

Szpik potrzebuje zgody



JACEK NOWAK

Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa
jnowak@ihit.waw.pl

Prof. Jacek Nowak jest specjalistą od badań immunogenetycznych i problemów związanych ze zgodnością tkankową dawcy i biorcy przeszczepu krwiotwórczych komórek macierzystych.

Przeszczep może uratować życie, ale tylko wtedy, gdy tkanka dawcy jest „zgodna” z organizmem biorcy. Co to znaczy i dlaczego organizm potrafi zidentyfikować i odrzucić obcą tkankę? Odpowiadają za to białka głównego kompleksu zgodności tkankowej – MHC

Białka MHC (ang. *major histocompatibility complex*) są cząsteczkami występującymi na powierzchni komórek. Ich zadanie polega na prezentowaniu antygenów – krótkich produktów rozpadu obecnych w komórce białek – wyspecjalizowanym komórkom układu odpornościowego. Ich odkrycie zawdzięczamy badaniom nad odrzucaniem przeszczepów u myszy, prowadzonym w pierwszej połowie XX wieku przez G. Snella, B. Benacerrafa i J. Dausseta, którzy za swoją pracę otrzymali w 1980 roku Nagrodę Nobla. Później okazało się, że cząsteczki MHC uczestniczą też w odpowiedzi immunologicznej przeciwko wirusom, a R. Zinkernagel i P. Doherty zdobyli Nagrodę Nobla (w 1996 r.), pokazując, że odpowiedź immunologiczna ogranicza się do komórek organizmu, które na swojej powierzchni mają cząsteczki MHC takie jak komórki układu odpornościowego. Nazywamy to restrykcją immunologiczną.

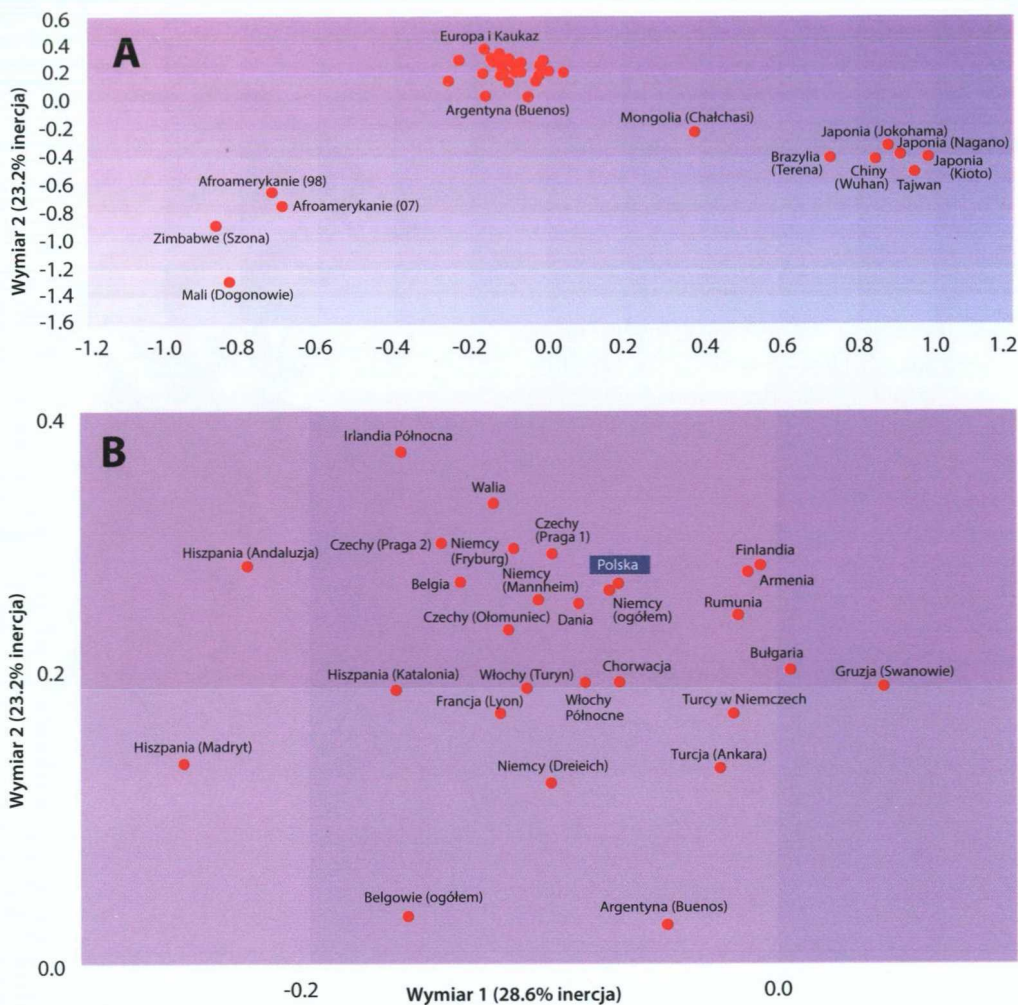
Cząsteczki MHC współpracują ściśle z limfocytami T, które stanowią jeden z typów komórek układu odpornościowego. Limfocyty T potrafią rozpoznawać prezentowane przez MHC antygeny. Mogą one pochodzić zarówno z białek normalnie obecnych w komórce, jak również z atakujących ją patogenów wewnątrzkomórkowych, takich jak wirusy.

Jeżeli antygen zostanie rozpoznany jako obcy, limfocyt rozpoczyna odpowiedź immunologiczną przeciwko prezentującej go komórce. W ten sposób cząsteczki MHC, zwane u ludzi HLA (ang. *human leukocyte antigen*), stanowią istotny element tzw. selfu immunologicznego, czyli systemu pozwalającego odróżnić własne struktury od obcych.

Repertuar cząsteczek HLA jest szeroki – wśród ludzi istnieją tysiące alleli (wariantów kodujących je genów), a poszczególne grupy etniczne mają ich charakterystyczną dla siebie kombinację oraz częstość występowania. W naszym zespole wykonaliśmy badania określające podobieństwo genetyczne między niespokrewnionymi osobami figurującymi w rejestrze dawców szpiku (im bardziej dawca jest podobny do biorcy pod względem garnituru HLA, tym większa szansa, że przeszczep nie zostanie odrzucony i nie dojdzie do reakcji przeszczepu przeciwko biorcy). Wykazaliśmy, że dystans genetyczny określony na podstawie częstości alleli w genach HLA A, B oraz DRB1 odzwierciedla dystans geograficzny między populacjami, a mapa wykreślona na podstawie częstości genowych do złudzenia przypomina obraz z atlasu geograficznego. Wyniki pokazuje rycina obok – czytelnik może zatem sprawdzić, do której populacji jest Polakom najbliższej. My zaś, jako transplantolodzy, stwierdziliśmy na tej podstawie, że niespokrewnieni dawcy szpiku z rejestrów sąsiedzkich są pod względem immunogenetycznym lepsi niż dawcy z rejestrów bardziej oddalonych geograficznie.

MHC to nie wszystko

Zgodność cząsteczek MHC nie jest, niestety, jedynym warunkiem decydującym o przyjęciu przeszczepu i tolerancji tkanek biorcy. W skład *selfu* wchodzi bowiem także słabe antygeny zgodności tkankowej (mHA, ang. *minor histocompatibility antigens*). Są to peptydy pochodzące z własnych białek organizmu, związane z cząsteczkami HLA. Dla receptorów limfocytów T potrafiących rozpoznawać własne struktury MHC-peptyd charaktery-



Dystans genetyczny określony na podstawie częstości alleli w genach HLA A, B oraz DRB1 odzwierciedla dystans geograficzny między populacjami

styczne jest niskie powinowactwo do tych struktur, co zapewnia tolerancję immunologiczną oraz podtrzymanie puli tzw. naiwnych limfocytów T. Przypuszcza się, że niewielka zmiana sekwencji (np. zmiana tylko jednego aminokwasu) prezentowanego peptydu może zwiększyć powinowactwo kompleksu MHC-peptyd do receptora komórki T i spowodować jej aktywację, wzbudzając w ten sposób odpowiedź odpornościową przeciwko patogenowi lub obcym tkankom. Niestety, nasza wiedza na temat sekwencji oraz swoistości tkankowej peptydów istotnych z punktu widzenia transplantacji jest bardzo ograniczona.

Kompleksowe opracowanie klinicznego znaczenia różnic peptydowych w kontekście pełnej zgodności HLA pomiędzy dawcą a biorcą przeszczepu szpiku stanowi przedmiot grantu, o który nasz Instytut wraz Warszawskim Uniwersytetem Medycznym aplikuje do Narodowego Centrum Nauki. Badania te zamierzamy przeprowadzić, wykorzystując metodę sekwencjonowania pełnego składu eksonowego (ang. WES, *whole exome sequencing*). Mamy nadzieję, że wyjaśni ona niektóre właściwości *selfu* peptydowego oraz

związane z jego niezgodnością niepowodzenia transplantacji szpiku lub krwiotwórczych komórek macierzystych (KKM).

Odporność wrodzona też ma znaczenie

Główny układ zgodności tkankowej (MHC) to element odporności nabytej. W procesie immunologicznego nadzoru przeszczepu u biorcy liczą się jednak także mechanizmy odporności wrodzonej. Tutaj istotną funkcję pełnią receptory KIR (ang. *killer-cell immunoglobulin-like receptor*) występujące na komórkach naturalnej cytotoxycywności, czyli komórkach NK (ang. *natural killer*). Komórki NK, jak sama nazwa wskazuje, potrafią zabijać inne komórki, ale ta ich tendencja jest hamowana poprzez związanie receptora KIR z niektórymi cząsteczkami HLA klasy I. W tym przypadku cząsteczki HLA pełnią funkcję *selfu*, ponieważ ich występowanie na wszystkich komórkach organizmu chroni tkanki przed atakiem komórek NK. W przypadku infekcji wirusowej albo stanu zapalnego związanego z transformacją nowotworową w nieprawidłowej komórce dochodzi do wzmożonej ekspresji cząsteczek aktywu-

Konflikt immunologiczny – problem w transplantologii

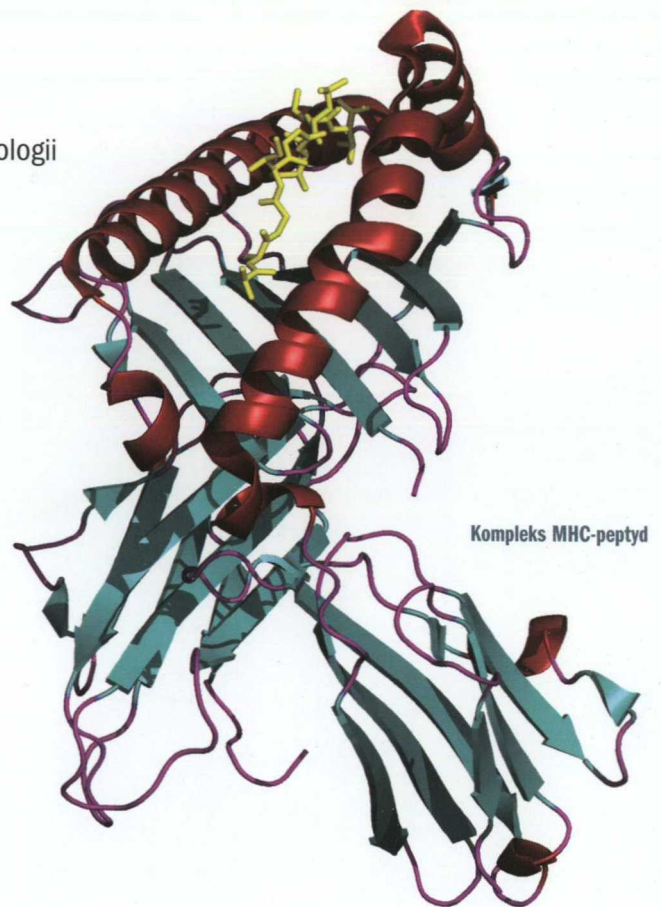
jących komórki NK poprzez receptory KIR typu aktywującego. Wówczas sygnał aktywacji przeważa nad hamowaniem i komórki NK zaczynają takie komórki niszczyć.

Zagadnienie *selfu* to jeden z kluczowych tematów badań immunologicznych, także w naszym ośrodku. Kompleksowe zdefiniowanie struktur wchodzących w jego skład, a co za tym idzie – zrozumienie jego funkcji – mogłoby wpłynąć na skuteczność zwalczania chorób zakaźnych, nowotworowych, autoimmunologicznych oraz na powodzenie leczenia transplantacyjnego czy częstość niektórych powikłań przetoczeniowych.

Kiedy dojdzie do konfliktu...

Niezgodność przeszczepu krwiotwórczych komórek macierzystych pod względem HLA między dawcą a biorcą stanowi konflikt immunologiczny o wielu obliczach. Gdy limfocyty T dawcy rozpoznają obce cząsteczki HLA na tkankach biorcy, skutkuje to najczęściej ostrą chorobą „przeszczep przeciwko gospodarzowi” zwaną aGvHD (ang. *acute graft versus host disease*). Około 10% przeszczepionych limfocytów T pochodzących od dawcy z niezgodnością HLA wykazuje bezpośrednią reaktywność z tkankami biorcy bez poprzedzającej immunizacji. Ostra postać GvHD wywoływana przez tę populację limfocytów polega na niszczeniu głównych barier immunologicznych biorcy, takich jak skóra, śluzówka jelita, wątroba itp. Powikłanie to jest w wysokim odsetku śmiertelne i wymaga zastosowania intensywnej immunosupresji zarówno zapobiegawczo, jak i w celu leczenia skutków aGvHD, co z kolei sprzyja rozwojowi zakażeń. Później u biorcy może rozwinąć się przewlekła GvHD (cGvHD, ang. *chronic GvHD*). Opóźnienie jest spowodowane wpływem czasu potrzebnego na wygenerowanie komórkowej odpowiedzi odpornościowej wywołanej prawdopodobnie niezgodnością mHA, często w połączeniu z niezgodnością HLA. Choć przewlekła GvHD występuje rzadziej niż ostra postać, jest trudniejsza do wyleczenia i częściej prowadzi do śmierci biorcy.

Nie jesteśmy wobec tych powikłań bezradni. Obecnie ok. 80% polskich chorych otrzymuje przeszczep szpiku od dawcy całkowicie zgodnego pod względem HLA, podczas gdy jeszcze 5 lat temu odsetek ten wynosił ok. 35%. Jest to możliwe dzięki skutecznym programom rekrutacji honorowych dawców



szpiku oraz godnemu pochwały altruizmowi Polaków. Ośrodek Dawców Szpiku Instytutu Hematologii i Transfuzjologii bierze udział m.in. w Narodowym Programie Rozwoju Medycyny Transplantacyjnej, który przyczynił się do wzrostu liczby zarejestrowanych dawców w ciągu ostatnich 5 lat z ok. 30 tys. do ponad 580 tys. Dla chorych, dla których brak w rejestrach dawcy całkowicie zgodnego, opracowywane są metody doboru dawców z tzw. niezgodnością permissywną, tj. niezgodnością o dopuszczalnej szkodliwości.

Wstępne wyniki naszych badań klinicznych wskazują, że oprócz liczby niezgodnych cząsteczek HLA (10 zgodnych na 10 badanych – dobrze, 9/10 lub 8/10 – gorzej, mniej – jeszcze gorzej) bardzo istotne dla przeżycia biorcy KKM jest rozłożenie niezgodności w pochodzących od obojga rodziców supergenach MHC zwanych haplotypami. Aktualnie prowadzimy więc badania nad opracowaniem algorytmu doboru nie w pełni zgodnego dawcy KKM w taki sposób, żeby niezgodność dotyczyła tylko jednego spośród dwóch posiadanych przez potencjalnego dawcę haplotypów MHC. Działaniom tym towarzyszy poprawa procedur medycznych przeciwdziałających powikłaniom poprzez stosowanie skuteczniejszych środków immunosupresyjnych nowej generacji oraz przeciwciał monoklonalnych, dostosowa-

nie metody przygotowania chemicznego i radiacyjnego do stanu pacjenta, tzw. pre-emptywne zapobieganie aktywacji wirusów, antybiotykoterapia czy manipulacje składem komórkowym przeszczepu.

Immunologiczna dominacja

Po transplantacji KKM w konflikcie pozostają dwa układy immunologiczne – biorcy i dawcy, które próbują się nawzajem zdominować. Aktywność układu immunologicznego biorcy jest w znacznym stopniu ograniczona poprzez przygotowanie immunosupresyjne i chemioterapię, a aktywność przeszczepu nie może być hamowana, aby zwiększyć szansę podjęcia funkcji u biorcy. Dlatego znacznie częstszym problemem jest niekorzystne immunologiczne oddziaływanie przeszczepu przeciwko tkankom biorcy w postaci wspomnianej choroby GvHD. Oddziaływanie immunologiczne w kierunku przeciwnym, tj. odrzucania przeszczepu przez biorcę, jest znacznie rzadsze, ale również może do niego dojść ze względu na niezgodność HLA. I tu także medycyna pozwala minimalizować powikłania dzięki sprawnemu wyszukiwaniu całkowicie zgodnego dawcy dla coraz szerszego grona pacjentów. Postęp w tej dziedzinie nastąpił również dzięki skutecznemu przygotowaniu chorych, które zostało dostosowane do stanu pacjenta (kondycjonowanie mielo- i niemieloablacyjne), oraz opracowaniu metod przeciwdziałania odrzucaniu przeszczepu poprzez wykonanie retransplantacji lub infuzji kontrolowanej liczby limfocytów dawcy DLI (ang. *donor lymphocyte infusion*).

Najczęstszym wskazaniem do transplantacji KKM jest choroba nowotworowa – ostra lub przewlekła białaczka, a rzadziej chłoniak lub szpiczak mnogi. Transplantacja KKM pozwala w wielu przypadkach na jej wyleczenie, a nawrót lub progresja nowotworu u biorcy jest przykładem kolejnego konfliktu immunologicznego, wskazującego na nadmierną tolerancję immunologiczną ze strony przeszczepu w stosunku do komórek nowotworowych biorcy. Jest to ciekawe potwierdzenie tezy, że konflikt pomiędzy dobrem (zdrowym przeszczepem) a złem (komórkami nowotworowymi biorcy) może ostatecznie dać pozytywny wynik, w tym przypadku – wyleczenie z choroby nowotworowej.

W potransplantacyjnej kontroli immunologicznej nowotworu istotną rolę odgrywają

też komórki NK dawcy. Zgodnie z hipotezą deficytu rozpoznania *selfu* (ang. *missing self recognition*) korzystny jest brak u biorcy cząsteczki HLA klasy I, która wiąże się z hamującym receptorem KIR komórek NK dawcy, bo komórki NK pozbawione hamowania skuteczniej niszczą tkankę nowotworową z deficytem HLA. Teorię tę potwierdzono jak dotąd dla ostrej białaczki szpikowej. Wyniki dla innych rodzajów nowotworów są niespójne.

W Instytucie prowadzimy na ten temat badania wykorzystujące niedawne odkrycie zjawiska licencjonowania komórek NK dawcy. Licencjonowanie polega na uzyskaniu bardzo silnej kompetencji cytotoksycznej przez komórki NK dawcy z równoczesną ekspresją hamującego receptora KIR i jego ligandu, czyli cząsteczki HLA klasy I. Komórki nielicencjonowane bardzo słabo oddziałują przeciw nowotworom. W naszych badaniach nie uzyskaliśmy potwierdzenia skuteczności przeciwnowotworowej deficytu ligandu KIR. Tym samym nie potwierdziliśmy teorii *missing self recognition*, a wręcz przeciwnie – stwierdziliśmy, że brak ligandu KIR u biorcy przeszczepu KKM z nowotworem w przypadku obecności licencjonowanych komórek NK u dawcy powodował dramatyczne skrócenie okresu przed nawrotem choroby oraz całkowitego przeżycia chorych. Wskazuje to na konieczność unikania częściowo niezgodnego dawcy, jeśli niezgodność polega na braku u biorcy cząsteczki HLA klasy I (ligandu KIR), która odpowiada za licencjonowanie komórek NK dawcy. Opierając się na tych wynikach, w doborze immunogenetycznym będziemy skrupulatnie unikać dawców z tego typu niezgodnością HLA.

Trudno jest stwierdzić, czy dla poprawy bezpieczeństwa i skuteczności transplantacji KKM jako metody leczenia nowotworów większy wpływ ma ulepszenie doboru dawcy pod względem zgodności immunogenetycznej, czy lepsze medyczne procedury okołotransplantacyjne. Jedno jest pewne – pomiędzy doбором a bezpośrednimi działaniami lekarskimi na pewno nie ma konfliktu. ■

Chcesz wiedzieć więcej?

Nowak J. (2008). *Role of HLA in hematopoietic SCT*. Bone Marrow Transplantation, 42(S2), 71-76.

Nowak J., Fabijańska-Mitek J. (2012). *Podstawy immunogenetyki transplantacyjnej*. Warszawa: Fundacja Pro Pharmacia Futura, ISBN 978-83-930152-5-2.