

BEATA PIĄTKOWSKA-JAKUBAS, JANUSZ KRAWCZYK, ALEKSANDER B. SKOTNICKI

## Nowe aspekty immunologiczne ostrej reakcji przeszczep przeciwko biorcy po allogenicznej transplantacji szpiku kostnego

### New Immunological Aspects of Acute Graft-Versus-Host-Disease in Allogeneic Bone Marrow Transplantation

Katedra i Klinika Hematologii CM UJ w Krakowie

#### Streszczenie

Reakcja przeszczep przeciwko biorcy (GVHD – graft-versus-host-disease) jest jednym z najpoważniejszych powikłań ograniczających stosowanie allogenicznej transplantacji szpiku. Uważa się, że GVHD jest złożonym procesem immunologicznym przebiegającym w 3 fazach. W fazie pierwszej terapia kondycjonująca (chemioterapia i/lub iradiacja mieloimmunoablacyjna) uszkadza tkanki, odsłaniając antygeny tkankowe biorcy oraz indukuje wydzielanie cytokin prozapalnych m.in. TNF- $\alpha$  i IL-1. Dochodzi do zwiększonej ekspresji antygenów głównego układu zgodności tkankowej – MHC i molekuł adhezyjnych, co ułatwia limfocytom T dawcy rozpoznawanie alloantygenów. Faza druga przebiega z udziałem limfocytów T dawcy, które na skutek interakcji z komórkami prezentującymi antygen (APC) biorcy ulegają proliferacji, różnicowaniu i wytwarzają cytokiny. Cytokiny te (IL-2 oraz IFN- $\gamma$ ) ułatwiają ekspansję limfocytów T, indukują limfocyty T cytotoksyczne (CTL), stymulują odpowiedź komórek NK oraz wytwarzanie IL-1 i TNF- $\alpha$  przez fagocytujące komórki jednojądrzaste. Faza trzecia, tzw. eferentna, mediowana przez komórki efektorowe, w tym CTL i NK oraz cytokiny TNF- $\alpha$  i IL-1 oraz tlenek azotu (NO), przebiega z destrukcją docelowych dla reakcji GVHD tkanek biorcy. W artykule przedstawiono udział i wzajemne interakcje limfocytów T dawcy, komórek NK, APC oraz udział poszczególnych cytokin w patomechanizmie ostrej reakcji przeszczep przeciwko biorcy, będącej powikłaniem allogenicznej transplantacji szpiku (*Adv Clin Exp Med 2004, 13, 6, 1003–1011*).

**Słowa kluczowe,** Th1, Th2, cytokiny, komórki prezentujące antygen, komórki NK, limfocyty T cytotoksyczne.

#### Abstract

Graft-versus-host-disease (GVHD) is one of the major complications of allogeneic bone marrow transplantation. GVHD is initiated by donor T cells specific against the host antigens. The immunobiology and pathophysiology of acute GVHD can be divided in three sequential phases 1) effects of conditioning, 2) donor T-cell activation that constitute the afferent phase, 3) and effector phase. Conditioning regimen (TBI and/or chemotherapy) leads to the activation of host cells with secretion of proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1, increased expression of MHC antigens and adhesion molecules. In phase 2 donor T cells interact with host antigen presenting cells which in a consequence underwent proliferation, differentiation and secrete cytokines. These inflammatory cytokines (IL-2, IFN- $\gamma$  enhance T-cell expansion, cytotoxic T cells, NK cells and prime mononuclear cells to produce TNF- $\alpha$  and IL-1. Inflammatory cytokines in turn stimulate production of chemokines and recruit effector cells into GVHD target organs. In phase 3 effectors mononuclear phagocytes triggered via secondary signals promote an inflammatory response which together with CTL and NK leads to host target tissue destruction. This paper summarizes the novel aspects of the immunobiology of acute GVHD (*Adv Clin Exp Med 2004, 13, 6, 1003–1011*).

**Key words,** Th1, Th2, cytokines, antigen presenting cells, natural killer, cytotoxic T cells.

Allogeniczna transplantacja szpiku kostnego (BMT) jest dziś uznaną metodą stwarzającą możliwość wyleczenia schorzeń nowotworowych układu krwiotwórczego. Ostra reakcja przeszczep

przeciwko biorcy (aGVHD) jest jednym z najważniejszych powikłań ograniczających stosowanie tej formy leczenia [1].

Występowanie aGVHD wiąże się z reakcją

limfocytów T dawcy (obecnych w przeszczepie) przeciwko antygenom biorcy obecnym na komórkach prezentujących antygen (APC) z następową dalszą rekrutacją i aktywacją limfocytów T dawcy oraz monocytów i makrofagów (tzw. faza aferentna). Na skutek tej dynamicznej interakcji między komórkami oraz uwalniania cytokin dochodzi do destrukcji tkanek docelowych (jelit, przewodów żółciowych wątroby oraz skóry) w wyniku apoptozy komórek (tzw. faza efektorowa). Klinicznym następstwem tych procesów immunologicznych jest choroba przeszczep przeciw biorcy objawiająca się: biegunką, żółtaczką i zmianami skórnymi o różnym nasileniu.

W zależności od obecności czynników ryzyka częstość występowania istotnego klinicznie aGVHD ocenia się na 10–80% (średnio 40%) [2].

Uznanyimi czynnikami ryzyka dla aGVHD są: obecność limfocytów T w przeszczepie, różnice w tzw. małych antygenach zgodności tkankowej (w przypadku genoidentycznych przeszczepów), stopień niezgodności w zakresie układu HLA (human leukocyte antigens) między parą dawca–biorca, różnica płci pomiędzy parą dawca–biorca (kobieta dawcą przeszczepu dla mężczyzny), alloimmunizacja dawcy (przetoczenie, porody), wiek biorcy, rodzaj i dawki chemioterapii/radioterapii kondycjonującej, użycie TBI (total body irradiation), seropozytywność CMV (wirus cytomegalii), źródło komórek hemopoetycznych (szpik kostny *versus* komórki hemopoetyczne z krwi obwodowej *versus* krew pępowinowa), środowisko mikrobiologiczne biorcy.

## Faza pierwsza – efekt kondycjonowania

Obejmuje okres kondycjonowania, tj. dużych dawek chemioterapii i/lub napromieniania całego ciała (TBI). Limfocyty T dawcy znajdujące się w materiale przeszczepowym dostają się do organizmu biorcy poddanego głębokiej immunosupresji, narażonego na toksyczne dla tkanek leczenie kondycjonujące oraz współistniejące zakażenie, zwłaszcza wirusowe. Wymienione czynniki są odpowiedzialne za aktywację komórek biorcy i wydzielanie cytokin prozapalnych, TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) i IL-1 (interleukina 1) [3]. Obecność cytokin prozapalnych nasila ekspresję molekuł adhezyjnych i kostymulujących, receptorów dla chemokin oraz antygenów kompleksu zgodności tkankowej MHC (major histocompatibility complex). Konsekwencją „sygnałów” z uszkodzonych tkanek jest aktywacja komórek dendrytycznych (DC) biorcy oraz zapoczątkowanie pierwotnej i wtórnej odpowiedzi immunologicznej [4].

Zwiększone ryzyko wystąpienia aGVHD, związane ze stosowaniem TBI, wynika z apoptozy komórek endotelialnych przewodu pokarmowego i zniszczenia nabłonka jelita na skutek napromienienia. Umożliwia to wnikanie białek immunostymulujących pochodzenia bakteryjnego – lipopolisacharydów (LPS), nasilających przebieg drugiej fazy aGVHD. Zależność stopnia nasilenia objawów aGVHD od intensywności leczenia kondycjonującego oraz poziomu cytokin we wczesnym okresie potwierdzono zarówno na modelu zwierzęcym, jak i w obserwacjach klinicznych.

## Faza druga – aktywacja komórek T

Aktywacja komórek T zależy od interakcji limfocytów T dawcy z komórkami prezentującymi antygen (APC – antigen presenting cells) biorcy. Kluczową dla inicjacji aGVHD rolę alloantygenów obecnych na komórkach APC potwierdzono niedawno na modelu zwierzęcym. U myszy będących chimerami antygeny klasy I i II układu HLA były jedynie obecne na komórkach APC, a komórki nabłonka jelit były pozbawione antygenów HLA, mimo to wystąpiły objawy ostrej GVHD w przewodzie pokarmowym. Potwierdzono w ten sposób, że obecność samych komórek APC wystarczy do aktywacji limfocytów T dawcy [5].

Alloantygeny mogą być prezentowane bezpośrednio przez komórki APC biorcy lub pośrednio przez komórki APC pochodzące od dawcy, chociaż tylko APC biorcy indukują aGVHD w przypadku niezgodności między dawcą i biorcą w zakresie głównego układu zgodności tkankowej (MHC – major histocompatibility complex) i mniejszych antygenów zgodności (MiHA – minor histocompatibility antigens) [5]. Na modelu mysim wykazano również większą aktywność immunostymulującą APCs u starszych osobników, co tłumaczy zależność ryzyka wystąpienia ciężkiej postaci aGVHD u starszych biorców.

Komórki dendrytyczne (DC – dendritic cells) należące do komórek APC odgrywają najważniejszą rolę w patomechanizmie aGVHD. Są aktywowane pod wpływem działania, 1) cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1), 2) apoptotycznych komórek powstałych pod wpływem terapii kondycjonującej oraz 3) tzw. antygenów grasiczoniezależnych, do których należą lipopolisacharydy ścian bakteryjnych (LPS) oraz ostatnio wykryty oligodeoksy nukleotyd pochodzenia wirusowego zawierający cytozynę i guaninę – CpG, które przenikają do układu krwionośnego przez uszkodzoną na skutek chemio-/radioterapii błonę śluzową przewodu pokarmowego. Pod wpływem tych sy-

gnałów komórki dendrytyczne stają się dojrzałe i zdolne do aktywacji limfocytów T, podczas gdy niedojrzałe DC indukują tolerancję T-komórkową [6]. Należy jednak dodać, że udział zarówno komórek dendrytycznych, jak i pozostałych komórek prezentujących antygen, (monocytów/makrofagów, limfocytów B) w patogenezie aGVHD nie jest do końca wyjaśniony.

Wiadomo, że aktywacja limfocytów T wymaga tzw. drugiego sygnału, czyli obecności molekuł kostymulujących dostarczanych przez komórki prezentujące antygen, między innymi molekuły CD28 (teoria synapsy immunologicznej utworzonej przez połączenie receptora limfocyty T i antygenów MHC obecnych na APC) [7]. Przerwanie drugiego sygnału przez zablokowanie molekuł kostymulujących zmniejsza objawy aGVHD, co wykazano na modelu mysim [8]. Wykazano także, że w przypadku HLA-zgodnych transplantacji szpiku u ludzi w indukcji aGVHD biorą udział obie subpopulacje limfocytów T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> rozpoznające tzw. antygeny „major minor” kodowane przez polimorficzne geny układu MiHA [9]. W następstwie aktywacji limfocyty T dawcy ulegają proliferacji, różnicowaniu i wytwarzają cytokiny.

## Udział cytokin

Alloantygeny obecne na komórkach prezentujących antygen aktywują w limfocytach T transkrypcję genów kodujących cytokiny i receptory cytokinowe [10]. Istnieje preferencja ze strony limfocytów Th1 (pomocnicze działające w odpowiedzi typu komórkowego) do wytwarzania cytokin, głównie IL-2 i IFN- $\gamma$  (interferon  $\gamma$ ), które kontrolują i nasilają odpowiedź immunologiczną wobec alloantygenów [11]. Dane eksperymentalne wskazują, że IL-2 jest wytwarzana we wczesnej fazie aGVHD przez limfocyty T CD4<sup>+</sup> dawcy, a dodanie nawet małych dawek IL-2 po dokonanym przeszczepieniu nasila objawy i zwiększa śmiertelność z powodu aGVHD. Ilość prekursorów limfocytów T produkujących IL-2 swoistych wobec biorcy (pHTLs – precursor host-specific T cells) jest czynnikiem ryzyka występowania aGVHD po allotransplantacji od HLA-identycznego dawcy. Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych blokujących receptor dla IL-2 spowodowało hamowanie rozwoju aGVHD w badaniach eksperymentalnych na zwierzętach, ale badania kliniczne z użyciem przeciwciała monoklonalnego 2A3 wykazały jedynie nieznaczne zmniejszenie nasilenia objawów klinicznych aGVHD. Ostatnio udowodniono również rolę interleukiny 15, która jest odpowiedzialna za inicjowanie podziałów allogeicznych limfocytów T *in vivo*. Stwierdzono zwią-

zek podwyższonego stężenia tej cytokiny w osoczu chorych z występowaniem ostrej GVHD [12]. IFN- $\gamma$  jest obok IL-2 najistotniejszą cytokiną w patogenezie aGVHD. Na modelu zwierzęcym zaobserwowano, że wczesny wzrost stężenia IFN- $\gamma$  w osoczu w + 7 dobie po transplantacji poprzedzało wystąpienie klinicznych objawów aGVHD. IFN- $\gamma$  wpływa na ekspresję molekuł adhezyjnych, chemokin, antygenów MHC oraz wielu molekuł kostymulujących odgrywających rolę w prezentacji antygenów. IFN- $\gamma$  mediuje również rozwój zmian narządowych w przebiegu aGVHD enteropatii oraz zmian skórnych [32]. IFN- $\gamma$  mediuje także immunosupresję towarzyszącą aGVHD polegającą na aktywacji indukowanej śmierci komórek (apoptozy) (AICD) aktywowanych limfocytów T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> z udziałem układu Fas/Fas ligand i tlenu azotu (NO). Obecność IFN- $\gamma$  powoduje, że nawet niewielkie ilości LPS w środowisku aktywują makrofagi i pobudzają wydzielanie przez nie prozapalnych cytokin i NO.

## Rola limfocytów Th1/Th2

Wśród limfocytów T wyróżnia się 4 funkcjonalnie zdefiniowane populacje: limfocyty pomocnicze CD4<sup>+</sup> Th1/Th2 oraz cytotoksyczne CD8<sup>+</sup> Tc1/Tc2, różniące się między innymi typem wydzielanych cytokin [13]. Limfocyty CD4<sup>+</sup> typu Th1 wydzielają cytokiny typu I (IL-2, IFN- $\gamma$ ), natomiast Th2 cytokiny typu II (IL-4, IL-5, IL-10). Podobnie limfocyty CD8<sup>+</sup> Tc1 i Tc2 wydzielają odpowiednio cytokiny typu I i II. Populacje Tc1 i Tc2 są odpowiedzialne za efekt cytolityczny, przy czym limfocyty Tc1 wykorzystują perforyny i drogę apoptozy zależną od Fas, Tc2 natomiast cytolizę zależną jedynie od perforyn. Badania eksperymentalne na modelu mysim wykazały, że limfocyty Th2 dawcy nie biorą udziału w inicjacji aGVHD, ale modulują jego przebieg. Alloswoiste limfocyty Tc2 dawcy wpływają hamująco na rozwój aGVHD. Uważa się, że funkcjonalnie zdefiniowane populacje limfocytów Th2 i Tc2 odgrywają istotną rolę w kontrolowaniu przebiegu aGVHD, zapobieganiu odrzuceniu przeszczepu oraz mediowaniu efektu przeszczep przeciwko białaczce (GVL – graft-versus-leukemia effect). Udział limfocytów Th1 pozostaje wciąż kontrowersyjny. Sugeruje się jednak, że odpowiadają za „burzę cytokinową” inicjującą aGVHD [14]. Wykazano również, że wahania w wydzielaniu cytokin przez limfocyty Th1 (ekstremalnie małe lub duże) mogą również indukować aGVHD [15, 16]. W indukcji i mediowaniu aGVHD odgrywa więc rolę wczesna polaryzacja funkcjonalna limfocytów T dawcy pod wpływem różnych cytokin, tak-

że podawanych dawcy *ex vivo* w celu mobilizacji komórek do transplantacji (czynnik wzrostu granulocytów – G-CSF u ludzi, w modelu zwierzęcym IL-18). Wydaje się również, że żadna z subpopulacji limfocytów Th1/Th2 nie jest osobno odpowiedzialna jedynie za indukowanie bądź hamowanie aGVHD [17].

Jedno z doniesień sugeruje również udział limfocytów Th1 i Th2 w przebiegu aGVHD w różnych narządach docelowych. Wykorzystano szczepy myszy pozbawione genów kodujących czynniki transkrypcyjne STAT 4 i STAT 6 (signal transducer and activator of transcription 4 i 6) aktywujące cytokiny odpowiedzialne za różnicowanie funkcjonalne limfocytów odpowiednio pod wpływem IL-12 i IL-4. Szczep myszy STAT4(–/–) charakteryzowała więc obniżona reaktywność limfocytów Th1 i podwyższona Th2, szczep STAT 6(–/–) charakteryzował się odwrotnym fenotypem limfocytów. Materiał przeszczepowy (komórki śledziony) pobrany od obu szczepów wywołał u biorców (napromienionych letalnie myszy) objawy aGVHD. Większe nasilenie objawów i większą śmiertelność obserwowano w przypadku dawcy STAT 6(–/–). Przeszczepienie komórek STAT6(–/–) powodowało objawy ostrego GVHD głównie w przewodzie pokarmowym, a transplantacja komórek STAT 4(–/–) skórną postać aGVHD i jedynie mierne objawy w obrębie przewodu pokarmowego. Na podstawie oceny obrazu klinicznego i badania histopatologicznego autorzy sugerują, że limfocyty Th2 indukują aGVHD w skórze i wątrobie, natomiast limfocyty Th1 w jelicie [18].

## Apoptoza limfocytów T

Delecja klonalna, czyli eliminacja odpowiednich klonów limfocytów autoreaktywnych jest podstawowym mechanizmem zabezpieczającym przed reakcją autoimmunologiczną. W modelu BMT u myszy z mieszanym chimeryzmem dojrzewające reaktywne limfocyty T dawcy są eliminowane w grasicy w wyniku apoptozy [19]. U człowieka rola narządów limfatycznych oraz zjawiska tzw. centralnej delecji w wywoływaniu tolerancji nie są jednoznacznie wyjaśnione. Repertuar obwodowych limfocytów T rozpoznających alloantygeny układu MHC odgrywa, jak się wydaje, główną rolę w rozwoju tolerancji przeszczepu. W przypadku przeszczepienia niezgodnego w układzie MHC liczba limfocytów T rozpoznających alloantygeny jest pięciokrotnie wyższa niż rozpoznających antygeny nominalne.

Delecja limfocytów T w obwodowych narządach limfatycznych odbywa się w mechanizmie

indukowanej przez receptor Fas (AICD – activation-induced cell death) lub biernej apoptozy zależnej od Bcl-2 (PCD – passive cell death). Rolę AICD mediowanej przez układ Fas/Fas ligand potwierdza zmniejszenie nasilenia aGVHD przez cytokiny limfocytów Th1 [20]. Podkreśla się również silną zależność aktywowanych limfocytów T od czynników wzrostu, w tym IL-2, IL-4, IL-7, IL-15 [21].

Ostatnio wykazano również, że wybiórcza delecja alloswoistych limfocytów T dawcy poprzez oczyszczenie przeszczepu metodą fotodynamiczną (z użyciem fotouczulacza limfocytów 4,5-dwubromorodaminy 123) zapobiega wystąpieniu aGVHD.

## Regulatorowe limfocyty T

Liczne doniesienia wskazują, że limfocyty T(reg) o fenotypie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> izolowane z krwi obwodowej, pępowinowej, grasicy oraz migdałków zdrowych dawców wykazują *in vitro* supresyjny wpływ na alloreaktywne limfocyty CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>. Limfocyty T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> izolowane ze śledziony myszy wywołują znamienne supresję limfocytów CD4<sup>+</sup>CD25<sup>–</sup> w mieszanej hodowli limfocytów (MLR), nawet gdy stosunek CD25<sup>+</sup>/CD25<sup>–</sup> wynosił 1: 4 [21]. Uważa się, że równowaga między CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T(reg) dawcy i konwencjonalnymi limfocytami T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>–</sup> ma istotny wpływ na przebieg klinicznego aGVHD [22]. Zdolność limfocytów T(reg) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> do hamowania alloreaktywności, a tym samym do wywoływania zjawiska tolerancji, zależy między innymi od wytwarzania IL-10 przez te limfocyty, obecności TGF-β (transforming growth factor beta) oraz zdolności do hamowania molekuł kostymulujących CD28/CTLA-4/B7 (gdzie B7 jest ligandem dla CD28), CD40/CD40. Ligandy, które jak wspomniano, są kluczowe dla aktywacji limfocytów T dawcy [23–25]. Obecność limfocytów T(reg) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> oraz CD4<sup>+</sup> CD25<sup>–</sup> dawcy oraz ich progenitorów wykazano w badaniach immunohistochemicznych i cytofluorymetrycznych tkanek docelowych dla aGVHD (jelito, wątroba) w 5 dobie po ich przeszczepieniu napromienionemu letalnie biorcy (badania na modelu zwierzęcym) (dane niepublikowane Hoffmann et al.). Wskazuje to, że limfocyty T(reg) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nie hamują ekspansji limfocytów CD4<sup>+</sup>CD25<sup>–</sup> w tkankach zajętych procesem aGVHD. W wielu badaniach na modelu zwierzęcym wykazano, że podanie świeżo wyizolowanych limfocytów T(reg) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (bez uprzedniej stymulacji dawcy cytokinami) jest terapią „ratunkową” dla biorcy, u którego limfocyty T



CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> wywołały zagrażające życiu aGVHD/, ponadto stwierdzono, że efekt protekcyjny mają tylko limfocyty T(reg) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> pochodzące od dawcy i zależy głównie od wytwarzania przez te limfocyty interleukiny 10 [21]. Limfocyty T(reg) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> poddane ekspansji *ex vivo*, a uzyskane po wcześniejszej stymulacji komórkami prezentującymi antygen pochodzący od biorcy przeszczepu, hamują aGVHD [24].

## Chemokiny

Migracja limfocytów jest wielostopniowym procesem przebiegającym z sekwencyjnym udziałem molekuł adhezyjnych na powierzchni limfocytów, w śródbłonku naczyń oraz wielu chemokin i ich receptorów. Rola chemokin biorących udział w rekrutacji i migracji alloreaktywnych limfocytów T do tkanek docelowych dla aGVHD nie jest w pełni wyjaśniona. W badaniach na zwierzętach wykazano, że rekrutacja limfocytów T CD8<sup>+</sup> zawierających mRNA dla chemokiny CCR5 (z grupy chemokin zawierających sąsiadujące ze sobą cząsteczki cysteiny) ma związek z rozwojem aGVHD w wątrobie. Podanie przeciwciała monoklonalnego anti-CCR5 powodowało ograniczenie migracji tych limfocytów i zmian histopatologicznych związanych z aGVHD w wątrobie. Chemokiny wydzielane przez limfocyty T, przede wszystkim MIP-1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ ) są odpowiedzialne za rekrutację limfocytów T CD8<sup>+</sup> do tkanek docelowych dla ostrego GVHD, nie wpływają natomiast na limfocyty T CD4<sup>+</sup>. Stwierdzono nadekspresję wielu chemokin w narządach docelowych dla aGVHD, MIP-1 $\alpha$ , MIP-2 oraz MIG (monokine induced by IFN- $\gamma$ ) w wątrobie i śledzionie oraz MIP-1 $\alpha$ , MIP-2, MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), MCP-3 głównie w skórze. Ostatnie badania na modelu aGVHD u myszy wykazały, że limfocyty T dawcy ulegają jednocześnie ekspansji w narządach (wątrobie, płucach, śledzionie), co dowodzi, że limfocyty T dawcy reagują bezpośrednio z komórkami prezentującymi antygen biorcy nie tylko w narządach limfatycznych, ale i w docelowych narządach nielimfatycznych [26].

## Komórki NK

Ostatnio wiele uwagi poświęca się udziałowi komórek NK w przebiegu aGVHD. Ludzkie komórki NK mają na swojej powierzchni 2 typy receptorów: pierwszy tzw. KIR (killer-cell inhibitory receptors) należący do nadrodziny immunoglobulin, dla którego ligandem są antygeny MHC kla-

sy I oraz receptor lektynowy typu C [27]. Połączenie KIR ze swoistym ligandem, którym jest cząsteczka MHC klasy I powoduje transdukcję negatywnego sygnału hamującego aktywność komórki NK. Wykazano, że jeśli istnieje niezgodność między dawcą i biorcą w zakresie HLA klasy I, alloreaktywność mediowana przez komórki NK dawcy (które nie mają w tej sytuacji swoistego ligandu) zostaje zwielokrotniona. W modelu mysim infuzja komórek NK dawcy zmniejsza nasilenie aGVHD prawdopodobnie na skutek eliminacji APCs lub przez hamowanie TGF- $\beta$ . Zwrócono też uwagę, że niezgodność w zakresie niektórych antygenów HLA klasy I wzmacnia efekt GVH (graft versus host) wywołany przez alloreaktywne komórki NK dawcy, mediuje tym samym silny efekt GVL (graft versus leukemia) bez wywoływania ostrego GVHD. Badania z użyciem szczepu myszy pozbawionych fosfatazy inozytolu zawierającej grupę -SH2 (SHIP SH2 – containing inositol phosphatase), których komórki NK mają 2 rodzaje receptorów inhibitorowych zdolnych do przyłączania własnych lub allogenicznych ligandów MHC, sugerują, że również komórki NK biorcy odgrywają rolę w inicjowaniu aGVHD [28–31].

## Faza trzecia – efektorowa

### Efektory komórkowe

Faza eferentna aGVHD jest realizowana przez komórki NK oraz limfocyty cytotoksyczne (CTLs – cytotoxic T lymphocytes) oraz cytokiny mediuje reakcje zapalną, TNF- $\alpha$ , IL-1 oraz NO (tlenek azotu).

Udział komórek NK i CTLs w aGVHD polega na wywoływaniu cytolizy komórek w tkankach docelowych. Komórki NK i CTLs wywołują efekt cytolityczny przez interakcję Fas/Fas ligand oraz układu perforyna (proteaza serynowa)/granzym obecnego w ziarnistościach tych komórek. Fas/Fas ligand jest odpowiedzialny za AICD (activation-induced cell death), rola granzymów (granule-associated enzymes) polega na fragmentacji DNA i wywoływaniu apoptozy [32, 33]. Przeszczepienie pozbawionych perforyny limfocytów T powoduje efekt opóźniający wystąpienie aGVHD w układzie transplantacji z niezgodnością układu MiHA, nie wpływając jednak na zmiany histopatologiczne i zmniejszenie śmiertelności związanej z aGVHD [34]. Znaczenie cytolizy zależnej od drogi perforyna/granzym badano w różnych podtypach limfocytów T. Stwierdzono, że w limfocytach cytotoksycznych CD4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup> CTLs) wykorzystują preferencyjnie układ Fas/Fas ligand, natomiast CD8<sup>+</sup> CTLs głównie układ perforyna/granzym

[35]. Działanie układu perforyna/granzym w wywoływaniu zmian patologicznych w tkankach nie zostało dotąd dobrze poznane [36].

Wiadomo natomiast, że cytotoksyczność mediowana przez pozakomórkowy Fas ligand odgrywa istotną rolę w wywoływaniu zmian narządowych w aGVHD (w wątrobie, skórze, narządach limfatycznych) [36]. W przebiegu aGVHD w wątrobie wzrasta ekspresja Fas na komórkach nabłonka przewodów żółciowych, a podanie przeciwciała monoklonalnego anty-Fas ligand u myszy z objawami aGVHD znacząco zmniejsza zmiany destrukcyjne w wątrobie [37]. Także u chorych z ostrym GVHD zaobserwowano podwyższone stężenie rozpuszczalnego Fas i Fas ligand.

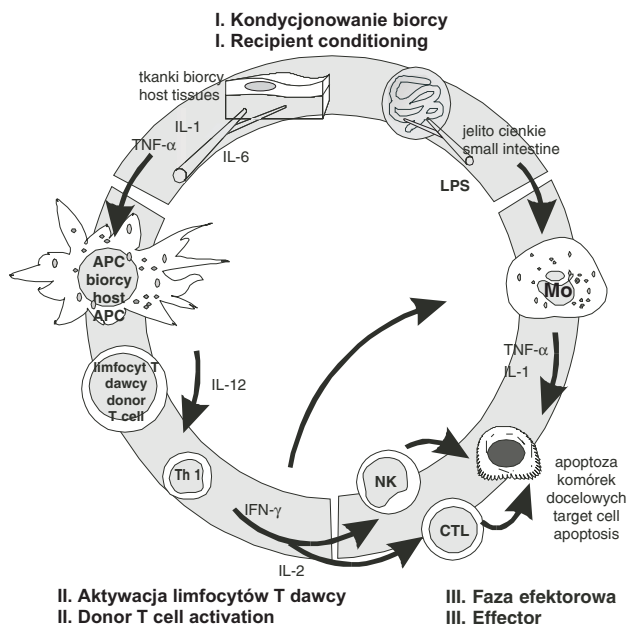
Eksperymenty na myszach wykazały, że limfocyty T cytotoksyczne z deficytem układu Fas/Fas ligand i perforyna/granzym (cdd-cytotoxic double deficient) nie były zdolne do wywołania śmiertelnej postaci aGVHD u subletalnie napromienionego biorcy [38]. Kolejne badania z letalnie napromienionymi myszami wykazały, że limfocyty T cdd dawcy powodowały taką samą śmiertelność z powodu aGVHD w porównaniu do tzw. dzikich limfocytów T zawierających oba układy odpowiedzialne za apoptozę [39]. Oznacza to, że istnieją inne cząsteczki efektorowe zdolne do indukowania cytotoksyczności przy niesprawnej funkcji układu Fas/Fas ligand i perforyna/granzym. Ostatnie badania wykazały, że brak ligandu odpowiedzialnego za apoptozę komórek indukowaną TNF (TRAIL – tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand) na komórkach dawcy istotnie zmniejsza reakcję przeszczep przeciwko białaczce, nie wpływając na stopień ciężkości aGVHD [40]. Może to oznaczać, że limfocyty T

dawcy wykorzystują różne dla mediowania obu reakcji mechanizmy efektorowe.

## Efektory prozapalne – cytokiny

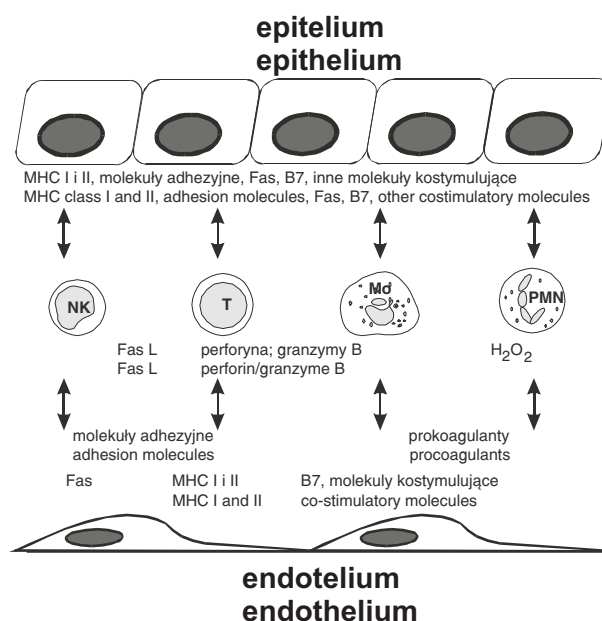
Cytokiny prozapalne TNF- $\alpha$  i IL-1 są wydzielane przez monocyty i makrofagi oraz stymulowane przez receptory, tzw. toll-like receptors (TLRs) przez wspomniane wcześniej produkty bakteryjne, np. LPS przechodzące przez błonę śluzową jelit i skórę uszkodzone pod wpływem leczenia kondycjonującego oraz procesu aGVHD. Wiadomo także, że zmiany destrukcyjne w przewodzie pokarmowym nasilają układową reakcję aGVHD w wyniku propagacji „burzy cytokinowej”. TNF- $\alpha$  odgrywa kluczową rolę w patofizjologii jelitowego aGVHD, co wykazano w badaniach na zwierzętach i u ludzi. Pełni również rolę efektorową w reakcji aGVHD w skórze i tkance limfatycznej. Zmiany narządowe w przebiegu aGVHD mogą zostać zahamowane podaniem przeciwciała monoklonalnego anty-TNF- $\alpha$ . Niezależnie od tego, czy źródłem TNF- $\alpha$  są komórki dawcy, czy biorcy cytokina ta: 1) aktywuje komórki dendrytyczne i ułatwia prezentację alloantygenów, 2) pobudza migrację komórek efektorowych limfocytów T, granulocytów i monocytów do tkanek docelowych przez indukcję chemokin, 3) wywołuje bezpośrednio uszkodzenie tkanek w mechanizmie apoptozy i martwicy [41].

Drugą wydzielaną głównie w efektorowej fazie aGVHD w skórze i śledzionie cytokiną jest IL-1. Podanie biorcy antagonisty receptora dla IL-1 (IL-1ra) zmniejsza śmiertelność z powodu aGVHD u zwierząt, chociaż kliniczne badania randomizo-



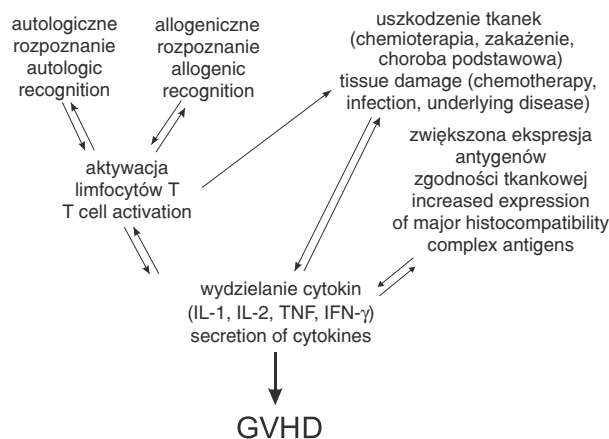
**Ryc. 1.** Reakcja przeszczep przeciwko biorcy: faza I – uszkodzenie tkanek związane z kondycjonowaniem, chorobą podstawową oraz zakażeniami, faza II – aktywacja limfocytów T, faza III – efektorowa

**Fig. 1.** Graft-versus-host-disease (GVHD) is a three step process. Phase I – conditioning regimen, phase II – T cells activation, III – effector phase (acc. to Ferrara JLM, Antin JH. The Pathophysiology of graft-versus-host-disease. From Donnell Thomas E, Blume KG, Forman SJ. Hematopoietic Cell Transplantation. Blackwell Science Inc, 1998)



**Rys. 2.** Interakcje komórkowe w przebiegu reakcji przeszczep przeciwko biorcy. Uszkodzenie nabłonka i śródbłonka może prowadzić do ekspresji licznych białek powierzchniowych i pobudzenia interakcji między komórkami NK, limfocytami T(T), monocytami (Mo) i granulocytami (PMN). Działanie to może obejmować zwiększoną ekspresję molekuł MHC, molekuł adhezyjnych, receptorów, molekuł kostymulujących, prokoagulantów powierzchniowych, Fas oraz innych. Zachodzi także aktywacja komórek efektorowych oraz ułatwienie rozpoznawania antygenów oraz oddziaływania z komórkami docelowymi. Dodatkowo występuje miejscowe uszkodzenie tkanek (nadtlenuk i ponadtlenek wodoru uwalniane przez granulocyty); jest nieswoiste i może prowadzić do uszkodzenia komórek niebiorących udziału w tych procesach

**Fig. 2.** Cellular interactions in graft-versus-host-disease. Injury to endothelium and epithelium may result in the expression of surface proteins that may foster interactions with natural killer cells (NK), T cells (T), monocytes (Mo) and granulocytes (PMN). This may include increased expression of MHC molecules, adhesion molecules and receptors, co-stimulatory molecules cell surface procoagulants, Fas and others. Facilitation of antigen recognition and interaction with targets by effector cells also occurs. Additionally nonspecific local injury through hydrogen peroxide and superoxide produced by recruited granulocytes also occurs



**Ryc. 3.** Procesy prowadzące do wystąpienia reakcji przeszczep przeciwko biorcy (GVHD). Aktywacja limfocytów T i uszkodzenie tkanek prowadzi do uwolnienia cytokin, co wywołuje objawy kliniczne GVHD

**Fig. 3.** Events that lead to graft-versus-host-disease (GVHD). T cell activation and tissue injury release cytokines that produce the clinical manifestations of GVHD

wane u ludzi nie potwierdziły wpływu IL-1 ra na przebieg aGVHD.

Przemawia to za plejotropowym działaniem IL-1 oraz synergizmem działania z innymi cytokinami głównie z TNF- $\alpha$  [42].

Wystąpienie objawów aGVHD poprzedza wzrost stężenia produktów oksydacji w surowicy. Tlenek azotu jest jednym z czynników sprzyjających temu procesowi przez nasilenie immunosupresji. Aktywowane makrofagi wytwarzają NO,

co powoduje uwolnienie żelaza z komórek, a to przyczynia się do zahamowania proliferacji komórek odnawiających nabłonek w jelicie i skórze. Rolę obu cytokin potwierdzono w badaniach u chimer mysich, u których neutralizacja IL-1 i TNF- $\alpha$  ograniczyła aGVHD mediowane głównie przez limfocyty CD4<sup>+</sup> w mniejszym stopniu przez limfocyty CD8<sup>+</sup> [5].

Ostra GVHD jest złożoną wieloetapową, kompleksową reakcją immunologiczną przebiegającą

z udziałem różnych rodzajów komórek dawcy i biorcy. W patogenezie tego procesu najważniejszą rolę odgrywa aktywacja limfocytów T dawcy przez komórki APCs biorcy oraz następowe uaktywnienie kaskady cytokin, co doprowadza do klinicznych objawów aGVHD.

Efektory reakcji zapalnej działają synergicznie

z komórkami cytotoksycznymi w obecności wielu różnych sygnałów chemotaktycznych i powodują zwielokrotniony efekt miejscowego uszkodzenia tkanek, co ułatwia nasilenie i uogólnienie reakcji zapalnej prowadzącej do wielonarządowych zmian u biorcy przeszczepu allogenicznego. Omówione etapy aGVHD przedstawiono na ryc 1–3.

## Piśmiennictwo

- [1] Ferrara JLM, Deeg HJ: Graft versus host disease. *N Engl J Med* 1991, 324, 667–674.
- [2] Goker H, Haznedaroglu IC, Chao NJ: Acute graft-vs-host disease, pathobiology and management. *Exp Hematol* 2001, 29, 259–277.
- [3] Xun CQ, Thompson JS, Jennings CD, Brown SA, Widmer MB: Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice. *Blood* 1994, 83, 2360–2367.
- [4] Matzinger P: The danger model, a renewed sense of self. *Science* 2002, 296, 301–305.
- [5] Teshima T, Ferrara JL: Understanding the alloresponse, new approaches to graft-versus-host disease prevention. *Semin Hematol* 2002, 39, 15–22.
- [6] Ordemann R: Enhanced allostimulatory activity of host antigen-presenting cells in old mice intensifies acute graft-versus-host disease. *JCI* 2002.
- [7] Sallusto F, Lanzavecchia A: The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis Res* 2002, 4, Suppl. 3, S127–132.
- [8] Dustin ML: Role of adhesion molecules in activation signaling in T lymphocytes. *J Clin Immunol* 2001, 21, 258–263.
- [9] Ferrara J, Antin J: Pathophysiology of human GVHD. In: *Hematopoietic Cell Transplantation*. Eds.: Forman S, Blume K, Thomas E, Blackwell Science, 1999, 305–315.
- [10] Ho IC, Glimcher LH: Transcription, tantalizing times for T cells. *Cell* 2002, 109, Suppl., S109–S120.
- [11] Tseng SY, Dustin ML: T-cell activation, a multidimensional signaling network. *Curr Opin Cell Biol* 2002, 14, 575–580.
- [12] Ferrara JLM, Marion A, McIntyre JF, Murphy GF, Burakoff SJ: Amelioration of acute graft-versus-host disease due to minor histocompatibility antigens by *in vivo* administration of anti-interleukin 2 receptor antibody. *J Immunol* 1986, 137, 1874–1877.
- [13] Wall DA, Sheehan KC: The role of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interferon  $\gamma$  in graft-versus-host disease and related immunodeficiency. *Transplantation* 1994, 57, 273–279.
- [14] Brochu S, Rioux-Masse B, Roy J, Roy DC, Perreault C: Massive activation-induced cell death of alloreactive T cells with apoptosis of bystander postthymic T cells prevents immune reconstitution in mice with graft-versus-host disease. *Blood* 1999, 94, 390–400.
- [15] Refaeli Y, Van Parijs L, Alexander SI, Abbas AK: Interferon  $\gamma$  is required for activation-induced death of T lymphocytes. *J Exp Med* 2002, 196, 999–1005.
- [16] Fowler DH, Gress RE: Th2 and Tc2 cells in the regulation of GVHD, GVL, and graft rejection, considerations for the allogeneic transplantation therapy of leukemia and lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2000, 38, 221–234.
- [17] Sykes M, Szot GL, Nguyen PL, Pearson DA: Interleukin-12 inhibits murine graft-versus-host disease. *Blood* 1995, 86, 2429–2438.
- [18] Murphy WJ, Welniak LA, Taub DD, Wütrout RH, Taylor PA, Valleria DA, Kopf M, Young H, Longo DL, Blazar BR: Differential effects of the absence of interferon- $\gamma$  and IL-4 in acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in mice. *J Clin Invest* 1998, 102, 1742–1748.
- [19] Welniak LA, Blazar BR, Wütrout RH, Anver MR, Murphy WJ: Role of interleukin-12 in acute graft-versus-host disease (1). *Transpl Proc* 2001, 33, 1752–1753.
- [20] Reddy P, Teshima T, Hildebrandt G, Williams DL, Liu C, Cooke KR, Ferrara IL: Pretreatment of donors with interleukin-18 attenuates acute graft-versus-host disease via STAT6 and preserves graft-versus-leukemia effects. *Blood* 2003, 101, 2877–2885.
- [21] Nikolic B, Lee S, Bronson RT, Grusby MJ, Sykes M: Th1 and Th2 mediate acute graft-versus-host disease, each with distinct end-organ targets. *J Clin Invest* 2000, 105, 1289–1298.
- [22] Kamradt T, Mitchison NA: Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med* 2001, 344, 655–664.
- [23] Sykes M: Mixed chimerism and transplant tolerance. *Immunity* 2001, 14, 417–424.
- [24] Li XC, Strom TB, Turka LA, Wells AD: T cell death and transplantation tolerance. *Immunity* 2001, 14, 407–416.
- [25] Suchin EJ, Langmuir PB, Palmer E, Sayegh MH, Wells AD, Turka LA: Quantifying the frequency of alloreactive T cells *in vivo*, new answers to an old question. *J Immunol* 2001, 166, 973–981.
- [26] Drobyski WR, Komorowski R, Logan B, Gendelman M: Role of the passive apoptotic pathway in graft-versus-host disease. *J Immunol* 2002, 169, 1626–1633.
- [27] Drobyski WR, Gendelman M: Regulation of alloresponses after bone marrow transplantation using donor T cells expressing a thymidine kinase suicide gene. *Leuk Lymphoma* 2002, 43, 2011–2016.



- [28] **Chen BJ, Cui X, Liu C, Chao NJ:** Prevention of graft-versus-host disease while preserving graft-versus-leukemia effect after selective depletion of host-reactive T cells by photodynamic cell purging process. *Blood* 2002, 99, 3083–3088.
- [29] **Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S:** Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* 2002, 196, 389–399.
- [30] **Johnson BD, Konkol MC, Truitt RL:** CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T-cells of donor origin suppress alloreactivity after BMT. *Biol Blood Marrow Transpl* 2002, 8, 525–535.
- [31] **Cohen JL, Trenado A, Vasey D, Klatzmann D, Salomon BL:** CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells, new therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp Med* 2002, 196, 401–406.
- [32] **Taylor PA, Friedman TM, Korngold R, Noelle RJ, Blazar BR:** Tolerance induction of alloreactive T cells via *ex vivo* blockade of the CD40, CD40L costimulatory pathway results in the generation of a potent immune regulatory cell. *Blood* 2002, 99, 4601–4609.
- [33] **Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR:** The infusion of *ex vivo* activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2002, 99, 3493–3499.
- [34] **Taylor PA, Friedman TM, Korngold R, Noelle RJ, Blazar B:** Tolerance induction of alloreactive T cells via *ex vivo* blockade of the CD40, CD40L costimulatory pathway results in the generation of a potent immune regulatory cell. *Blood* 2002, 99, 4601–4609.
- [35] **Tamada K, Tamura H, Flies D, Fu YX, Ceuse E, Pease LR, Blazar BR, Chen L:** Blockade of LIGHT/LT $\beta$  and CD40 signalling induces allospecific T cell anergy, preventing graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 2002, 109, 549–557.
- [36] **Serody JS, Cook DN, Kirby SL, Reap E, Shea TC, Frelinger JA, Murine T:** lymphocytes incapable of producing macrophage inhibitory protein-1 are impaired in causing graft-versus-host disease across a class I but not class II major histocompatibility complex barrier. *Blood* 1999, 93, 43–50.
- [37] **New JY, Li B, Koh WP, et al.:** T cell infiltration and chemokine expression, relevance to the disease localization in murine graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 2002, 29, 979–986.
- [38] **Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA:** Natural killer cell receptors, new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 2002, 100, 1935–1947.
- [39] **Murphy WJ, Koh CY, Raziuddin A, Bennett M, Longo DL:** Immunobiology of natural killer cells and bone marrow transplantation, merging of basic and preclinical studies. *Immunol Rev* 2001, 181, 279–289.
- [40] **Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchile WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli MF, Velardi A:** Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002, 295, 2097–2100.
- [41] **Schmaltz C, Alpdogan O, Muriglan SJ, Kappel BJ, Rotolo JA, Ricchetti ET, Greenberg AS, Willis LM, Murphy GF, Crawford JM, van den Brink MR:** Donor T cell-derived TNF is required for graft-versus-host disease and graft-versus-tumor activity after bone marrow transplantation. *Blood* 2003, 2440–2445.
- [42] **van den Brink MR, Burakoff SJ:** Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Immunol* 2002, 2, 273–281.

### Adres do korespondencji:

Beata Piątkowska-Jakubas  
Katedra i Klinika Hematologii CM UJ  
ul. Kopernika 17  
31-501 Kraków

Praca wpłynęła do Redakcji: 5.12.2003 r.

Po recenzji: 6.05.2004 r.

Zaakceptowano do druku: 6.05.2004 r.

Received: 5.12.2003

Revised: 6.05.2004

Accepted: 6.05.2004