

INDUZIONE DI TOLLERANZA DOPO TRAPIANTO SPERIMENTALE DI CUTE NEL TOPO MEDIANTE BLOCCO DELLE VIE DI COSTIMOLAZIONE

***C. Matteotti, A. Gaspari, E. Casabianca, J. Rademacher, M. Polese, S. Crespi,
R. Maccario, P. Dionigi, A. Zonta, M. Maestri***

***CHIRURGIA SPERIMENTALE, SEZIONE DI CHIRURGIA GENERALE A,
DIPARTIMENTO DI CHIRURGIA, UNIVERSITÀ DI PAVIA***

INTRODUZIONE

Recentemente è stato sottolineato il ruolo di alcune molecole di costimolazione nelle fasi precoci dell'attivazione degli eventi immunologici che causano il rigetto (1). Le molecole di adesione/costimolazione forniscono un segnale aspecifico ma fondamentale per l'attivazione e proliferazione dei T-linfociti in risposta ad una stimolazione antigenica via *T-cell receptor*, la cui assenza determina uno stato di anergia antigene-specifica (1). Tale effetto non ha al momento una spiegazione compiuta, ma esistono indizi riguardo alla possibile generazione di cellule anergiche, all'induzione di cloni cellulari soppressori e alla delezione di linfociti antigene specifici (2, 3).

Recenti studi hanno, inoltre, dimostrato che la somministrazione *in vivo* di CTLA4Ig, molecola di sintesi ad attività inibitoria sull'attivazione T linfocitaria, e/o di anticorpi monoclonali anti-CD40L, prolungano efficacemente la sopravvivenza del graft (4, 5). Altre ricerche hanno evidenziato come sia possibile influenzare il processo di adattamento tra organo trapiantato del donatore e sistema immunitario del ricevente attraverso l'infusione di cellule immuno-competenti del donatore in associazione a reagenti in grado di interferire con la funzione costimolatoria (6, 7).

È nata da queste considerazioni l'idea di valutare un approccio terapeutico differente dalle terapie immunosoppressive convenzionali, basato su un modello sperimentale di induzione di tolleranza periferica in animali sottoposti a trapianto di cute, mediante la somministrazione *in vivo* della proteina di fusione CTLA4Ig, dell'anticorpo monoclonale anti-CD40L e di splenociti del donatore (DST). Tale studio appare di particolare interesse in quanto, date le premesse, potrebbe costituire un primo passo verso lo sviluppo di metodologie di immunosoppressione mirata, che mantenga cioè inalterata la capacità di risposta im-

mune dell'ospite verso antigeni non-self, ma che promuova uno stato di tolleranza donatore-specifica.

MATERIALI E METODI

Nel corso di questo studio sono stati utilizzati topi BALB/c (H2^d) quali riceventi di cute e splenociti da topi C57BL/6 (H2^b), due ceppi murini fra loro incompatibili. Gli animali trapiantati sono stati divisi per randomizzazione nei diversi gruppi di studio come descritto in tabella I.

Brevemente: si è prelevato dal dorso rasato dei topi donatori C57BL/6 un lembo cutaneo circolare di circa 1 cm². Il tessuto sottocutaneo è stato eliminato per via smussa e cruenta con una lama da bisturi. Il frammento di cute così preparato è stato impiantato in un'area corrispondente della regione dorsale dei topi riceventi BALB/c. Gli animali trapiantati sono stati sottoposti a controllo giornaliero per la valutazione precoce dell'insorgenza del rigetto. Il termine del periodo di osservazione è stato posto alla rilevazione di una necrosi pari ad un'area del 90% della cute trapiantata. Il trapianto è stato effettuato in condizioni di sterilità ed in anestesia generale.

Gli splenociti utilizzati quale trattamento postoperatorio sono stati raccolti dopo omogeneizzazione delle milze dei topi donatori di cute ed infusi EV alla concentrazione di 10⁷ cellule/100 ml PBS al termine dell'intervento. Il blocco della costimolazione linfocitaria è stato effettuato mediante somministrazione della sola proteina di fusione CTLA4Ig alla dose di 200 mg in seconda giornata postoperatoria, del solo anticorpo monoclonale anti-CD40L alla dose di 200 mg al termine della procedura chirurgica, o mediante associazione dei due trattamenti.

Tabella I - Gruppi di studio e trattamento postoperatorio

Gruppo	N	Sesso	Peso	Procedura	Trattamento		
					DST	CTLA4Ig	Anti-CD40L
1	7	M vs M	20-22 g	Allotrapianto di cute	-	-	-
2	7	M vs M	20-22 g	Allotrapianto di cute	10 ⁷ cellule/ 100 ìl EV; giorno 0	-	-
3	7	M vs M	20-22 g	Allotrapianto di cute	-	200 ìg/dose IP; giorno 2 p.o.	-
4	7	M vs M	20-22 g	Allotrapianto di cute	10 ⁷ cellule/ 100 ìl EV; giorno 0	200 ìg/dose IP; giorno 2 p.o.	-
5	7	M vs M	20-22 g	Allotrapianto di cute	-	200 ìg/dose IP; giorno 2 p.o.	200 ìg/dose IP; giorno 0
6	7	M vs M	20-22 g	Allotrapianto di cute	10 ⁷ cellule/ 100 ìl EV; giorno 0	200 ìg/dose IP; giorno 2 p.o.	200 ìg/dose IP; giorno 0

I dati sono stati valutati impiegando il metodo di analisi della sopravvivenza di Kaplan-Meier, stratificati nei gruppi di studio secondo i criteri del suddetto metodo. L'esistenza di differenze significative è stata determinata confrontando i gruppi nel loro insieme (valori di $p < 0.05$ sono stati considerati significativi). Le differenze tra i gruppi sono state valutate applicando il Log-Rank test (valori di $p < 0.05$ sono stati considerati significativi).

La sopravvivenza, quando non altrimenti specificato, è riferita numericamente come mediana.

RISULTATI

Lo studio si è articolato in due fasi temporali distinte: una prima fase nella quale si è voluto testare l'efficacia della somministrazione della proteina di fusione CTLA4Ig con o senza infusione di splenociti ed una seconda che prevedeva l'utilizzo anche dell'anticorpo monoclonale anti-CD40L.

Il trapianto di cute senza ulteriori trattamenti (gruppo 1) come atteso, viene rigettato in un lasso di tempo breve e costante in tutti gli esperimenti, con una mediana di sopravvivenza di 10 giorni, a dimostrazione dell'incompatibilità dei ceppi utilizzati. La somministrazione contemporanea di alte dosi di antigene donatore-specifico (DST) nel gruppo 2 induce un prolungamento moderato della sopravvivenza del graft in assenza di altri trattamenti (mediana: 15 giorni). La somministrazione di CTLA4Ig prolunga in modo significativo la sopravvivenza dei grafts anche senza infusione di splenociti. Nel gruppo 3, infatti, la mediana di sopravvivenza è risultata essere di 15 giorni. Il trattamento combinato, DST e CTLA4Ig, nel gruppo 4, porta ad un ulteriore prolungamento nella sopravvivenza dei grafts (mediana: 20 giorni). In nessun caso si è potuto però osservare lo sviluppo di un vero e proprio stato di tolleranza stabile nel tempo. Trattando gli animali del gruppo 5 con CTLA4Ig e anti-CD40L si è ottenuta una mediana di sopravvivenza di 16 giorni. Solo l'associazione di CTLA4Ig, anti-CD40L e DST nel gruppo 6 è risultata efficace nel prolungare la sopravvivenza delle cuti trapiantate fino alla 50^a giornata postoperatoria, termine fissato come *end point* dell'osservazione e comunemente considerato limite temporale oltre il quale nel modello murino vi è sviluppo di tolleranza stabile.

Dall'analisi delle curve di sopravvivenza dei grafts è emersa una differenza statisticamente significativa fra i diversi gruppi di studio ($p < 0.01$), come si può osservare in figura 1.

I risultati del confronto fra i singoli gruppi di studio sono riportati in tabella II.

Tabella II -Analisi della sopravvivenza: confronto fra gruppi.

Sono state considerate significative differenze per $p < 0.05$.

gruppo 1: controllo trapianto di cute; gruppo 2: trapianto di cute + infusione DST; gruppo 3: trapianto di cute + CTLA4Ig; gruppo 4: trapianto di cute + DST + CTLA4Ig; gruppo 5: trapianto di cute + CTLA4Ig + anti-CD40L; gruppo 6: trapianto di cute + DST + CTLA4Ig + anti-CD40L.

Gruppo	Log-Rank test	Gruppo	Log-Rank test
1 vs 2	$p=0.003$	2 vs 6	$p=0.003$
1 vs 3	$p=0.062$	3 vs 4	$p=0.050$
1 vs 4	$p=0.004$	3 vs 5	$p=0.377$
1 vs 5	$p=0.008$	3 vs 6	$p=0.003$
1 vs 6	$p=0.003$	4 vs 5	$p=0.805$
2 vs 3	$p=0.304$	4 vs 6	$p=0.005$
2 vs 4	$p=0.023$	5 vs 6	$p=0.012$
2 vs 5	$p=0.207$		

Confronto globale fra gruppi

Gruppi	Kaplan-Meier, multiple sample survival
1-2-3-4	$p < 0.01$
1-2-5-6	$p < 0.01$
1-2-3-4-5-6	$p < 0.01$

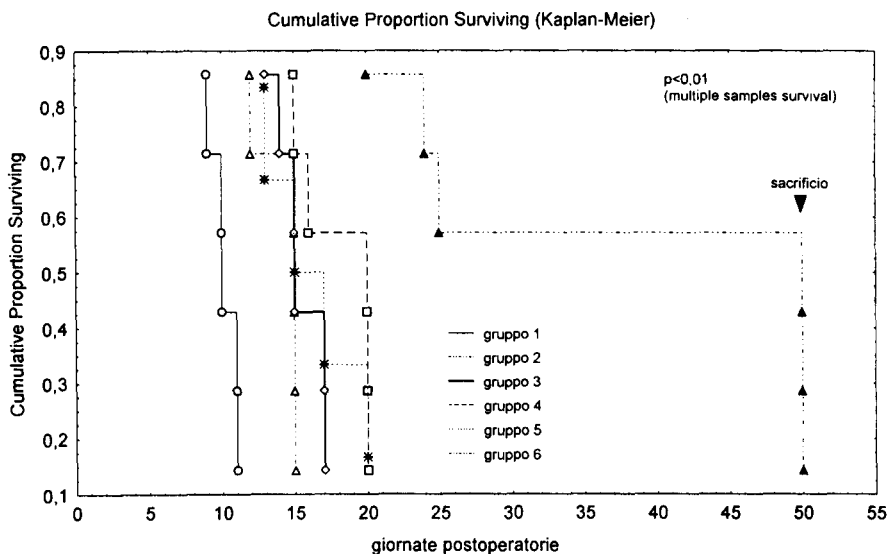


Figura 1 - Curve di sopravvivenza ottenute nei diversi gruppi di studio e riferite all'evento rigetto completo, definito come necrosi del 90% del graft.

DISCUSSIONE

Questo studio si basa su ricerche precedenti svolte da altri gruppi che hanno dimostrato come l'inibizione della via costimolatoria, necessaria all'attivazione delle cellule T, possa essere un sistema efficace in grado di inibire la reazione di rigetto alloantigene specifica.

L'obiettivo primario per migliorare i risultati dei trapianti d'organo dovrebbe essere infatti quello di indurre l'accettazione dell'organo non self, lasciando integre le capacità difensive naturali. Il nostro modello è stato realizzato con l'obiettivo di verificare la possibilità di prolungare la sopravvivenza di un tessuto trapiantato in presenza del blocco della costimolazione B7:CD28 e CD40-CD40L mediata ed in condizioni di presentazione massiva dell'antigene donatore-specifico DST. Il modello sperimentale prescelto presenta intrinseche caratteristiche di difficoltà, poiché è noto che la cute è in assoluto il tessuto meno tollerato e che maggiormente stimola il rigetto. Questo è particolarmente importante nei roditori, dove è possibile ottenere tolleranza spontanea dopo trapianto di organo vascolarizzato (particolarmente fegato) anche in ceppi non compatibili (8).

Il trapianto di cute senza ulteriori trattamenti, viene rigettato in breve tempo. La somministrazione contemporanea di alte dosi di antigene donatore-specifico DST è stata eseguita impiegando una sospensione di splenociti con lo scopo duplice di indurre la presentazione delle molecole di costimolazione sul maggior numero di cellule immunocompetenti possibile e di sfruttare le capacità di down-regulation del rigetto dimostrate da altri autori in ricerche sugli effetti del chimerismo (1, 7). In effetti la somministrazione di splenociti induce un prolungamento della sopravvivenza del graft in assenza di altri trattamenti, espressa come trend significativo nella nostra casistica.

La somministrazione di CTLA4Ig prolunga in modo significativo la sopravvivenza. Questo dato è interessante in modo particolare se si osserva che la somministrazione è stata limitata ad una singola dose non ripetuta nel tempo. Nel gruppo 4 degli animali trattati con splenociti e CTLA4Ig la sopravvivenza dei grafts cutanei viene prolungata fino ad un massimo 23 giorni (mediana 20). L'effetto globale è quindi sinergico nel prolungare l'inibizione del rigetto al di là della capacità dei due trattamenti considerati singolarmente in modo altamente significativo ($p < 0.01$). Questo risultato potrebbe dipendere dalla presenza di grandi quantità di antigene donatore-specifico presenti in circolo in seguito all'infusione di splenociti, con una conseguente rapida esposizione delle molecole costimolatorie da parte di molte se non tutte le cellule APC del ricevente su cui potrebbe così agire il CTLA4Ig con maggiore efficacia.

Soltanto recentemente le interazioni esistenti fra CD40 ed il suo ligando CD40L, che inizialmente si pensava avessero un ruolo nell'attivazione B linfo-

citaria, sono state riconosciute come fondamentali nell'attivazione delle cellule T e nell'insorgenza del rigetto (9).

Nel nostro caso la somministrazione dell'anticorpo monoclonale anti-CD40L ha portato ad un effettivo prolungamento della sopravvivenza della cute trapiantata. Abbiamo osservato inoltre che, l'associazione di CTLA4Ig, splenociti del donatore e anti-CD40L porta allo sviluppo di una vera e propria tolleranza al graft.

L'ipotesi, che dovrà essere confermata nel corso dei successivi studi *in vitro* ed *in vivo*, è che un trattamento immunosoppressivo alloantigene-specifico mediato attraverso il blocco CD28:B7 e CD40-CD40L ed infusione massiva di APC del donatore, possa in qualche modo creare delle condizioni favorevoli per lo sviluppo di tolleranza stabile e duratura.

Questi dati rappresentano osservazioni compiute in un modello sperimentale che presenta in assoluto il maggior rischio possibile di rigetto, per le caratteristiche note di immunogenicità del trapianto di cute non vascolarizzato. Mentre non sarebbe opportuno in questa fase estrapolare i dati prevedibili impiegando gli stessi ceppi e gli stessi trattamenti in un modello di trapianto vascolarizzato, è probabile che, in base ai dati della letteratura relativi a ricerche di altri gruppi (4, 6-7), le sopravvivenze osservate nel gruppo trattato con DST, CTLA4Ig e anti-CD40L sarebbero prolungate di un ordine di grandezza superiore.

BIBLIOGRAFIA

1. Sayegh MH, Turka LA. The role of T cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *New Engl J Med* 1998; 338(25): 1813-21.
2. Comoli P, Montagna D, Moretta A, Zecca M, Locatelli F, Maccario R. Alloantigen-induced human lymphocytes rendered nonresponsive by a combination of anti-CD80 monoclonal antibodies and cyclosporin - A suppress mixed lymphocyte reaction *in vitro*. *J Immunol.* 1995; 155:5506-5511.
3. Lombardi G, Sidhu S, Batchelor R, Lechler R. Anergic T cells as suppressor cells *in vitro*. *Science* 1994; 264: 1587-1589.
4. Kirk AD, Harlan DM, Armstrong NN, et al. CTLA4-Ig and antiCD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:8789-94.
5. Sun H, Subbotin V, Chen C, Aitouche A, Valdivia LA, Sayegh MH, Linsley PS, Fung JJ, Starzl TE, Rao AS. Prevention of chronic rejection in mouse aortic allografts by combined treatment with CTLA4Ig and antiCD40 ligand monoclonal antibody. *Transplantation* 1997; 64(12): 1838-1856.

6. Sayegh MH, Zheng X-G, Magee C, Hancock WW, Turka LA. Donor antigen is necessary for the prevention of chronic rejection in CTLA4Ig treated murine cardiac allograft recipients. *Transplantation* 1997;64:1646-50.
7. Pearson TC, Alexander DZ, Hendrix R, et al. CTLA4Ig plus bone marrow induces long-term allograft survival and donor specific unresponsiveness in the murine model: evidence for hematopoietic chimerism. *Transplantation* 1996;61:997-1004.
8. Sun J, Sheil AGR, Wang C, Wang L, Rokahr K, Sharland A, Jung SE, Li L, McCaughan GW, Bishop GA. Tolerance to rat liver allografts. *Transplantation* 1996; 62(12): 1725-1730.
9. Durie FH, Foy TM, Masters SR, Laman JD, Noelle RJ. The role of CD40 in the regulation of humoral and cell-mediated immunity. *Immunol Today* 1994;15:406-11.