

PREVENIREA ȘI TRATAMENTUL REJEȚIEI ÎN TRANSPLANTUL DE ORGANE

Rodica Ciubotariu*

REZUMAT

O importantă deficiență în cercetările clinice de transplant este rejecția acută sau cronică. În ultima decadă o nouă generație de medicamente imunosupresoare a determinat creșterea supraviețuirii. În articolul de față sunt discutate aspecte recente privind imunosupresia la bolnavii cu transplant.

Cuvinte cheie: ciclosporină, tacrolimus, rapamicină.

Ultimele decade ale acestui secol se caracterizează prin creșterea numărului de operații de transplant de organe, lucru ce se acompaniază de un imens interes în dezvoltarea medicației care să prevină și/sau să trateze fenomenul complex al rejecției grefei, în centrul interesului plasându-se evident medicația imunosupresoare (1 - 3).

În anii 1950, imunosupresia se limitează la corticoizi și aztioprină. Antilinfocitele policlonale și globulinele antileucocite au apărut în anii '60. Anii 1970 au însemnat o adevărată revoluție în imunosupresie prin apariția ciclosporinei, primul din a doua generație de imunosupresoare selective.

În 1980, centrul de greutate s-a transferat asupra agenților biologici, mai ales asupra anticorpilor monoclonali, unul din aceștia, anticorpul anti CD3 - OKT3, câștigând o largă folosire terapeutică (15 - 17).

În fine, începutul anilor 1990 a dus la descoperirea celei de-a treia generații de imunosupresoare, multe dintre ele având un mecanism și un situs de acțiune specific. Cel puțin 6 dintre aceștia sunt testați actualmente în studii clinice controlate (15).

Cercetările din acest domeniu sunt în plină desfășurare, urmărindu-se descoperirea de noi molecule specifice cum ar fi spre exemplu agoniști - antagoniști de TCR, etc.

Perspective terapeutice

Există **2 strategii majore** care încearcă să elimine sau să întârzie rejecția:

- Supresarea sistemului imunitar al recipientului.
- Scăderea imunogenității grefei.

Medicația imunosupresoare se adresează primei strategii. Supresia medicamentoasă rămâne pentru moment elementul cheie pentru prevenția sau tratamentul rejecției.

Mecanismele imunologice vizate de medicația imunosupresoare sunt:

- Inhibarea sau liza celulelor T

ABSTRACT

Prevention and treatment of rejeete in transplant organ

A major goal of clinical transplant research has been prevention of graft loss to acute and/or chronic rejection.

In the last decade the new generation of immunosuppressive drugs and associated patient care improvements have resulted in increased patient and graft survival. In the following article we will discuss recent aspects of immunosuppression in transplant patients.

Key words: Ciclosporine, tacrolimus, rapamicine.

- Inhibarea celulelor B și Ac preformați
- Inducerea toleranței recipientului față de greafă.

Inhibarea celulelor T

Corticoizii

Pentru corticoizi, în imunosupresie au fost propuse 2 mecanisme de acțiune:

a) Primul se referă la lizarea selectivă a celulelor T prin **activarea unor endonucleaze** care clivează selectiv ADN-ul. Punctul slab al acestui mecanism propus constă în faptul că, corticoizii nu lizează leucocitele sau celulele T mature izolate din sânge sau din organele periferice.

b) Un al doilea mecanism propus, care pare pentru moment mai aproape de adevăr, este acțiunea de a **bloca transcripția** genei pentru citokine și de a **bloca secreția** de citokine din fagocite.

Inhibarea secreției de IL1, IL6, TNF α de către glucocorticoizi, a fost demonstrată atât *in vivo* cât și *in vitro*. Lipsa de IL1 și TNF α va limita dezvoltarea reacțiilor inflamatorii. De asemenea, corticoizii afectează producția de IL2 de către celulele T activate, dar acest efect pare să nu se producă la dozele terapeutice folosite în imunosupresie.

Toxinele metabolice

Aztiopirina și ciclofosfamida inhibă creșterea și dezvoltarea limfocitelor (și a altor leucocite!) din precursori hematologici, și probabil că determină și liza preferențială a celulelor T.

Ciclosporina, tacrolimus (FK506), rapamicină

Cel mai important imunosupresiv folosit la ora actuală este **ciclosporina A** sau pe scurt, ciclosporina, descoperită în urmă cu 20 de ani. Este o peptidă ciclică, metabolit natural al unor specii de fungi. În linii mari și foarte generale mecanismul său de acțiune este de a inhiba transcripția unor gene, cel mai important părănd a fi inhibiția genei pentru IL2.

* Dr. Rodica Ciubotariu - Asistent Catedra de Farmacologie Fac. de Medicină U.M.F. Carol Davila București

Este folosită actualmente pentru prevenția și tratamentul rejecției grefei; de asemenea a îmbunătățit substanțial rata de supraviețuire post transplant de măduvă.

Tacrolimus, cel de-al doilea imunosupresor din această „familie” a fost descoperit în urmă cu 15 ani. A fost aprobat de FDA pentru prevenția și tratamentul rejecției la pacienții cu transplant hepatic și este în studii pentru tratamentul GVHD („graft versus host disease”) la pacienții cu transplant medular.

Ciclosporina și tacrolimus (FK 506) exercită efecte similare asupra limfocitelor. Ambii agenți inhibă „signal transduction pathway” (calea de semnalizare celulară) caracterizată de o creștere a Ca^{++} liber intracelular. Pentru limfocitele T, aceasta conduce la o inhibiție a transcripției limfokinelor și a altor gene esențiale pentru funcția și proliferarea acestor celule. Ambele medicamente își exercită acțiunea numai după legarea de receptori distincți, localizați în interiorul celulei și care poartă denumirea de *imunofiline*. O dată legate de imunofiline, complexul medicament + receptor acționează asupra unei ținte comune intracelulare: o *serintreanin - fosfatază* denumită *calcineurină* (calciu - calmodulin protein fosfatază activată).

Tacrolimus pare mai potent decât **ciclosporina**. Ambele par să aibă, datorită mecanismul de acțiune, profile de toxicitate similare, dar totuși nu identice. Din păcate administrarea fiecăruia dintre aceste două medicamente se asociază cu apariția de efecte adverse redutabile, incluzând toxicitate sistemică renală și nervos centrală. De aceea, folosirea lor în administrare cronică este limitată.

Rapamicina este cel de-al treilea compus al acestei „quasi familii”, care inhibă proliferarea celulelor T. A fost izolat în 1975 din tulpina de „*Streptomyces hygrosopicus*”.

Din punct de vedere structural este un antibiotic (făcând parte din clasa macrolidelor, deci destul de apropiat de eritromicină), fiind asemănător structural cu tacrolimus, cu care de altfel împarte și același sediu de legare. Mecanismul prin care inhibă activarea limfocitelor T este însă diferit, **rapamicina** inhibând calea de „signal transduction” care duce la proliferarea celulară, independent de concentrația intracelulară de calciu. La nivelul celulelor T, **rapamicina** inhibă proliferarea limfokin - dependentă, fără însă să afecteze procesul de transcripție al genelor de limfokine.

Mecanismul de acțiune al tuturor acestor trei medicamente este strâns legat de **imunofiline**. Membrii ai familiei imunofilinelor, pe scara filogenetică sunt foarte bine conservați, sugerând prezumția că pot avea funcții celulare foarte importante. Toate imunofilinele sunt capabile să catalizeze *izomerizarea cis-trans* în jurul legăturilor peptidil - prolil, ceea ce este cunoscut și definit ca *activitate rotamazică*. Se presupune că această activitate rotamazică servește la reglarea „folding”-ului proteinelor și a circulației lor între diferitele tipuri de celule.

Imunofilinele se clasifică în clase distincte:

- *ciclosporina* se leagă de familia ciclofilinelor (CyP)
- în vreme ce *tacrolimus* și *rapamicina* se leagă de proteina de legare pentru tacrolimus („FK506 binding protein” sau FKBP).

Aceste două clase sau familii de imunofiline nu prezintă analogie structurală sau secvențială. Ciclosporina inhibă activitatea rotamazică a CyP, în vreme ce tacrolimus și rapamicina inhibă activitatea rotamazică a FKBP.

Ceea ce este deosebit de interesant este că nu această activitate de inhibiție a rotamazei conferă proprietățile imunosupresoare. Mai degrabă s-ar putea spune că agentul

imunosupresor acționează ca **prodrug**. Complexul format între medicament și „*immunofilin - binding protein*” conduce la sinteza unui inhibitor activ al unei căi de „signal transduction” (18, 20).

Ținta moleculară pentru complexul *ciclosporina - CyP* este aceeași ca și pentru tacrolimus - FKBP și este **calcineurina**, în vreme ce pentru *rapamicina - FKBP* este diferită și este reprezentată de membri ai familiei de proteine TOR (18, 19).

Calcineurina; rol în activarea celulelor T

Atât ciclosporina cât și tacrolimusul inhibă, după cum am menționat pe scurt anterior, mecanismele de activare celulară dependente de Ca^{++} intracelular, sugerând că aceste medicamente ar putea afecta evenimente asociate cu o creștere a nivelului de Ca^{++} intracelular (20, 22).

Nici ciclosporina, nici tacrolimus, singure nu au nici un efect în eliberarea inozitoltrifosfat-ului în activarea PKC, sau în modificarea intracelulară a calciului. Totuși, complexe de ciclosporina - CyP sau tacrolimus - FKBP se leagă de trei proteine din extractul de creier sau timus bovin. Două dintre aceste trei proteine au fost identificate și sunt subunitățile A și B ale calcineurinei, o *serin - treonin fosfatază* Ca^{++} - calmodulin dependentă. Cea de-a treia proteină a fost identificată și ea, fiind chiar calcineurina.

Faptul că ținta ciclosporinei - CyP și tacrolinus - FKBP este această Ca^{++} - calmodulin fosfatază explică selectivitatea acestor medicamente pentru căile de „signal-transduction” dependente de Ca^{++} (18).

Inhibiția calcineurinei se corelează cu inhibiția producției de limfokine la nivelul celulelor T, când acestea sunt activate via complexe TCR - CD3 (20). Mai mult, studii ale analogilor sintetici ai ciclosporinei și tacrolimusului au arătat o strânsă corelație între inhibiția activității calcineurinei și efectul imunosupresor.

Deci până în momentul de față este unanim acceptat ca, **calcineurina** este ținta comună a complexelor ciclosporinei și tacrolimusului. Ceea ce se știe mai puțin este ceea ce se întâmplă în aval de calcineurină („downstream”). Se presupune că calcineurina activată este necesară pentru a activa componenta citoplasmatică a factorului de transcripție NFAT („nuclear factor of activated T cells”). NFAT este important pentru inducerea unui număr important de gene pentru limfocite. Pe scurt în acest fel va fi **blocată activarea NFAT și transcripția IL2** și a genelor altor citokine, ceea ce va conduce la blocarea proliferării și diferențierii celulelor T dependente de IL2.

S-a mai sugerat de asemenea că ar mai putea exista și alte substraturi, posibile ținte pentru calcineurină, aparte de NFAT. **Nitric oxid sintetaza** (a cărei funcție la nivelul limfocitelor nu a fost pe deplin elucidată) poate servi ca țintă pentru calcineurină.

Revenind la **rapamicină** și la mecanismul ei de acțiune, reamintim că acest antibiotic nu afectează concentrația intracelulară de calciu, neavând drept țintă calcineurina, și de asemenea nu afectează transcripția genelor pentru limfokine. Acționează însă la nivelul ciclului celular, afectând mecanismul de semnalizare intracelulară, legat de factorii de creștere („growth factor - mediated signaling pathway”). Împărțind cu **tacrolimus** același sediu de legare, între aceste două medicamente există competiție pentru sediu

de legare (13).

Dacă efectele ciclosporinei și ale tacrolimus se limitează la celulele hematopoetice, rapamicina acționează și asupra altor celule.

Răspunsul celulelor la factorii de creștere și la alți stimuli mitogeni este afectat în prezența rapamicinei; de aceea primele eforturi de elucidare a mecanismului de acțiune a rapamicinei s-au concentrat asupra evenimentelor celulare ce urmau imediat stimulării cu GF. Legarea de receptorii factorilor de creștere (GFRs) este urmată de tirozinfosforilarea a numeroase substraturi proteice celulare via PTK și de activarea ulterioară a MAP-kinazei („mitogen activated kinaze“).

Studii recente de biochimie au arătat că aceste procese nu sunt afectate de rapamicina. Fosforilarea subunității ribozomale 40 s care apare mai târziu via „GF signaling“ (semnalizarea celulară produsă de GF) este mediată de membri ai familiei „S6 proteinkinaze“ și se crede că determină o sinteză mai eficientă a proteinelor implicate în reglarea ciclului celular (15).

Au fost identificate două familii de S6 kinaze: familia p70 S6 kinaza și p85 (rsk) S6 kinaza. Activitatea p70 S6 kinazei, dar nu și a p85 S6 kinazei este inhibată de rapamicină, iar la nivelul celulelor T această inhibiție a fost corelată cu inhibiția proliferării celulare (18).

Deoarece rapamicina inhibă proliferarea produsă de GF și proliferarea indusă și de alți diverși mitogeni, s-a investigat efectul acestui medicament asupra ciclului celular. S-a constatat că produce blocarea trecerii de la G1 - S, atât la mamifere cât și la tulpinile de *Sacharomyces cerevisiae*. La nivelul acestor fungi au fost identificate țintele complexului R-FKBP; două gene TOR1 (DRR1) și TOR2 (DRR2). Mutantele lor conferă rezistența la rapamicină. Partea carboxiterminală, atât a TOR1 cât și a TOR2 prezintă homologie structurală importantă cu lipidkinaza fosfadilinozitol PI3-kinaza. Totuși prezența activității kinazice pentru TOR nu a fost încă stabilită. De asemenea nu se cunoaște exact nici funcția PI kinazelor. Actualmente se crede că ar funcționa ca mesageri secunzi implicați în semnalizarea celulară.

Multiple studii se centrează pe elucidarea activității enzimatice a TOR proteinelor și pe determinarea efectelor rapamicinei la nivel celular.

Aplicații clinice ale terapiei imunosupresoare cu ciclosporină, tacrolimus și rapamicină

Introducerea ciclosporinei în transplantul de organe a revoluționat acest domeniu scăzând evident incidența rejecției grefei. Din păcate însă, efectele adverse apărute la administrarea cronică de ciclosporină, dintre care menționăm: toxicitate renală, toxicitate SNC, hiperglicemie, hirsutism, limitează folosirea ei pentru terapia de durată. Mai mult, menținerea acestei stări de imunosupresie pe perioade lungi de timp a dus la creșterea frecvenței și gravității complicațiilor infecțioase.

Tacrolimus a fost introdus mai recent în terapeutică. Două studii prospective, randomizate, multicentrice, care au comparat eficacitatea tacrolimusului vs. ciclosporină în transplantul de ficat au dus la aprobarea folosirii lui în acest tip de transplant. Ambele studii au avut înrolați mai mult de 500 de pacienți fiecare și au ajuns la aceleași concluzii

(14). Un alt studiu efectuat în S.U.A. a concluzionat că administrarea de tacrolimus se asociază cu o rată de supraviețuire a grefei de 82%, comparativ cu 79%, rata de supraviețuire a grefei la administrarea de ciclosporină, demonstrând echivalența ambilor agenți terapeutici (13).

Scopul inducerii imunosupresiei la recipientii grefei medulare este mai complex decât în alte tipuri de transplanturi de organe. Se încearcă prin această terapie nu numai prevenirea rejecției grefei, dar și situația inversă, în care greva reacționează împotriva donorului, conducând la ceea ce se numește GVHD („graft versus host disease“). GVHD reprezintă o cauză semnificativă de morbiditate și mortalitate la recipientii de transplant medular. Ciclosporina se folosește deja „tradițional“ pentru profilaxia și tratamentul GVHD, dar la fel ca și în celelalte tipuri de transplant se însoțește de o importantă toxicitate.

Mai multe studii, nerandomizate, care au implicat un număr nu foarte mare de pacienți au arătat că tacrolimus poate preveni instalarea GVHD, corelat cu un nivel al toxicității acceptabil.

Studii clinice randomizate se află acum în faza a III-a, urmărind evaluarea rolului acestui medicament în prevenirea și tratamentul GVHD în transplantul medular.

Aprobarea folosirii tacrolimusului în transplantul hepatic conferă terapeutului cel puțin o opțiune în tratamentul și prevenția rejecției dar, din păcate, administrarea lui se acompaniază și ea de numeroase reacții adverse.

Mai mult, pentru ca tacrolimus și ciclosporina au aceeași țintă intracelulară, administrarea simultană a acestor două medicamente nu va crește beneficiul terapeutic, în schimb va crește frecvența și gravitatea reacțiilor adverse.

În aceeași ordine de idei, deoarece rapamicina are altă țintă moleculară, și de aceea un alt mecanism de acțiune, s-ar putea administra concomitent cu ciclosporina sau tacrolimus.

Studii preliminare au arătat eficacitatea rapamicinei administrată în monoterapie, în prelungirea supraviețuirii grefei în transplantul cardiac, pancreaticoduodenal și renal. De asemenea merită subliniat că, deoarece rapamicina inhibă proliferarea celulelor T într-un stadiu mai tardiv decât ciclosporina sau tacrolimus, există șansa controlării rejecției grefei rezistente la ciclosporină sau tacrolimus.

După cum am mai menționat, rapamicina este singurul medicament dintre cele trei care inhibă proliferarea și a unor celule nehematopoetice, ca de exemplu a mușchiului neted vascular, prevenind restenozarea post angioplastie. De asemenea se încearcă folosirea rapamicinei în unele boli autoimune, deocamdată pe animal.

BIBLIOGRAFIE

1. Arkonak B., Hosenpund. 1997. Pathogenesis of cardiac allograft vasculopathy (Chronic rejection). *The transplantation and replacement of thoracic organs*, 321 - 331
2. Hosenpund J., C.R. Wagner. 1992. Cardiac allograft vasculopathy: current concepts, recent developments, and future direction. *J. Heart Lung Transpl.* 11, 9
3. Billingham M. 1987. Cardiac transplant atherosclerosis. *Transplant Proc.* 19 supplement 5, 19.
4. Liu G., J. Butany. 1992. Morphology of graft arteriosclerosis in cardiac transplantation. *Hum. Pathology* 23, 768.
5. Keogh A., H. Hunt. 1991. Predictors of proximal epicardial artery disease after heart transplantation. *J. Heart*

REFERATE GENERALE

Lung Transplantation 10, 188 - 189.

6. **Miller L.W.** 1992. Transplant coronary artery disease. (Editorial) *J. Heart Lung Transplant* 11, S1.

7. **Tzucu M.E., R. Hobbs, G. Rincon.** 1995. Occult and frequent transmission of atherosclerotic coronary disease with cardiac transplantation, insights from intravascular ultrasound. *Circulation*. 91, 1706.

8. **Dressler F.A., L.W. Miller.** 1992. Necropsy versus angiography: how accurate is angiography? *J. Heart Lung Transpl.* 11, S56

9. **Anderson T.J., I.T. Meredith, A. Uehta.** 1993. Functional significance of intimal thickening as detected by intravascular ultrasound early and late after cardiac transplantation. *Circulation* 88, 1093.

10. **Heroux A.L., M.R. Constanzo.** 1994. Intracoronary ultrasound assessment of morphological and functional abnormalities associated with cardiac vasculopathy. *Circulation*. 89, 272.

11. **Wagner C.R., R.M. Veto, D.R. Burger.** 1984. The mechanisms of antigen presentation by endothelial cells. *Immunobiology*. 168. 453 - 459.

12. **Russell M.L., C.M. Chase, R.B. Corvin.** 1994. Coronary arteriosclerosis in mouse hearts: importance of humoral immunity. *J. Immunol.* 152, 5135 - 5142.

13. **Matas A.** 1996. Chronic allograft rejection - Definition and clinical laboratory correlates. *Principles of Drug Development in Transplantation and Autoimmunity*, 549 - 553.

14. **Hayry P., A. Mennander et al.** 1993. Pathophysiology of vascular wall changes in chronic allograft rejection. *Transplantation Review* 7, 1-20.

15. **Schmid C., H. Azuma, N. Tilney.** 1996. *Principles of Drug Development in Transplantation and Autoimmunity*, 21 - 27

16. **Berry G., M. Billingham.** 1996. Rejection of the cardiac allograft: current morphologic criteria and

classification. *Principles of Drug Development in Transplantation and Autoimmunity*, 530 - 537.

17. **Hafner D.** 1995. Immunologic mechanism and therapy in multiple sclerosis. *Immunological Reviews*. 144, 75 - 107.

18. **Croft M., C. Dubey.** 1997. Accessory molecules and costimulation requirements for CD4 T cell responses. *Critical immunological reviews*. 17, 89 - 118.

19. **Bradley L.M., M. Croft, S.L. Swain.** 1993. T-cell memory: new perspectives. *Immunology Today* 14, 197 - 204.

20. **Dubey C., M. Croft.** 1995. Costimulatory requirements of naive CD4 T cells. *ICAM1 and B7. J Immunology*.

21. **Azuma M., K. Okumura, C. Somoza.** 1993. B7 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature*. 366, 76 - 80.

22. **Damle N.K., A. Arrufo.** 1992. Differential costimulatory effects of adhesion molecules B7, ICAM1, LFA-3, and VCAM-1, on resting and antigen primed CD4 T cell. *J. Immunol.* 148, 1985 - 1998.

23. **Harding F.A., J.A. Gross, J.P. Allison.** 1992. CD28 mediated signaling co-stimulates murine T cells and prevent induction of anergy in T and cell clones. *Nature*, 356, 607 - 612

24. **Hatchcock K.J., R.J. Hodes.** 1993. Identification of an alternative CTLA-4 ligand costimulatory for T cell activation.

25. **Hurtado J.C., B.S. Kwon.** 1995. Potential role of 4-BB in T cells activation. Comparison with the costimulatory molecule CD28. *J. Immunol.* 155. 3360 - 3372.

26. **June C.H., J.A. Ledbetter, P.S. Linsley.** 1990. Role of CD28 receptor in T cell activation. *Immunology Today*, 11. 211 - 218

27. **Lenscow D.J., J.A. Bluestone.** 1993. Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4. *Proc. Acad. Sci.* 90, 11054 - 11062

MEMOMED '98

Memorator comentat al medicamentelor de uz uman înregistrate în România

*Prof. Dr. Doc. Dumitru Dobrescu, Prof. Dr. Emanoil Manolescu, Farm. primar Victoria Subțirică,
Dr. medic Anca Drăgan, Farm. specialist Cristina Ivan, Medic primar Liliana Dobrescu,
Medic primar Ioana Alina Anca
Editura Minesan, București 1998, 904 pagini*

Lucrarea este la a patra ediție, primele trei ediții au apărut în 1995, 1996, 1997 bucurându-se de o largă apreciere. Este de remarcat că ediția 1996 a fost în topul cărților medicale.

Pentru fiecare grupă de medicamente sunt prezentate caracteristicile generale: farmacodinamice, farmacocinetice, toxicologice, terapeutice și în continuare produsele înregistrate în țară. Pentru fiecare medicament este dată denumirea comună internațională ca și diversele denumiri comerciale, casele producătoare, amănunte privind acțiunile, indicațiile, reacțiile adverse, posologie, formele farmaceutice.

Volumul reprezintă un instrument de lucru esențial, comod, pentru medicul practicant din diferite specialități ca și pentru farmacist.

Lucrarea se poate procura de la tonetele de stradă ale distribuitorilor de carte din principalele orașe. Prețul unui exemplar este de 40.000 lei.

Redacția