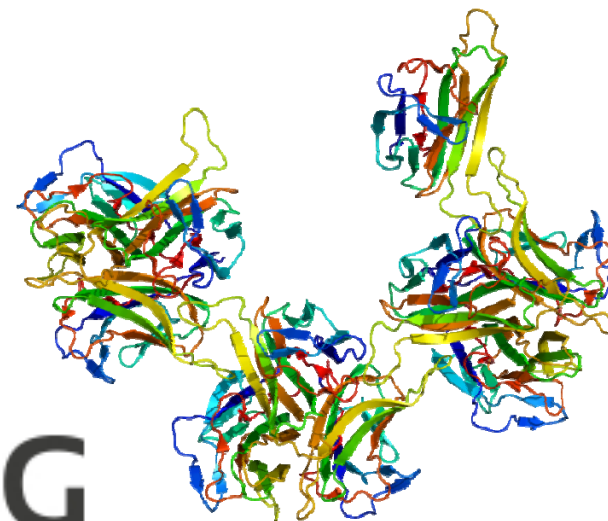


Role BAFF cytokinu v transplantačních reakcích

Mgr. Zuzana Sekerková
RNDr. Alena Sekerková



IKE
M

OIG

PREVEDIG
Laboratorně diagnostické centrum

OKI

Historie transplantací

- 4.-5. století př. n. l. Lékař Sushruta Samhita (Indie) - postupy pro rekonstrukci nosu či ušních boltců - **autotransplantace**
- 19. století – první xenotransplantace ledvin - **transplantační techniky**
- začátek 20. stol. – neúspěšné pokusy o transplantace zvířecích ledvin lidem a 1. pokusy o **alotransplantace** – problém s odhojováním (**rejekcí**) orgánů
- 1960 – Peter Medawar a Thomas Gibson - odhalen **imunologický základ**
- 60. léta - první úspěšné transplantace + transplantace dalších orgánů
- 1970 – **cyklosporin** – první imunosuprese - výrazné zlepšení přežívání

Otázky dneška

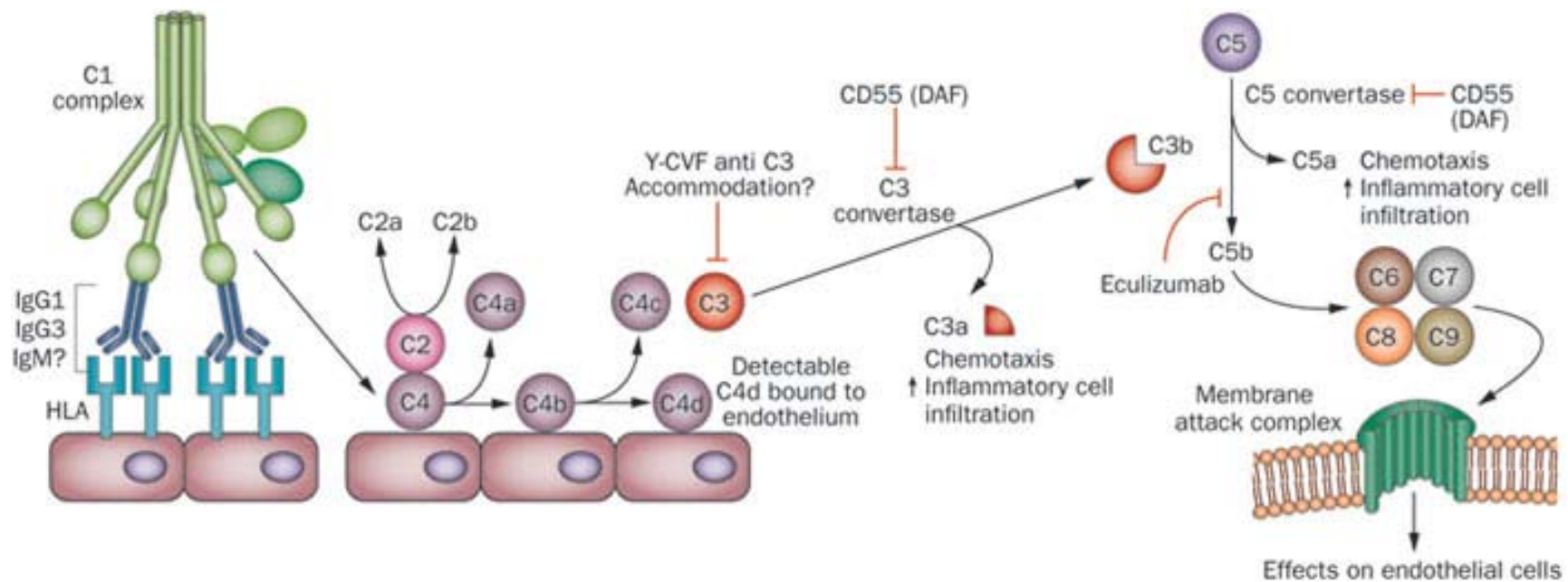
- rozvoj imunosupresiv – jejich vyvážení?
 - způsob odběru a uchování orgánů?
 - rejekce - HLA typizace
 - protilátky proti HLA (DSA) , C4d depozity
 - včasné rozpoznání rejekce a její predikce
- > **nové biomarkery**

Cíle práce

- **BAFF cytokin - marker humorální rejekce (AMR)?**
- **solubilní BAFF (sBAFF)**
 - rozdíl v koncentraci u pacientů s AMR a bez rejekce?
 - porovnání s klinickým průběhem po transplantaci
- **vázané formy BAFF**
 - jaké subpopulace B lymfocytů
 - změny u pacientů s AMR a bez rejekce?
 - porovnání s klinickým průběhem po transplantaci
 - porovnat s vývojem sBAFF
- Zhodnocení rizika vývoje **akutní AMR** u pacientů po **transplantaci ledviny**

B lymfocyty a jejich úloha v rejekci

- B lymfocyty – produkce protilátek, uvolňování prozánětlivých cytokinů a chemokinů, komplement
- AMR - velké riziko pro selhání transplantovaných orgánů -> hledání nových možností

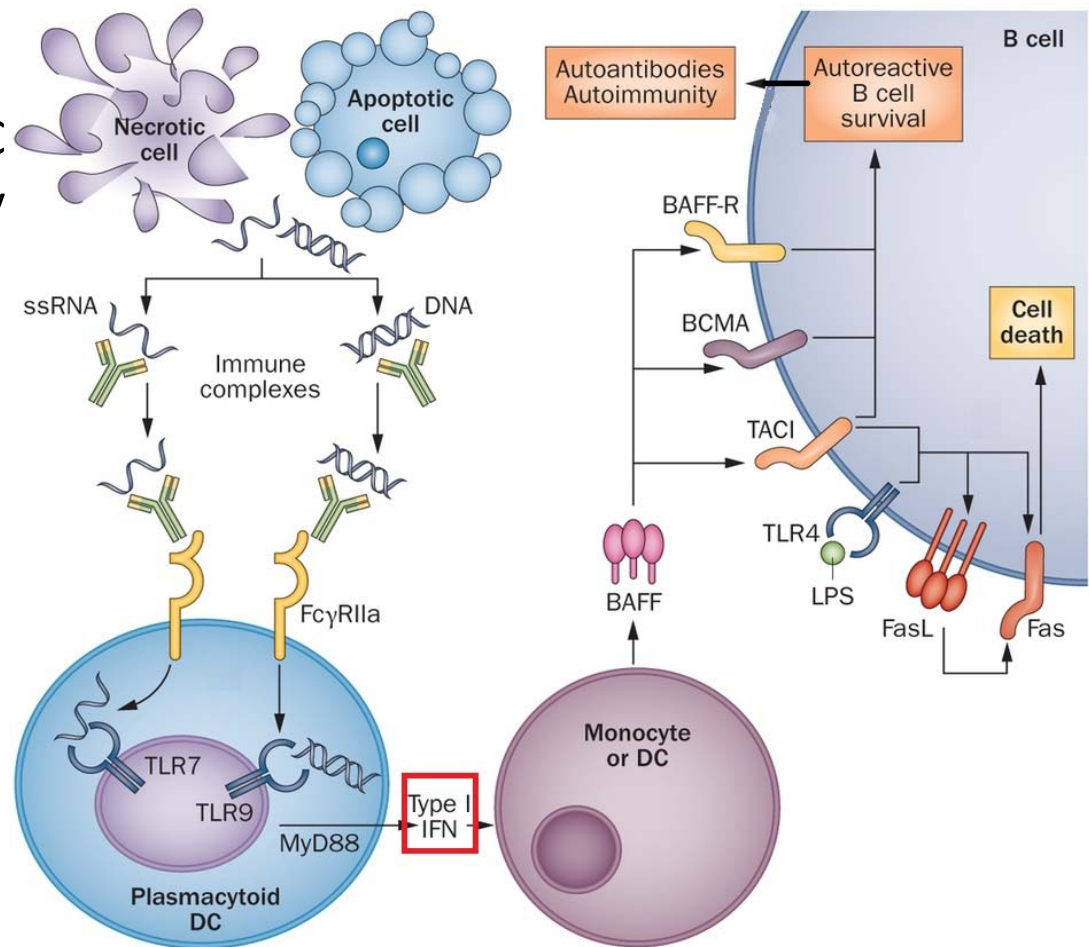


(After Stegall, MD et al., Nat. Rev. Nephrol. 8:670–678,2012)

BAFF (B-buněčný aktivační faktor)

také nazýván CD257, BlyS, Tall-1, TNF-4, THANK, TNSF 13b

- člen TNF superrodiny
- Producenti: monocyty, DC makrofágy, žírné b., eozinofily a astrocyty
- INF gamma, IL10, CD40L
- aktivace přes TLR receptory
- přežití B a T lymfocytů
- TACI, BAFF-R a BCMA
- NF- κ B signalizační dráha
- udržuje normální imunitu



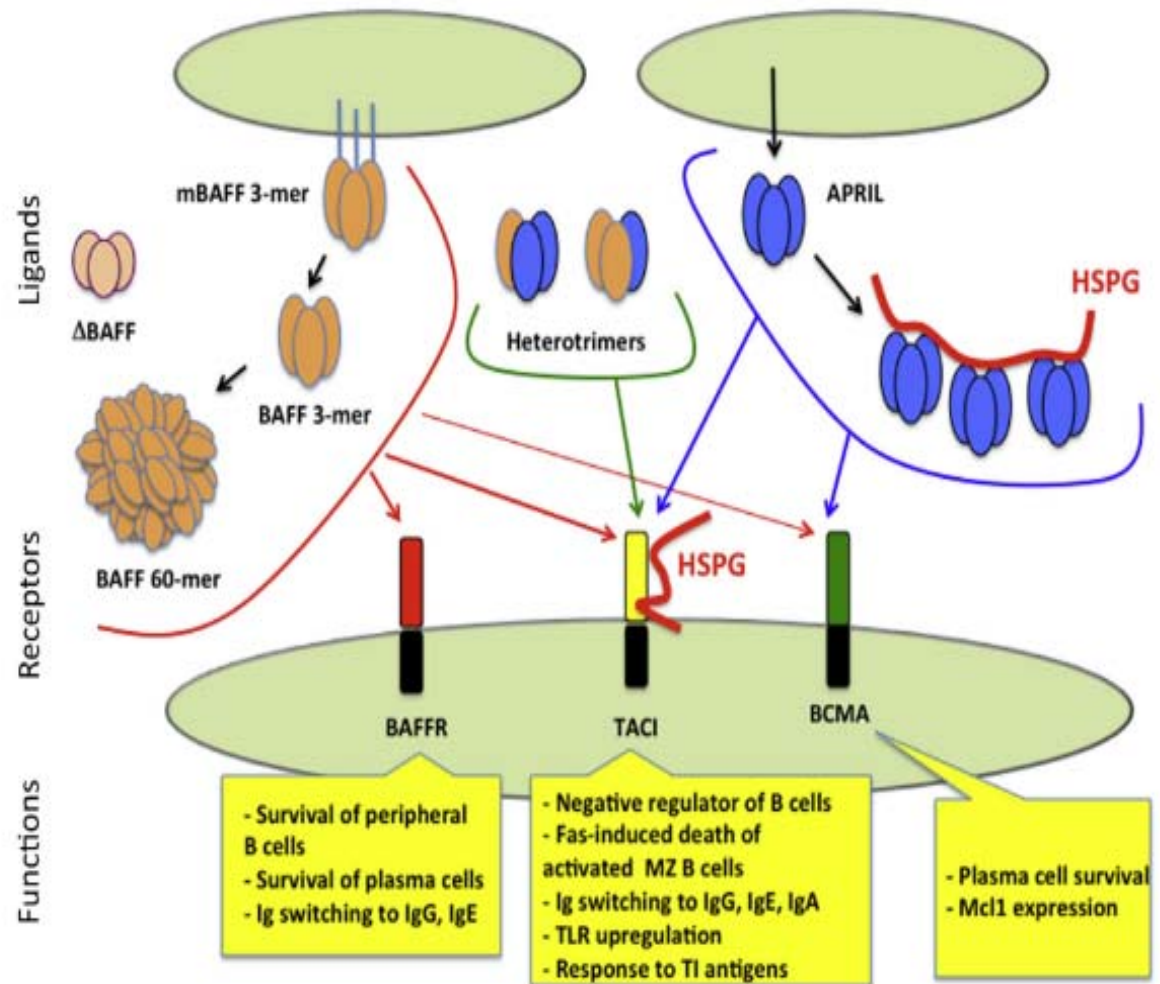
(<http://www.nature.com/nrrheum/journal/v10/n6/images/nrrheum.2014.33-f3.jpg>)

BAFF

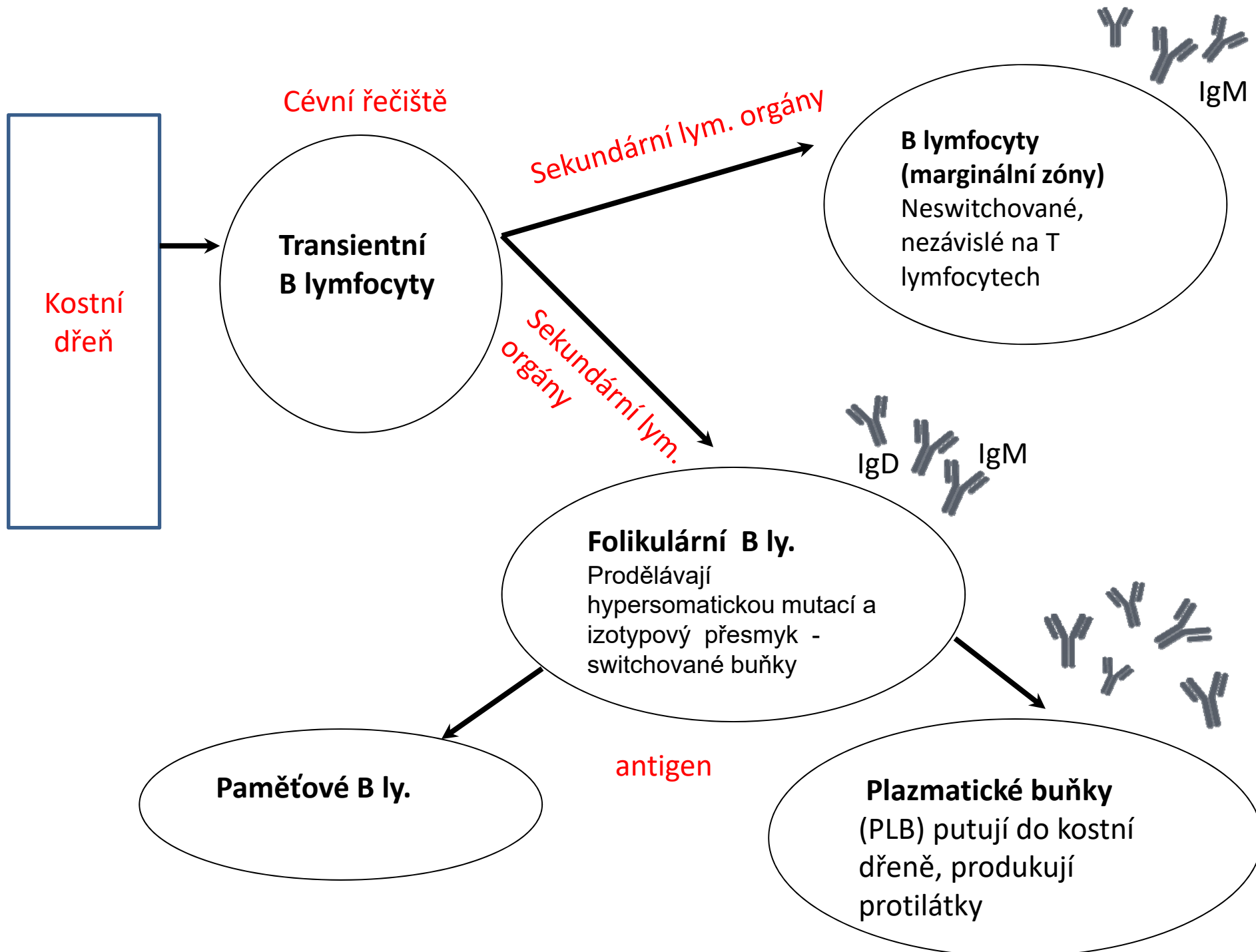
- ligand vázaný na membránu
- uvolňován jako sBAFF
- homotrimery
- 60-mery - vazba na receptory (v kyselém pH rozpad)

APRIL

- sdílí s BAFF receptory TACI a BCMA
- silná vazba na BCMA, slabě na TACI (u BAFF obráceně)
- BAFF-R – váže pouze BAFF



Převzato z *Molecular Biology of B cells*, Frederick. W. Alt. et al, 2015)



Exprese receptorů pro BAFF na B lymfocytech

Receptor BAFF-R

- dominantní receptor **maturovaných B ly.**
- > základ pro přežití a maturaci B ly. -> **pozitivní regulace**

(Ng et al, 2004, Cancro, 2004)

- není – na prekurzorech B ly. v kostní dřeni

(Batten et al., 2000)

- zvýšená exprese na aktivovaných T ly.
- > k produkci T_H1 cytokinového spektra CD4 T ly.

(Ng et al., 2004)

Exprese receptorů pro BAFF na B lymfocytech

Receptor TACI

- podporuje **přesmyk imunoglobulínů** (IgG, IgA, IgE)
- snižování počtu B ly. – směřování do **apoptózy**
(Seshasayee et al., 2003)
- zvyšuje expresi Fas a FasL na povrchu LPS aktivovaných buněk marginální zóny
(Figget et al., 2013)
- zvýšená exrese na B ly.-aktivovaných přes TLR -> aktivace B ly. marginální zony
(Groom et al., 2007, Katsenelson et al., 2007)
- na paměťových buňkách
(Darce et al., 2007)
- přežití makrofágů
(Chang et al., 2006)

Exprese receptorů pro BAFF na B lymfocytech

- **Receptor BCMA**
- vysoce exprimován na **prekurzorových B ly. v kostní dřeni** -> podpora dlouhého přežití

(Mackay et al., 2003. Zhang et al., 2005, O'Conor et al., 2004)

- není exprimován na slezinných B ly.

(Sadanlick et al., 2008)

- **role v prezentaci antigenu**

(Yang et al., 2005)

BAFF a transplantace

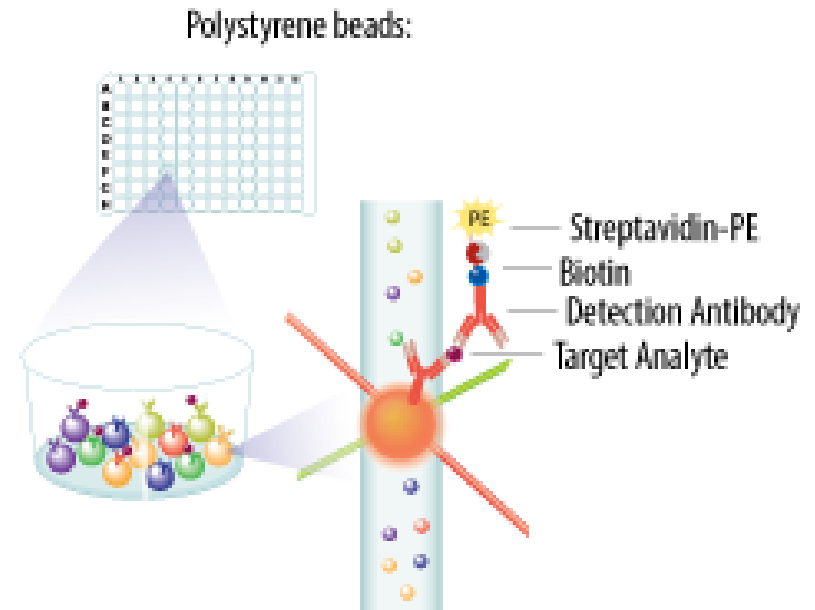
- BAFF - důležitá role v životě B buněk -> víme málo o úloze sBAFF a jeho receptorech při transplantaci a rozvoji AMR
- **mohl by sloužit jako marker AMR?**
- pacienti s anti-HLA protilátkami a vyššími hladinami sBAFF vyšší pravděpodobnost vývoje AMR -> neutralizace sBAFF - zajímavá terapie? (použito u autoimunit – protilátka proti BAFF - belimumab)
(Banham et al., 2013, Thibault-Espitia et al., 2012)
- jiné práce - neprokázaly, že by se hladina sBAFF před transplantací lišila u pacientů s AMR a pacientů bez rejekce
(Snaunoudj et al., 2014)
- neutralizace s BAFF/APRIL - aplikována pro zvýšení účinnosti CD40 / CD154(CD40L) kostimulační blokády a zlepšení přežití štěpu u T buněk senzibilizovaných příjemcům
- Dostatečně účinné?
(Gorbacheva et al., 2015)
- u autoimunitních onemocnění v kombinaci s jinými imunosupresivy
(Lateef et al., 2010, Ginzler et al., 2012)



Experimentální část

Experiment 1 – solubilní BAFF

- retrospektivní studie, 92 pacientů sledovaných v čase, séra z periferní krve
- klinický stav sledován - 7 let
- HLA protilátky a donor-specifických protilátky (DSA)
- pacienti s AMR (n=13) byli vybráni na základě nálezu C4d depozit v peritubulárních kapilárách transplantované ledviny (imunoflorescenční detekce) a detekci pozitivních DSA v sérech pacientů
- rozvoj AMR – 2 týdny až 3 měsíce po Tx
- hladiny sBAFF - Xmap metodika-Luminex



Experimentální část

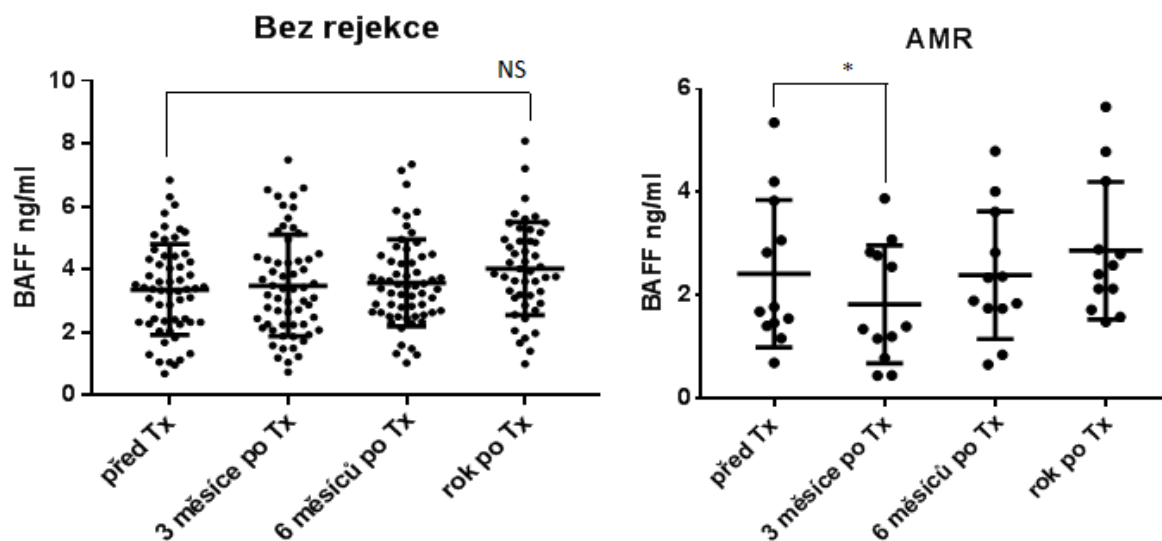
Experiment 2 – membránově vázaný BAFF

- analýza vztahu sBAFF a membránově vázaného BAFF na jednotlivých subpopulacích B ly. u pacientů s AMR a bez rejekce
- 20 pacientů
- periferní krev, zkumavky s EDTA, zpracována (izolace mononukleárních buněk)
- měřena na průtokovém cytometru Cyan ADP 9C
- sBAFF - z plazmy - Luminex

Koncentrace sBAFF ve vztahu k AMR

		Bez rejekce		AMR		P hodnota
sBAFF (ng/ml)	před Tx	3,4±1,4	(0,6-6,8)	2,4±1,3	(0,6-5,3)	NS
	3m po Tx	3,5±1,5	(0,7-7,6)	***1,8±1,1	(0,4-3,8)	<0,001
	6m po Tx	3,6±1,4	(1,4-7,1)	*2,34±1,2	(0,6-4,7)	<0,05
	rok po Tx	4,0±1,5	(1,4-7,2)	*2,8±1,3	(1,4-5,6)	<0,05

Koncentrace sBAFF u pacientů bez rejekce a s AMR, Hodnoceno Mann-Whitneyův testem, *, ***vztaženo ke skupině bez rejekce

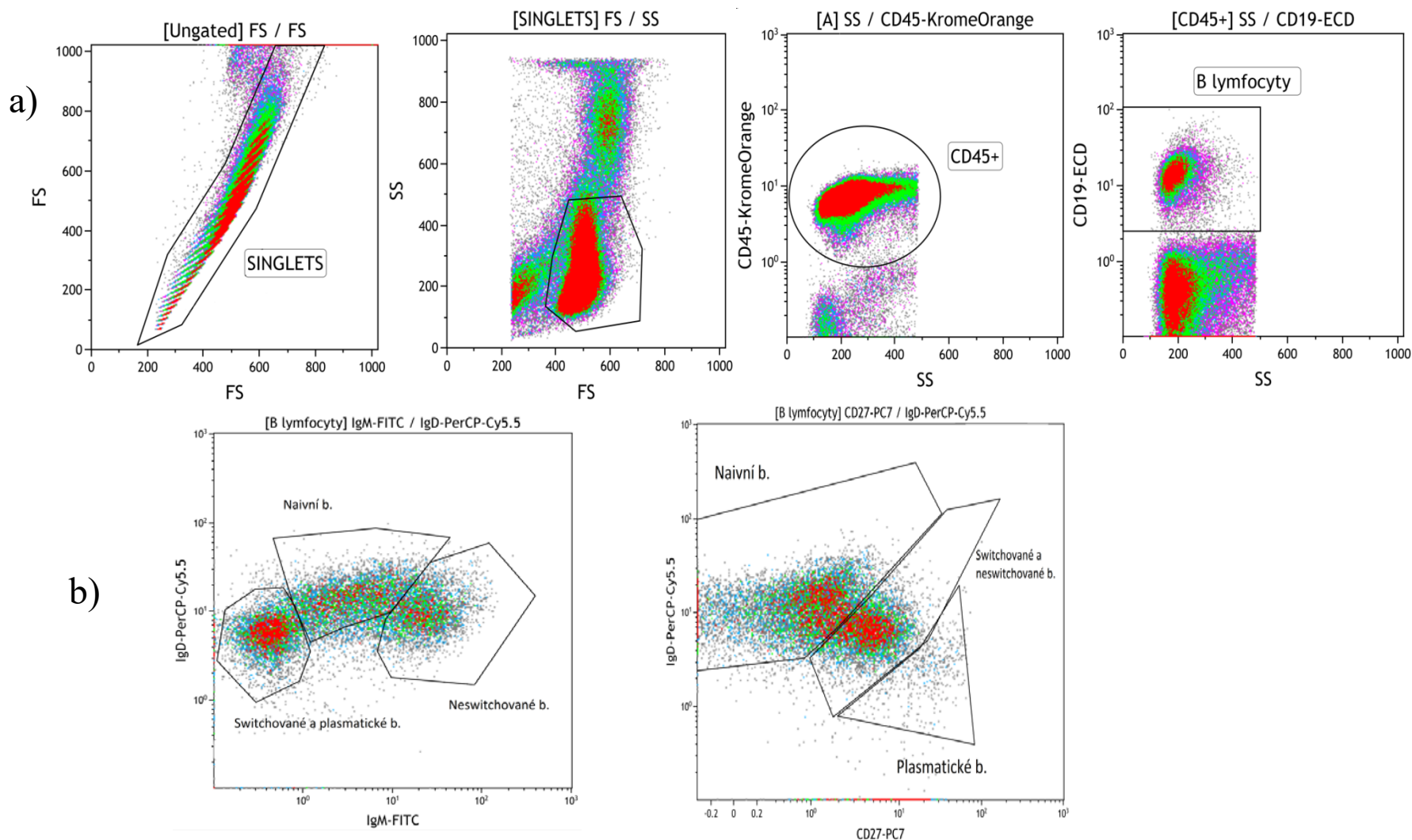


Vývoj koncentrace sBAFF cytokinu v čase u pacientů bez rejekce a s AMR, Hodnoceno Mann-Whitneyovým testem, (* p < 0,05)

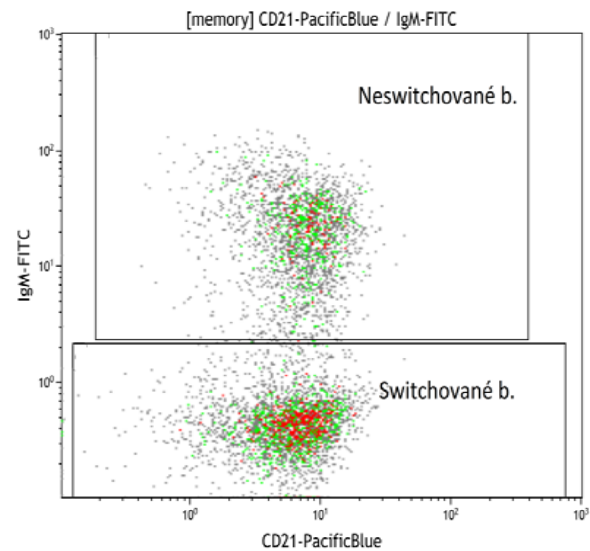
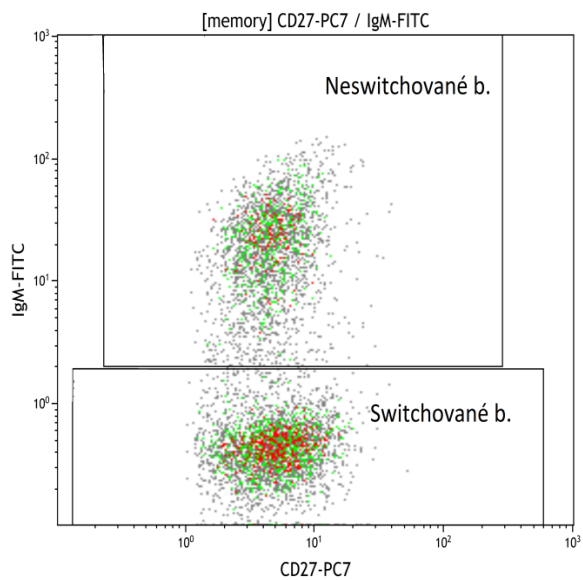
Funkce CD znaků na B lymfocytech

- CD19** Funkce-regulace vývoje, aktivace, diferenciací (v komplexu s CD21,CD81...) Spolu s BCR zvyšuje vnímavost k aktivaci antigenem
Výskyt-na všech Blymfocytech včetně pro-B lymfocytů, snížená exprese po maturaci do plazmatických buněk
- CD21** Funkce-na CD4+ T ly nezávislá aktivace Bly (obrana proti antigenům s repetitivní polysacharidovou strukturou)
Výskyt-hlavně na T2 Bly a Bly marginální zóny (receptor pro C3d složku komplementu)
- CD24** Funkce -neznámá
Výskyt-všechny stádia Bly s výjimkou plazmatických buněk
- CD27** Funkce-patří do rodiny TNF receptorů
Výskyt-plazmatické B lym.
- CD38** Funkce-enzym s mnoha aktivitami
Výskyt-transientní buňky a plazmatické B lym.
- CD257** Funkce-podporuje maturaci, přežití a aktivaci B lymfocytů
Výskyt –B lym.a T lym.

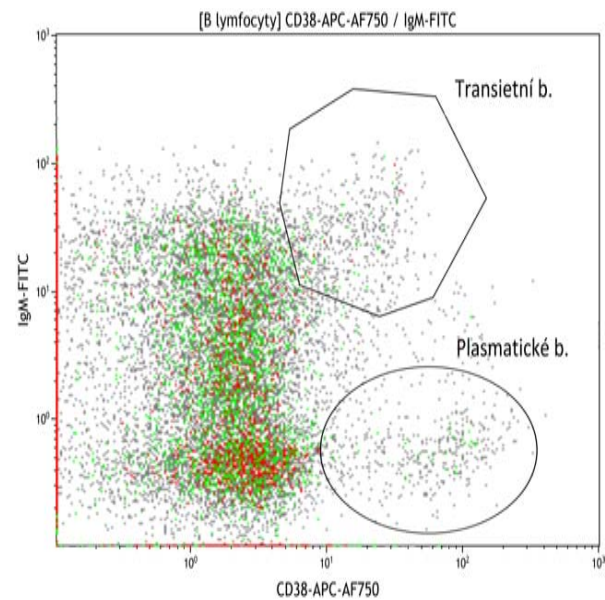
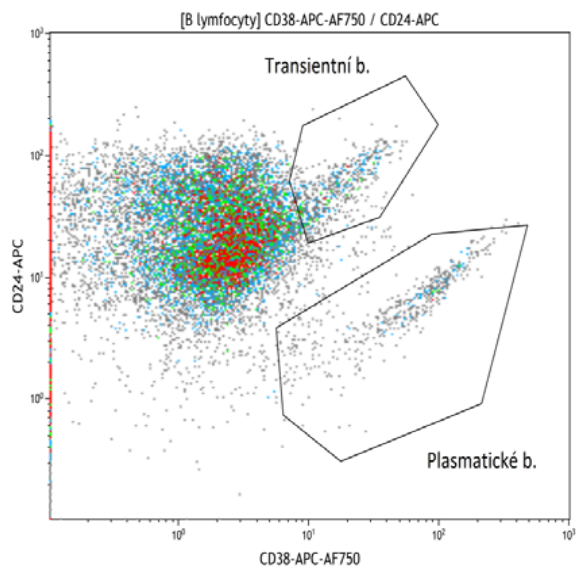
Gatovací strategie pro stanovení lidských periferních B lymfocytů



c)



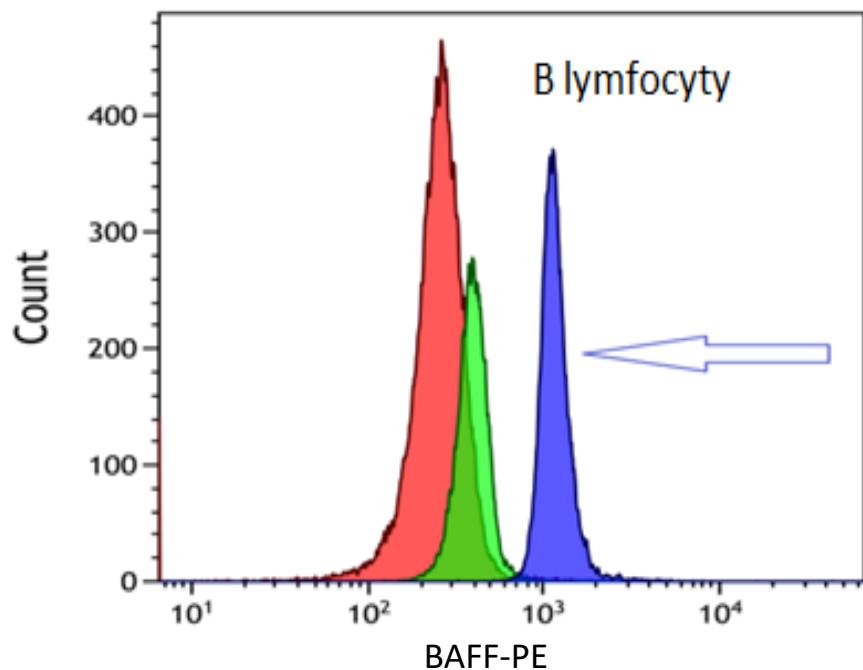
d)



EXPERIMENT 2

- 20 pacientů, 23-70 let
- AMR - 4 pacienti a 2 pacienti - ACR (malý vzorek)
- sledované období - 14 pacientů - bez rejekce
- indukční léčba - ATG (n=9), intravenózní imunoglobuliny (n=3) a jednou plazmaferéza, protilátka proti IL-2 receptoru (n=3) a jednou protilátka proti CD52
- **sBAFF u pacientů s AMR:**
- před transplantací $1,4 \pm 0,4$ ng/ml
- týden po transplantaci *** $0,88 \pm 0,3$** ng/ml
- 3 m po transplantaci $1,77 \pm 0,4$ ng/ml
- **sBAFF - bez rejekce**
- před transplantací $1,45 \pm 0,8$ ng/ml
- týden po transplantaci $1,32 \pm 0,8$ ng/ml a
- 3 m po transplantaci $1,7 \pm 1,6$ ng/ml

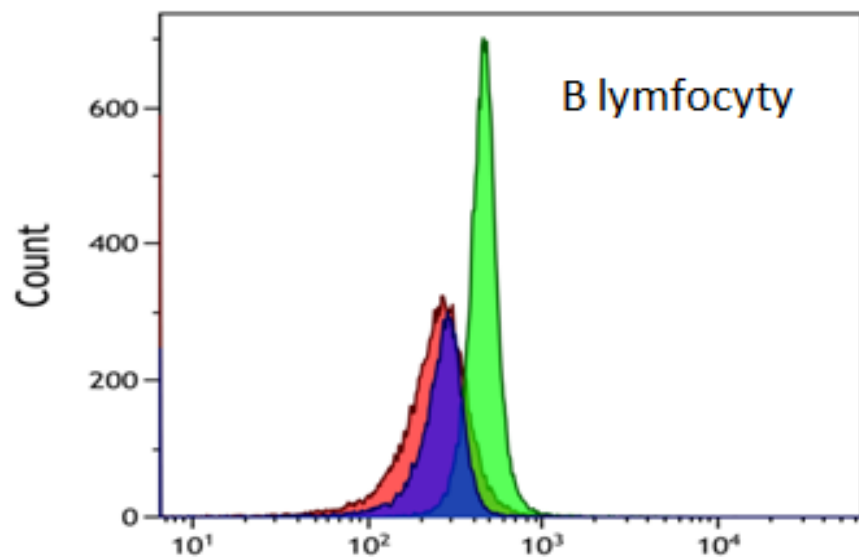
Měření exprese vázaného BAFFu



24.5.2016 doba rejekce
3.3.2016 7 dnů po Tx
25.2.2016 Před Tx

Pacient s AMR

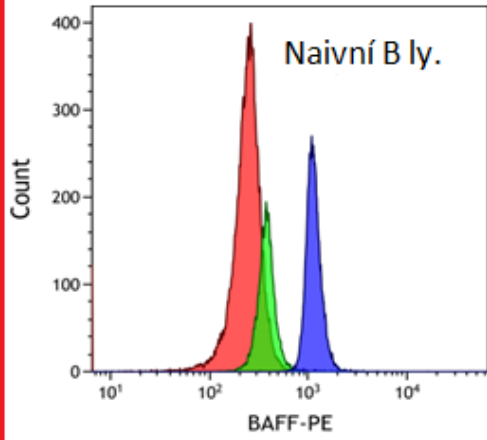
doba rejekce



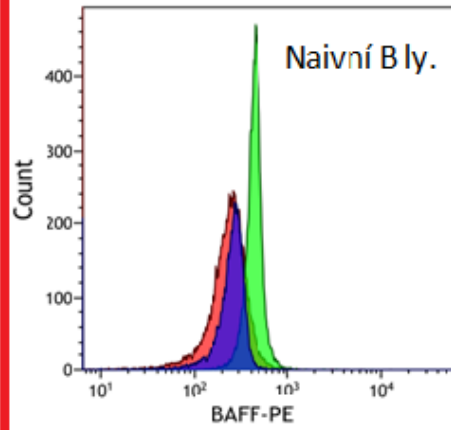
2.6.2016 3 m po Tx
3.3.2016 7 dnů po Tx
25.2.2016 před Tx

Pacient bez rejekce

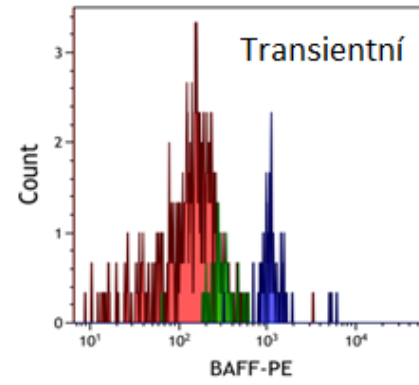
AMR



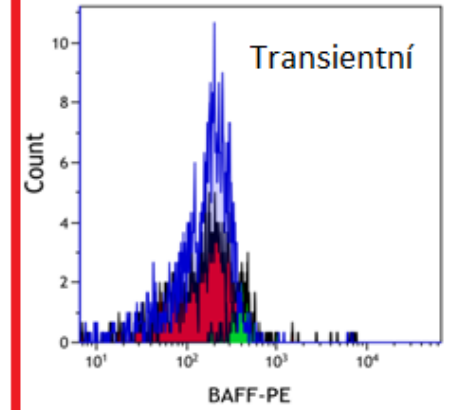
Bez rejeckce



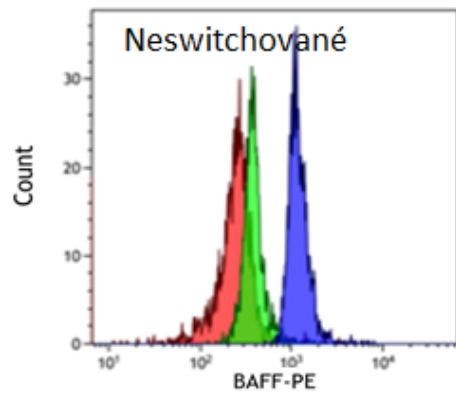
AMR



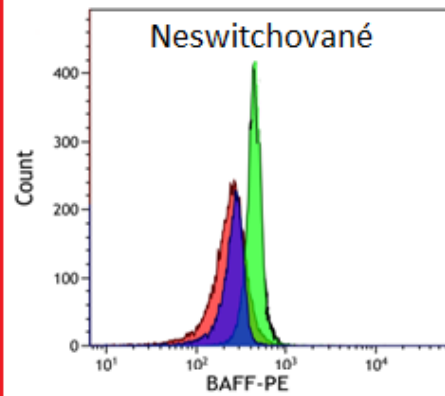
Bez rejeckce



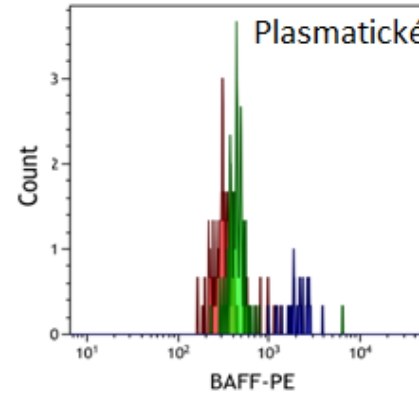
Neswitchované



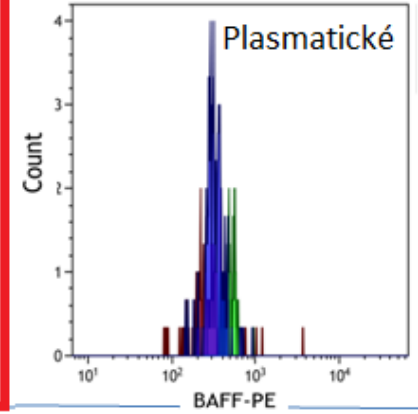
Neswitchované



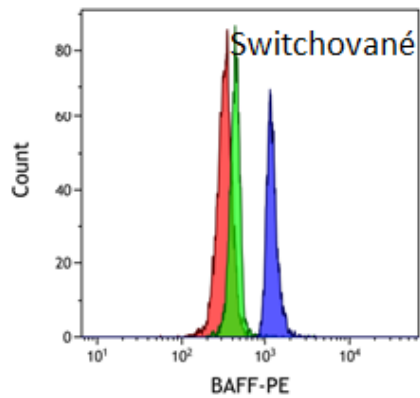
Plasmatické



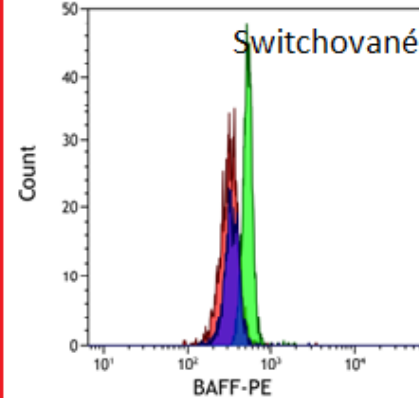
Plasmatické

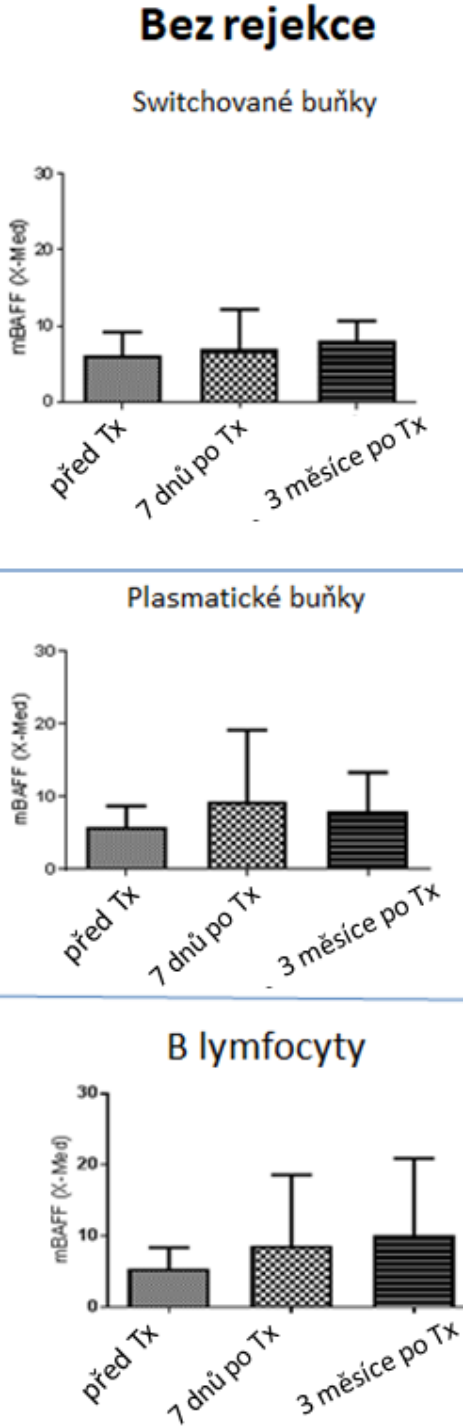
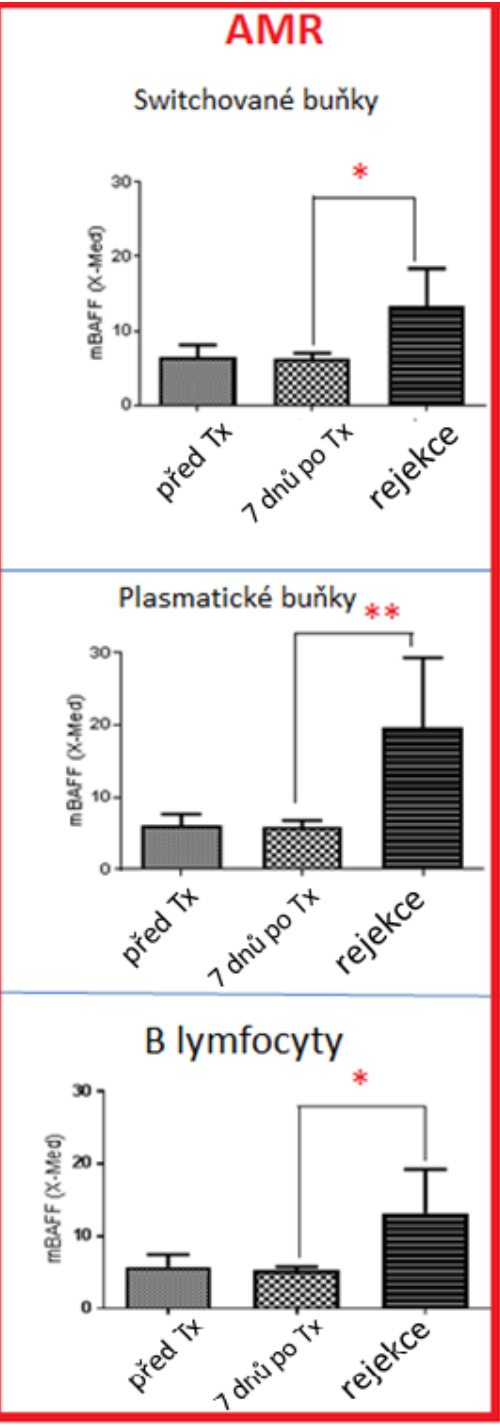
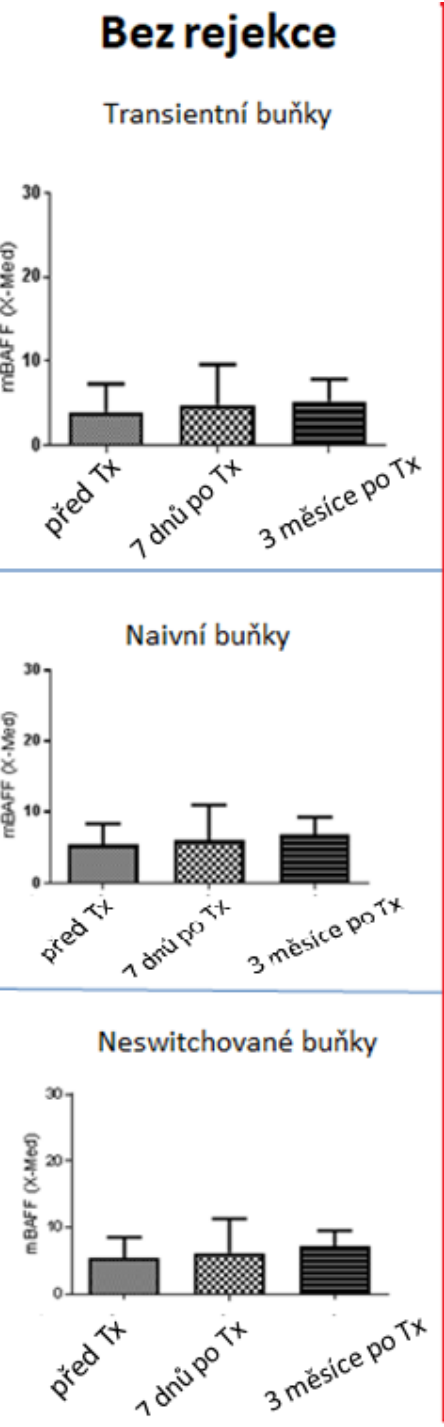
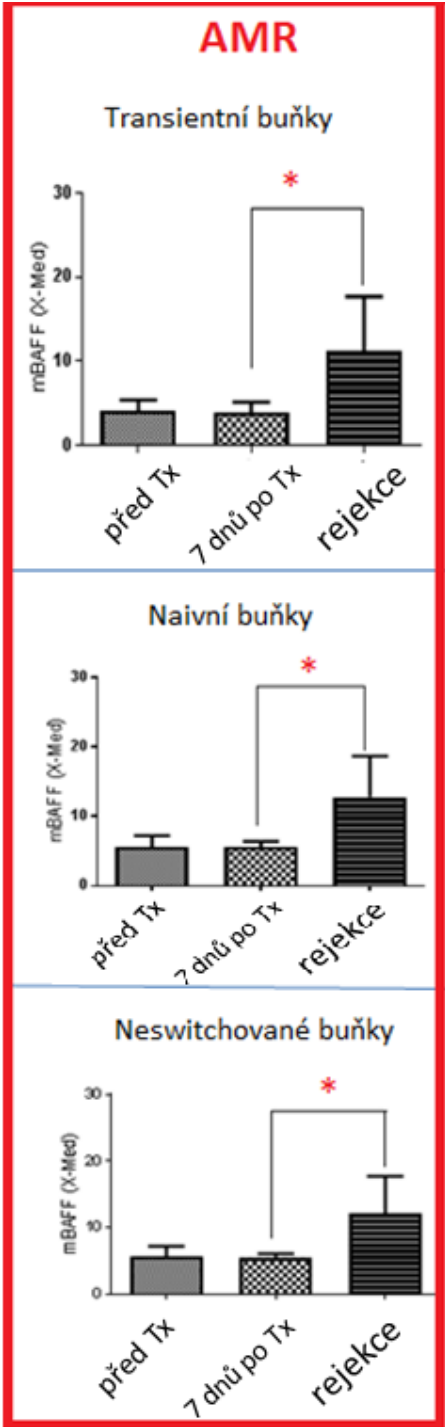


Switchované



Switchované





Závěry

- Hladiny **sBAFF** ani **BAFF vázaného** na B lymfocytech **před transplantací** se **signifikantně nelišily** u pacientů s AMR a bez rejekce.
- Koncentrace **sBAFF** – v době rejekce je **signifikantně nižší** u pacientů s **AMR** ve srovnání s pacienty bez rejekce.
- U pacientů s **AMR** **signifikantně klesla** hladina **sBAFF v průběhu rejekce**. U pacientů bez rejekce nebyl pokles sBAFF v čase zaznamenán.
- U pacientů s **AMR** došlo k **statisticky významnému nárůstu BAFF vázaného** na B lymfocytech v době rejekce. U pacientů bez rejekce nedošlo k žádné změně hladiny BAFF po celé sledované období.
- BAFF** se váže na receptory **na všech populacích B lymfocytů** (nejvíce na plazmatických buňkách).
- BAFF by mohl sloužit jako **marker humorální rejekce** (pokles hladiny sBAFF i nárůst membránově vázaného BAFF na B lymfocytech)

Poděkování

doc. MUDr. Antonij Slavčev, CSc.

Mgr. Markéta Rodová

OIG, IKEM

Mgr. Veronika Švachová

OKI, IKEM



Děkuji za pozornost