

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Marek Karczewski

Wybrane immunologiczne wskaźniki ryzyka
ostrego i przewlekłego odrzucania allogenicznej nerki
przeszczepionej, pochodzącej od dawcy zmarłego

Poznań 2012

© Copyright by Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,
Poznań 2012

© Copyright by Marek Karczewski, 2012

Tytuł angielski

Selected immunologic indicators of acute and chronic rejection of allogeneic kidney transplanted from a deceased donor

Recenzent

Prof. dr hab. Krzysztof Wiktorowicz

Korekta

Grażyna Dromirecka

Skład komputerowy

Beata Łakomiak

ISBN 978-83-7597-163-7

WYDAWNICTWO NAUKOWE UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU
60-812 Poznań, ul. Bukowska 70

Ark. wyd. 4,0. Ark. druk. 9,8. Papier offset. kl. III 80 g/m², 70 x 100.
Format A4. Zam. nr 54/12.
Druk ukończono w kwietniu 2012 r.

*Kasieńce, która jest zawsze przy mnie, wspierając mnie w trudnych chwilach
i dzieląc się radością w chwilach szczęśliwych;
Moim sześciu synom, którzy choć wielokrotnie przysparzają rozlicznych zmartwień,
wypełniają dom radosnym hałasem;
Bratu Jackowi, za naszą współpracę i braterskie zrozumienie;
Rodzicom, za to, że jestem i że pokierowali mnie na właściwą drogę w życiu;
Całej Rodzinie, która daje wsparcie i radość;
Krzysztofowi, za pomoc i życzliwość;
Przyjaciołom, na których mogę liczyć;
I Medycynie, której się poświęciłem.*

Spis treści

Wykaz skrótów	7
1. Wstęp	9
1.1. Wprowadzenie	9
1.2. Zarys historii przeszczepiania nerek u ludzi	9
1.3. Przeszczepianie nerek w Polsce	10
1.4. Proces odrzucania po przeszczepieniu nerki allogenicznej	11
1.4.1. Wczesne odrzucanie po przeszczepieniu nerki allogenicznej	11
1.4.2. Późne odrzucanie po przeszczepieniu nerki allogenicznej	15
1.5. Wybrane immunologiczne wskaźniki ryzyka ostrego i przewlekłego odrzucania allogenicznej nerki przeszczepionej, pochodzącej od dawcy zmarłego	17
1.5.1. Cytokiny, jako cząsteczki sygnałowe w reakcji odrzucania przeszczepu allogenicznego	17
1.5.2. Rola limfocytów T regulatorowych w indukcji tolerancji transplantacyjnej	20
1.5.2.1. Limfocyty regulatorowe u człowieka	20
1.5.2.2. Limfocyty T regulatorowe CD4+CD25+FOXP3+	21
1.5.2.3. Limfocyty T supresorowe CD8+CD28-	22
1.6. Nowoczesne metody rozpoznawania procesu odrzucania przeszczepionej nerki allogenicznej	23
2. Cel badań	25
3. Metodyka	26
4. Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy	27
4.1. Rola limfocytów T regulatorowych/supresorowych w indukcji tolerancji immunologicznej u pacjentów po przeszczepieniu nerki allogenicznej, pochodzącej od dawcy zmarłego	27
4.2. Wartość prognostyczna oznaczeń wybranych cytokin Th1/Th2 w surowicy pacjentów w okresie przedtransplantacyjnym w ostrym odrzucaniu przeszczepionej nerki allogenicznej, pochodzącej od dawcy zmarłego	29
4.3. Profil cytokin w różnych stanach dysfunkcji przeszczepionej nerki allogenicznej, pochodzącej od dawcy zmarłego	31
4.4. Przydatność kliniczna monitoringu immunologicznego opartego na cytometrycznej analizie stężeń wybranych cytokin Th1/Th2 w surowicy i moczu pacjentów poddanych przeszczepieniu nerki allogenicznej, pochodzącej od dawcy zmarłego	32
5. Podsumowanie i wnioski	34
6. Piśmiennictwo	35
7. Załączone publikacje	43

PUBLIKACJA I

- Karczewski M.**, Karczewski J., Kostrzewa A., Wiktorowicz A., Głyda M.:
The role of Foxp3+ regulatory T cells in kidney transplantation. *Transplantation Proceedings*, 2009, 41, 1527-1529. 43

PUBLIKACJA II

- Karczewski J., **Karczewski M.**, Wiktorowicz K.: Possible defect of T suppressor cell subpopulation in patients with kidney acute rejection. *Transplantation Proceedings*, 2010, 42, 4538-4539. 49

PUBLIKACJA III

- Karczewski J., **Karczewski M.**, Głyda M., Wiktorowicz K.: Role of Th1/Th2 cytokines in kidney allograft rejection. *Transplantation Proceedings*, 2008, 40, 3390-3392. 53

PUBLIKACJA IV

- Karczewski M.**, Karczewski J., Poniedziałek B., Wiktorowicz K., Śmietańska M., Głyda M.: Distinct cytokine patterns in different states of kidney allograft rejection. *Transplantation Proceedings*, 2009, 41, 4147-4149. 59

PUBLIKACJA V

- Karczewski M.**, Karczewski J., Poniedziałek B., Wiktorowicz K., Głyda M.: Cytometric analysis of Th1/Th2 cytokines in the urine of patients undergoing kidney transplantation. *Annals of Transplantation*, 2009, 14, 25-28. 65

PUBLIKACJA VI

- Karczewski J., **Karczewski M.**, Wiktorowicz K.: Preliminary study evaluating the risk factors of kidney acute rejection. *Central European Journal of Immunology*, 2011, 36, 233-236. 71

Wykaz skrótów

ACTH	(ang. <i>Adrenocorticotropic hormone</i>) – hormon adrenokortykotropowy
ADCC	(ang. <i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>) – reakcja cytotoksyczna zależna od przeciwciał
APC	(ang. <i>Antigen presenting cell</i>) – komórka prezentująca antygen
AR	(ang. <i>Acute rejection</i>) – ostre odrzucanie
ARE	(ang. <i>Acute rejection episode</i>) – epizod ostrego odrzucania
ARF	(ang. <i>Acute renal failure</i>) – ostra niewydolność nerek
ATN	(ang. <i>Acute tubular necrosis</i>) – ostra martwica cewek nerkowych
AZA	azatiopryna
CAI	(ang. <i>Chronic allograft injury</i>) – przewlekłe uszkodzenie przeszczepu
CD	(ang. <i>Cluster of differentiation</i>) – antygen różnicowania
CML	(ang. <i>Cell-mediated lympholysis</i>) – limfoliza zależna od komórek
CMV	(ang. <i>Cytomegalovirus</i>) – cytomegalowirus
CR	(ang. <i>Chronic rejection</i>) – odrzucanie przewlekłe
CRE	(ang. <i>Chronic rejection episode</i>) – epizod przewlekłego odrzucania
CsA	cyklosporyna
CTLA-4	(ang. <i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>) – antygen limfocytu cytotoksycznego 4
DGF	(ang. <i>Delayed graft function</i>) – opóźniona czynność przeszczepu
DSA	(ang. <i>Donor specific antibodies</i>) – przeciwciała przeciwko antygenom dawcy
DTH	(ang. <i>Delayed type hypersensitivity</i>) – nadwrażliwość typu późnego
GNZ	granzym
Gs	glikokortykosteroid
HLA	(ang. <i>Human leukocyte antigen</i>) – ludzki antygen leukocytarny
IFN	interferon
IL	interleukina
IRMA	(ang. <i>Immunoradiometric assay</i>) – metoda immunoradiometryczna

iTregs	(ang. <i>Induced regulatory T cells</i>) – indukowane limfocyty T regulatorowe
KIR	(ang. <i>Killer cell immunoglobulin-like receptor</i>) – immunoglobulinopodobny receptor komórek cytotoksycznych
MAC	(ang. <i>Membrane attack complex</i>) – kompleks ataku błonowego
MHC	(ang. <i>Major histocompatibility complex</i>) – główny układ zgodności tkankowej
MLR	(ang. <i>Mixed lymphocyte reaction</i>) – mieszana reakcja limfocytów
MMF	mykofenolan mofetilu
NKC	(ang. <i>Natural killer cell</i>) – naturalny zabójca, komórka NK
NONARE	(ang. <i>Non-acute rejection episode</i>) – brak epizodu odrzucania ostrego
nTregs	(ang. <i>Natural regulatory T cells</i>) – naturalne limfocyty T regulatorowe
PFN	perforyna
PRA%	poziom surowiczych przeciwciał alloreaktywnych
PRR	(ang. <i>Pattern recognition receptor</i>) – receptor rozpoznający wzorce molekularne
RIA	(ang. <i>Radioimmunoassay</i>) – metoda radioimmunologiczna
RAPA	rapamycyna
Tac	takrolimus
Tc	(ang. <i>T cytotoxic</i>) – limfocyt T cytotoksyczny
TCR	(ang. <i>T cell receptor</i>) – receptor limfocyta T
Th	(ang. <i>T helper</i>) – limfocyt T pomocniczy
TNF	(ang. <i>Tumor necrosis factor</i>) – czynnik martwicy nowotworów
TGF	(ang. <i>Transforming growth factor</i>) – czynnik transformujący wzrostu

1. Wstęp

1.1. Wprowadzenie

Niniejsza rozprawa składa się z cyklu 6 oryginalnych publikacji poświęconych wybranym immunologicznym wskaźnikom ryzyka ostrego i przewlekłego odrzucania allogenicznego nerki przeszczepionej, pochodzącej od dawcy zmarłego. Prace te zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach polskich i zagranicznych w latach 2008–2011. Prezentowane badania zostały przeprowadzone na Oddziale Transplantologii i Chirurgii Ogólnej Szpitala Wojewódzkiego w Poznaniu oraz w Katedrze Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

1.2. Zarys historii przeszczepiania nerek u ludzi

Przeszczepianie komórek, tkanek i narządów, w tym nerek, jest od wielu lat uznaną klinicznie metodą leczniczą. Z chirurgicznego punktu widzenia bardzo szybko opracowano skuteczne metody przeszczepienia nerki, natomiast przez długi czas trudnymi do pokonania pozostawały przeszkody biologiczne, jakimi są reakcje organizmu na obcy narząd. Dopiero rok 1933 przyniósł przełom w tej dziedzinie. Ukraiński chirurg Voronoy przeszczepił nerkę dawcy grupy krwi B pacjentowi z grupą krwi 0. Biorca zmarł po dwóch dniach z powodu nadostrego odrzucania przeszczepu wywołanego niezgodnością w obrębie układu AB0 [1]. Przypadek ten przyczynił się do postępu w dziedzinie transplantologii.

Po okresie II wojny światowej zwiększyło się zainteresowanie immunologią, a tym samym transplantologią. W roku 1953 Simonsen w Danii i Dempster w Londynie opublikowali wnioski ze swoich badań, w których podali, iż przyczyną zatrzymania funkcji nerki są procesy immunologiczne oraz, że preferowanym miejscem umieszczenia przeszczepianej nerki jest dół biodrowy [1, 2]. Na początku lat 50. Kuss, Dubost i Serrville przeszczepili kilka nerek w okolicy miedniczej, nie stosując żadnej immunosupresji. W tym samym okresie Lawler w Chicago przeszczepił nerkę w podobny sposób. W 1953 r. Hume przedstawił swoje wyniki przeszczepiania nerki z użyciem ACTH lub kortyzonu [3]. Stwierdził, że przetoczenie krwi przed przeszczepieniem może być korzystne, ale istotną rolę odgrywa zgodność grupowa krwi. Dopiero udane przeszczepy u bliźniaków jednojajowych przeprowadzone przez Murraya w Bostonie przyczyniły się do dalszego rozwoju transplantologii [4]. Lata 60. to głównie rozwój technik przetrzymywania narządów i typowania tkankowego. Lata 70. przyniosły rutynowe typowanie

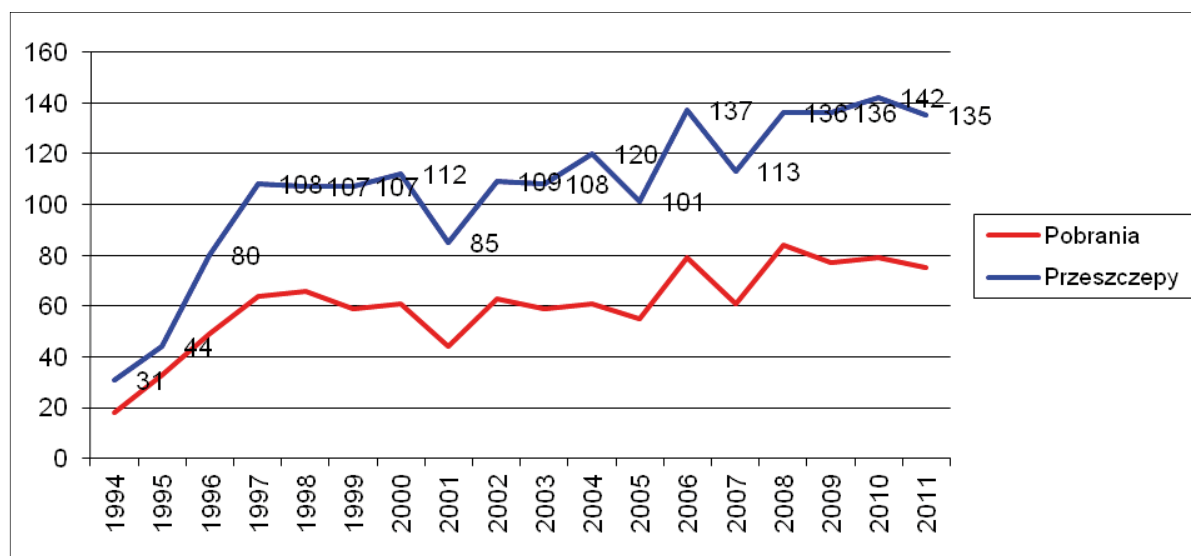
HLA-DR (Morris) [5]. W 1976 r. została odkryta przez Borela cyklosporyna, wykorzystana następnie przez Calnea do leczenia, co stanowiło prawdziwy przełom w leczeniu immunosupresyjnym pacjentów po przeszczepieniu narządów [3, 6]. W Polsce pierwsze udane przeszczepienie nerki, pobranej od osoby zmarłej, przeprowadził profesor Jan Nielubowicz 26 stycznia 1966 r.

W ostatnich latach w Polsce nastąpił gwałtowny rozwój transplantologii klinicznej. Przeszczepianie nerek stało się, obok hemodializ i dializ otrzewnowych, uznaną metodą leczenia nerkozastępczego. Nastąpiło to dzięki rozwojowi immunologii transplantacyjnej, poznaniu mechanizmów niedokrwienia narządów oraz wprowadzeniu nowych schematów leczenia immunosupresyjnego.

1.3. Przeszczepianie nerek w Polsce

Przeszczepianie nerek w Polsce rozpoczęło się w 1966 r. Po początkowym okresie wzrostu ilości wykonywanych przeszczepów, obecnie liczba zabiegów utrzymuje się na poziomie blisko 1000 rocznie. Liczba oczekujących na przeszczepienie nerki w Polsce w 2010 r. wynosiła 1469 osób. W tym samym roku przeszczepiono w Polsce nerki 999 biorcom. W tej ogólnej liczbie, 949 biorców otrzymało nerki pochodzące od dawców zmarłych, a 50 biorców od dawców żywych [7].

W latach 1994 – 2011 w Szpitalu Wojewódzkim w Poznaniu przeszczepiono około 1800 nerek, z czego w 2011 r. wykonano 135 przeszczepów [Rycina 1].



Rycina 1. Liczba przeszczepionych nerek w stosunku do liczby pobrań przeprowadzonych przez zespół z Oddziału Transplantologii i Chirurgii Szpitala Wojewódzkiego w Poznaniu [opracowanie własne].

Illustration 1. Ratio of kidney transplantations to kidney harvestings performed at the Department of Transplantation and General Surgery, District Hospital in Poznan [own study].

1.4. Proces odrzucania po przeszczepieniu nerki allogenicznej

Proces odrzucania jest główną przyczyną utraty przeszczepionej nerki i statystycznie dotyczy co czwartego przeszczepionego narządu [8]. W 10-letnim okresie po przeszczepieniu, proces ostrego odrzucania jest odpowiedzialny za utratę narządu u 4,1 – 5,4% pacjentów, a przewlekłe odrzucanie u 16,1–20,3% biorców [9]. Wprowadzenie nowych schematów immunosupresyjnych znacznie zmniejszyło częstość występowania epizodów ostrego odrzucania. W większości ośrodków transplantacyjnych roczne przeżycie przeszczepu wynosi ok. 90% [8].

Poniższa tabela [Tabela 1] prezentuje wyniki przeszczepiania nerek pobranych od dawców zmarłych na Oddziale Transplantologii i Chirurgii Ogólnej Szpitala Wojewódzkiego w Poznaniu. Wyniki uzyskiwane w ośrodku poznańskim zbliżone są do wyników z innych placówek na świecie.

Tabela 1. Wyniki przeszczepiania nerek pobranych od dawców zmarłych na Oddziale Transplantologii i Chirurgii Ogólnej Szpitala Wojewódzkiego w Poznaniu [opracowanie własne]

Table 2. Results of cadaveric kidney transplantations performed at the Department of Transplantation and General Surgery, District Hospital in Poznan [own study]

Przeżycie	Liczba biorców objętych obserwacją	Przeżycie biorcy	% przeżycia biorcy	Przeżycie przeszczepu	% przeżycia przeszczepu
3 mies.	1356	1338	99	1298	96
12 mies.	1158	1108	96	1024	88
36 mies.	888	816	92	722	81
60 mies.	658	598	91	510	78

1.4.1. Wczesne odrzucanie po przeszczepieniu nerki

Przyspieszone ostre odrzucanie

Przyspieszone ostre odrzucanie jest spowodowane immunizacją biorcy przed przeszczepieniem nerki. Odpowiedzialne za ten proces są przeciwciała skierowane przeciwko obcym antygenom, głównie antygenom zgodności tkankowej (ang. *Human Leukocyte Antigens* – HLA) dawcy oraz antygenom krwinkowym układu AB0. Wytwarzanie dużych ilości takich przeciwciał przez organizm biorcy powoduje trwałe i nieodwracalne uszkodzenie przeszczepionego narządu. Jeżeli pojawia się bezpośrednio po przeszczepieniu, wywołuje nadostre odrzucanie, które może również pojawić się w kilka dni po zabiegu. Powikłanie to występuje niezwykle rzadko, jako że w procesie selekcji dawców wykonuje się próbę krzyżową (ang. *Cross-match*) przed przeszczepieniem narządu. W procesie nadostrego odrzucania faza powstawania przeciwciał przeciwko alloantygenom następuje przed przeszczepieniem narządu, na skutek kontaktu układu immunologicznego biorcy z obcym antygenem, głównie w czasie transfuzji krwi, wcześniejszym przeszczepom tkanek i narządów oraz ciążyom [10]. Po wypełnieniu łożyska

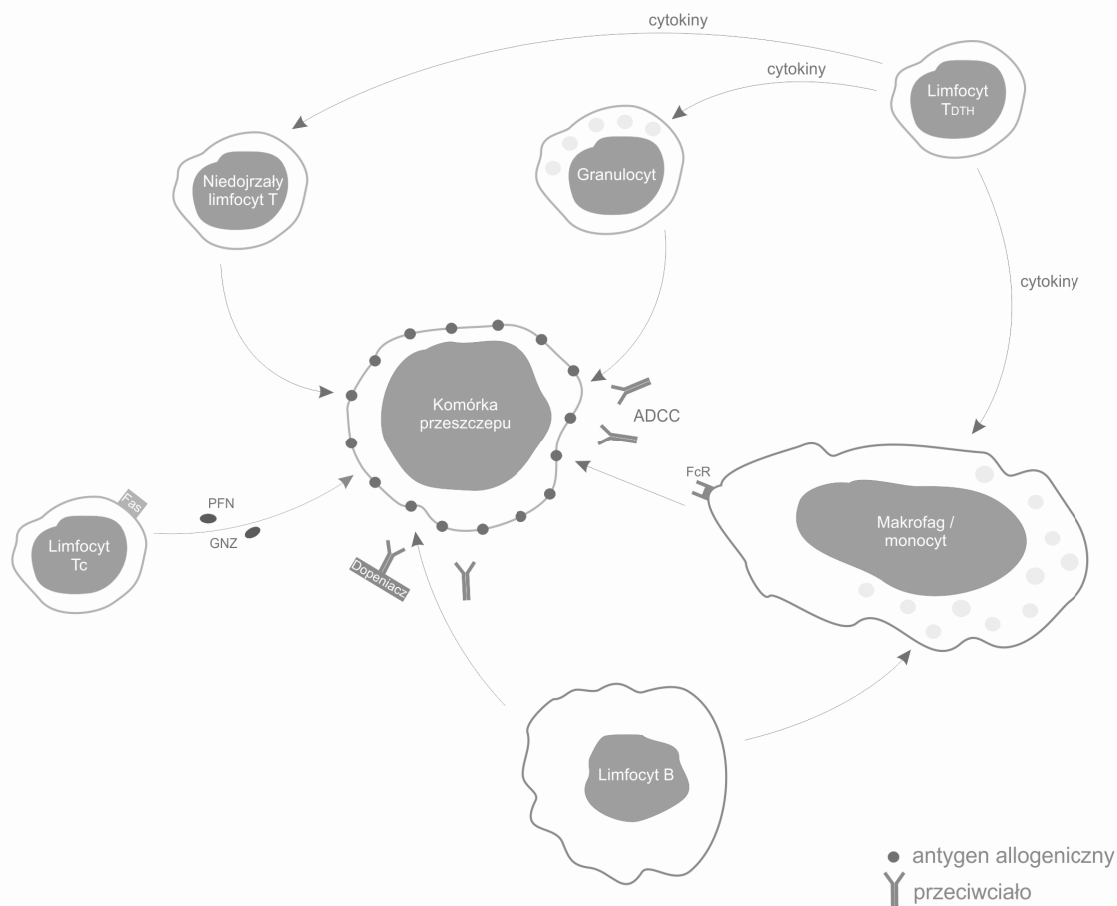
naczyniowego przeciwciała biorcy łączą się z komórkami śródbłonka naczyniowego i aktywując układ dopełniacza i układ krzepnięcia oraz chemotaksję neutrofilów prowadzą do niedokrwienia i martwicy ścian naczyń, a następnie całego mięszu nerki. W procesie tym dochodzi do zmniejszenia diurezy (oliguria, anuria), powiększenia i bolesności przeszczepionej nerki oraz podwyższenia temperatury. Objawy te są niespecyficzne i mogą w ogóle nie wystąpić [11]. W różnicowaniu bierze się najczęściej pod uwagę zakrzepicę w żyłę lub tętnicy nerkowej. Stan taki wymaga natychmiastowej operacji i usunięcia przeszczepionego narządu.

Wczesne odrzucanie typu komórkowego

Ostre odrzucanie przeszczepu jest reakcją typową w przypadkach występowania różnic w zakresie antygenów zgodności tkankowej pomiędzy dawcą a biorcą. W warunkach eksperymentalnych (przy użyciu modelu zwierzęcego) reakcja osiąga największe natężenie w ciągu tygodnia od dokonania przeszczepienia. W warunkach klinicznych odrzucanie ostre może nastąpić w przeciągu kilku dni do kilku miesięcy od transplantacji, ze szczególnym nasileniem epizodów w trzydziestodniowym okresie pooperacyjnym [12].

Występują tutaj dwa typy reakcji, reakcja nadwrażliwości typu późnego DTH (ang. *Delayed type hypersensitivity*) i reakcja cytotoksyczności limfocytów T [**Rycina 2**]. W pierwszym mechanizmie limfocyty pomocnicze Th1 produkują limfokiny, które zwiększają przepuszczalność naczyń krwionośnych i stymulują miejscowy proces zapalny poprzez komórki jednojądrzaste (limfocyty, makrofagi/monocyty). W drugim mechanizmie limfocyty Tc rozpoznają swoisty alloantygen dawcy i niszczą komórki dawcy poprzez ich lizę na skutek działania perforyn i granzymów lub apoptozę, po interakcji między cząsteczką CD178 (*Fas ligand*) na limfocycie Tc a cząsteczką CD95 (*Fas*) na powierzchni komórek przeszczepu.

Pomimo przewagi limfocytów Tc oraz makrofagów/monocytów w nacieku, decydującą rolę w procesie odrzucania ostrego pełną limfocyty T pomocnicze CD4+ (Th). Ich rola polega na aktywacji limfocytów Tc oraz indukcji odpowiedzi o typie nadwrażliwości typu późnego z udziałem makrofagów. Dodatkowo, limfocyty Th mogą wywierać bezpośredni efekt cytotoksyczny na komórki przeszczepionego narządu poprzez cząsteczkę Fas i indukcję apoptozy [11].



Rycina 2. Główne mechanizmy ostrego odrzucania przeszczepu allogenicznego (objaśnienie w tekście). Skróty: (ang. *Delayed type hypersensitivity*) – nadwrażliwość typu późnego, ADCC (ang. *Antibody dependent cellular cytotoxicity*) – reakcja cytotoksyczna zależna od przeciwciał, PFN – perforyna, GNZ – granzym, Fas – antygen powierzchniowy CD95, limfocyt Tc – limfocyt T cytotoksyczny.

Illustration 2. Major mechanisms underlying the acute allograft rejection (description in text). Abbreviations: DTH – Delayed type hypersensitivity, ADCC – Antibody dependent cellular cytotoxicity, PFN – Perforin, GNZ – Granzyme, FAS – CD95 antigen, Tc lymphocyte – Cytotoxic T lymphocyte.

Najistotniejszą rolę w procesie ostrego odrzucania komórkowego wydają się zatem pełnić limfocyty pomocnicze Th1, które są zdolne do nasilania reakcji typu cytotoksycznego. W naciekach obecne są również limfocyty T pamięci CD8+, które mogły powstać w wyniku wcześniejszych immunizacji (ciąża, transfuzja, wcześniejsze przeszczepienie etc.). Limfocyty te mogą wywierać efekt cytotoksyczny na komórki przeszczepionego narządu z pominięciem etapu ekspansji klonalnej i różnicowania, co znacznie przyspiesza reakcję odrzucania. Istnieją dane wskazujące, że komórki pamięci powstałe w wyniku wcześniejszych immunizacji mogą wchodzić w reakcje krzyżowe z innymi antygenami allogenicznymi [13]. Pomimo że limfocyty T pełnią kluczową rolę w ostrym odrzucaniu komórkowym, warto pamiętać, iż wzrost ekspresji cząstek prozapalnych w obrębie przeszczepionego narządu zachodzi na długo przed rozpoczęciem odpowiedzi swoistej. Wczesne procesy zapalne są wynikiem działania mechanizmów

wrodzonych na uszkodzenie przeszczepionej tkanki i są niezależne antygenowo [14-16]. W procesach tych kluczową rolę wydają się pełnić receptory rozpoznające wzorce molekularne (ang. *Pattern recognition receptors* – PRR), które w odpowiedzi na różne sygnały „zagrożenia” (ang. *Damage-associated molecular patterns* – DAMPs), wywołane rozległymi uszkodzeniami w obrębie przeszczepionego narządu, aktywują prozapalne szlaki sygnałowe [17]. Prowadzi to m.in. do aktywacji profesjonalnych komórek prezentujących antygen dawcy, znajdujących się w obrębie przeszczepionego narządu, a w rezultacie do aktywacji limfocytów T biorcy na drodze bezpośredniej prezentacji antygenów allogenicznych [12]. Dodatkowo, sygnały prozapalne aktywują komórki nieswoiste, takie jak neutrofile, makrofagi, komórki NK, prowadząc do infiltracji narządu i jego dalszego uszkodzenia.

Wczesne odrzucanie typu komórkowego najczęściej występuje w końcu pierwszego tygodnia po przeszczepieniu nerki. W procesie tym zostaje zachowany przepływ przez nerkę, więc obraz w scyntygrafii lub badaniu dopplerowskim jest odmienny w różnicowaniu z przyspieszonym ostrym odrzucaniem, w którym z reguły brak jest przepływu krwi przez nerkę. Biopsja nerki i badanie histopatologiczne jest ostatecznym rozpoznaniem.

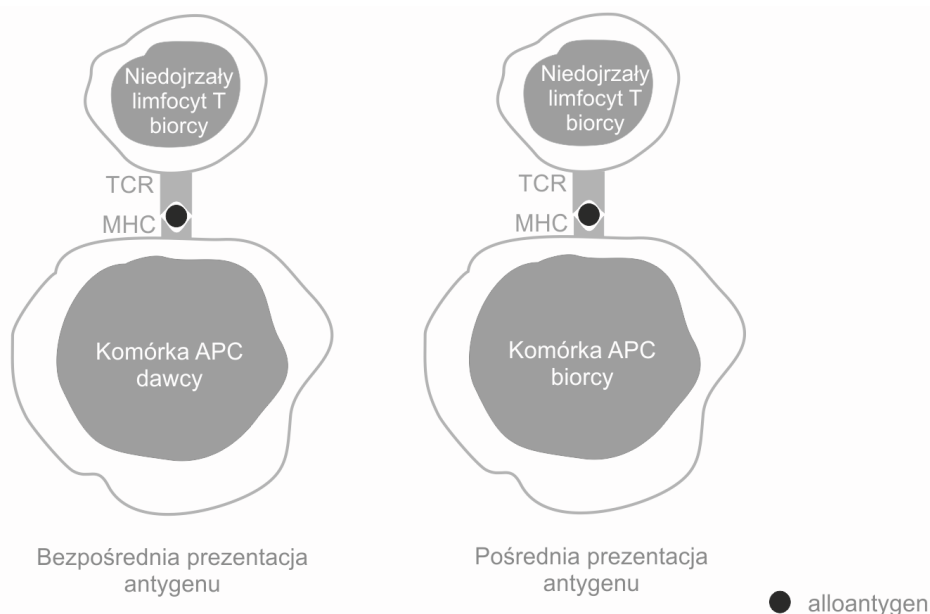
Wczesne odrzucanie typu humoralnego

W procesie tym, po wcześniejszym przekształceniu limfocytów B w komórki plazmatyczne, produkowane są przeciwciała skierowane przeciwko antygenom MHC dawcy (klasy I i II) oraz innym antygenom zlokalizowanym w obrębie przeszczepionego narządu, głównie antygenom śródbłonna [10]. Następnie aktywowany układ dopełniacza na drodze klasycznej powoduje powstanie kompleksu MAC (C5-C9), który niszczy błony komórkowe, i powoduje lizę komórek przeszczepu. Liza komórek przeszczepu może nastąpić także w reakcji cytotoksycznej zależnej od przeciwciał ADCC (ang. *Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*) [11]. W procesie tym dochodzi do zniszczenia komórek dawcy przez komórki zapalne, takie jak monocyty, granulocyty i komórki NK łączące się z receptorem Fc przeciwciał opłaszczających komórki docelowe przeszczepionego narządu. Zmiany w tym typie odrzucania, zarówno kliniczne jak i histopatologiczne, są znacznie mniej zaznaczone, niż w typie komórkowym. Wczesne odrzucanie typu humoralnego występuje z reguły w pierwszych kilku miesiącach po przeszczepieniu, szczególnie u pacjentów wysoko immunizowanych. Najczęstszym odchyleniem jest izolowany wzrost poziomu kreatyniny. Ostateczne rozpoznanie dokonywane jest na podstawie biopsji nerki, a markerem uszkodzenia humoralnego jest rozlane gromadzenie się znacznika przeciwciał anti-C4d w badaniu immunofluorescencyjnym. Odrzucanie to jest łatwe do przeoczenia i trudne do różnicowania z martwicą cewek nerkowych (ATN) na podstawie obrazu klinicznego i metod obrazowych. Odrzucanie typu humoralnego może być powikłane dodatkowo odrzucaniem komórkowym, co znacznie utrudnia rozpoznanie i skuteczne leczenie.

1.4.2. Późne odrzucanie po przeszczepieniu nerki allogenicznej

Chociaż proces ostrego odrzucania występuje głównie we wczesnym okresie pooperacyjnym, to jednak w niektórych przypadkach dochodzi do procesu ostrego odrzucania w kilka miesięcy lub lat po przeszczepieniu narządu. Nie ma jednoznacznej granicy dzielącej epizody ostrego odrzucania na wczesne i późne. W celach praktycznych często korzysta się z podziału opublikowanego przez Bassadonnę i wsp., według którego za wczesne uznaje się odrzucanie mające miejsce w przeciągu 60 dni od zabiegu, a za późne odrzucanie, występujące po tym okresie [18]. W badaniu pediatrycznym, Tejani i wsp. granicę pomiędzy wczesnym a późnym odrzucaniem ustalili na 12 miesięcy od przeszczepienia narządu [19]. Obecnie większość ośrodków transplantacyjnych przyjmuje granicę pomiędzy wczesnym a późnym odrzucaniem po 3. miesiącu od przeszczepienia narządu [20].

U podłoża przewlekłego odrzucania leży niezgodność antygenów HLA, odpowiadających za rozpoznanie pośrednie alloantygeny i wtórną aktywację limfocytów B, co prowadzi do produkcji przeciwciał [10]. Mechanizm polega na przetworzeniu przez komórki dendrytyczne biorcy antygenów dawcy i prezentację ich subpopulacji limfocytów pomocniczych Th, które aktywują odporność komórkową i humoralną (w pierwszych tygodniach dominuje mechanizm bezpośredniej prezentacji alloantygeny) [Rycina 3]. W 40% przypadków przewlekłego odrzucania występują złogi C4d w kapilarach okołocerkowych [21]. Markerem odrzucania przewlekłego są przeciwciała przeciwko antygenom HLA klasy I dawcy (ang. *Donor specific antibodies* – DSA) [22].



Rycina 3. Dwa typy rozpoznawania alloantygeny. Skróty: TCR (ang. *T cell receptor*) – receptor limfocytu T, MHC (ang. *Major histocompatibility complex*) – główny układ zgodności tkankowej, APC (ang. *Antigen presenting cell*) – komórka prezentująca antygen.

Illustration 3. Two types of alloantigen recognition. Abbreviations: TCR – T cell receptor, MHC – Major histocompatibility complex, APC – Antigen presenting cell.

Przewlekłe odrzucanie jest częścią ogólnego procesu, zwanego inaczej przewlekłym uszkodzeniem przeszczepu (ang. *Chronic allograft injury – CAI*) i jest, zaraz po zgonie pacjenta z przyczyn naczyniowo-sercowych, główną przyczyną utraty przeszczepu. Według rejestrów transplantacyjnych śmierć biorcy jest przyczyną utraty przeszczepu w 54%, a przewlekłe uszkodzenie przeszczepu w 40% [11]. W przewlekłym uszkodzeniu przeszczepu biorą udział czynniki immunologiczne i nieimmunologiczne [Tabela 2]. Wśród czynników ryzyka późnego odrzucania wymienia się: młody wiek biorcy, narząd pochodzący od dawcy marginalnego, żeńską płeć dawcy, infekcję wirusem CMV, wysokie miano surowiczych przeciwciał alloreaktywnych (PRA), niezgodność antygenów w klasie I układu HLA, niedostateczną immunosupresję [11].

Tabela 2. Immunologiczne i nieimmunologiczne czynniki ryzyka późnego uszkodzenia przeszczepionego narządu [11]

Table 2. Immune and non-immune risk factors of chronic allograft injury [11]

	Czynnik ryzyka
Czynniki immunologiczne	<ul style="list-style-type: none"> • Ostre odrzucanie przeszczepu • Czynny proces humoralny • Niezgodność w układzie HLA • Immunizacja biorcy przed przeszczepieniem • Niski poziom immunosupresji
Czynniki nieimmunologiczne	<ul style="list-style-type: none"> • Opóźniona czynność przeszczepu (DGF) • Dawca marginalny • Dysproporcja pomiędzy masą dawcy i biorcy • Nefrotoksyczność inhibitorów kalcyneuryny • Nadciśnienie • Hiperlipidemia • Nikotyna • Hiperhomocysteinemia • Zakażenia wirusowe (CMV) • Proteinuria • Wolne rodniki tlenowe • Brak współpracy biorcy w zakresie leczenia

Epizody ostrego odrzucania mają wpływ na przeżywalność przeszczepionego narządu. Wystąpienie epizodu ostrego odrzucania w ciągu pierwszego półrocza po przeszczepieniu zwiększa do 50% ryzyko utraty przeszczepu [11]. Istotny jest również czas wystąpienia epizodów ostrego odrzucania po przeszczepieniu [23]. Najgorsze rokowanie dotyczy biorców, u których rozpoznano ostre odrzucanie po 12 miesiącach od przeszczepienia [24]. Istota samej korelacji pomiędzy epizodami ostrego odrzucania przeszczepu a rozwinięciem przewlekłego odrzucania nie jest jasna. Wiadomo, że liczba epizodów oraz burzliwość przebiegu procesu zwiększają ryzyko przewlekłego uszkodzenia przeszczepu. Istnieją podstawy, aby stwierdzić, że proces ostrego odrzucania po pierwszych trzech miesiącach po przeszczepieniu jest gorszym czynnikiem rokowniczym dla przeżycia przeszczepu, niż proces odbywający się w pierwszych trzech miesiącach po przeszczepieniu [11].

W przebiegu przewlekłego odrzucania nerki przeszczepionej wyróżnia się dwa okresy. W pierwszym roku dominują procesy immunologiczne, głównie epizody ostrego odrzucania, odrzucanie subkliniczne oraz opóźnione ostre odrzucanie, które nakładają się na uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne. Po roku od przeszczepienia dominuje szkliwienie w tętniczkach, stwardnienie w kłębuszkach i włóknienie śródmiąższowe. W dużym, prospektywnym badaniu Nankivell i wsp. przedstawili hipotezę, że dominującym procesem jest nefrotoksyczność inhibitorów kalcyneuryny [25]. Dwufazowość odrzucania przewlekłego w tym ujęciu jest oczywiście zbyt uproszczeniem. U 50% biorców ze zdiagnozowanym odrzucaniem przewlekłym występuje swoista alloreaktywność komórkowa wobec antygenów dawcy, podczas gdy w grupie bez przewlekłego uszkodzenia odsetek wynosi 28% [26]. Udowodniono ścisły związek pomiędzy zgodnością antygenów MHC (ang. *Major histocompatibility complex*) dawcy i biorcy a rozwojem przewlekłego uszkodzenia przeszczepu. Pełna zgodność warunkuje lepsze długotrwałe przeżycie przeszczepionego narządu. Mniej znaczący jest wpływ słabych antygenów tkankowych (ang. *Minor histocompatibility antigens* – mHAgs) [11]. Kolejnym czynnikiem korelującym z przeżywalnością przeszczepu jest obecność przeciwciał preformowanych. Aż u 60% pacjentów z przewlekłym uszkodzeniem narządu stwierdza się obecność przeciwciał [11].

U podłoża CAI może leżeć wspomniana nefrotoksyczność inhibitorów kalcyneuryny, ale równocześnie mogą występować: subkliniczne odrzucanie, glomerulopatia i waskulopatia na skutek nieadekwatnego leczenia immunosupresyjnego. W związku z tym, że proces przewlekłego uszkodzenia przeszczepu może zacząć się i przebiegać przy stałym poziomie kreatyniny w surowicy, wydaje się, że istotnym byłoby wykonywanie biopsji protokolarnych w 3. i 12. miesiącu po przeszczepieniu [27].

Objawami klinicznymi przewlekłego uszkodzenia są: białkomocz, zwykle w przedziale 1–2 g/dobę i nadciśnienie tętnicze.

1.5. Wybrane immunologiczne wskaźniki ryzyka ostrego i przewlekłego odrzucania allogenicznego nerki przeszczepionej, pochodzącej od dawcy zmarłego

1.5.1. Cytokiny jako cząsteczki sygnałowe w reakcji odrzucania przeszczepu allogenicznego

W roku 1986 Mosmann i Coffman zaobserwowali, że długotrwała stymulacja mysich limfocytów T pomocniczych odpowiednimi antygenami skutkuje ściśle ukierunkowanym rozwojem komórek [28]. U ludzi przejawia się to restrykcyjnym wzorem produkowanych cytokin, które nazwano typem 1 (Th1) i typem 2 (Th2) [29]. Limfocyty

Th1 produkują IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- α i TNF- β , warunkują reakcję nadwrażliwości typu późnego (DTH) oraz ułatwiają produkcję przeciwciał klasy IgG2a biorących udział w procesie opsonizacji i wiązania elementów dopełniacza, aktywację makrofagów, cytotoxycytność komórkową zależną od przeciwciał [30]. Z tego względu przyjęto, że limfocyty Th1 uczestniczą w nieswoistej ochronie immunologicznej zależnej od fagocytów. Z kolei limfocyty Th2 produkują większe ilości IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 i IL-13 oraz ukierunkowują odpowiedź immunologiczną w stronę typu humoralnego. Umożliwiają przesunięcie produkcji przeciwciał w kierunku IgE i nietoksycznych podklas IgG oraz wspomagają istotne dla odporności błon śluzowych mechanizmy, jak produkcję przeciwciał klasy IgA oraz produkcję i rozwój komórek tucznych i eozynofili. Co istotne, część cytokin produkowanych przez limfocyty Th2, jak IL-4, IL-10 i IL-13 hamuje niektóre istotne funkcje makrofagów [30]. W przypadku braku wyraźnego sygnału polaryzującego odpowiedź immunologiczną wykształca się subpopulacja limfocytów pomocniczych Th0, charakteryzująca się mniej ukierunkowanym profilem produkowanych cytokin. Dalsza rola tych komórek uzależniona jest od przypadkowego profilu cytokin w środowisku lokalnym oraz typu zaangażowanych w reakcję immunologiczną komórek. Populacja komórek Th0 nie jest jednorodna i prawdopodobnie składa się z licznych subpopulacji częściowo zróżnicowanych komórek efektorowych, zdolnych do produkcji zarówno cytokin typu Th1, jak i Th2. Dalsza produkcja cytokin na poziomie efektorowym może zatem pozostać zróżnicowana lub zostać spolaryzowana w kierunku Th1 lub Th2 [30].

Przyjmuje się, że komórki Th2 to limfocyty T CD4+ zdolne do produkcji IL-4, lecz nie IFN- γ . W przeciwieństwie do nich komórki Th1 to limfocyty T CD4+ zdolne do produkcji IFN- γ , lecz nie IL-4. Należy jednak zaznaczyć, że różnica pomiędzy komórkami Th1 i Th2 dotyczy raczej ilości niż całkowitego profilu wydzielanych cytokin [31]. Dotychczas nie udało się zidentyfikować markerów powierzchniowych charakterystycznych dla limfocytów Th1 i Th2. Istnieją jednak cząsteczki preferencyjne związane z fenotypami. Przykładowo, cząsteczki CD26, LAG-3 i receptor chemokinowy CCR5 ulegają preferencyjnej ekspresji na limfocytach Th1, natomiast cząsteczki CD30 oraz receptory chemokinowe CCR2 i CCR4 na limfocytach Th2 [32]. Pomimo faktu, że oba typy limfocytów Th mają wspólne komórki prekursorowe posiadające gen IL-4, reakcje, które warunkują są antagonistyczne [33]. Istnieją różne czynniki, które wpływają na proces różnicowania się prekursorowych komórek Th0 CD4+ w kierunku Th1 lub Th2 [34, 35]. Do czynników tych należą: i) obecność cytokin pro- i antyzapalnych produkowanych przez komórki odporności nieswoistej w miejscu uszkodzenia tkanki; ii) stężenie antygeny; iii) swoistość wiązania antygeny; iv) typ profesjonalnych komórek prezentujących antygen (APC); v) obecność cząstek kostymulujących; vi) droga podania antygeny (miejsce prezentacji antygeny); vii) poziom ekspresji cząstek adhezyjnych. Kluczowa wydaje się również równowaga pomiędzy czynnikami transkrypcyjnymi.

mi w limfocycie Th0 CD4+: T-bet (IL-12) jest istotną determinantą dla różnicowania się w kierunku komórek Th1, podczas gdy GATA3 (IL-4) dla różnicowania się w kierunku komórek Th2 [35].

Oba typy odporności, Th1 i Th2, mają na celu ochronę organizmu gospodarza przed patogenami oraz komórkami nowotworowymi [34]. Komórki Th1 pełnią istotną rolę w przypadku ochrony skierowanej przeciwko patogenom wewnątrzkomórkowym, natomiast komórki Th2 w przypadku patogenów zewnątrzkomórkowych. W oparciu o obserwacje dotyczące antagonizmu obu typów odpowiedzi immunologicznej w połowie lat 80. wprowadzony został model odporności Th1/Th2 (tzw. paradygmat Th1/Th2) [30]. Według zakładanego modelu polaryzacja odpowiedzi immunologicznej Th1/Th2 miała leżeć u podstaw odpowiedzi swoistej oraz stanowić podłoże chorób autoimmunologicznych. Jako że oba typy odpowiedzi biorą również udział w reakcji odrzucania przeszczepu, model ten został przyjęty również w transplantologii [31]. Stąd wzięła się idea monitoringu immunologicznego oparta na analizie poziomu cytokin Th1/Th2 w surowicy lub moczu biorców przeszczepu.

Przyjmuje się, że przesunięcie odpowiedzi immunologicznej z Th1 w kierunku Th2 sprzyja przeżywalności przeszczepionego organu ze względu na: i) hamowanie reakcji nadwrażliwości typu późnego; ii) blokowanie działania IFN- γ na makrofagi; iii) przesunięcie produkcji przeciwciał w kierunku IgE i nietoksycznych podklas IgG. Dotychczasowe doniesienia wskazują, że dewiacja immunologiczna w kierunku odpowiedzi typu Th2 przyczynia się do indukcji tolerancji obwodowej, choć niekoniecznie utrzymania tego stanu [36-38]. Utrzymująca się dominacja profilu cytokin Th2, pomimo że wydłuża okres przeżywalności przeszczepionego narządu, przyczynia się do rozwinięcia reakcji przewlekłego odrzucania [39]. Zaobserwowano, że podwyższony poziom IL-4 oraz obniżony poziom IFN- γ w surowicy w okresie 12 i 24 miesięcy po przeszczepieniu nerki korelują z epizodami przewlekłego odrzucania [40]. Wyniki badań wskazują, że brak IL-2, uważanej początkowo jedynie za czynnik wzrostu limfocytów T, uniemożliwia rozwój tolerancji obwodowej w stosunku do alloantygenów [41]. Wydaje się również, że cytokina ta jest konieczna dla prawidłowego rozwoju naturalnych komórek T regulatorowych (nTreg) [42].

Opisano również, że wpływ na przeżywalność przeszczepu, oprócz takich czynników ryzyka, jak wiek, czas ciepłego i zimnego niedokrwienia, brak reżimu immunosupresyjnego etc., może mieć poziom cytokin u pacjentów w okresie przedtransplantacyjnym. Podwyższony poziom cytokin typu Th1, a w szczególności IFN- γ , IL-2 i IL-12, może sprzyjać późniejszym epizodom odrzucania ostrego [41, 43, 44]. Co ciekawe, w niektórych doniesieniach wspomina się również o podwyższonym poziomie cytokiny regulatorowej IL-10 w okresie przedtransplantacyjnym w grupie ze zdiagnozowanym odrzucaniem ostrym po przeszczepieniu narządu [45].

Wydaje się, że przyjęty paradygmat Th1/Th2 jest zbyt uproszczony i nie tłumaczy w pełni procesów immunologicznych prowadzących do odrzucania przeszczepu [46]. Model ten dodatkowo ulega komplikacji ze względu na: i) plejotropowe działanie cytokin i ich redundancję; ii) odkrycie odrębnej subpopulacji prozapalnych limfocytów pomocniczych Th17 (komórki produkujące IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, TNF- α) [47] oraz komórek T regulatorowych/supresorowych (komórki produkujące cytokiny regulatorowe IL-10 i TGF- β) [48] zdolnych do modulacji odpowiedzi immunologicznej [31]. Pomimo tych kontrowersji zastosowanie analizy profilu cytokin w monitoringu immunologicznym pacjentów po przeszczepieniu narządu pozostaje wciąż atrakcyjną koncepcją.

1.5.2. Rola limfocytów T regulatorowych w indukcji tolerancji transplantacyjnej

1.5.2.1. Limfocyty regulatorowe u człowieka

Tolerancja immunologiczna oznacza brak aktywności immunologicznej wobec określonych antygenów, przy zachowanej odpowiedzi na inne antygeny. Jednym z kluczowych mechanizmów odpowiedzialnych za jej utrzymanie oraz kontrolę równowagi w obrębie populacji limfocytów jest aktywna immunoregulacja/immunosupresja z udziałem komórek regulatorowych/supresorowych [49]. Liczne dane wskazują, że defekty funkcjonalne i/lub ilościowe w obrębie subpopulacji komórek regulatorowych/supresorowych mogą być istotnym czynnikiem w patogenezie różnych chorób autoimmunologicznych [50, 51] i stanów patologicznych [52, 53].

Sama koncepcja regulacji odpowiedzi immunologicznej, skierowanej przeciwko alloantygenom na drodze aktywnej supresji przy udziale komórek, jest dość stara i sięga lat 50. XX w. [54, 55]. Od tego czasu udało się zidentyfikować różne subpopulacje komórek regulatorowych/supresorowych oraz scharakteryzować mechanizmy ich działania [49]. Obecnie wiadomo, że komórki regulatorowe/supresorowe należą do heterogenicznej grupy i wywodzą się głównie spośród limfocytów T CD4+, w szczególności CD4+CD25+, lecz również limfocytów T CD8+CD28-, limfocytów T podwójnie negatywnych CD4-CD8- i limfocytów B, komórek NKT [56]. Pod względem funkcjonalnym można podzielić tę niejednorodną grupę komórek na dwie kategorie. W pierwszej kategorii, działanie supresorowe wymaga kontaktu bezpośredniego z komórką docelową i związane jest z cząsteczkami powierzchniowymi, takimi jak: CTLA-4 (ang. *Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) i GITR (ang. *Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family related protein*) [56]. W drugiej kategorii mechanizm działania oparty jest na produkcji i uwalnianiu cytokin regulatorowych IL-10 i TGF- β [56]. Wśród komórek regulatorowych/supresorowych można wyróżnić komórki naturalne (nTregs), występujące wśród populacji komórek naiwnych, oraz komórki indukowane antygenem na obwodzie (iTregs). Podział ten nie jest jednak jednoznaczny, gdyż w niektórych przypad-

kach może dochodzić do indukcji naiwnych komórek regulatorowych/supresorowych właśnie na obwodzie [49].

1.5.2.2. Limfocyty T regulatorowe CD4+CD25+FOXP3+

Najistotniejszą z punktu widzenia immunologii transplantacyjnej oraz najdokładniej opisaną subpopulacją komórek regulatorowych/supresorowych są limfocyty T o fenotypie CD4+CD25+FOXP3+ [57]. Limfocyty te stanowią 5–10% wszystkich obwodowych limfocytów T CD4+ [58]. Wykazują one ekspresję czynnika transkrypcyjnego FOXP3 (ang. *Forkhead box protein 3*), który jest uznany za wspólny, choć nie uniwersalny marker tych komórek regulatorowych [59]. Czynnikiem transkrypcyjnym FOXP3 jest kluczowy dla procesu różnicowania się tych limfocytów w grasicy i/lub na obwodzie, a jego odpowiedni poziom ekspresji w komórce jest niezbędny dla utrzymania funkcji regulatorowych/supresorowych [60]. Utratę funkcji FOXP3 na skutek mutacji obserwuje się w przypadku różnych chorób autoimmunologicznych m.in. ciężkich zaburzeń immunologicznych IPEX (immunodysregulacja, poliendokrynopatia, enteropatia, syndrom X) [49, 51]. Dokładny mechanizm działania FOXP3 nie jest znany, ale sugeruje się, że hamuje on różne czynniki transkrypcyjne, jak: NFAT (ang. *Nuclear factor of activated T cells*), AML1 (ang. *Acute myeloid leukemia-1*)/Runx1 (ang. *Runt-related transcription factor 1*), kompleksu HAT (ang. *Histone acetyl transferase*)/HDAC (ang. *Histone deacetyl transferase*) i najprawdopodobniej NF- κ B [49, 58]. Szacuje się, że FOXP3 oddziałuje bezpośrednio lub pośrednio na ekspresję ok. 700 różnych genów, łącząc się bezpośrednio z blisko 10 procentami z nich [61, 62]. Zaobserwowano również, że poziom ekspresji FOXP3 w komórkach regulatorowych/supresorowych podlega regulacji przez różne czynniki pozakomórkowe, takie jak: i) wiązanie TCR z antygenem; ii) cytokinę regulatorową/supresorową TGF β czy iii) estrogen, co przynajmniej częściowo tłumaczy wzrost liczby komórek regulatorowych i indukcję tolerancji obwodowej w stosunku do antygenów płodu obserwowanych w przebiegu ciąży [58].

Subpopulację limfocytów T regulatorowych o fenotypie CD4+CD25+FOXP3+ tworzą: i) nTregs, powstające w trakcie normalnego procesu dojrzewania limfocytów T w grasicy oraz ii) iTregs, powstające w odpowiednich warunkach na drodze aktywacji naiwnych limfocytów T CD4+CD25- na obwodzie [49]. nTregs charakteryzują się większą stabilnością i wykazują silniejsze własności supresorowe niż iTregs, co prawdopodobnie związane jest z modyfikacjami epigenetycznymi w obrębie kluczowych genów [63]. Wykazano, że naturalne limfocyty T regulatorowe CD4+CD25+FOXP3+ zdolne są do zahamowania proliferacji naiwnych limfocytów T i ich różnicowania w komórki efektorowe w warunkach *in vivo*. Komórki te mogą również hamować funkcje efektorowe już zróżnicowanych limfocytów T CD4+ i CD8+, jak również funkcje komórek NK, NKT, tucznych, limfocytów B, makrofagów, osteoklastów i komórek dendrytycznych [49, 64-66]. Limfocyty te działają w sposób antygenowo niespecyficzny [67]. Dokładny

mechanizm działania limfocytów T CD4+CD25+FOXP3+ nie jest znany. Prawdopodobnie obejmuje on: i) supresję lub indukcję apoptozy komórek za pośrednictwem cząstek powierzchniowych (np.: CTLA-4); ii) produkcję i wydzielanie cytokin supresorowych (IL-10, TGF- β , IL-35); iii) funkcjonalną modyfikację lub indukcję apoptozy komórek dendrytycznych [58]. Działanie to może być uzależnione od licznych czynników, takich jak: natężenia i czasu stymulacji antygenem, lokalnego środowiska cytokin czy typu tkanki.

Wydaje się, że limfocyty T CD4+CD25+FOXP3+ zarówno naturalne, jak i indukowane zdolne są nie tylko do indukcji tolerancji w stosunku do antygenów allogenicznych, ale i długotrwałego utrzymywania tego stanu [57, 68-71]. Istnieją jednak sprzeczne doniesienia, które sugerują, że podwyższony odsetek limfocytów T CD4+CD25+FOXP3 bądź podwyższona ekspresja FOXP3 w przeszczepionym narządzie może korelować z procesem odrzucania ostrego [72-74]. Proces taki może być związany z aktywacją limfocytów T regulatorowych i infiltracją przez nie odrzucanego narządu. Większość doniesień wskazuje na istnienie korelacji pomiędzy podwyższonym odsetkiem limfocytów T regulatorowych bądź podwyższoną ekspresją FOXP3 w przeszczepionym narządzie i zwiększoną przeżywalnością przeszczepu, szczególnie w dłuższym przedziale czasu [70, 75-78]. Obserwacje te są zgodne z wynikami badań nad wytworzeniem stanu tolerancji immunologicznej po przeszczepieniu za pomocą limfocytów T regulatorowych, indukowanych antygenami allogenicznymi w warunkach *in vivo* [57, 68, 79].

1.5.2.3. Limfocyty T supresorowe CD8+CD28-

Komórki wykazujące funkcje supresorowe zidentyfikowano również wśród limfocytów T CD8+ [50, 80]. Do najlepiej poznanych komórek w tej heterogennej grupie należą limfocyty supresorowe T CD8+CD28- [81]. Komórki te wywierają swój efekt supresorowy na komórkach Th w sposób pośredni, poprzez kontakt powierzchniowy z profesjonalnymi komórkami prezentującymi antygen APC [82]. Pod wpływem tych oddziaływań dochodzi do ekspresji receptorów inhibitorowych ILT3 i ILT4 (ang. *Immunoglobulinlike transcripts 3 and 4*) na powierzchni komórek APC, co z kolei hamuje ekspresję cząstek kostymulujących CD40, CD80 i CD86, niezbędnych do pełnej aktywacji limfocytów efektorowych [82]. W efekcie, kontakt z „tolerogenicznymi” komórkami APC prowadzi limfocyty T CD4+ do stanu anergii. Nie zaobserwowano, by limfocyty T CD8+CD28- były zdolne do indukcji apoptozy komórek APC [50]. Samo działanie komórek CD8+CD28- jest antygenowo specyficzne [83]. Badania wykazały wysoki poziom ekspresji cząstek FOXP3, GITR i CTLA4 w tych komórkach, zbliżony do poziomu obserwowanego w nTreg [84]. Dodatkowo, wykazują one silną ekspresję mRNA immunoglobulinopodobnych receptorów komórek cytotoksycznych (ang. *Killer cell immunoglobulin-like receptor – KIR*) [84].

Limfocyty T CD8+CD28⁻ wydają się być istotne dla indukcji stanu tolerancji w stosunku do antygenów allogenicznych [85, 86]. Podwyższony odsetek tych komórek znaleziono m.in. u pacjentów po przeszczepieniu serca, nerki i wątroby [87, 88], u których nie zaobserwowano oznak procesu odrzucania narządu w długim przedziale czasu. Zebrane dane wskazują również, że komórki te prawdopodobnie wywierają swój efekt supresorowy na komórkach APC we wnętrzu zinfiltrowanego narządu [89].

1.6. Nowoczesne metody rozpoznawania procesu odrzucania przeszczepionej nerki allogenicznej

Biopsja jest wciąż uznawana za złoty standard w diagnostyce transplantacji nerek [90]. Ze względu na inwazyjność i podwyższone ryzyko dla pacjenta, technika ta nie może być jednak stosowana zbyt często, nie jest zatem optymalnym narzędziem diagnostycznym w transplantologii. Idealna metoda monitorowania procesu odrzucania przeszczepionego narządu powinna charakteryzować się: i) wczesną wykrywalnością reakcji odrzucania; ii) możliwością stałego monitorowania odpowiedzi allogenicznej w trakcie leczenia immunosupresyjnego; iii) małą inwazyjnością; iv) relatywnie niskim kosztem procedury. Z powyższych powodów poszukuje się nowych metod monitorowania różnorodnych wskaźników aktualnego stanu układu immunologicznego biorcy. Metody te powinny umożliwić: i) wczesne wykrycie ryzyka odrzucania alloprzeszczepu; ii) optymalizację schematu leczenia immunosupresyjnego; iii) odróżnienie procesu odrzucania od innych stanów patologicznych przeszczepionego narządu.

Oprócz rozpoznawania niespecyficznym symptomów, które mogą towarzyszyć procesowi odrzucania nerki, takich jak: spadek produkcji moczu, nadciśnienie tętnicze, nadwrażliwość i obrzęk przeszczepu, najczęściej stosowaną metodą monitoringu w okresie potransplantacyjnym jest kontrola poziomu kreatyniny w surowicy krwi. Metoda ta jest stosunkowo prosta i tania, lecz niesatysfakcjonująca. Istnieje bowiem szereg procesów patologicznych powodujących spadek filtracji kłębuszkowej i wzrost stężenia kreatyniny w surowicy krwi. Poszukiwanie wczesnych wskaźników ryzyka odrzucania ostrego i przewlekłej nefropatii jest wciąż wyzwaniem dla współczesnej transplantologii.

Jednym z najstarszych testów alloreaktywności jest mieszana reakcja limfocytów (ang. *Mixed lymphocyte reaction* – MLR). W teście tym miesza się inaktywowane komórki dawcy z limfocytami biorcy i ocenia stopień proliferacji komórek biorcy, głównie limfocytów Th. Na podstawie pomiaru stopnia wbudowania tymidyny znakowanej trytem do dzielących się komórek w odpowiedzi na antygeny HLA klasy II limfocytów dawcy możliwe jest określenie zdolności odpowiedzi limfocytów biorcy. Kolejny test to limfoliza zależna od komórek (ang. *Cell-mediated lympholysis* – CML), w którym mierzy się stopień zniszczenia komórek dawcy przez limfocyty T cytotoksyczne. Ocena

intensywności tej reakcji określa zdolność limfocytów T cytotoksycznych do wiązania antygenów HLA klasy I dawcy. Zastosowanie kliniczne tych testów jest jednak ograniczone w związku z brakiem ścisłej korelacji MLR i CML z klinicznym przebiegiem procesu odrzucania narządu.

Inny sposób badania odpowiedzi immunologicznej po przeszczepieniu narządu polega na inkubacji limfocytów T biorcy z peptydami odpowiadającymi sekwencji aminokwasów antygenów MHC dawcy. Wynik tego badania może odzwierciedlać pośrednie rozpoznanie antygeny i może być przydatne w celach prognostycznych w kierunku odrzucania przewlekłego narządu. Kolejną metodą, którą stosuje się przy monitorowaniu stanu układu immunologicznego biorcy jest pomiar liczby alloreaktywnych limfocytów T we krwi za pomocą ELISPOT (ang. *Enzyme-linked immunoabsorbent assay*). Metoda ta umożliwia ocenę liczby alloreaktywnych limfocytów T produkujących IFN- γ w reakcji na komórki lub peptydy. Nie ustalono jednak dokładnej korelacji między klinicznym obrazem odrzucania a liczbą komórek produkujących IFN- γ . W innych testach ocenia się również czynność limfocytów B lub liczbę swoistych alloprzeciwciał.

Bardzo obiecującym narzędziem monitorowania odpowiedzi immunologicznej biorcy, opracowanym w ostatnim czasie, jest pomiar ekspresji genów cząsteczek odgrywających rolę w niszczeniu przeszczepu oraz cytokin. Przykładem mogą być badania, w których wykazano stosunkowo duży stopień korelacji pomiędzy obrazem histopatologicznym odrzucania a stężeniem mRNA dla perforyny, granzymu B i ligandu Fas [91, 92] oraz różnych cytokin prozapalnych [93, 94] w materiale biopsyjnym. Metody te wymagają jednak wcześniejszego wykonania biopsji oraz stosunkowo wysokich nakładów finansowych.

W celu zmniejszenia stopnia inwazyjności oraz uproszczenia procedury coraz częściej w transplantologii próbuje się stosować monitoring immunologiczny biorców z wykorzystaniem płynów ustrojowych, takich jak: krew pełna, surowica i mocz [95, 96]. Takie podejście ma wiele zalet. Przede wszystkim metody te nie stanowią dodatkowego zagrożenia dla pacjenta ze względu na swą mało- lub nie-inwazyjność. Procedury pobierania próbek są łatwe i zapewniają pełną powtarzalność oraz stały monitoring immunologiczny. Odpowiednie przygotowanie próbek zapewnia stabilność temperatury, pH i czasu przechowywania. Z kolei sam proces analizy próbek najczęściej charakteryzuje się stosunkowo niskim kosztem i dużą wydajnością. Dotychczasowym ograniczeniem monitoringu immunologicznego, opartego na analizie próbek płynów ustrojowych, jest natomiast brak jednoznacznych wczesnych wskaźników procesu odrzucania przeszczepionego narządu. Stosowane metody powinny bowiem charakteryzować się wysoką czułością i swoistością w kierunku procesu odrzucania narządu. Powinny również umożliwiać rozróżnienie różnorodnych stanów dysfunkcji przeszczepionego narządu.

2. Cel badań

Celem przedstawionych badań było określenie przydatności oznaczeń wybranych parametrów immunologicznych jako wskaźników ryzyka ostrego i przewlekłego odrzucania allogenicznej nerki przeszczepionej, pochodzącej od dawcy zmarłego.

Przeprowadzone badania oraz odnośne publikacje obejmowały następujące zagadnienia:

1. Rola limfocytów T regulatorowych/supresorowych w indukcji tolerancji immunologicznej u pacjentów po przeszczepieniu nerki allogenicznej, pochodzącej od dawcy zmarłego (publikacje I, II).
2. Wartość prognostyczna oznaczeń wybranych cytokin Th1/Th2 w surowicy pacjentów w okresie przedtransplantacyjnym w ostrym odrzucaniu przeszczepionej nerki allogenicznej, pochodzącej od dawcy zmarłego (publikacje III, VI).
3. Profil cytokin w różnych stanach dysfunkcji przeszczepionej nerki allogenicznej, pochodzącej od dawcy zmarłego (publikacja IV).
4. Przydatność kliniczna monitoringu immunologicznego opartego na cytometrycznej analizie stężeń wybranych cytokin Th1/Th2 w surowicy i moczu pacjentów poddanych przeszczepieniu nerki allogenicznej, pochodzącej od dawcy zmarłego (publikacje III, V).

3. Metodyka

Badania przeprowadzono na Oddziale Transplantologii i Chirurgii Ogólnej Szpitala Wojewódzkiego w Poznaniu oraz w Katedrze Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Projekt badawczy zaaprobowała Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu. Pacjenci wyrazili zgodę na wykorzystanie ich płynów ustrojowych do celów naukowych. Przebieg eksperymentów oraz wykorzystanych metod badawczych przedstawiono szczegółowo w publikacjach stanowiących treść niniejszej rozprawy. Pewnym ograniczeniem prezentowanych wyników może być relatywnie niewielka liczebność badanej grupy pacjentów. Należy jednak nadmienić, że grupa ta została starannie wyselekcjonowana, a dobór zastosowanych metod pozwolił zminimalizować błąd statystyczny.

4. Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy

4.1. Rola limfocytów T regulatorowych/supresorowych w indukcji tolerancji immunologicznej u pacjentów po przeszczepieniu nerki allogenicznej, pochodzącej od dawcy zmarłego

Proces odrzucania jest główną przyczyną utraty przeszczepionej nerki i statystycznie dotyczy co czwartego przeszczepionego narządu [8]. W 10-letnim okresie po przeszczepieniu, proces ostrego odrzucania jest odpowiedzialny za utratę narządu u 4,1 – 5,4% pacjentów, a przewlekłe odrzucanie u 16,1–20,3% biorców [9]. Wprowadzenie nowych schematów immunosupresyjnych znacznie zmniejszyło częstość występowania epizodów ostrego odrzucania, jednakże nadal jest to istotny klinicznie problem. Dodatkowo epizody ostrego odrzucania mają wpływ na przeżywalność przeszczepionego narządu. Wystąpienie epizodu ostrego odrzucania w czasie pierwszego półrocza po przeszczepieniu zwiększa do 50% ryzyko utraty przeszczepu [11]. Kluczową funkcję w indukcji tolerancji immunologicznej w stosunku do antygenów allogenicznych dawcy oraz długotrwałym utrzymaniu tego stanu pełnią limfocyty T regulatorowe/supresorowe biorcy [57, 79]. Najistotniejsze wydają się tu być limfocyty T regulatorowe o fenotypie CD4+CD25+FOXP3+ [70, 76]. Celem części przeprowadzonych doświadczeń było zbadanie, czy istnieje związek pomiędzy odsetkiem obwodowych limfocytów T regulatorowych CD4+CD25+FOXP3+ w okresie przed- oraz potransplantacyjnym a incydentami ostrego odrzucania allogenicznej nerki. W tym celu od pacjentów po przeszczepieniu nerki pobrano próbki krwi obwodowej, które następnie poddano analizie cytometrycznej z zastosowaniem odpowiednich przeciwciał. Próbkę krwi pobrano przed zabiegiem (doba 1.) oraz po zabiegu (doba 10.). Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazano, że grupę pacjentów ze zdiagnozowanym epizodem odrzucania ostrego przeszczepionej nerki w 3-miesięcznym okresie pozabiegowym charakteryzowało niższe średnie stężenie limfocytów T regulatorowych CD4+CD25+FOXP3+ w obu punktach pomiarowych. Ponadto w okresie pozabiegowym zaobserwowano wzrost poziomu limfocytów T regulatorowych CD4+CD25+FOXP3+ w grupie pozbawionej epizodów ostrego odrzucania narządu, świadczący o rozszerzeniu badanej subpopulacji na drodze proliferacji (nTreg) lub aktywacji naiwnych limfocytów T CD4+CD25- na obwodzie (iTreg) [49]. Dane te świadczą o aktywnym udziale limfocytów T regulatorowych CD4+CD25+FOXP3+ w indukcji tolerancji immunologicznej w stosunku do przeszczepu allogenicznego. Defekt ilościowy i/lub funkcjonalny w obrębie tej subpopulacji może być istotnym czynnikiem przyczyniającym się do reakcji odrzucania ostrego. Co

istotne, różnice te są widoczne już w okresie przedtransplantacyjnym, co może być efektem negatywnego wpływu przewlekłej reakcji zapalnej na obwodowe mechanizmy regulatorowe u pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek [97]. W ostatnim czasie udało się zidentyfikować różne czynniki immunologiczne, takie jak: IL-1, IL-4, IL-6, IL-23, IFN- γ , niedobór IL-2 czy ligację niektórych receptorów Toll-podobnych (ang. *Toll-like receptors* – TLR), które na drodze metylacji mogą hamować aktywność czynnika transkrypcyjnego FOXP3 [63, 98]. Efektem może być obniżenie ekspresji czynnika FOXP3 w części subpopulacji limfocytów T regulatorowych na poziomie nawet 10–15% oraz utrata funkcji immunoregulatorowych. Obserwowany defekt w obrębie subpopulacji limfocytów T regulatorowych może wynikać również z predyspozycji genetycznych [99]. Interesującym jest fakt, że w badanej próbie nie zaobserwowano statystycznie znamiennej różnicy w odsetkach limfocytów T regulatorowych pomiędzy badanymi grupami różniącymi się stosowaną terapią immunosupresyjną, na co wskazywały niektóre wcześniejsze doniesienia [100, 101]. Wydaje się zatem, że pomiar stężenia obwodowych limfocytów T regulatorowych CD4+CD25+FOXP3+ u pacjentów po przeszczepieniu narządów w okresie przed- i pozabiegowym może mieć wartość prognostyczną w ostrym odrzucaniu przeszczepionej nerki allogenicznej (**PUBLIKACJA I**).

Podobne zależności zaobserwowano w przypadku analizy subpopulacji limfocytów T supresorowych o fenotypie CD8+CD28-FOXP3+. Te antygenowo specyficzne komórki wywierają swój efekt supresorowy na limfocytach Th w sposób pośredni, poprzez kontakt powierzchniowy z profesjonalnymi komórkami prezentującymi antygen APC [82]. Oddziaływania te prowadzą do powstania tolerogenicznych komórek APC, zdolnych do anergizacji limfocytów Th [82, 102]. Przeprowadzona analiza cytometryczna wykazała niższy poziom limfocytów T supresorowych u pacjentów ze zdiagnozowanym epizodem odrzucania ostrego przeszczepionej nerki w badanym okresie potransplantacyjnym. Nie wykazano natomiast statystycznie istotnych różnic w poziomach limfocytów T supresorowych pomiędzy badanymi grupami w okresie przedtransplantacyjnym. Warto nadmienić, że w badanej próbie również nie zaobserwowano istotnych różnic w poziomach limfocytów T supresorowych pomiędzy badanymi grupami różniącymi się stosowaną terapią immunosupresyjną. Prezentowane dane sugerują, że limfocyty T CD8+CD28-FOXP3+, podobnie jak limfocyty T CD4+CD25+FOXP3+, są istotne dla indukcji tolerancji immunologicznej po przeszczepieniu. Defekt ilościowy i/lub funkcjonalny w obrębie tej subpopulacji komórek może w sposób istotny przyczynić się do nasilenia reakcji immunologicznej, skierowanej przeciwko antygenom allogenicznym, prowadząc do ostrego odrzucania przeszczepionego narządu [87, 88]. Istniejące dane wskazują, że limfocyty T supresorowe u osób ze zdiagnozowanym odrzucaniem ostrym i przewlekłym przeszczepionego narządu są niezdolne do indukcji ekspresji receptorów inhibitorowych ILT3 i ILT4 na powierzchni komórek dendrytycznych i endotelialnych [85]. Wydaje się również, że pomiar stężenia obwodowych

limfocytów T supresorowych CD8+CD28-FOXP3+ u pacjentów po transplantacji może mieć wartość prognostyczną w wykrywaniu procesu ostrego odrzucania przeszczepionej nerki allogenicznej (**PUBLIKACJA II**).

4.2. Wartość prognostyczna oznaczeń wybranych cytokin Th1/Th2 w surowicy pacjentów w okresie przedtransplantacyjnym w ostrym odrzucaniu przeszczepionej nerki allogenicznej, pochodzącej od dawcy zmarłego

Oprócz znanych czynników ryzyka, takich jak: wiek, czas ciepłego i zimnego niedokrwienia, brak reżimu immunosupresyjnego etc., wpływ na przeżywalność przeszczepionego narządu wydaje się mieć również poziom niektórych cytokin w okresie przedtransplantacyjnym [41, 45]. W przeprowadzonej analizie cytometrycznej wybranych cytokin Th1/Th2 w okresie przedtransplantacyjnym wykazano znacząco wyższe stężenie IFN- γ i IL-10 w surowicy pacjentów ze zdiagnozowanym odrzutem ostrym w stosunku do grupy pacjentów ze stabilnym przeszczepem. Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic dla stężeń IL-2, IL-4, IL-5 i TNF- α pomiędzy badanymi grupami. Wyższe stężenia IFN- γ i IL-10 w okresie przedtransplantacyjnym świadczą o obecności niezdiagnozowanych procesów zapalnych, które mogły przyczynić się do nasilenia reakcji immunologicznej przeciwko antygenom allogenicznym, prowadząc do odrzucania ostrego przeszczepionego narządu. Zaobserwowane wyższe stężenie IFN- γ w tej grupie w okresie przedtransplantacyjnym jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami różnych autorów o korelacji pomiędzy przewagą profilu cytokin Th1 w okresie przedzabiegowym, a późniejszymi epizodami odrzucania ostrego przeszczepionej nerki [41, 43, 44]. Co ciekawe, wysokim stężeniem IFN- γ nie towarzyszył wzrost stężeń innych badanych cytokin prozapalnych. Może to być związane z: i) różnicami pomiędzy odpowiedzią układową i odpowiedzią miejscową; ii) zbyt niską czułością zastosowanej metody pomiaru stężeń cytokin w surowicy bądź też iii) selektywną nadprodukcją IFN- γ . Istnieją bowiem doniesienia o braku korelacji pomiędzy wzrostem stężenia IFN- γ i stężeniami innych cytokin prozapalnych w różnych stanach patologicznych [103, 104]. IFN- γ jest cytokiną o silnym działaniu stymulującym cytotoksyczne komórki efektorowe, jak limfocyty T cytotoksyczne, monocyty, komórki NK i granulocyty [30]. Wysokie stężenie tej cytokiny w surowicy pacjentów w okresie przedtransplantacyjnym może sugerować przebieg niezdiagnozowanej, nieswoistej reakcji zapalnej typu komórkowego, związanej z aktywacją komórek NK oraz monocytów/makrofagów. Z kolei wysokie stężenie IL-10, cytokiny o silnym działaniu przeciwzapalnym, zaobserwowane w surowicy pacjentów w okresie przedtransplantacyjnym, ze zdiagnozowanym procesem odrzucania ostrego, może być po części związane z obwodowymi mechanizmami regulatorowymi kontrolującymi przebieg reakcji zapalnej,

a po części z aktywacją samych monocytów/makrofagów. Źródłem tej cytokiny mogą zatem być zarówno limfocyty T regulatorowe/supresorowe oraz tolerogeniczne komórki dendrytyczne biorące udział w immunoregulacji [105], jak i aktywowane monocyty/makrofagi [106]. Przeprowadzona analiza cytometryczna wykazała znacząco niższy odsetek limfocytów T regulatorowych/supresorowych w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym odrzucaniem ostrym w okresie przed- i potransplantacyjnym. Dane te wskazują na wadę obwodowych mechanizmów regulatorowych w obrębie układu czynnika transkrypcyjnego FOXP3 oraz wskazują monocyty/makrofagi, jako potencjalne źródło IL-10. Wyższe stężenie IL-10 u pacjentów ze zdiagnozowanym odrzucaniem ostrym w okresie przedtransplantacyjnym znajduje również potwierdzenie w niektórych doniesieniach [107, 108]. Prezentowane wyniki sugerują, że podwyższone stężenie IFN- γ i IL-10 w surowicy pacjentów transplantacyjnych w okresie przedzabiegowym można rozpatrywać w kategoriach czynników ryzyka odrzucania ostrego przeszczepionej nerki allogenicznego (**PUBLIKACJA III**).

W celu określenia wartości prognostycznej oznaczeń wybranych cytokin Th1/Th2 (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ , TNF- α) w surowicy pacjentów w ostrym odrzucaniu przeszczepionej nerki allogenicznego, przeprowadzono dodatkową analizę statystyczną opartą na wieloczynnikowej regresji logistycznej. Otrzymany model matematyczny opisuje wpływ analizowanych zmiennych niezależnych na dychotomiczną zmienną *Odrzut ostry* i pomaga w określaniu prawdopodobieństwa ryzyka zajścia epizodu ostrego odrzucania pod wpływem zmian wartości analizowanych parametrów niezależnych. Należy jednak zaznaczyć, że model ten jest oparty na stosunkowo małej liczbie elementów ($N = 44$, przy zalecanej wielkości $N \geq 100$), co wpływa na jego niedokładność. W celu zwiększenia wiarygodności modelu badane zmienne przeanalizowano pod kątem wykluczenia ewentualnych punktów odstających oraz zjawiska współliniowości między zmiennymi. Przy budowie modelu wykorzystano metodę selekcji postępującej LR, która jest najskuteczniejsza w przypadku grup o mniejszej liczebności elementów. Zastosowanie postępującej metody krokowej umożliwiło zbudowanie modelu uwzględniającego wyłącznie istotne zmienne niezależne, tj. o najniższym poziomie istotności. Do zmiennych tych zalicza się: Wiek, IFN- γ , IL-10 i IL-4. Pomimo że zmienna IFN- γ nie spełnia przyjętego kryterium istotności $p < 0,05$, postanowiono ją ująć w modelu ze względu na zaobserwowaną istotną statystycznie różnicę w poziomie tej cytokiny pomiędzy grupą ze zdiagnozowanym odrzucaniem ostrym (ARE) vs. a grupą ze stabilną funkcją przeszczepionego narządu (NONARE) w okresie przedtransplantacyjnym. Prawdopodobnym jest, że oparcie modelu na liczniejszej grupie elementów przyczyniłoby się do precyzyjniejszego określenia istotności parametru IFN- γ . Zbudowany model uzyskał 84,1% poprawnych klasyfikacji, z czego dla przypadków NONARE przypada 87,9%, a dla przypadków ARE 72,7%. Uzyskane wartości ilorazu szans $\text{Exp}(B)$ dla zmiennych wskazują na zmianę prawdopodobieństwa zajścia zjawiska niepożąda-

nego *Odrzut ostry* pod wpływem wzrostu wartości zmiennej o jednostkę, przy czym wartości >1 sprzyjają zajściu zdarzenia, a wartości <1 mają wpływ negatywny. Dla zmiennej Wiek wartość $\text{Exp}(B) = 0,9$, dla IFN- γ $\text{Exp}(B) = 2,49$, dla IL-10 $\text{Exp}(B) = 2,41$ i dla IL-4 $\text{Exp}(B) = 0,11$. Interpretując wielkości ilorazu szans $\text{Exp}(B)$ można stwierdzić, że pacjenci młodszy (o silniejszej odpowiedzi immunologicznej), o podwyższonym surowiczym stężeniu IFN- γ i/lub IL-10 w okresie przedtransplantacyjnym są bardziej narażeni na zajście epizodu odrzucania ostrego. Z kolei, wyższe surowicze stężenie IL-4 w okresie przedtransplantacyjnym może działać korzystnie na przeżywalność przeszczepu. Prezentowany model ma poparcie w opublikowanych doniesieniach. Młody wiek biorcy wiązany jest z silniejszą odpowiedzią immunologiczną przeciwko antygenom allogenicznym, przez co może zwiększać ryzyko wystąpienia epizodów ostrego odrzucania przeszczepionego narządu [109]. Z kolei rola IFN- γ w procesie ostrego odrzucania przeszczepionego narządu jest dobrze udokumentowana [43, 44]. Istnieją również dane wskazujące, że reakcji ostrego odrzucania narządu może towarzyszyć podwyższona produkcja IL-10 [107, 108] (**PUBLIKACJA VI**).

4.3. Profil cytokin w różnych stanach dysfunkcji przeszczepionej nerki allogenicznej, pochodzącej od dawcy zmarłego

W kolejnym cyklu badań wykazano, że różne stany dysfunkcji przeszczepionej nerki allogenicznej, pochodzącej od osoby zmarłej, charakteryzują odrębne profile cytokin. Na podstawie analizy cytometrycznej próbek surowicy krwi pochodzącej od pacjentów ze zdiagnozowanym ostrym odrzucaniem nerki, odrzucaniem przewlekłym oraz stabilną funkcją przeszczepu przez okres ≥ 5 lat zaobserwowano różnice w poziomie IFN- γ , IL-4, IL-6 i IL-10 pomiędzy poszczególnymi grupami. Z kolei nie zaobserwowano istotnych różnic w stężeniach IL-2 i TNF- α pomiędzy badanymi grupami. Przeprowadzona analiza wykazała, że grupę ze zdiagnozowanym ostrym odrzucaniem nerki charakteryzował mieszany profil cytokin, z podwyższonym poziomem IFN- γ i IL-10, w porównaniu z grupą pacjentów ze stabilną funkcją przeszczepionego narządu. Wyniki te pokrywają się z wcześniej prezentowanymi danymi (**PUBLIKACJA III**). Z kolei grupę pacjentów z przewlekłym odrzucaniem nerki charakteryzował podwyższony poziom cytokin typu Th2 w surowicy (IL-4, IL-6, IL-10) oraz obniżony poziom IFN- γ w stosunku do pacjentów ze stabilną funkcją nerki i zdiagnozowanym ostrym odrzucaniem nerki przeszczepionej. Pomimo że w przewlekłym uszkodzeniu przeszczepu biorą udział czynniki o zróżnicowanym charakterze, najistotniejsze wydają się czynniki immunologiczne [11, 110]. Otrzymane wyniki sugerują, że odpowiedź typu Th2 może być istotna dla inicjacji i/lub utrzymania procesu przewlekłego uszkodzenia przeszczepu, gdyż IL-4, IL-6 i IL-10 są czynnikami różnicowania się i wzrostu limfocytów B oraz przyczyniają się do nasilonej produkcji przeciwciał [30]. Potencjalny udział cytokin Th2 w rozwoju

procesu przewlekłego uszkodzenia przeszczepionego narządu był wcześniej opisany przez niektórych autorów [111, 112]. Z drugiej strony istnieje również możliwość, że obserwowany podwyższony poziom cytokin Th2 w tej grupie pacjentów jest wywołany innymi czynnikami. Z kolei grupę pacjentów ze stabilną funkcją przeszczepionej nerki w okresie ≥ 5 lat charakteryzuje podwyższony poziom IFN- γ w surowicy. Jest to spójne z wcześniejszymi doniesieniami Sadeghi i współpracowników [40, 41]. Nadekspresja IFN- γ obserwowana w tej grupie może wiązać się ze wzrostem subpopulacji limfocytów T regulatorowych/supresorowych stymulowanych stałą obecnością antygenów allogeicznych. Istnieją dane wskazujące, że przejściowa nadprodukcja IFN- γ przez indukowane limfocyty T regulatorowe/supresorowe jest istotna dla pełnionych przez nie funkcji immunomodulacyjnych, wywieranych przez profesjonalne komórki prezentujące antygen i efektorowe limfocyty T [40, 113] (**PUBLIKACJA IV**).

4.4. Przydatność kliniczna monitoringu immunologicznego opartego na cytometrycznej analizie stężeń wybranych cytokin Th1/Th2 w surowicy i moczu pacjentów poddanych przeszczepieniu nerki allogeicznej, pochodzącej od dawcy zmarłego

W analizowanym trzydziestodniowym okresie potransplantacyjnym zaobserwowano wzrost stężenia IFN- γ i IL-10 w surowicy pacjentów ze zdiagnozowanym ostrym odrzucaniem nerki przeszczepionej w stosunku do grupy pacjentów bez oznak odrzucania. Związane jest to z nasilającą się reakcją zapalną typu komórkowego. W przypadku innych analizowanych cytokin typu Th2 jedynie IL-4 wykazuje odmienną kinetykę wydzielania na poziomie układowym pomiędzy badanymi grupami. W okresie przedzabiegowym nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w stężeniach tej cytokiny pomiędzy badanymi grupami, jednakże w trzydziestodniowym okresie pozabiegowym widoczny był wzrost stężenia IL-4, przy czym średnie wartości stężenia cytokiny w obu grupach badanych były zbliżone. W grupie pacjentów bez oznak odrzucania przeszczepionego narządu, średnie stężenie IL-4 ulegało zmniejszeniu od doby 7. W tym samym okresie widoczny był stały wzrost stężenia IL-4 w grupie ze zdiagnozowanym odrzucaniem ostrym. Wyniki te mogą sugerować, iż krótkotrwałe nasilenie odpowiedzi immunologicznej typu Th2 w okresie poprzyszczepowym może przyczynić się do indukcji tolerancji obwodowej, a zatem przeżywalności przeszczepionej nerki allogeicznej. Obserwacja ta jest ogólnie przyjętym poglądem, że przesunięcie odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego (Th1) w kierunku typu humoralnego (Th2) sprzyja indukcji tolerancji obwodowej [36, 38, 114]. Niemniej długotrwała, nasilająca się odpowiedź typu Th2 w okresie potransplantacyjnym może przyczynić się do ostrego odrzucania zależnego od przeciwciał (**PUBLIKACJA III**).

Analogiczny obraz zmian stężeń badanych cytokin Th1/Th2 zaobserwowano w okresie pozabiegowym w próbkach moczu pacjentów transplantologicznych. Oprócz silnego wzrostu stężenia IFN- γ i IL-10 u pacjentów ze zdiagnozowanym ostrym odrzucaniem przeszczepionej nerki allogenicznej znaleziono również znacząco wyższy poziom TNF- α w 30. dobie po przeszczepieniu. Zaobserwowany wzór zmian analizowanych cytokin Th1/Th2 w moczu sugeruje możliwość istnienia nasilonej odpowiedzi nieswoistej u pacjentów ze zdiagnozowanym ostrym odrzucaniem narządu (**PUBLIKACJA V**).

Odpowiedź immunologiczna na przeszczepiony narząd allogeniczny jest związana z aktywacją szeregu komórek wydzielających różnorodne cytokiny będące mediatorami procesów immunologicznych. Ta „sieć cytokin” stanowi złożony układ i analiza natężenia odpowiedzi immunologicznej na podstawie oceny stężeń pojedynczych cytokin Th1 lub Th2 jest niemiarodajna. W procesie odrzucania przeszczepionego narządu allogenicznego niewątpliwie biorą udział oba typy odpowiedzi. Wydaje się, że to raczej równowaga pomiędzy cytokinami produkowanymi przez komórki Th1 i Th2, a nie sama dewiacja immunologiczna może być istotna dla kontroli procesu odrzucania. Prezentowane wyniki dowodzą, że cytometryczna analiza stężeń panelu cytokin Th1/Th2 w surowicy i moczu pacjentów poddanych przeszczepieniu nerki allogenicznej może być przydatną klinicznie metodą monitorowania immunologicznego w procesach ostrego i przewlekłego odrzucania narządu. Metoda ta jest minimalnie inwazyjna, przez co nie stanowi dodatkowego zagrożenia dla pacjentów. Procedury pobierania próbek są łatwe i zapewniają pełną powtarzalność pomiarów oraz ciągłość monitoringu. Odpowiednie przygotowanie próbek zapewnia stabilność pod względem temperatury, pH i czasu przechowywania. Z kolei sam proces analizy próbek charakteryzuje się stosunkowo niskim kosztem i dużą wydajnością.

5. Podsumowanie i wnioski

1. Obwodowe limfocyty T regulatorowe CD4+CD25+FOXP3+ oraz limfocyty T supresorowe CD8+CD28-FOXP3+ pełnią istotną funkcję w indukcji tolerancji immunologicznej w stosunku do antygenów allogenicznych dawcy. Defekt ilościowy i/lub funkcjonalny w obrębie subpopulacji tych komórek jest istotnym czynnikiem przyczyniającym się do reakcji odrzucania ostrego u pacjentów poddanych przeszczepieniu nerki allogenicznej.
2. Pacjenci o podwyższonym surowiczym stężeniu IFN- γ i/lub IL-10 w okresie przedtransplantacyjnym są bardziej narażeni na wystąpienie epizodu ostrego odrzucania przeszczepionej nerki allogenicznej. Z kolei, wyższe surowicze stężenie IL-4 w okresie przedtransplantacyjnym może korelować z większą przeżywalnością przeszczepu w trzymiesięcznym okresie potransplantacyjnym.
3. Różne stany dysfunkcji przeszczepionej nerki allogenicznej, pochodzącej od osoby zmarłej, charakteryzują odrębne profile cytokin w surowicy krwi. Pacjenci ze zdiagnozowanym procesem ostrego odrzucania przeszczepu posiadają mieszany profil cytokin, z podwyższonym poziomem IFN- γ i IL-10, w porównaniu do grupy pacjentów ze stabilną funkcją przeszczepionego narządu w okresie ≥ 5 lat. Grupę pacjentów z przewlekłym odrzucaniem nerki charakteryzuje podwyższony poziom cytokin typu Th2 (IL-4, IL-6, IL-10) oraz obniżony poziom IFN- γ w stosunku do pacjentów ze stabilną funkcją przeszczepu i zdiagnozowanym ostrym odrzuceniem nerki. Z kolei grupę pacjentów ze stabilną funkcją przeszczepionej nerki w okresie ≥ 5 lat charakteryzuje podwyższony poziom IFN- γ w surowicy.
4. Cytometryczna analiza stężeń wybranych cytokin Th1/Th2 w surowicy i moczu pacjentów poddanych przeszczepieniu nerki allogenicznej jest przydatną klinicznie metodą monitorowania immunologicznego w procesach ostrego i przewlekłego odrzucania narządu.

6. Piśmiennictwo

- [1] Stefoni S, Campieri C, Donati G, Orlandi V. The history of clinical renal transplant. *Journal of Nephrology*. 2004;17:475-8.
- [2] Mancuso DW. *Progress in kidney transplantation*. 1 ed. New York: Nova Science Publishers, Inc.; 2006.
- [3] Thomson AW. *Therapeutic immunosuppression. Immunology and medicine*. 1 ed: Springer; 2001.
- [4] Murray JE, Tilney NL, Wilson RE. Renal transplantation: a twenty-five year experience. *Annals of Surgery*. 1976;184:565-73.
- [5] Ting A, Morris PJ. Powerful effect of HL-DR matching on survival of cadaveric renal allografts. *Lancet*. 1980;2:282-5.
- [6] Borel JF, C. F, Gubler HU, Stähelin H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents and Actions*. 1976;6:468-75.
- [7] "Poltransplant" CO-KdT. *Biuletyn Informacyjny*. 2010.
- [8] Wu O, Levy A, Briggs A, Lewis G, Jardine A. Acute rejection and chronic nephropathy: a systemic review of the literature. *Transplantation*. 2009;87:1330-9.
- [9] Briganti EM, Graeme RR, Russ GR, McNail JJ, Atkins RC, Chadban SJ. Risk of renal allograft loss from recurrent glomerulonephritis. *New England Journal of Medicine*. 2002;347:103-9.
- [10] Colvin RB. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nature Review Immunology*. 2005;5:807-17.
- [11] Racusen KS. *Kidney transplant rejection: diagnosis & treatment*. 3d edition ed: Informa Healthcare; 1998.
- [12] Heeger PS. T-cell allorecognition and transplant rejection: a summary and update. *American Journal of Transplantation*. 2003;3:525-33.
- [13] Burrow SR, Silins SL, Khanna R, Burrows JM, Rischmueller M, McCluskey J, et al. Cross-reactive memory T cells for Epstein-Barr virus augment the alloresponse to common human leukocyte antigens: degenerate recognition of major histocompatibility complex-bound peptide by T cells and its role in alloreactivity. *European Journal of Immunology*. 1997;27:1726-36.
- [14] Christopher K, Mueller TF, Ma C, Liang Y, Perkins DL. Analysis of the innate and adaptive phases of allograft rejection by cluster analysis of transcriptional profiles. *Journal of Immunology*. 2002;169:522-30.
- [15] He H, Stone JR, Perkins DL. Analysis of robust innate immune response after transplantation in the absence of adaptive immunity. *Transplantation*. 2002;73:853-61.

- [16] He H, Stone JR, Perkins DL. Analysis of differential immune responses induced by innate and adaptive immunity following transplantation. *Immunology*. 2003;109:185-96.
- [17] LaRosa DF, Rahman AH, Turka LA. The innate immune system in allograft rejection and tolerance. *Journal of Immunology*. 2007;178:7503-9.
- [18] Bassadona GP, Matas AJ, Gillingham KJ, Payne WD, Dunn DL, Sutherland DER, et al. Early versus late acute renal allograft rejection: impact on chronic rejection. *Transplantation*. 1993;55:993-5.
- [19] Tejani A, Cortes L, Stablein D. Clinical correlates of chronic rejection in pediatric renal transplantation: A report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study 1. *Transplantation*. 1996;61:1054-8.
- [20] Leggat JEJ, Ojo AO, Leichtman AB, Alan B, Port FK, Wolfe RA, et al. Long term renal allograft survival: prognostic implication of the timing of AR episodes. *Transplantation*. 1997;63:1268-72.
- [21] Poduval RD, Kadambi PV, Josephson MA, Cohn RA, Harland RC, Javaid B, et al. Implications of immunohistochemical detection of C4d along peritubular capillaries in late acute allograft rejection. *Transplantation*. 2005;79:228-35.
- [22] Mauiyyedi S, Crespo M, Collins AB, Schneeberger E, Pascual MA, Saidman SL, et al. Acute humoral rejection in kidney transplantation: II. Morphology, immunopathology and pathologic classification. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2002;13:779-87.
- [23] Matas AJ. Acute rejection is a major risk factor for chronic rejection. *Transplantation Proceedings*. 1998;30:1766-8.
- [24] Joseph JT, Kingsmore DB, Junor BJR. The impact of late acute rejection after cadaveric kidney transplantation. *Clinical Transplantation*. 2001;15:221-7.
- [25] Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *New England Journal of Medicine*. 2003;349:2326-33.
- [26] Poggio ED, Clemente M, Riley J, Roddy M, Greenspan NS, DeJelo C, et al. Alloreactivity in renal transplant recipients with and without chronic allograft nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2004;15:1952-60.
- [27] Seron D, Moreso F, Fulladosa X, Huesco M, Carrera M, Grinyo JM. Reliability of chronic allograft nephropathy diagnosis in sequential protocol biopsies. *Kidney International*. 2002;61:727-33.
- [28] Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman R. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities, and secreted proteins. *Journal of Immunology*. 1986;136:2348-57.
- [29] Romagnani P. Human Th1 and Th2 subsets: doubt no more. *Immunology Today*. 1991;12:256-7.
- [30] Balkwill F. The cytokine network. In: Hames BD, Glover DM, editors. *Frontiers in molecular biology*. 1st ed. New York: Oxford University Press Inc.; 2000.

- [31] Wilkes DS, Burlingham WJ. Immunobiology of organ transplantation. 1st ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2004.
- [32] Annunziato F, Galli G, Cosmi L, Romagnani P, Manetti R, Maggi E, et al. Molecules associated with human Th1 or Th2 cells. *European Cytokine Network*. 1998;9:12-6.
- [33] Swain SL, Bradley LM, Croft M, Tonkonagy S, Atkins G, Weinberg AD, et al. Helper T-cell subsets: phenotype, function and the role of lymphokines in regulating their development. *Immunological Reviews*. 1991;123:115-44.
- [34] Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature Immunology*. 1996;383:787-93.
- [35] Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nature Reviews Immunology*. 2002;2.
- [36] Dallman MJ. Cytokines as mediators of organ graft rejection and tolerance. *Current Opinion in Immunology*. 1993;5:788-93.
- [37] Dallman MJ. Cytokines and transplantation: Th1/Th2 regulation of the immune response to solid organ transplantation in the adult. *Current Opinion in Immunology*. 1995;7:632-8.
- [38] Lowry RP, Takeuchi T. The Th1, Th2 paradigm and transplantation tolerance in medical intelligence unit. Austin, Texas, USA: RG Landes Company; 1994.
- [39] Sayegh MH, Akalin E, Hancock WW, Russell ME, Carpenter CB, Linsey PS, et al. CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. *Journal of Experimental Medicine*. 1995;181:1869-74.
- [40] Sadeghi M, Daniel V, Naujokat C, Mehrabi A, Zeier M, Opelz G. Evidence for IFN-gamma up- and IL-4 downregulation late post-transplant in patients with good kidney graft outcome. *Clinical Transplantation*. 2007;21:449-59.
- [41] Sadeghi M, Daniel V, Weimar W, Hergesell O, Opelz G. Pre-transplant Th1 and post-transplant Th2 cytokine patterns are associated with early acute rejection in renal transplant recipients. *Clinical Transplantation*. 2003;17:151-7.
- [42] Malek TR, Bayer AL. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nature Reviews Immunology*. 2004;4:665-74.
- [43] Amirzargar A, Lessanpezeshki M, Fathi A, Amirzargar M, Khosravi F, Ansari-pour B, et al. Th1/Th2 cytokine analysis in Iranian renal transplants recipients. *Transplantation Proceedings*. 2005;37:2985-7.
- [44] Jimenez R, Ramirez R, Carracedo J, Agüera M, Navarro D, Santamaria R, et al. Cytometric bead array (CBA) for the measurement of cytokines in urine and plasma of patients undergoing renal rejection. *Cytokine*. 2005;32:45-50.
- [45] Fitzgerald JT, J.R. J, Perez RV. Pretransplant elevations of interleukin-12 and interleukin-10 are associated with acute rejection after renal transplantation. *Clinical Transplantation*. 2004;18:434-9.
- [46] Strom TB, Roy-Chaudhury P, Manfro R, Xheng XX, Nickerson PW, Wood KJ, et al. The Th1/Th2 paradigm and the allograft response. *Current Opinion in Immunology*. 1996;8:688-93.

- [47] Chen Y, Wood KJ. Interleukin-23 and Th17 cells in transplantation immunity: does 23 + 17 equal rejection? *Transplantation*. 2007;84:1071-4.
- [48] Yong Z, Chang L, Mei YM, Yi L. Role and mechanisms of CD4+CD25+ regulatory T cells in the induction and maintenance of transplantation tolerance. *Transplant Immunology*. 2007;17:120-9.
- [49] Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133:775-87.
- [50] Suzuki M, Konya C, Goronzy JJ, Weyand CM. Inhibitory CD8+ T cells in autoimmune disease. *Human Immunology*. 2008;69:781-9.
- [51] DeJaco C, Duftner C, Grubeck-Loebenstien B, Schirmer M. Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Immunology*. 2006;117:289-300.
- [52] Curiel TJ. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *Journal of Clinical Investigation*. 2007;117:1167-74.
- [53] Wang R. CD8+ regulatory T cells, their suppressive mechanisms, and regulation in cancer. *Human Immunology*. 2008;69:811-4.
- [54] Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature*. 1953;172:603-6.
- [55] Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Quantitative studies on tissue transplantation immunity. III. Actively acquired tolerance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 1956;239:357-414.
- [56] Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annual Review of Immunology*. 2012;30:531-64.
- [57] Newell KA, Phippard D, Turka LA. Regulatory cells and cell signature in clinical transplantation tolerance. *Current Opinion in Immunology*. 2011;23:655-9.
- [58] Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature Reviews Immunology*. 2010;10:490-500.
- [59] Minton K. Regulatory T cells: A question of stability and commitment. *Nature Reviews Immunology*. 2012;12:149.
- [60] Wan YY, Flavell RA. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated FOXP3 expression. *Nature*. 2007;445:766-70.
- [61] Marson A, Kretschmer K, Frampton GM, Jacobsen ES, Polansky JK, MacIsaac KD, et al. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature*. 2007;445:931-5.
- [62] Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A, Chu TT, Gavin MA, Rudensky AY. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature*. 2007;445:936-40.
- [63] Lal G, Bromberg JS. Epigenetic mechanisms of regulation of FOXP3 expression. *Blood*. 2009;114:3727-35.

- [64] Von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nature Immunology*. 2005;6:338-44.
- [65] Shevach EM, DiPaolo RA, Andersson J, Zhao DM, Stephens GL, Thornton AM. The lifestyle of naturally occurring CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Immunological Reviews*. 2006;212:60-73.
- [66] Tang Q, Bluestone JA. The FOXP3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nature Immunology*. 2008;9:239-44.
- [67] Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *International Immunology*. 1998;10:1969-80.
- [68] Long E, Wood KJ. Understanding FOXP3: Progress towards achieving transplantation tolerance. *Transplantation*. 2007;84:459-61.
- [69] Francis RS, Feng G, Tha-In T, Lyons IS, Wood KJ, Bushell A. Induction of transplantation tolerance converts potential effector T cells into graft-protective regulatory T cells. *European Journal of Immunology*. 2011;41:726-38.
- [70] Shan J, Guo Y, Luo L, Lu J, Li C, Zhang C, et al. Do CD4+ Foxp3+ Treg cells correlate with transplant outcomes: a systematic review on recipients of solid organ transplantation. *Cellular Immunology*. 2011;270:5-12.
- [71] Issa F, Chandrasekharan D, Wood K. Regulatory T cells as modulators of chronic allograft dysfunction. *Current Opinion in Immunology*. 2011;23:648-54.
- [72] Dadhania D, Muthukumar T, Naqvi R, Snopkowski C, Ding R, Sharma V, et al. Foxp3+ regulatory cells in urine: A biomarker of renal allograft rejection outcome. *Human Immunology*. 2005;66.
- [73] Neujahr DC, Cardona AC, Ulukpo O, Rigby M, Pelaez A, Ramirez A, et al. Dynamics of human regulatory T cells in lung lavages of lung transplant recipients. *Transplantation*. 2009;88:521-7.
- [74] Baan CC, Dijke IE, Weimar W. Regulatory T cells in alloreactivity after clinical heart transplantation. *Current Opinion in Immunology*. 2009;14:577-82.
- [75] Louis S, Braudeau C, Giral M, Dupont A, Moizant F, Robillard N, et al. Contrasting CD25hiCD4+ T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation*. 2006;81:398-407.
- [76] Iwase H, Kobayashi T, Kodera Y, Miwa Y, Kuzuya T, Iwasaki K, et al. Clinical significance of regulatory T-cell-related gene expression in peripheral blood after renal transplantation. *Transplantation*. 2011;91:191-8.
- [77] Li Y, Koshiba T, Yoshizawa A, Yonekawa Y, Masuda K, Ito A, et al. Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *American Journal of Transplantation*. 2004;4:2118-25.
- [78] Li Y, Zhao X, Cheng D, Haga H, Tsuruyama T, Wood K, et al. The presence of Foxp3 expressing T cells within grafts of tolerant human liver transplant recipients. *Transplantation*. 2008;86:1837-43.

- [79] Wood K. Regulatory T cells in transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2011;43:2135-6.
- [80] Kapp JA, P.R. B. CD8+ suppressor T cells resurrected. *Human Immunology*. 2008;69:715-20.
- [81] Liu Z, Tugulea S, Cortesini R, Suci-Foca N. Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells. *International Immunology*. 1998;10:775-83.
- [82] Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, Yuan J, Colovai AI, Piazza F, et al. Tolerization of dendritic cells by T(s) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nature Immunology*. 2002;3:237-43.
- [83] Colovai AI, Ciubotariu R, Liu Z, Cortesini R, Suci-Foca N. DCD8+CD28- T suppressor cells represent a distinct subset in a heterogenous population. *Transplantation Proceedings*. 2001;33:104-7.
- [84] Scotto L, Naiyer AJ, S. G, P. R, Manavalan JS, Kim-Schulze S, et al. Overlap between molecular markers expressed by naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells and antigen specific CD4+CD25+ and CD8+CD28- T suppressor cells. *Human Immunology*. 2004;65:1297-306.
- [85] Manavalan JS, Kim-Schulze S, Scotto L, Naiyer AJ, Vlad G, Colombo PC, et al. Alloantigen specific CD8+CD28-FOXP3+ T suppressor cells induce ILT3+ILT4+ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *International Immunology*. 2004;16:1055-68.
- [86] Dijke IE, Weimar W, Baan CC. The control of anti-donor immune responses by regulatory T cells in organ transplant patients. *Transplantation Proceedings*. 2008;40:1249-52.
- [87] Zhou H, Wang ZD, Zhu X, You Y, Zou P. CD8+Foxp3+ T cells from renal transplant recipients in quiescence induce immunoglobulin-like transcripts-3 and -4 on dendritic cells from their respective donors. *Transplantation Proceedings*. 2007;39:3065-7.
- [88] Ciubotariu R, Vasilescu R, Ho E, Cinti P, Cancedda C, Poli L, et al. Detection of T suppressor cells in patients with organ allograft. *Human Immunology*. 2001;62:15-20.
- [89] Honjo K, Xu XY, Kapp JA, Bucy RP. Activation and migration of allo-peptide specific TCR transgenic T cells in cardiac allograft rejection. *Cellular Immunology*. 2004;230:44-55.
- [90] Mengel M, Chapman JR, Cosio FG, Cavaille-Coll MW, Haller H, Halloran PF, et al. Protocol biopsies in renal transplantation: insights into patient management and pathogenesis. *American Journal of Transplantation*. 2007;7:512-7.
- [91] Sharma VK, Ding R, Li B, Bologna RM, Lagman M, Eduafo A, et al. Molecular correlates of human renal allograft rejection. *Transplantation Proceedings*. 1998;30:2364-6.
- [92] Carstens J, Øzbay A, Tørring C, Hansen HE. Intragraft mRNA cytotoxic molecule expression in renal allograft recipients. *Transplant Immunology*. 2009;20:212-7.

- [93] Nocera T, Tagliamacco A, De Palma R, Del Galdo F, Reffante A, Fontana I, et al. Cytokine mRNA expression in chronically rejected human renal allografts. *Clinical Transplantation*. 2004;18:564-70.
- [94] Hribova P, Kotsch K, Brabcova I, Vitko S, Volk HD, Lacha J. Cytokines and chemokine gene expression in human kidney transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2005;37:760-3.
- [95] Simon T, Opelz G, Wiesel M, Ott RC, Susal C. Serial peripheral blood perforin and granzyme B gene expression measurements for prediction of acute rejection in kidney graft recipients. *American Journal of Transplantation*. 2003;3:1121-7.
- [96] Gwinner W. Renal transplant rejection markers. *World Journal of Urology*. 2007;25:445-55.
- [97] Hendriks TK, van Gurp EAFJ, Mol WM, Schoordijk W, Sewgobind VDKD, IJzermans JNM, et al. End-stage renal failure and regulatory activities of CD4+CD25bright+Foxp3+ T-cells. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2009;24:1969-78.
- [98] Lal G, Yin N, Xu J, Lin M, Schroppel S, Ding Y, et al. Distinct inflammatory signals have physiologically divergent effects on epigenetic regulation of Foxp3 expression and Treg function. *American Journal of Transplantation*. 2011;11:203-14.
- [99] Bacchetta R, Passerini L, Gambineri E, Dai M, Allan SE, Perroni L, et al. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *Journal of Clinical Investigation*. 2006;116:1713-22.
- [100] San Segundo D, Ruiz JC, Fernández-Fresnedo G, Izquierdo M, Gómez-Alamillo C, Cacho E, et al. Calcineurin inhibitors affect circulating regulatory T cells in stable renal transplant recipients. *Transplantation Proceedings*. 2006;38:2391-3.
- [101] Korczak-Kowalska G, Wierzbicki P, Bocian K, Klosowska D, Niemczyk M, Wyzgal J, et al. The Influence of Immunosuppressive Therapy on the Development of CD4+CD25+ T Cells After Renal Transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2007;39:2721-3.
- [102] Liu J, Liu Z, Witkowski P, Vlad G, Manavalan JS, Scotto L, et al. Rat CD8+ FOXP3+ T suppressor cells mediate tolerance to allogeneic heart transplants, inducing PIR-B in APC and rendering the graft invulnerable to rejection. *Transplant Immunology*. 2004;13:239-47.
- [103] Hitchon CA, Alex P, Erdile LB. A distinct multicytokine profile is associated with anti-cyclical citrullinated peptide antibodies in patients with early untreated inflammatory arthritis. *Journal of Rheumatology*. 2004;31:2336-46.
- [104] Brazille P, Dereuddre-Bosquet N, Leport C. Decreases in plasma TNF-alpha level and IFN-gamma mRNA level in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and an increase in IL-2 mRNA level in PBMC are associated with effective high active antiretroviral therapy in HIV-infected patients. *Clinical and Experimental Immunology*. 2003;13:304-11.

- [105] Chan C, Lechler RI, George AJT. Tolerance mechanisms and recent progress. *Transplantation Proceedings*. 2004;36:561S-9S.
- [106] Nathan CF. Secretory products of macrophages. *Journal of Clinical Investigation*. 1987;79:319-26.
- [107] Merville P, Lambert C, Durand I, Pouteil-Noble C, Touraine JL, Berthoux F, et al. High frequency of IL-10 secreting CD4+ graft-infiltrating T lymphocytes in promptly rejected kidney allografts. *Transplantation*. 1995;59:1113-9.
- [108] Lee B, Oh CK, Kim MS, Kim JH, Kim SJ, Kim HS, et al. Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells during acute renal allograft rejection. *Transplantation Proceedings*. 2012;44:236-40.
- [109] Morrissey PE, Reinert S, Yango A, Gautum A, Monaco A, Gohh R. Factors contributing to acute rejection in renal transplantation: the role of noncompliance. *Transplantation Proceedings*. 2005;37:2044-7.
- [110] Ashan N. *Chronic allograft failure: Natural history, pathogenesis, diagnosis and management*. 1st ed. Austin: Landes Bioscience; 2008.
- [111] Loong CC, Chen A, Lui WY, King KL, Lin CY. Expression of cytokines, growth factors and adhesion molecules in rejecting human renal allograft. *Transplantation Proceedings*. 1996;28:1445-6.
- [112] Baan CC, Weimar W. Intragraft cytokine gene expression: implications for clinical transplantation. *Transplant International*. 1998;11:169-80.
- [113] Wood KJ, Sawitzki B. Interferon gamma: a crucial role in the function of induced regulatory T cells in vivo. *Trends in Immunology*. 2006;27:183-7.
- [114] Dallman MJ, Wood KJ, Hamano K, Bushell A, Morris PJ, Wood MJ. Cytokines and peripheral tolerance to alloantigen. *Immunological Reviews*. 1994;133:5-18.