doi: 10.48095/cctahd2022prolekare.cz12

Invariantní NKT buňky a jejich využití pro imunomodulaci GvHD – souhrn literatury a preklinická data

Invariant NKT cells and immunomodulation of GvHD – review of literature and preclinical data

Hejretová L[1,2], Weberová K[1,3], Čedíková M[3,4], Lysák D[1], Jindra P[1], Holubová M[1,3]

[1] *Hematologicko-onkologické oddělení, FN Plzeň*
[2] *Ústav histologie a embryologie, LF UK v Plzni*
[3] *Biomedicínské centrum, LF UK v Plzni*
[4] *Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví, Fakulta zdravotnických studií, Západočeská univerzita v Plzni*

SOUHRN: Reakce štěpu proti hostiteli (*graft versus host disease* – GvHD) patří mezi nejzávažnější komplikace alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk. Přestože se díky optimalizaci transplantačních postupů mortalita v důsledku GvHD neustále snižuje, nadále existuje početná skupina pacientů, u kterých se rozvine život ohrožující forma GvHD, případně kterým GvHD zásadně snižuje kvalitu života po transplantaci. Jedním z inovativních přístupů, které by mohly zlepšit prognózu pacientů, je adoptivní podání některých buněčných populací, které mají imunomodulační potenciál. Na našem pracovišti jsme v rámci klinické studie podávali léčivé přípravky z mezenchymálních kmenových buněk (MSC) v léčbě steroidně-refrakterní GvHD (SR-GvHD). Nyní ověřujeme možnost využití invariantních NKT lymfocytů (iNKT) v této indikaci. Tyto iNKT lymfocyty jsou schopné tlumit patologické imunitní reakce a rozvoj příznaků GvHD a současně podporovat protinádorovou imunitu – tzv. reakci štěpu proti leukemii (*graft versus leukemia* – GvL). V rámci preklinického testování jsme porovnali několik šarží kultivovaných a expandovaných iNKT a MSC od různých dárců z hlediska jejich imunofenotypu a imunomodulačního potenciálu. Průtokovou cytometrií jsme kvantifikovali expresi aktivačního znaku CD25 na nespecificky stimulovaných mononukleárních buňkách po kokultivaci s MSC nebo s iNKT. Studie prokázala, že je možné připravit čistou populaci iNKT buněk s dostatečnou imunomodulační kapacitou srovnatelnou s MSC. Zdá, že iNKT buňky představují slibnou léčebnou strategii v rámci terapie potransplantačních komplikací, nicméně vzhledem k výrazné heterogenitě jejich subpopulací bude nutné provést hlubší stanovení funkce iNKT a optimalizovat protokol pro jejich přípravu.

KLÍČOVÁ SLOVA: reakce štěpu proti hostiteli – imunomodulace – mesenchymální kmenové buňky – invariantní NKT lymfocyty

SUMMARY: Graft versus host disease (GvHD) is one of the most serious complications of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Although GvHD mortality is steadily declining due to the optimalization of transplant procedures, there remains a large group of patients who develop life-threatening forms of GvHD, or whose quality of life after transplantation is reduced due to GvHD. The adoptive administration of immunomodulatory cell populations is an innovative approach that could improve the prognosis of these patients. We had previously used mesenchymal stem cells (MSC) in steroid-refractory GvHD (SR-GvHD) in a clinical trial and we are currently verifying the possibility of using invariant NKT lymphocytes (iNKT) in SR-GvHD treatment. iNKT are a cell population that is able to suppress pathological immune responses and the development of GvHD symptoms. At the same time, iNKT are able to promote anti-tumour immunity – the graft versus leukaemia effect (GvL). In a preclinical study, we compared several batches of cultured and expanded iNKT and MSCs from different donors in terms of their immunophenotype and immunomodulatory potential. We quantified the expression of the activation marker CD25 on non-specifically stimulated mononuclear cells after co-cultivation with MSC or iNKT. The study showed that it is possible to prepare a pure population of iNKT with sufficient immunomodulatory capacity comparable to MSCs. While iNKT cells appear to be a promising treatment strategy for post-transplant complications, the significant heterogeneity of their subpopulations will require a deeper assessment of iNKT function and optimisation of their production protocols.

KEY WORDS: graft-versus-host disease – immunomodulation – mesenchymal stem cells – invariant NKT lymphocytes

ÚVOD

Alogenní transplantace krvetvorných buněk

Alogenní transplantace krvetvorných buněk (aloHSCT) je vysoce specializovaná terapeutická metoda, která je potenciálně kurativní pro řadu hematologických i nehematologických onemocnění. Převažují indikace pro myeloidní a lymfoidní malignity [1], ale narůstají i počty transplantací pro primárně nehematologické choroby, např. pro autoimunitní [2] nebo metabolická onemocnění [3]. Do dnešního dne bylo celosvětově provedeno již přibližně 1,4 milionu transplantací a každý rok podstoupí tuto proceduru kolem 70 tisíc pacientů. Polovina z nich v Evropě [4]. Dle dat EBMT (The European Society for Blood & Marrow Transplantation) má počet transplantací za rok stále vzestupný trend. I přes kontinuální pokroky v transplantační medicíně zhoršují prognózu pacientů dvě zásadní potransplantační komplikace – relaps původní malignity a reakce štěpu proti hostiteli (*graft-versus-host disease* – GvHD).

Reakce štěpu proti hostiteli

Reakce štěpu proti hostiteli patří k hlavním příčinám krátkodobé potransplantační mortality do dne +100 a do +1 roku [5]. Zároveň vede k rozvoji řady příznaků, které jsou příčinou závažné potransplantační morbidity, a které zásadně snižují kvalitu života pacientů. Nezbytnou podmínkou pro úspěch transplantace je shoda v HLA systému (*human leukocyte antigens*) mezi dárcem a pacientem [6]. HLA neshoda zvyšuje riziko rozvoje GvHD, kdy dárcovské imunokompetentní buňky (zejména T lymfocyty) poškozují tkáně příjemce, které rozpoznávají jako cizorodé. Na druhou stranu ani úplná shoda v HLA znacích s omezenou imunologickou interakcí mezi dárcem a příjemcem nemusí být pro optimální efekt transplantace žádoucí, a to zejména u agresivních malignit. Výsledný terapeutický efekt alogenní transplantace totiž nespočívá pouze v cytotoxicitě podané chemoterapie či radioterapie. Významnou měrou se na něm podílí komplexní imunologické mechanizmy, které zahrnujeme pod pojmem reakce štěpu proti tumoru (*graft versus tumor* – GvT) nebo konkrétněji reakce štěpu proti leukemii *(graft versus leukemi*a – GvL) [7].

Obvykle je rozlišována forma akutní (aGvHD) a chronická (cGvHD), které se liší časovým odstupem od transplantace, klinickými projevy i patofyziologickým mechanizmem jejich vzniku. Středně těžká až těžká akutní GvHD (aGvHD *grade* II–IV) se projeví přibližně u 40 % ze všech pacientů, kteří podstoupí alogenní transplantaci [5]. Patofyziologické mechanizmy, které stojí za rozvojem aGVHD jsou stále cílem intenzivního výzkumu. Předpokládá se, že prvotním podnětem pro rozvoj aGvHD je poškození tkání způsobené podáním vysocedávkované chemoterapie v rámci přípravného transplantačního režimu. Z poškozených tkání pacienta se uvolňují molekulární struktury tzv. alarminy (*damage-associated molecular patterns* – DAMPs), které vedou k rozvoji prozánětlivé reakce [8] a v konečném stádiu až k nekrotizujícímu poškození tkání. Zásadní roli v inhibici imunitních reakcí hrají T-regulační buňky (Treg), typ 1 regulační T lymfocyty (Tr1), invariantní NKT lymfocyty (iNKT) a myeloidní supresorové buňky (*myeloid-derived suppressor cells* – MDSCs) [9].

Chronická GvHD (cGVHD) patří mezi pozdní transplantační komplikace a je hlavní příčinou dlouhodobé potransplantační mortality, která není způsobena relapsem (*non-relapse mortality* – NRM) [10]. Postihuje až 50 % všech transplantovaných pacientů a její incidence stoupá v důsledku řady faktorů, jako jsou narůstající počet nepříbuzných dárců a dárců s větší HLA neshodou, zvyšující se věk pacientů, aplikace PBSC, podání DLI [11]. Imunologické mechanizmy vedoucí k rozvoji cGvHD se liší od těch, které způsobují aGvHD, a mají blíže spíše k procesům probíhajícím při rozvoji patologických autoimunitních procesů.

Mesenchymální kmenové buňky v léčbě GvHD

Mesenchymální kmenové buňky jsou multipotentní nehematopoetické buňky, které jsou schopny sebeobnovy a diferenciace do řady buněčných typů [12]. Mají nízký imunogenní potenciál, neexprimují HLA antigeny I. Třídy ani kostimulatorní molekuly [13], a proto při jejich podání není nutné respektovat shodu v HLA systému mezi dárcem a příjemcem. Jejich využití v hematoonkologii je založeno na jejich schopnosti modulovat imunitní reakce, potlačit příznaky či předcházet rozvoji GvHD a podpořit přihojení štěpu hematopoetických buněk. Navozují nezánětlivé prostředí ovlivněním cytokinové produkce leukocytů a zároveň tlumí proliferaci T lymfocytů [14]. Výsledky předchozích studií, vč. naší vlastní práce, ve kterých byly MSC přidány do suspenze lymfocytů stimulovaných buď HLA inkompatibilními mononukleárními buňkami (MNC), anebo nespecifickými lektiny, potvrdily, že MSC signifikantně ovlivňují aktivaci a proliferaci lymfocytů [15]. MSC snižují cytotoxický potenciál T-lymfocytů a zároveň stimulují proliferaci Treg [16], snižují sekreci IFNγ v Th1 buňkách a zvyšují expresi IL-4 v Th2 buňkách.

První úspěšné klinické podání MSC u pacienta se steroidně-refrakterní aGvHD IV. stupně uskutečnila skupina pod vedením Katariny Le Blanc v roce 2004 ve Švédsku [17]. Podání MSC vedlo k výraznému zlepšení klinických příznaků. Navazující klinická studie stejného týmu zahrnula 9 pacientů se SR-GvHD, u kterých nebyla aplikace MSC doprovázena žádnými projevy akutní toxicity a 6 z 9 pacientů dosáhlo kompletní odpovědi [18]. MSC byly testovány i pro léčbu chronických forem GVHD. Přestože dosavadní výsledky klinických studií prokazují větší efektivitu při podání MSC v léčbě aGvHD, i v této indikaci některé studie prokázaly zlepšení symptomů, možnosti snížení nebo úplného vysazení imunosupresivní léčby a ani zde nebyly zaznamenány žádné signifikantní projevy časné či pozdní toxicity [19]. Využití

MSC v léčbě SR-GvHD se dostalo do klinické praxe v řadě evropských zemí, nicméně studie zaměřené na efektivitu této léčby přinášejí kontroverzní výsledky. Z metaanalýzy z roku 2015 vyplývá, že MSC lze využít jako alternativu v léčbě SR-GvHD, ale pro potvrzení jejich efektivity je nezbytné provedení randomizovaných klinických studií [20].

Invariantní NKT lymfocyty

Invariantní NKT lymfocyty jsou minoritní subpopulací lymfocytů, pro které je charakteristická exprese povrchových antigenů typických pro T-lymfocyty (CD3+), pro NK-lymfocyty (CD161, NKp46, NKp30) a které zároveň exprimují antigeny společné pro T a NK buňky (NKG2D, 2B4, DNAM1) [21]. Dále mají na svém povrchu „invariantní" T buněčný receptor (*invariant T-cell receptor* – iTCR), který reaguje na lipidové struktury, zejména glykolipidy a glykosfingolipidy, ve vazbě na nepolymorfní molekulu ze skupiny tzv. neklasických MHC molekul I. třídy na povrchu antigen prezentujících buněk – CD1d [22]. Invariantní NKT mohou být touto cestou aktivovány exogenními lipidy, např. mikrobiálními nebo endogenními lipidy z vlastních poškozených, tumorózně změněných buněk, anebo alergeny [23]. Pro *in vitro* i *in vivo* aktivaci iNKT skrze vazbu na CD1d je využíván arteficiální lipidový antigen α-galactosylceramide (α-GalCer, KRN7000) [24], což je sloučenina izolovaná z výtažku mořské houby *Agelas mauritianus*. Přirozeně se v buňkách savců nevyskytuje a dokáže vyvolat aktivaci a expanzi iNKT buněk. Množství iNKT je vysoce variabilní mezi jednotlivci a je ovlivňováno celou řadou fyziologických i patologických stavů. V lidské periferní krvi se iNKT nacházejí v množství od nedetekovatelných hodnot až k 1 % ze všech cirkulujících T lymfocytů, přičemž medián se pohybuje kolem 0,05 % [25]. Nízké počty iNKT buněk v periferní krvi byly asociovány s řadou imunologických defektů u lidí i u myší [26]. V závislosti na podmínkách jsou iNKT schopny chovat se jako efektorové buňky s vlastní cytotoxickou aktivitou nebo jako pomocné imunitní buňky secernující cytokiny [23]. Jejich aktivace může vést k posílení nebo k supresi imunitní reakce cestou produkce konkrétního spektra cytokinů (prozánětlivých/regulačních) a aktivace dalších molekul a buněk imunitního systému [26], kdy jsou iNKT schopny podnítit rozvoj Th1 a nebo Th2 imunitní odpovědi [27]. O typu imunitní reakce je pravděpodobně rozhodnuto na základě setkání iNKT s primárním antigenním stimulem a jeho charakteru [28].

Protinádorový efekt iNKT

Nízké hladiny iNKT byly popsány u řady solidních nádorů – u karcinomu plic, prsu, tlustého střeva, melanomu a u dlaždicobuněčných nádorů hlavy a krku [28]. Vyšší hladiny iNKT prokazované ve tkáních solidních nádorů jsou spojeny s lepší prognózou [23]. Obdobné jsou výsledky u hematologických malignit. Nízké hladiny iNKT v periferní krvi pacientů s akutní myeloidní leukemií jsou asociovány s horší prognózou a kratším přežíváním [29]. Nepřímý antitumorózní efekt iNKT je založen na schopnosti iNKT produkovat řadu cytokinů, které aktivují CD8+ T a NK lymfocyty a podněcují jejich cytolytickou aktivitu [30]. Zároveň mají iNKT i vlastní přímý protinádorový efekt, který nevyžaduje zapojení dalších buněk imunitního systému [28]. Řada studií na leukemických nádorových liniích [31] i na solidních nádorech [23] potvrdila tento přímý protinádorový efekt vůči CD1d-pozitivním nádorovým buňkám, současně však bylo *in vitro* prokázáno, že aktivované iNKT lymfocyty rozpoznávají leukemické buňky nezávisle na tom, zda exprimují CD1d antigen [31]. To vede k závěru, že iNKT by mohly uplatnit svůj protinádorový efekt v léčbě hematologických malignit i nezávisle na CD1d expresi.

Imunomodulační potenciál iNKT v léčbě GvHD

iNKT by mohly najít místo v léčbě komplikací po aloHSCT, protože současně se svými protinádorovými vlastnostmi, které by mohly podněcovat GvL efekt, nepřispívají k rozvoji GvHD [32]. Současný výzkum naopak poukazuje na jejich významnou roli při její regulaci. Vyšší hladiny iNKT v časném období po aloHSCT korelovaly s nižším rizikem rozvoje GvHD [33] a naopak nízké hladiny iNKT v dárcovském štěpu jsou spojeny s vyšším rizikem jejího rozvoje [34]. Na myších modelech bylo prokázáno, že stimulace pomocí α-GalCer nebo adoptivní přenos iNKT buněk vede k nižšímu riziku rozvoje GvHD, přičemž pro optimální potlačení GvHD se zdá být zásadní role IL-4, který iNKT produkují a který vede k expanzi T-regulačních buněk [35]. Aplikovaná dávka iNKT ovlivňuje pravděpodobnost vzniku a rozvoje GvHD [36]. Účinnost iNKT buněk byla prokázána na myších modelech i v léčbě chronické GvHD. Adoptivní transfer iNKT byl efektivní v rámci preventivního podání, ale zároveň umožnil i zmírnění příznaků již rozvinuté chronické GvHD s rysy autoimunitních onemocnění a počínající orgánovou fibrózou [37].

MATERIÁLY A METODIKA

Izolace iNKT buněk

Invariantní NKT buňky byly izolovány z mononukleárních buněk (MNC) 14 zdravých dárců. Všichni dárci podepsali informovaný souhlas schválený společnou etickou komisí Lékařské fakulty v Plzni a Fakultní nemocnice Plzeň. Mononukleární buňky byly získány pomocí gradientové centrifugace s využitím separačního média Ficoll-Paque (GE Health Care). Z této frakce MNC byly pozitivní selekcí s využitím magneticky značených protilátek (Anti-iNKT MicroBeads, human; Miltenyi Biotech) získány iNKT buňky, a to dle protokolu výrobce. Invariantní NKT buňky byly poté kultivovány spolu s autologními podpůrnými MNC ozářenými 25Gy (tzv. *feeder*) v poměru 1 : 1 po dobu 14 dní v 5% CO_2 a 37 °C. Pro aktivaci byl přidán IL-15 (Miltenyi Biotech; finální koncentrace 150 IU/ml) a α-GalCer (Cayman Chemical; finální koncentrace 100 ng/ml). Buňky byly takto kultivovány po dobu

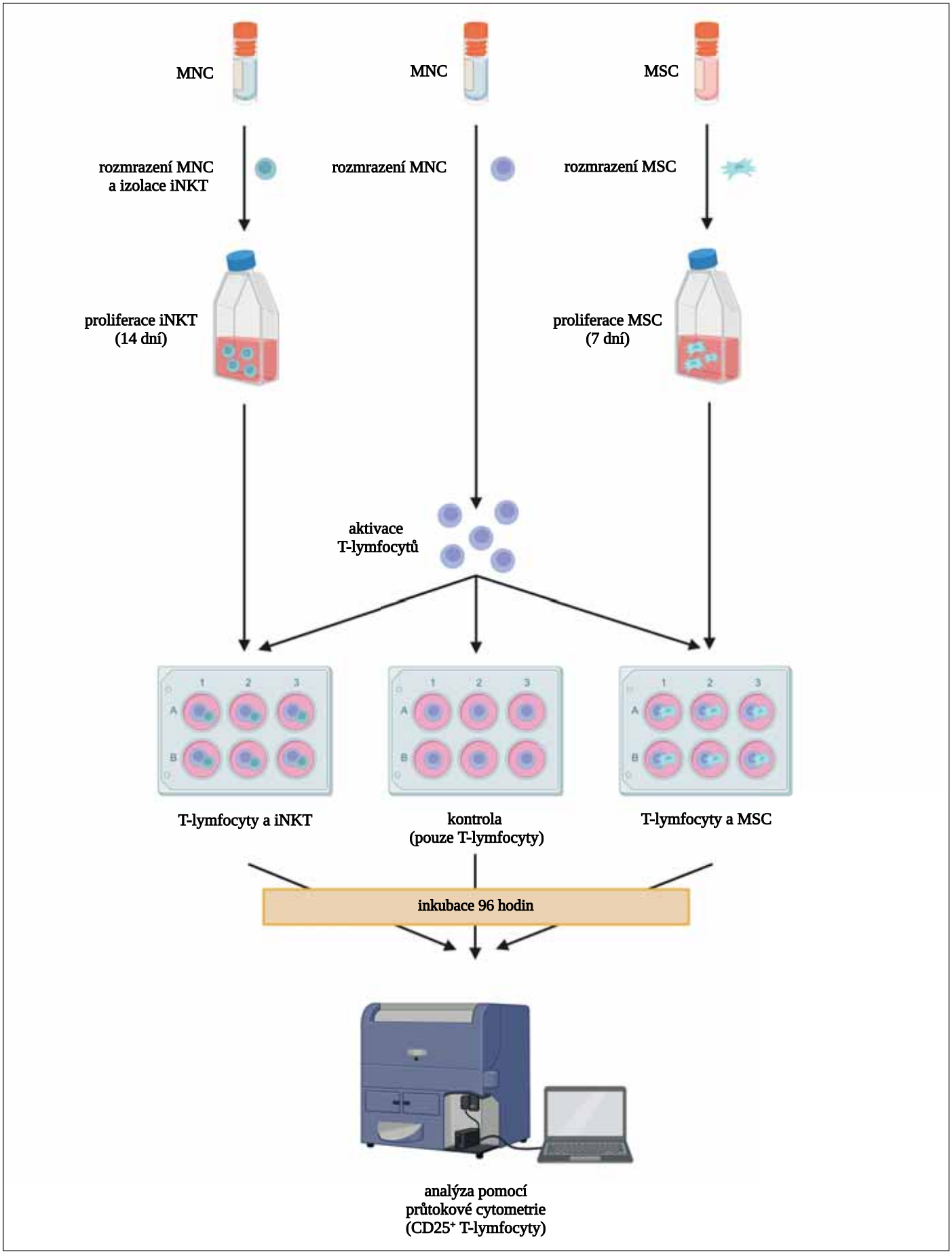


Schéma 1. Grafické schéma experimentu.

14 dní v 5% CO2 a 37°C. Každý 3.–5. den byl aplikován čerstvý IL-15 (finální koncentrace 150 IU/ml).

Kultivace mezenchymálních kmenových buněk

MSC byly izolovány z kostní dřeně zdravých dárců z frakce mononukleárních buněk na základě 48hodinové adheze. Frakce neadheretních buněk byla opakovaně odmyta a adherentní buňky byly dále kultivovány v médiu složeném z alpha-MEM (Gibco), 10% destičkového lyzátu (vlastní produkce) a heparinu (86 IU/ml). V průběhu kultivace byly buňky 2× pasážovány, přičemž byly nejprve z povrchu buněk uvolněny pomocí TrypLE Select roztoku (Gibco), poté centrifugovány (480 g/8 min/20 °C) a následně znovu nasazeny v koncentraci $0{,}5\times10^6$ na láhev s plochou 175 cm^2. Médium bylo v průběhu celé kultivace měněno každé 2–3 dny. Po zhruba 14–18 dnech byly buňky zamrazeny v 30% destičkovém lyzátu a 10% DMSO a byly uchovány v tekutém dusíku až do experimentu. Pro ověření jejich imunomodulačních vlastností byly buňky rozmrazeny a re-kultivovány po dobu 7–8 dní. Následně byly pasážovány a využity na imunomodulační testy.

Imunomodulační vlastnosti MSC a iNKT

Pro porovnání byly nejprve izolovány mononukleární buňky pěti zdravých dárců, od kterých byly dříve izolovány iNKT buňky naředěné na koncentraci 2×10^6/ml v RPMI médium s přídavkem FBS a nespecificky stimulované phytohemaglutininem (PHA) ve finální koncentraci 10 µg/ml. Do takto připravených buněk byla přidána suspenze MSC (tři nezávislé šarže pro každého dárce MNC) či iNKT v koncentraci 1×10^6/ml. Buňky byly smíchány v poměru 2 : 1 (MNC : iNKT/MSC) a společně kultivovány po dobu 96 hod. Do kontrolních buněk bylo přidáno pouze kultivační médium. Po uplynutí doby kultivace byl z každé zkumavky odebrán vzorek pro stanovení exprese aktivačního markeru CD25. Design experimentu je graficky znázorněn na schématu 1.

Stanovení imunofenotypu a exprese CD25 průtokovou cytometrií

Stanovení imunofenotypu iNKT buněk proběhlo po jejich 14-denní kultivaci. K části suspenze (50 µl) byly přidány následující protilátky: anti-CD45RO-BV510, anti-TCR Vα24-Jα18 – BV421, anti-CD45RA-PerCP-Cy5.5, anti-CD314 (NKG2D)-PE (vše Biolegend), CD4-APCCy7, CD8-PE, CD62L-APC, CD25-PECy7 (vše Exbio). Stanovení exprese CD25 bylo provedeno na suspenzi nespecificky stimulovaných MNC. K suspenzi byly přidány následující protilátky: CD45-BV510 (Biolegend), CD3-Pacific Blue, CD25-PE (vše Exbio). Po 15min inkubaci byly vzorky promyty PBS a centrifugovány 350 g/5 min/20 °C. Následně byl odstraněn supernatant a buňky byly rozvolněny v 300 µl PBS a ihned měřeny na průtokovém cytometru BD FACSCanto II (BD Bioscience). Analýza byla provedena v softwaru FlowJo. V rámci imunofenotypizace iNKT bylo hodnoceno procentuální zastoupení subpopulací a exprese funkčních molekul. Ovlivnění míry aktivace MNC bylo zjišťováno na základě intenzity exprese fluorescence (MFI) znaku CD25 na T-lymfocytech.

Hodnocení dat

Porovnání imunomodulačního potenciálu bylo hodnoceno pomocí testování nezávislých dat Mann-Whitney U-testem s využitím software Matlab (The MathWorks, Inc., USA).

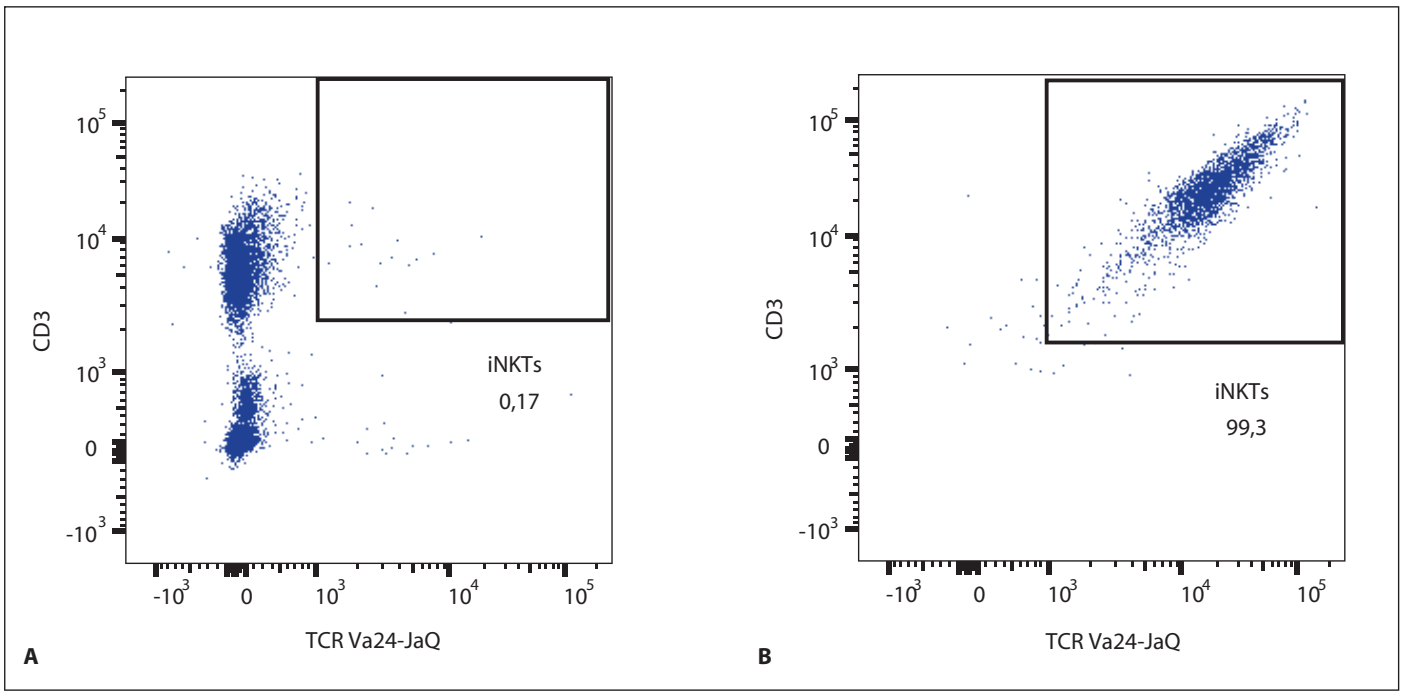
VÝSLEDKY

In vitro expanze a porovnání vlastností šarží iNKT buněk od různých dárců

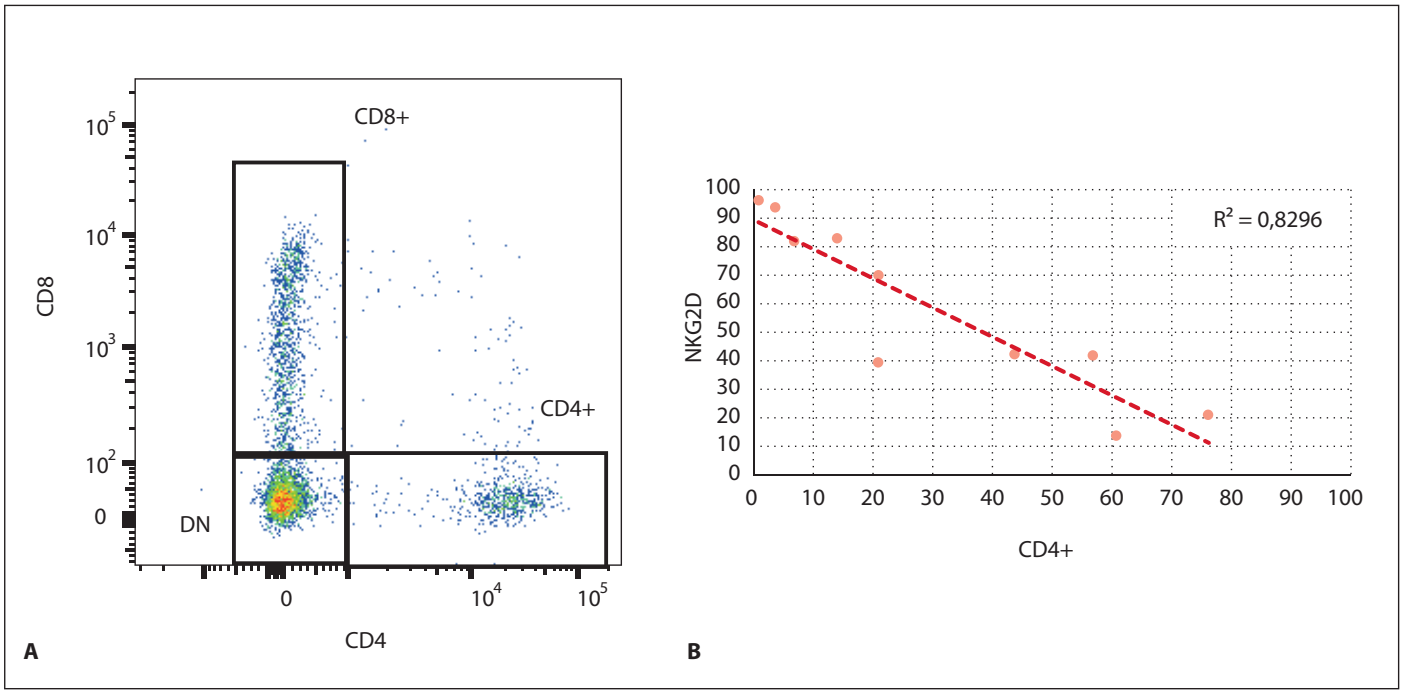
Izolované iNKT buňky byly specificky aktivovány αGalCer v kombinaci s ozářenými autologními mononukleárními buňkami. Počáteční čistota izolovaných iNKT buněk se pohybovala v rozmezí 13–98 % (medián 73,5 %). Po expanzi trvající 2 týdny byly stanoveny jejich koncentrace a zastoupení (tj. čistota). Průměrný počet buněk se zvýšil 250×. Hodnota minimálního nárůstu počtu buněk od začátku do konce kultivace byla 60× a maximální 413×. U všech vzorků byla po kultivaci detekována vysoká čistota populace iNKT buněk přesahující 90 %. Zbytkové buňky reprezentovaly T lymfocyty. Příklad zastoupení iNKT před a po izolaci (graf 1). V rámci charakterizace buněk byly stanovené CD4+ a CD8+ subpopulace, dvojitě negativní buňky, funkční molekuly NKG2D, CD25, CD62L a zastoupení paměťových (CD45RO) a naivních buněk (CD45RA). Byla zaznamenána velká heterogenita v zastoupení jednotlivých subpopulací, u některých dárců byly dominantní CD4+ buňky, u některých CD8+ a dvojitě negativní buňky. Zastoupení u CD4+ buněk se pohybovalo v rozpětí přibližně 1–76 % (medián 21 %), u CD8+ 0,5–60 % (medián 20 %) a u dvojitě negativních 17–86 % (medián 33 %). Většina iNKT buněk byla paměťová (v průměru 97 %) a zbytek byly naivní buňky (pod 1 %). Medián exprese NKG2D na iNKT byl 56 % (v mezích 13,9–96,1 %), exprese negativně korelovala se zastoupením CD4+ subpopulace (graf 2). Analýza exprese na CD4+ a CD8+ buňkách ukázala výrazně vyšší expresi na CD8+ populaci (medián 94 %) v porovnání s expresí na CD4+ buňkách (medián 8 %), kde však bylo mnohem širší rozpětí (2–58 % vs. 62–98 % u CD8). Molekula CD62L měla nízkou expresi (medián 5,9 %, meze 0,87–23,1 %) a byla detekována spíše na CD4+ a dvojitě negativních buňkách. Molekulu CD25 exprimovaly všechny tři subpopulace v podobné míře v rozmezí od 0,1 % do 17 % (medián pro celkové iNKT 5 %).

Porovnání imunomodulačního potenciálu MSC a iNKT

Po kokultivaci aktivovaných MNC s MSC došlo k poklesu mediánu intenzity fluorescence (median fluorescence intensity – MFI) ve všech vzorcích. Výsledná míra exprese CD25 se pohybovala v rozmezí 3 710–7 951 (medián MFI – 6 041).



Graf. 1. Zastoupení iNKT před izolací a po expanzi.
Zastoupení iNKT buněk se stanoví pomocí kombinace exprese CD3 a TCR Va24-JaQ detekující invariantní TCR.
(A) Zastoupení iNKT buněk z T-lymfocytů před izolací; (B) zastoupení iNKT buněk po 14 denní expanzi.



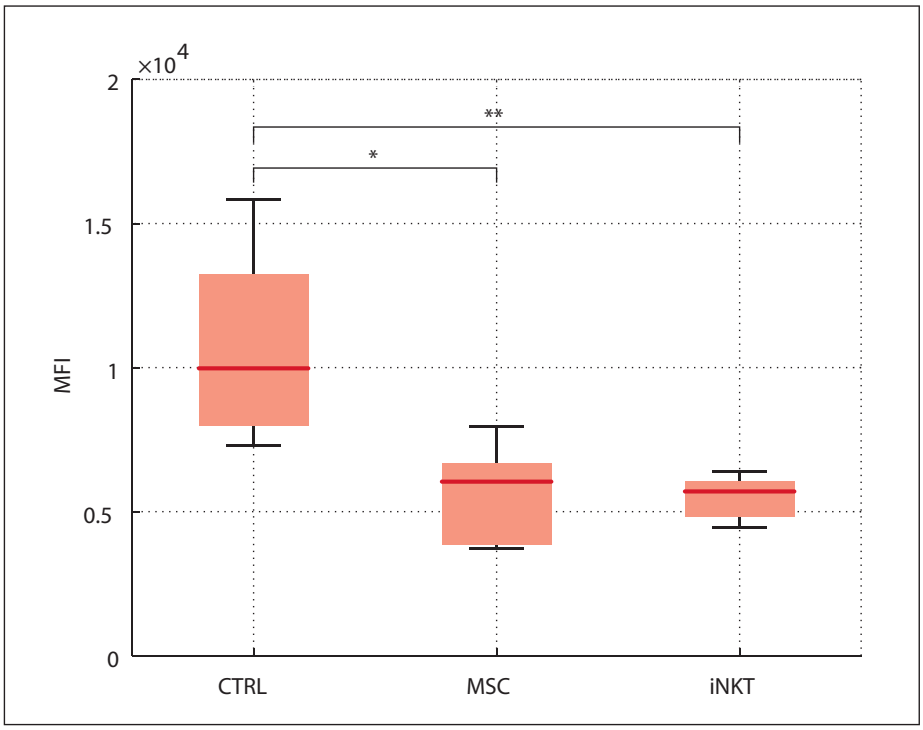
Graf 2. Imunofenotypická charakteristika iNKT.
Reprezentativní ukázka rozložení subpopulací iNKT buněk (A). Negativní korelace NKG2D exprese a CD4+ buněk.
Se zvyšujícím zastoupením CD4+ subpopulace klesá exprese NKG2D na iNKT buňkách (B).

Po kokultivaci aktivovaných MNC s iNKT došlo rovněž k poklesu MFI ve všech sledovaných vzorcích a míra exprese CD25 byla v rozmezí 4 435–6 404 (medián MFI – 5701). Jako kontrola byla stanovena míra exprese aktivačního znaku CD25 na suspenzi nespecificky stimulovaných MNC bez kokultivace s MSC/iNKT, který byl považován za 100 % míry exprese CD25. MFI kontrolních vzorků se pohybovala v rozmezí 8 226–15 819 (medián MFI – 9 974). Míra exprese CD25 na MNC po kokultivaci s MSC tedy poklesla v průměru o 39 % a po kokultivaci s iNKT poklesla průměrně o 43 % vůči kontrol-

ním vzorkům. Pro grafické zobrazení výsledků viz graf 3.

DISKUZE

Moderní přípravky buněčné terapie, které zasahují do imunopatologických procesů, jsou nepochybně součástí budoucnosti léčby potransplantačních komplikací. Lze očekávat, že bude přibývat buněčných populací, které budou využívány v léčbě relapsu nebo steroid-refrakterní GvHD, nejen MSC, ale také iNKT, Treg a dalších. Jejich zavedení do klinické praxe musí předcházet preklinické studie a optimalizace výrobních a aplikačních postupů. V rámci našeho testování jsme stanovovali imunofenotyp kultivovaných iNKT buněk u 10 zdravých dárců. Všechny naše testované šarže dosahovaly po specifické stimulaci αGalCer a *in vitro* expanzi dostatečných koncentrací iNKT a vysoké čistoty populace. Invariantní NKT jsou schopny rychlé expanze a zpravidla nebývá problém dosáhnout potřebného množství buněk, což potvrzují i další experimenty [38]. Specifická aktivace pomocí interakce α–-GalCer a CD1d molekuly vede k získání populace iNKT s vysokou čistotou [39]. Imunofenotypická charakteristika prokázala velkou heterogenitu v zastoupení jednotlivých subpopulací iNKT. U některých dárců byly dominantní CD4+ buňky, u některých CD8+ a dvojitě negativní buňky. Naše data jsou srovnatelná s výsledky jiných studiích [40,41] a ukazují na schopnost iNKT udržet si všechny subpopulace i po dlouhobější *in vitro* stimulaci. Většina iNKT buněk v našem experimentu exprimovala CD45RO (v průměru 97 %), což odpovídá paměťovému imunofenotypu detekovaném ve většině studií zároveň s nízkou expresí aktivačních molekul a CD62L [41] pozorovanou také na námi kultivovaných iNKT. CD62L pozitivní iNKT buňky déle přežívají a vykazují významnější míru proliferace po stimulaci iTCR receptoru [42]. Pro efektivnější využití iNKT je pravděpodobně nezbytné vyvinout strategie, které zvýší expresi CD62L např. cestou indukce jejích ligandů na antigen prezentujících buňkách [42]. Populace iNKT byly heterogenní také z hlediska zastoupení funkčních molekul. Molekula NKG2D byla exprimována zhruba na polovině buněk (medián 56 %). Její exprese byla výrazně vyšší na CD8+ populaci (medián 94 %) v porovnání s expresí na CD4+ buňkách (medián 8 %), kde byla zároveň vyšší, než je tomu u klasických CD4+ T-lymfocytů. Obdobné kvantitativní výsledky exprese NKG2D receptoru na iNKT získali Kuylenstierna et al. V jejich studii NKG2D receptor exprimovala zhruba polovina sledovaných iNKT buněk a jeho exprese převažovala na CD4 negativních iNKT, zatímco většina CD4 pozitivní iNKT ho neexprimovala. V rámci studie navíc prokázali, že NKG2D na CD8+ iNKT aktivuje iNKT buňky přímou cestou nezávislou na TCR receptoru, současně však funguje jako kostimulační signál pro aktivaci skrze interakci TCR a CD1d. Tato aktivace vede k rychlé cytotoxické reakci po NKG2D stimulaci [21], což může také vysvětlovat jejich přímý GvL efekt. NKG2D je klíčovou molekulou pro GvL efekt NK buněk [43]. Funkční rozdíly mezi NKG2D na CD4+ a CD8+ na iNKT dosud nebyly zcela jednoznačně definovány. NKG2D je normálně exprimován na všech NK, TCRγδ a TCRαβ CD8+ lymfocytech. Exprese na CD4+ Tαβ lymfocytech je však minoritní a její zvýšení je dáváno do souvislosti s přítomností autoimunitních onemocnění (revmatoidní artritida, granulomatóza s polyangiitidou, Sjögrenův syndrom, inzulin-dependentní diabetes mellitus) a také bylo popsáno u některých malignit [44]. Goronzy a Weyand [45] usuzují, že exprese NKG2D na CD4+ T lymfocytech reprezentuje senescentní efektor-paměťový fenotyp lymfocytů, který hraje roli v patogenezi chronických zánětlivých onemocnění, a může být tedy znakem vyčerpání po intenzivní *in vitro* expanzi.



Graf 3. Exprese CD25 na nespecificky aktivovaných MNC po kokultivaci s MSC/iNKT.
*** p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001**
CTRL – kontrola (odpovídá 100 % míry exprese CD25), iNKT – MNC po kokultivaci s invariantními NKT lymfocyty, MFI – *mean fluorescence intensity*, MNC – mononukleární buňky, MSC – MNC po kokultivaci s mesenchymálními kmenovými buňkami

Invariantní NKT a MSC buňky vykazují imunomodulační aktivitu a jsou schopné měnit stav T lymfocytů. Nespecifická stimulace zvýšila v našem experimentu expresi aktivačního markeru CD25 u všech dárců. Po kokultivaci s MSC či s iNKT došlo k poklesu aktivace, přičemž z hlediska míry poklesu CD25 nebyl mezi buněčnými typy prokázán významný rozdíl. Imunomodulační potenciál MSC vč. schopnosti inhibice exprese CD25 na aktivovaných lymfocytech *in vitro* byl již potvrzen v řadě studií [46]. Schmid et al. (2022) kokultivovali iNKT s alogenně aktivovanými dendritickými buňkami a také pozorovali pokles aktivačních markerů CD25 a CD69 na T-lymfocytech [47]. Doposud nejsou k dispozici studie zabývající se rozdíly v imunomodulačním potenciálu různých buněčných populací, nicméně existují již *in vitro* studie zaměřené na jejich společné podání a dosud získaná data ukazují, že by tento přístup mohl být velmi efektivní. Např. společné podání MSC a Treg vede k delšímu přežívání Treg a k zesílení jejich imnosupresivního potenciálu [48]. Z těchto výsledků usuzujeme, že jednotlivé buněčné populace by se mohly vzájemně podporovat, a vést tak k lepším výsledkům v léčbě GvHD. Do budoucna bude jistě přínosné vzájemné porovnání jednotlivých buněčných populací v léčbě potransplantačních komplikací, a to i v kontextu dalších buněčných typů, které se již využívají v rámci klinických studií (NK buňky, Treg, Tr1 regulační buňky, dendritické buňky aj.). Předpokládáme, že jednotlivé buněčné populace spolu nebudou soupeřit, ale mohou se naopak ve specifických situacích doplňovat.

ZÁVĚR

Naše studie prokázala, že je možné připravit velice čistou populaci iNKT buněk s dostatečnou imunomodulační kapacitou srovnatelnou s MSC, které jsou již využívány v klinické praxi. Vzhledem k výrazné heterogenitě těchto buněk je však nutné provést hlubší stanovení funkce iNKT a optimalizovat protokol pro přípravu autologních buněk. Invariantní NKT buňky představují slibnou léčebnou strategii v rámci terapie post-transplantačních komplikací.

Literatura

1. Passweg JR, Baldomero H, Chabannon C, et al. Hematopoietic cell transplantation and cellular therapy survey of the EBMT: monitoring of activities and trends over 30 years. Bone Marrow Transplant. 2021;56(7):1651–1664.
2. Daikeler T, Hügle T, Farge D, et al. Allogeneic hematopoietic SCT for patients with autoimmune diseases. Bone Marrow Transplant. 2009;44(1):27–33.
3. Hirano M, Martí R, Casali C, et al. Allogeneic stem cell transplantation corrects biochemical derangements in MNGIE. Neurology. 2006;67(8):1458–1460.
4. Gratwohl A, Pasquini MC, Aljurf M, et al. One million haemopoietic stem-cell transplants: a retrospective observational study. Lancet Haematol. 2015;2(3):e91–e100.
5. Holler E, Greinix H, Zeiser R. Acute graft-versus-host disease. In: Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, eds. The EBMT handbook: hematopoietic stem cell transplantation and cellular therapies. 7th ed. Springer; 2019. Zpřístupněno 30. prosince 2020. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553993/
6. Spierings E, Fleischhauer K. Histocompatibility. In: Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, eds. The EBMT handbook: hematopoietic stem cell transplantation and cellular therapies. 7th ed. Springer; 2019. Zpřístupněno 2. února 2022. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553927/
7. Appelbaum FR. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. Nature. 2001;411(6835):385–389.
8. Apostolova P, Zeiser R. The role of purine metabolites as DAMPs in acute graft-versus-host disease. Front Immunol. 2016;7:439.
9. Teshima T, Reddy P, Zeiser R. Acute graft-versus-host disease: novel biological insights. Biol Blood Marrow Transplant. 2016;22(1):11–16.
10. Grube M, Holler E, Weber D, Holler B, Herr W, Wolff D. Risk factors and outcome of chronic graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation – results from a single-center observational study. Biol Blood Marrow Transplant. 2016;22(10):1781–1791.
11. Arai S, Arora M, Wang T, et al. Increasing incidence of chronic graft-versus-host disease in allogeneic transplantation: a report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. Biol Blood Marrow Transplant. 2015;21(2):266–274.
12. Wagner W, Wein F, Seckinger A, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. Exp Hematol. 2005;33(11):1402–1416.
13. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood. 2005;105(4):1815–1822.
14. Maccario R, Podestà M, Moretta A, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. Haematologica. 2005;90(4):516–525.
15. Lysák D, Koutová L, Holubová M, Vlas T, Mikliková M, Jindra P. The quality control of mesenchymal stromal cells by in vitro testing of their immunomodulatory effect on allogeneic lymphocytes. Folia Biol (Praha). 2016;62(3):120–130.
16. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. Blood. 2007;110(10):3499–3506.
17. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. Lancet. 2004;363(9419):1439–1441.
18. Ringdén O, Uzunel M, Rasmusson I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. Transplantation. 2006;81(10):1390–1397.
19. Pérez-Simon JA, López-Villar O, Andreu EJ, et al. Mesenchymal stem cells expanded in vitro with human serum for the treatment of acute and chronic graft-versus-host disease: results of a phase I/II clinical trial. Haematologica. 2011;96(7):1072–1076.
20. Hashmi S, Ahmed M, Murad MH, et al. Survival after mesenchymal stromal cell therapy in steroid-refractory acute graft-versus-host disease: systematic review and meta-analysis. Lancet Haematol. 2016;3(1):e45–e52.
21. Kuylenstierna C, Björkström NK, Andersson SK, et al. NKG2D performs two functions in invariant NKT cells: direct TCR-independent activation of NK-like cytolysis and co-stimulation of activation by CD1d. Eur J Immunol. 2011;41(7):1913–1923.
22. Patterson S, Chaidos A, Neville DCA, et al. Human invariant NKT cells display alloreactivity instructed by invariant TCR-CD1d interaction and killer Ig receptors. J Immunol. 2008;181(5):3268–3276.
23. Cianferoni A. Invariant natural killer T cells. Antibodies. 2013;3(1):16–36.
24. Liao CM, Zimmer MI, Wang CR. The functions of type I and type II natural killer T (NKT) cells in inflammatory bowel diseases. Inflamm Bowel Dis. 2013;19(6):1330–1338.
25. Brennan PJ, Brigl M, Brenner MB. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. Nat Rev Immunol. 2013;13(2):101–117.
26. Godfrey DI, Kronenberg M. Going both ways: Immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. J Clin Invest. 2004;114(10):1379–1388.
27. Juno JA, Keynan Y, Fowke KR. Invariant NKT cells: regulation and function during viral infection. PLoS Pathog. 2012;8(8).

28. Wolf BJ, Choi JE, Exley MA. Novel approaches to exploiting invariant NKT cells in cancer immunotherapy. Front Immunol. 2018;9:384.
29. Najera Chuc AE, Cervantes LAM, Retiguin FP, Ojeda JV, Maldonado ER. Low number of invariant NKT cells is associated with poor survival in acute myeloid leukemia. J Cancer Res Clin Oncol. 2012;138(8):1427–1432.
30. Lam PY, Nissen MD, Mattarollo SR. Invariant natural killer T cells in immune regulation of blood cancers: harnessing their potential in immunotherapies. Front Immunol. 2017;8. Zpřístupněno 13. února 2022. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01355
31. Aoki T, Takami M, Takatani T, et al. Activated invariant natural killer T cells directly recognize leukemia cells in a CD1d-independent manner. Cancer Sci. 2020;111(7):2223–2233.
32. Jahnke S, Schmid H, Secker KA, et al. Invariant NKT cells from donor lymphocyte infusions (DLI-iNKTs) promote ex vivo lysis of leukemic blasts in a CD1d-dependent manner. Front Immunol. 2019;10. Zpřístupněno 13. února 2022. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.01542
33. Rubio MT, Moreira-Teixeira L, Bachy E, et al. Early posttransplantation donor-derived invariant natural killer T-cell recovery predicts the occurrence of acute graft-versus-host disease and overall survival. Blood. 2012;120(10):2144–2154.
34. Mavers M, Maas-Bauer K, Negrin RS. Invariant natural killer T cells as suppressors of graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Front Immunol. 2017;8.
35. Schneidawind D, Pierini A, Alvarez M, et al. CD4+ invariant natural killer T cells protect from murine GVHD lethality through expansion of donor CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. Blood. 2014;124(22):3320–3328.
36. Chaidos A, Patterson S, Szydlo R, et al. Graft invariant natural killer T-cell dose predicts risk of acute graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Blood. 2012;119(21):5030–5036.
37. Du J, Paz K, Thangavelu G, et al. Invariant natural killer T cells ameliorate murine chronic GVHD by expanding donor regulatory T cells. Blood. 2017;129(23):3121–3125.
38. Rotolo A, Caputo VS, Holubova M, et al. Enhanced anti-lymphoma activity of CAR19-iNKT cells underpinned by dual CD19 and CD1d targeting. Cancer Cell. 2018;34(4):596–610.
39. Zhang Y, Springfield R, Chen S, et al. α-GalCer and iNKT cell-based cancer immunotherapy: realizing the therapeutic potentials. Front Immunol. 2019;10:1126.
40. Zeng SG, Ghnewa YG, O'Reilly VP, et al. Human invariant NKT cell subsets differentially promote differentiation, antibody production, and T cell stimulation by B cells in vitro. J Immunol. 2013;191(4):1666–1676.
41. Montoya CJ, Pollard D, Martinson J, et al. Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. Immunology. 2007;122(1):1–14.
42. Tian G, Courtney AN, Jena B, et al. CD62L+ NKT cells have prolonged persistence and antitumor activity in vivo. J Clin Invest. 2016;126(6):2341–2355.
43. Siemaszko J, Marzec-Przyszlak A, Bogunia-Kubik K. NKG2D natural killer cell receptor – A short description and potential clinical applications. Cells. 2021;10(6):1420.
44. Sáez-Borderías A, Gumá M, Angulo A, Bellosillo B, Pende D, López-Botet M. Expression and function of NKG2D in CD4+ T cells specific for human cytomegalovirus. Eur J Immunol. 2006;36(12):3198–3206.
45. Goronzy JJ, Weyand CM. Rheumatoid arthritis. Immunol Rev. 2005;204:55–73.
46. Le Blanc K, Rasmusson I, Götherström C, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes. Scand J Immunol. 2004;60(3):307–315.
47. Schmid H, Ribeiro EM, Secker KA, et al. Human invariant natural killer T cells promote tolerance by preferential apoptosis induction of conventional dendritic cells. Haematologica. 2022;107(2):427–436.
48. Caplan HW, Prabhakara KS, Furman NET, et al. Human-derived Treg and MSC combination therapy may augment immunosuppressive potency in vitro, but did not improve blood brain barrier integrity in an experimental rat traumatic brain injury model. PLOS ONE. 2021;16(5):e0251601.

PODÍL AUTORŮ NA PŘÍPRAVĚ RUKOPISU

LH – příprava rukopisu, podíl na designu experimentu
KW – zpracování experimentu a části metodiky
MČ – grafické schéma, připomínkování a korektura rukopisu
DL – připomínkování a korektura rukopisu
PJ – připomínkování a korektura rukopisu
MH – design experimentu, připomínkování a korektura rukopisu

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Autoři práce prohlašují, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku nejsou ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou.

PODĚKOVÁNÍ

Práce byla podpořena projektem institucionálního výzkumu MZČR – FNPI, 00669806.

Doručeno do redakce dne: 24. 3. 2022.
Přijato po recenzi dne: 16. 5. 2022.

MUDr. Lenka Hejretová
Hematologicko-onkologické oddělení
Fakultní nemocnice v Plzni
alej Svobody 80
304 60 Plzeň-Lochotín
e-mail: lenka.hejretova@gmail.com