



Samenvatting proefschrift Ahmet Demirkiran

***'Dynamics of Regulatory T cells in
Liver Transplantation'***

**Promotie: woensdag 28 november
Erasmus Universiteit Rotterdam**

**Promotor: Prof. dr. H.W. Tilanus
Copromotor: Dr. L.J.W. van der Laan**

Levertransplantatie is de behandeling bij uitstek wanneer het eindstadium van leverziekte is bereikt. Na transplantatie wordt het donor orgaan door het immuun systeem van de ontvanger als niet-eigen herkend en ontstaat er een afstotingsreactie. Ter preventie van afstoting krijgen alle patiënten die een transplantatie ondergaan levenslang afweerdrukkende medicatie (immunosuppressiva) voorgeschreven. Echter, immunosuppressiva onderdrukken de algehele afweer op een niet specifieke manier, waardoor de ontvangers extra gevoelig zijn voor bacteriële, virale en schimmelinfecties en voor het ontwikkelen van kanker. Nierfalen, botontkalking en hart- en vaatziekten behoren tot de meest voorkomende bijwerkingen. In de huidige Rotterdamse patiëntenpopulatie kampt ongeveer tweederde van de patiënten na transplantatie met de bijwerkingen van de toegepaste immunosuppressiva. Na onttrekking van immunosuppressiva aan transplantatie patiënten die al jaren een stabiele transplantaatfunctie hebben, blijkt zich in een deel van de betrokkenen geen afstoting te ontwikkelen. Het is onbekend waarom bij sommige patiënten blijkbaar tolerantie voor het transplantaat optreedt, terwijl bij anderen immunosuppressiva niet onttrokken kunnen worden zonder dat dit tot afstoting leidt. Wel is bekend dat tolerantie vaker optreedt na levertransplantatie in vergelijking met andere organen. Het verminderen of zelfs stoppen van de immunosuppressieve medicatie zou leiden tot een belangrijke reductie van de morbiditeit en daardoor ook mortaliteit na transplantatie. Momenteel is het echter niet mogelijk om te bepalen welke patiënt wel of geen immunosuppressiva hoeft te gebruiken. Onderzoek in diermodellen heeft aangetoond dat regulatie een cruciaal element is voor het bereiken van tolerantie. Aangetoond is dat een speciale subset van witte bloedcellen, genaamd regulatoire T-cellen, een belangrijke rol spelen bij transplantaat tolerantie. Deze regulatoire cellen



zijn in staat om de functies van reactieve T-cellen, die de afstotingsreactie in gang zetten, te remmen.

Het eerste gedeelte van dit proefschrift (Part I) omvat een korte introductie, het doel en de opzet van dit proefschrift (hoofdstuk 1). In hoofdstuk 2 is er een literatuuroverzicht beschreven over de effecten van afweerderdrukkende medicatie (immunosuppressiva) op regulatoire T-cellen in klinische orgaan transplantatie. De rol van deze regulatoire T-cellen in het induceren en in stand houden van transplantaat tolerantie in experimentele diermodellen heeft vele onderzoekers gestimuleerd om onderzoek te doen op dit gebied. Een van de belangrijkste werkingsmechanismen van de huidige immunosuppressiva is het remmen van reactieve T-cellen, die onder andere betrokken zijn bij de afstotingsreactie, te remmen. Als onderdeel van de helper T-cel populatie is het dus mogelijk dat immunosuppressiva ook een remmend effect hebben op regulatoire T-cellen, en dit zou kunnen resulteren in een ongewenste remming van transplantaat tolerantie. In verschillende diermodellen is reeds aangetoond dat onder andere het toedienen van calcineurine remmers (Cyclosporine A en Tacrolimus), een van de meest gebruikte immunosuppressiva, juist een negatief effect hebben op tolerantie en dat het transplantaat werd afgestoten na het staken van de immunosuppressiva. Een van de hypothetische verklaringen voor dit fenomeen is het remmende effect van calcineurine remmers op regulatoire T-cellen. De recente literatuur toont verschillende effecten op de functie en overleving van regulatoire T-cellen bij de verschillende immunosuppressiva die gebruikt worden. Met name blijken de calcineurine remmers de verhouding tussen regulerende en reactieve T-cellen te veranderen. Dit is een belangrijke bevinding en kan van invloed zijn op de keuze en mate van immunosuppressieve medicatie in de toekomst. Hiervoor dienen de specifieke effecten van immunosuppressiva nader onderzocht te worden, met name het effect op regulatoire cellen. Uiteindelijk kan dit leiden tot geïndividualiseerde immuno-suppressieve behandeling en in een deel tot compleet stoppen, waardoor de kans op complicaties van de behandeling aanzienlijk zal worden gereduceerd.

In het tweede gedeelte van dit proefschrift (Part II) worden regulatoire T-cellen in de bloedcirculatie gekarakteriseerd en de effecten van verschillende immuno-suppressieve behandeling op de cellen beschreven. In hoofdstuk 3 en 4 hebben wij laten zien dat patiënten met een eindstadium leverziekte verhoudings-gewijs meer regulatoire T-cellen in het bloed hebben en dat na een levertransplantatie het aantal significant daalt. Er is daarbij een associatie geconstateerd tussen immunosuppressiva gebruik en de daling van het aantal regulatoire T-cellen. Alle patiënten in deze studie kregen immuunsuppressie op basis van calcineurine-remmers, maar dat is nog geen bewijs dat deze medicatie verantwoordelijk was voor de daling. Echter, duidelijk bleken patiënten die een acute afstotingsreactie hadden ontwikkeld en daarvoor werden behandeld met steroïden, significant minder



regulatoire T-cellen te hebben. Deze bevindingen hebben wij nader willen onderzoeken in een prospectief onderzoek (hoofdstuk 5) waarbij patiënten die een calcineurine remmer gebruikten werden geconverteerd naar een ander type immunosuppressivum, mycophenolaat mofetil. Gedurende zes tot negen maanden werd van deze patiënten bloed afgenomen om het effect van de conversie te onderzoeken. Na het stoppen van de calcineurine remmer steeg het percentage regulatoire T-cellen van het totaal aantal T-cellen, bevestigd middels een verhoogd Foxp3 genexpressie. Daarbij waren er tevens fenotypische veranderingen van de regulatoire T-cellen, onder andere een verhoogd IL-2 receptor expressie. Een belangrijke klinische observatie in deze studie was dat er een significante verbetering van de nierfunctie was opgetreden. Twee patiënten ontwikkelden een afstotingsreactie die adequaat behandeld konden worden met steroïden. Geen van deze veranderingen werden gezien in de controle patiënten, die de calcineurine remmer behandeling hebben gecontinueerd. Concluderend blijken er duidelijke verschillende effecten te bestaan van de verschillende afweeronderdrukkende medicijnen op het immuunsysteem. Wij hebben in levertransplantatie patiënten functionele regulatoire T-cellen aangetoond die onder invloed van calcineurine remmers dalen in het bloed. In diermodellen zijn er nu sterke aanwijzingen dat de keuze van behandeling tolerantie negatief kan beïnvloeden. Het specifieke effect hiervan op de anti-donor reactiviteit in de mens dient verder geanalyseerd te worden.

In het derde gedeelte (Part III) wordt getracht meer inzicht te geven in de immunologische karakteristieken van de getransplanteerde lever. Hiervoor hebben we op verschillende tijdstippen gekeken naar onder meer de aanwezigheid van regulatoire T-cellen in het levertransplantaat. Er zijn aanwijzingen dat de aanwezigheid van regulatoire T-cellen in het getransplanteerde orgaan een belangrijke rol spelen bij het reguleren van de immuun respons en tolerantie kunnen induceren. Dit suggereert dat de onderdrukking van de anti-donor reactiviteit door regulatoire T-cellen (deels) lokaal plaats vindt, dus in het getransplanteerde orgaan. Een ander bekend fenomeen wat een duidelijke link heeft met tolerantie is het optreden van chimerisme, gedefinieerd als het persisteren van donor afkomstige immuun cellen in de ontvanger. In hoofdstuk 6 hebben we perfusievloeistof van de donor lever opgevangen en geanalyseerd. Onder meer is er gekeken naar de samenstelling van de aanwezige immuun cellen, met name de aanwezigheid van donor regulatoire T-cellen. Wij hebben aangetoond dat donor regulatoire T-cellen aanwezig zijn in perfusievloeistof en dat deze cellen na transplantatie vrij komen en circuleren in de ontvanger. Bovendien waren deze regulatoire cellen in staat om de anti-donor respons door de ontvanger cellen te remmen. Dit pleit voor de veronderstelling dat er een belangrijke rol is voor regulatoire T-cellen in chimerisme-geassocieerde tolerantie. De directe link tussen de aanwezigheid van donor regulatoire T-cellen in de lever en de uitkomst na transplantatie dient nader onderzocht te worden.



Om op een veilige en patiënt vriendelijke wijze leverweefsel na transplantatie te verkrijgen hebben wij gekozen voor een alternatieve methode: de dunne-naald aspiratie biopsie. Om post-operatief de regulatoire T-cellen in de lever te kunnen monitoren hebben wij middels dunne- naald-aspiratie leverweefsel verkregen en geanalyseerd. Deze techniek blijkt een goed alternatief voor de klassieke dikke naald biopsie, die kan leiden tot ernstige complicaties. Doelstelling van deze studie was om beter inzicht te krijgen in de immunologische karakteristieken van de getransplanteerde lever. Hiervoor is er op een veilige en patiënt vriendelijke wijze leverweefsel middels dunne naald biopsie afgenomen van lever transplantatie patiënten in de eerste maand (hoofdstuk 7), op 6 maanden en 12 maanden (hoofdstuk 8) na transplantatie. In de eerste weken na transplantatie blijkt er in vergelijking met het bloed een verhoogd lever expressie te zijn van IFN- γ , een T-cel activerend cytokine. Op 6 maanden na transplantatie is IFN- γ niet meer verschillend tussen lever en bloed (hoofdstuk 7). De verhoogde IFN- γ expressie ging gepaard met relatief meer regulatoire T-cellen in de lever vergeleken met bloed. Deze bevindingen impliceren een verhoogde mate van activiteit en regulatie vroeg na transplantatie. Een interessante observatie was dat de expressie van het immuunsuppressieve cytokine IL-10 aanvankelijk niet verschillend is tussen lever en bloed in de eerste weken na transplantatie, maar op den duur wel degelijk verschillen toont op 6 en 12 maanden na transplantatie. Dit suggereert een immuunsuppressief milieu in de lever die ontstaat na verloop van tijd. Vroeg na transplantatie blijkt er tijdens een acute afstotingsreactie een lager expressie te zijn van IL-10 in de lever en in bloed vergeleken met patiënten die geen afstotingsreactie ontwikkelden. Collega Dr. M.C. Warlé heeft in 2002 aangetoond dat polymorfismes van cytokine genen, waaronder het IL-10 gen, een genetische risicofactor kan zijn voor het ontwikkelen van acute levertransplantaat afstoting. Onze studie bevestigt een belangrijke rol voor IL-10 in de eerste fase na levertransplantatie. Nader onderzoek dient te worden gedaan of er een causale verband bestaat tussen IL-10 expressie/productie en het ontwikkelen van afstoting. Langer na transplantatie blijkt er naast een toegenomen IL-10 expressie ook een toename te zijn van Foxp3 expressie (hoofdstuk 8), wat suggestief is voor een accumulatie van regulatoire T-cellen. Dit toont het onderlinge verband tussen IL-10 en Foxp3, zoals eerder reeds is beschreven. Patiënten die vroeg na transplantatie afstoting ontwikkelden blijken een hoger Foxp3 expressie in de lever te hebben dan patiënten die geen afstoting ontwikkelden. Ook hebben patiënten met een recidief hepatitis C infectie een hogere Foxp3 expressie. Deze verschillen duiden op een toegenomen aantal, of een verhoogde activiteit van regulatoire T-cellen. Bij patiënten met hepatitis C infectie zou dit een ontsnappingsmechanisme kunnen zijn van het virus, waardoor deze niet adequaat geëlimineerd kan worden omdat virus-specifieke T-cellen geremd worden door de regulatoire cellen. Deze beide studies tonen dat middels lever dunne naald biopsie het verloop van de immunologische processen zoals tolerantie op een veilige manier gevolgd kunnen worden.



De gevonden verschillen tussen patiënten suggereert een niet generaliseerbaar immuun status van de verschillende patiënten en pleit voor geïndividualiseerde immunosuppressieve behandeling.

Dit proefschrift heeft regulatoire T-cellen beschreven in de lever en bloed van levertransplantatie patiënten en vormt een basis voor verder onderzoek gericht op functionele capaciteiten van regulatoire T-cellen in relatie tot de uitkomst van een transplantatie. Een juiste balans tussen reactieve T-cellen en regulatoire T-cellen is cruciaal om tolerantie te verkrijgen. De diverse immunosuppressiva blijken verschillende effecten te hebben op de functie en overleving van regulatoire T-cellen, wat pleit voor de ontwikkeling van nieuwe immunosuppressieve strategieën die er op gericht zijn donor transplantaat tolerantie te bewerkstelligen. Wij stellen dat door het bepalen van de immuun status op basis van tolerogene kenmerken, waaronder regulatoire T-cel activiteit en cytokine profiel in relatie tot de anti-donor reactie, bij een subset van de patiënten de immunosuppressiva kunnen worden afgebouwd. Dit zou dan leiden tot een aanzienlijke verbetering van de kwaliteit van leven na een transplantatie. ◀