jest cennym źródłem wiedzy o mechanizmach tolerancji [33]. Trudności w prowadzeniu badań nad tolerancją transplantacyjną u ludzi powodują, mimo zastosowania wielu badań, na podstawie których próbuje się przewidzieć odpowiedź immunologiczną, rozwój tolerancji lub wczesne objawy odrzucania, że ich wyniki wymagają potwierdzenia klinicznego [37]. Obecnie można określić alloreaktywność komórek oceniając proliferację (MLR – mixed lymphocyte reaction) i cytotoksyczność (CML cell-mediated lymphocytotoxicity), dokonać analizy cytokin (możliwe metody – Elisa, Elispot, cytometria przepływową) oraz przeprowadzić badanie tzw. reakcji opóźnionej nadwrażliwości (metoda *trans-vivo*). W skład oceny odpowiedzi immunologicznej wchodzi również określenie miana alloprzeciwciał. Można przeprowadzać charakteryzację komórek immunologicznych, w tym ocenę wskaźników aktywacji limfocytów w cytometrii przepływową, oznaczenie profilu ekspresji wybranych genów za pomocą technik biologii molekularnej (np. real-time PCR) i fenotypowanie subpopulacji komórek dendrytycznych. Użyteczna jest analiza genetyczna, ocena polimorfizmu genów immunologicznych i definiowanie tzw. genów tolerancji w technologii mikro-macierzy. Zastosowanie ma również definiowanie „białek tolerancji” metodami proteomiki i ocena morfologiczna i immunohistochemiczna biopsji przeszczepionej nerki [3,13]. Rolę w przewidywaniu rozwoju i monitorowaniu leczenia odrzucania mogą spełniać także inne testy, np. pomiaru chemokiny CXCR3 lub jej receptorów [1]. Z pewnością nie jest możliwe określenie profilu immunologicznego pacjenta tylko jedną z wymienionych metod.

Problemem do rozwiązania pozostaje sprecyzowanie wpływu obecnie stosowanych leków immunosupresyjnych na wywoływanie tolerancji i wyjaśnienie związków między tolerancją a przewlekłą nefropatią przeszczepionego narządu, ponieważ istnieją dane wskazujące, że zmniejszona reaktywność na antygeny dawcy wiąże się z ochroną przed przewlekłym odrzucaniem. Intensywnego przebadania wymaga wpływ postępowania terapeutycznego wywołującego tolerancję na ryzyko powikłań infekcyjnych. Niektóre sposoby postępowania mające na celu wywołanie tolerancji okazały się nieskuteczne, gdy były prowadzone podczas trwania infekcji. Możliwym mechanizmem odpowiedzialnym za to zjawisko jest to, że osobnicy przechowujący indukowane wirusem komórki pamięci (limfocyty T), które krzyżowo reagują z alloantygenu dawcy są oporni na indukcję tolerancji. Niezwykle istotne jest również to, że próba zastosowania leczenia wywołującego tolerancję w obecności latentnych czynników infekcyjnych może spowodować powstanie tolerancji również wobec nich.

Nie bez znaczenia jest też problem interesów firm farmaceutycznych produkujących stosowane środki immunosupresyjne. Do osiągnięcia sukcesu i opracowania skutecznego postępowania wywołującego tolerancję potrzebna jest altruistyczna kooperacja przemysłu biotechnologicznego i transplantologów. W tym celu stworzona została ITN (The Immune Tolerance Network), sponsorująca projekty badawcze [12]. Obecnie dzięki tej organizacji prowadzone są m.in. programy badawcze obejmujące przeszczepienie szpiku oraz nerki u pacjentów chorujących na szpicza-

ka mnogiego oraz u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek bez choroby nowotworowej, u których nie można było dobrać dawcy zgodnego w HLA [11]. Wybór populacji pacjentów, która powinna zostać włączona jako pierwsza do badań klinicznych nad tolerancją jest bardzo trudny z przyczyn etycznych, ponieważ trzeba zaryzykować zastosowanie niepewnego programu leczenia w sytuacji, gdy roczne przeżycie przeszczepu przekracza 90% a w wyniku odrzucania tracone są jedynie pojedyncze przeszczepy. Bezpieczne wprowadzenie w życie protokołów wycofujących leczenie immunosupresyjne wymaga bezwzględnie identyfikacji markerów tolerancji, takich jak np. Foxp3 [30].

Tolerancja transplantologiczna nie oznacza całkowitego braku reakcji układu immunologicznego na przeszczep, a raczej brak niszczącej odpowiedzi na niego przy obecnej kompetentnej immunologicznej odpowiedzi ogólnej. Osiągnięcie stanu całkowitej tolerancji utrzymującej się bez jakiegokolwiek leczenia nie jest prawdopodobnie przy obecnym stanie wiedzy możliwe do osiągnięcia. Bardziej

realistyczne wydaje się uzyskanie stanu częściowej tolerancji, przy minimalnej dawce immunosupresji lub immunomodulacji, bezpiecznej dla pacjenta i potencjalnie chroniącej go przed wystąpieniem przewlekłego odrzucania czyli przedłużającej życie przeszczepu [10].

Celem zarówno leczenia immunosupresyjnego, jak i postępowania indukującego tolerancję jest maksymalne zmniejszenie ryzyka odrzucania narządu. Obecnie możemy to osiągać poprzez optymalizację doboru biorców pod względem zgodności tkankowej, ale także innymi metodami np. przez odizolowanie MHC („oplaszczanie” komórek wystuzkowych).

Być może już w niedalekiej przyszłości będzie możliwa terapia wprowadzająca do przeszczepianych komórek geny, które ochronią je przed odrzucaniem. Przed wprowadzeniem takiego postępowania do badań klinicznych muszą zostać określone optymalne warunki terapii i ocena ryzyka w badaniach na małpach.

PIŚMIENICTWO

- [1] Akalin E., Dikman S., Murphy B., Bromberg J.S., Hancock W.W.: Glomerular infiltration by CXCR3+ICOS+ activated T cells in chronic allograft nephropathy with transplant glomerulopathy. *Am. J. Transplant.*, 2003; 3: 1116–1120
- [2] Allison A.C., Eugui E.M.: Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection. *Transplantation*, 2005; 80(Suppl.2): S181–S190
- [3] Ansari M.J., Sayegh M.H.: Clinical transplantation tolerance: the promise and challenges. *Kidney Int.*, 2004; 65: 1560–1563
- [4] Bacchetta R., Gregori S., Roncarolo M.G.: CD4+ regulatory T cells: mechanisms of induction and effector function. *Autoimmun. Rev.*, 2005; 4: 491–496
- [5] Calne R.Y.: Prope tolerance: the future of organ transplantation – from the laboratory to the clinic. *Transplantation*, 2004; 77: 930–932
- [6] Cecka J.M.: The OPTN/UNOS Renal Transplant Registry. W: *Clinical Transplants 2004*, red. J.M. Cecka, P.I. Terasaki. UCLA Immunogenetics Center, Los Angeles 2004, 1–16
- [7] Chai J.G., Xue S.A., Coe D., Addey C., Bartok I., Scott D., Simpson E., Stauss H.J., Hori S., Sakaguchi S., Dyson J.: Regulatory T cells, derived from naive CD4+CD25– T cells by *in vitro* Foxp3 gene transfer, can induce transplantation tolerance. *Transplantation*, 2005; 79: 1310–1316
- [8] Clarkson M.R., Sayegh M.H.: T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance. *Transplantation*, 2005; 80: 555–563
- [9] Cobbold S.: Monoclonal antibodies as tools to induce immune tolerance. *Kidney Int.*, 2004; 65: 1541
- [10] Cortesini R., Suci-Foca N.: The concept of “partial” clinical tolerance. *Transpl. Immunol.*, 2004; 13: 101–104
- [11] Cosimi A.B., Sachs D.H.: Mixed chimerism and transplantation tolerance. *Transplantation*, 2004; 77: 943–946
- [12] Couzin J.: Putting tolerance to the test. *Science*, 2004; 305: 194–196
- [13] Derks R.A., Burlingham W.J.: *In vitro* parameters of donor-antigen-specific tolerance. *Curr. Opin. Immunol.*, 2005; 17: 560–564
- [14] Fandrich F., Schulze M., Zehle G., Lange H., Ungefroren H.: Stem cell-mediated tolerance inducing strategies in organ transplantation. *Kidney Int.* 2004; 65: 1548–1550
- [15] Gaciog Z., Korczak-Kowalska G.: Immunologia transplantacyjna. W: *Immunologia*, red.: Gołąb J., Jakóbiński M., Lasek W. PWN, Warszawa 2002, 493–521
- [16] Green D.R., Droin N., Pinkoski M.: Activation-induced cell death in T cells. *Immunol. Rev.*, 2003; 193: 70–81
- [17] Helderman J.H., Simin G.: Transplantation immunology. W: *Handbook of kidney transplantation*, red.: Danovitch G.M., Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia 2001, 17–38
- [18] Hori S., Sakaguchi S.: Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes. Infect.*, 2004; 6: 745–751
- [19] Hricik D.E.: Target of rapamycin (TOR) inhibition in renal transplantation: clinical uses in various populations. *Am. J. Kidney Dis.*, 2001; 38(4 Suppl.2): S1–S2
- [20] Kleindienst P., Wiethe C., Lutz M.B., Brocker T.: Simultaneous induction of CD4 T cell tolerance and CD8 T cell immunity by semi-mature dendritic cells. *J. Immunol.*, 2005; 174: 3941–3947
- [21] Knechtle S.J., Burlingham W.J.: Metastable tolerance in nonhuman primates and humans. *Transplantation*, 2004; 77: 936–939
- [22] McHugh R.S.: Regulation of T-cell mediated pathology: The revival of suppressor cells. *Kidney Int.*, 2004; 65: 1542
- [23] Moser M.: Dendritic cells as inducers and controllers of immunopathology. *Kidney Int.*, 2004; 65: 1543
- [24] Mowat A.M., Parker L.A., Beacock-Sharp H., Millington O.R., Chirido F.: Oral tolerance: overview and historical perspectives. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2004; 1029: 1–8
- [25] Nakamura K., Kitani A., Fuss I., Pedersen A., Harada N., Nawata H., Strober W.: TGF-β1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cells activity in both humans and mice. *J. Immunol.* 2004; 172: 834–842
- [26] Nishimura E., Sakihama T., Setoguchi R., Tanaka K., Sakaguchi S.: Induction of antigen-specific immunologic tolerance by *in vivo* and *in vitro* antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int. Immunol.*, 2004; 16: 1189–1201
- [27] Pączek L., Krawczyk M.: Perspektywy transplantologii. W: *Transplantologia kliniczna*, red., Rowiński W., Wałaszewski J., Pączek L. PZWL, Warszawa 2004, 292–302
- [28] Perico N., Remuzzi G.: Acquired transplant tolerance. *Int. J. Clin. Lab. Res.*, 1997; 27: 165–177
- [29] Raimondi G., Thomson A.W.: Dendritic cells, tolerance and therapy of organ allograft rejection. *Contrib. Nephrol.*, 2005; 146: 105–120
- [30] Sayegh M.H., Perico N., Remuzzi G.: Transplantation tolerance. A complex scenario awaiting clinical applicability. *Contrib. Nephrol.*, 2005; 146: 95–104
- [31] Sayegh M.H., Turka L.A.: The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N. Engl. J. Med.*, 1998; 338: 1813–1821
- [32] Shapiro R., Basu A., Tan H., Gray E., Kahn A., Randhawa P., Murase N., Zeevi A., Girnita A., Metes D., Ness R., Bass D.C., Demetris A.J., Fung J.J., Marcos A., Starzl T.E.: Kidney transplantation under minimal immunosuppression after pretransplant lymphoid depletion with Thymoglobulin or Campath. *J. Am. Coll. Surg.*, 2005; 200: 505–515
- [33] Starzl T.E., Murase N., Demetris A.J., Trucco M., Abu-Elmagd K., Gray E.A., Eghtesad B., Shapiro R., Marcos A., Fung J.J.: Lessons of organ-induced tolerance learned from historical clinical experience. *Transplantation*, 2004; 77: 926–929

-
- [34] Strober S., Lowsky R.J., Shizuru J.A., Scandling J.D., Millan M.T.: Approaches to transplantation tolerance in humans. *Transplantation*, 2004; 77: 932–936
- [35] Sykes M., Sachs D.H.: *Tolerance*. W: *Transplantation*, red. L.C. Ginns, A.B. Cosimi., P.J. Morris. Blackwell Science, Malden Massachusetts 1999, 79–93
- [36] Thompson C., Powrie F.: Regulatory T cells. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2004; 4: 408–414
- [37] Thomson A.W., Mazariegos G.V., Reyes J., Donnenber V.S., Donnenberg A.D., Bentlejewski C., Zahorchak A.F., O'Connell P.J., Fung J.J., Jankowska-Gan E., Burlingham W.J., Heeger P.S., Zeevi A.: Monitoring the patient off immunosuppression. Conceptual framework for a proposed tolerance assay study in liver transplant recipients. *Transplantation*, 2001; 72: 13–22
- [38] Trivedi H.L., Vanikar A.V., Modi P.R., Shah V.R., Vakil J.M., Trivedi V.B., Khemchandani S.I.: Allogenic hematopoietic stem-cell transplantation, mixed chimerism, and tolerance in living related donor renal allograft recipients. *Transplantation Proc.*, 2005; 37: 737–742
- [39] Vincenti F.: Chronic induction. What's new in the pipeline. *Contrib. Nephrol.*, 2005; 146: 22–29
- [40] Vincenti F., Larsen C., Durrbach A., Wekerle T., Nashan B., Blanco G., Lang P., Grinyo J., Halloran P.F., Solez K., Hagerty D., Levy E., Zhou W., Natarajan K., Charpentier B., Belatacept Study Group: Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. *N. Engl. J. Med.*, 2005; 353: 770–781
- [41] Waldmann H., Cobbold S.: Exploiting tolerance processes in transplantation. *Science*, 2004; 305: 209–212
- [42] Waldmann H., Graca L., Cobbold S., Adams E., Tone M., Tone Y.: Regulatory T cells and organ transplantation. *Semin. Immunol.*, 2004; 16: 119–126
- [43] Zheng X.X., Sanchez-Fueyo A., Domenig C., Strom T.B.: The balance of deletion and regulation in allograft tolerance. *Immunol. Rev.*, 2003; 196: 75–84
-