

Gdański Uniwersytet Medyczny

Karolina Gołąb

**Indukcja tolerancji immunologicznej  
w przeszczepie wysp trzustkowych**

ROZPRAWA NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

Gdańsk 2015

Pracę wykonano w Katedrze Chirurgii Uniwersytetu Chicago we współpracy z Pracownią Immunoregulacji i Terapii Komórkowych Katedry Medycyny Rodzinnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz firmą CELLT spółką z o.o. pod kierownictwem:

- Dr hab. n. med. Natalii Marek-Trzonkowskiej – Promotora pracy
- Dr hab. med. Piotra Witkowskiego – Kopromotora pracy

Praca została sfinansowana z funduszu Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (Projekt STRATEGMED1/233368/1/NCBR/2014) oraz ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2011/01/NZ3/00262 i ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego przyznanych na realizację grantu Iuventus Plus nr IP2011 033771

Pragnę serdecznie podziękować:

Promotorowi - Dr hab. n. med. Natalii Marek-Trzonkowskiej z Pracowni Immunoregulacji i Terapii Komórkowych Katedry Medycyny Rodzinnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za wdrożenie w „świat komórek T regulatorowych”, opiekę merytoryczną od samych początków realizacji badań, których wyniki zostały przedstawione w publikacjach zawartych w niniejszej rozprawie oraz za wsparcie, serdeczność, cierpliwość oraz za poświęcony czas i nieocenioną pomoc już przy samym otwarciu przewodu doktorskiego i składaniu pracy do recenzji.

Kopromotorowi - Dr hab. med. Piotrowi Witkowskiemu – Dyrektorowi Programu Przeszczepiania Wysp Trzustkowych w Katedrze Chirurgii Uniwersytetu w Chicago za umożliwienie realizacji badań naukowych w ramach zatrudnienia w zespole, którego jest dyrektorem, opiekę merytoryczną, motywację do rozwoju naukowego, udzielone zaufanie, szczególnie przy kierowaniu izolacjami wysp trzustkowych oraz pomoc i wsparcie przy pojawiających się problemach.

Pracownikom Pracowni Immunoregulacji i Terapii Komórkowych Katedry Medycyny Rodzinnej oraz Zakładu Immunologii Klinicznej i Transplantologii Katedry Immunologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za owocną współpracę, życzliwość, niezwykle cenną wymianę myśli i spostrzeżeń, a w szczególności:

- Kierownikowi Zakładu Immunologii Klinicznej i Transplantologii: Prof. dr. hab. med. Piotrowi Trzonkowskiemu za naukowe wsparcie, wskazówki i uwagi dotyczące planowania doświadczeń i interpretacji wyników.
- Dr n. biol. Adamowi Krzystyniakowi za pomoc w realizacji badań, owocne dyskusje dotyczące wyników i podczas przygotowywania publikacji prezentowanych w niniejszej rozprawie.

Koleżankom i Kolegom z Zespołu Izolacji i Transplantacji Wysp Trzustkowych Katedry Chirurgii Uniwersytetu w Chicago za owocną współpracę, wszechstronną pomoc i rady w trakcie wykonywania badań i stworzenie przyjaznej, rodzinnej atmosfery pracy.

Rodzinie i osobom bliskim za wyrozumiałość względem mojego poświęcania codziennego czasu pracy oraz wiarę we mnie i upewnianie, że to, nad czym naukowo pracuję ma sens i duże znaczenie.



## SPIS TREŚCI

<b>WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW .....</b>	<b>6</b>
<b>WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ .....</b>	<b>8</b>
<b>1. WPROWADZENIE.....</b>	<b>10</b>
1.1. TRZUSTKA I FUNKCJA WYSP TRZUSTKOWYCH .....	10
1.2. CUKRZYCA TYPU 1.....	10
1.3. PRZESZCZEP TRZUSTKI W CUKRZYCY TYPU 1 .....	11
1.4. PRZESZCZEP WYSP TRZUSTKOWYCH JAKO ALTERNATYWNA METODA TERAPII CUKRZYCY TYPU 1 .....	12
1.4.1. <i>Historia i obecny status przeszczepu wysp trzustkowych.....</i>	<i>12</i>
1.4.2. <i>Metoda izolacji wysp trzustkowych.....</i>	<i>14</i>
1.4.3. <i>Czynniki wpływające na powodzenie izolacji i przeszczepu wysp trzustkowych.....</i>	<i>16</i>
1.4.4. <i>W kierunku nowych metod indukcji tolerancji immunologicznej w przeszczepie wysp trzustkowych .....</i>	<i>24</i>
<b>2. CELE PRACY .....</b>	<b>32</b>
<b>3. NAJWAŻNIEJSZE SPOSTRZEŻENIA Z PREZENTOWANYCH PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.....</b>	<b>33</b>
3.1. WZROST DAWCY TRZUSTKI JAKO DODATKOWY CZYNNIK PRZY WYBORZE ODPOWIEDNIEGO DAWCY, WPŁYWAJĄCY NA POWODZENIE IZOLACJI WYSP TRZUSTKOWYCH.....	33
3.2. KOMÓRKI T REGULATOROWE JAK NARZĘDZIE TERAPEUTYCZNE DO INDUKCJI TOLERANCJI IMMUNOLOGICZNEJ W PRZESZCZEPIE WYSP TRZUSTKOWYCH .....	36
3.3. OPTIMALIZACJA EKSPANSJI KOMÓREK T REGULATOROWYCH POPRZEZ DOBÓR ODPOWIEDNIEJ POŻYWKI HODOWLANEGO .....	38
3.4. KRIOPREZERWACJA KOMÓREK T REGULATOROWYCH NA SKALĘ KLINICZNĄ – PROBLEMY I WYZWANIA .....	42
3.5. WPŁYW WYBRANYCH LEKÓW IMMUNOSUPRESYJNYCH NA KOMÓRKI T REGULATOROWE .....	47
3.6. METODA LOKALNEJ IMMUNOPROTEKCJI WYSP TRZUSTKOWYCH Z WYKORZYSTANIEM KOMÓREK T REGULATOROWYCH I JEJ OPTIMALIZACJA .....	50
<b>4. WNIOSKI .....</b>	<b>56</b>
<b>5. WYKAZ CYTOWANEGO PIŚMIENNICTWA .....</b>	<b>57</b>
<b>6. STRESZCZENIA PRAC / ABSTRACTS.....</b>	<b>78</b>

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- AMP** – adenozymonofosforan  
**APC** – *Antigen Presenting Cell* / komórka prezentująca antygen  
**ATG** – *Anti-Thymocyte Globulin* / globulina antytymocytna  
**BMI** – *Body Mass Index* / wskaźnik masy ciała  
**CCL22** – Chemokine (C-C motif) ligand 22 / chemokina 22 typu C-C  
**CCR5** – *Chemokine (C-C motif) receptor 5* / receptor 5 chemokin typu C-C  
**CITR** – *Collaborative Islet Transplant Registry* / Centralny Rejestr Przeszczepu Wysp  
**CFSE** – *Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester* / ester sukcynoimidu dioctanu karboksyfluoresceiny  
**CsA** – *Cyclosporine A* / cyklosporyna A  
**CTLA-4** – *Cytotoxic T Cell Antigen 4* / antygen 4 związany z cytotoksycznymi limfocytami T  
**CXCL8** – *C-X-C Chemokine Ligand 8* / chemokina 8 typu C-X-C  
**CXCL12** – *C-X-C Chemokine Ligand 12* / chemokina 12 typu C-X-C  
**FBS** – *Fetal Bovine Serum* / bydlęca surowica płodowa  
**GvHD** – *Graft versus Host Disease* / choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi  
**GLP** – *Good Laboratory Practice* / dobra praktyka produkcyjna  
**HbA<sub>1c</sub>** – glikowana hemoglobina  
**HS** – *Human Serum* / surowica ludzka  
**HSC** – *Hematopoietic Stem Cell* / hemapoetyczna komórka macierzysta  
**IBD** – *Inflammatory Bowel Diseases* / nieswoiste zapalenia jelit  
**IDO** – *Indoleamine 2,3-dioxygenase* / 2,3- dioksygenaza indoloaminy  
**IDS** – *Islet Donor Score* / punktowa ocena dawcy trzustki  
**IEQ** – *Islet Equivalent* / ekwiwalent wysp trzustkowych  
**IFN- $\gamma$**  – Interferon gamma  
**IL-1, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-10, IL-35** – Interleukina odpowiednio: -1, -1 $\beta$ , -2, -3, -4, -10, -35  
**IPEX** – *Immunodysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked syndrome* / sprzężony z chromosomem X zespół dysregulacji immunologicznej, poliendokrynopatii i enteropatii  
**JDRF** – *Juvenile Diabetes Research Foundation* / Fundacja na rzecz Badań nad Cukrzycą Młodzieńczą  
**LAG3** – *Lymphocyte-Activation gene 3* / gen 3 aktywacji limfocytów  
**LFA-1** – *Lymphocyte Function-Associated Antigen 1* / antygen 1 związany z funkcją limfocytów  
**MHC** – *Major Histocompatibility Complex* / główny układ zgodności tkankowej  
**MMF** – *Mycophenolate Mofetil* / mykofenolan mofetylu  
**MSC** – *Mesenchymal Stem Cell* / mezenchymalna komórka macierzysta

- mTOR** – *Mammalian Target of Rapamycin* / ssaczy cel rapamycyny
- NK** – *Natural Killer cell* / komórka naturalny zabójca
- NOD** – *Non-Obese Diabetic mice* / myszy zapadające na cukrzycę pomimo braku otyłości; zwierzęcy model cukrzycy typu 1
- PBMC** – *Peripheral Blood Mononuclear Cells* / jednojądrzaste komórki krwi obwodowej
- TCR** – *T Cell Receptor* / receptor limfocytów T
- TGF- $\beta$**  – *Transforming Growth Factor beta* / transformujący czynnik wzrostu beta
- TNF- $\alpha$**  – *Tumor Necrosis Factor alpha* / czynnik martwicy nowotworów alfa
- TSDR** – *T<sub>reg</sub>-specific-demethylated region* / demetylowany region specyficzny dla komórek Treg
- UNOS** – *United Network for Organ Sharing* / *Sieć Współdzielenia Organów do Transplantacji* – sieć zarządzająca systemem transplantacji organów w Stanach Zjednoczonych

**WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY  
DOKTORSKIEJ**

1. Wang LJ., Cochet O., Wang XJ., Krzystyniak A., Misawa R., **Gołab K.**, Tibudan M., Grose R., Savari O., Millis JM., Witkowski P. **Donor height in combination with islet donor score improves pancreas donor selection for pancreatic islet isolation and transplantation.** *Transplant Proc.* 2014, 46, 6, 1972-1974.

Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik IF: **0,984**  
Punktacja ministerstwa: **15,000**

2. Krzystyniak A., **Gołab K.**, Witkowski P., Trzonkowski P. **Islet cell transplant and the incorporation of Tregs.** *Curr Opin Organ Transplant.* 2014, 19, 6, 610-615.

Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik IF: **2,379**  
Punktacja ministerstwa: **25,000**

3. **Gołab K.**, Krzystyniak A., Marek-Trzonkowska N., Misawa R., Wang LJ., Wang X., Cochet O., Tibudan M., Langa P., Millis JM., Trzonkowski P., Witkowski P. (2013) **Impact of culture medium on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>lo/neg</sup> Treg expansion for the purpose of clinical application.** *Int. Immunopharmacol.* 2013, 16, 3, 358-363.

Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik IF: **2,711**  
Punktacja ministerstwa: **30,000**

4. **Gołab K.**, Leveson-Gower D., Wang XJ., Grzanka J., Marek-Trzonkowska N., Krzystyniak A., Millis JM., Trzonkowski P., Witkowski P. **Challenges in cryopreservation of regulatory T cells (Tregs) for clinical therapeutic applications.** *Int Immunopharmacol.* 2013, 16, 3, 371-375.

Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik IF: **2,711**  
Punktacja ministerstwa: **30,000**

5. Wang XJ., Leveson-Gower D., **Gołab K.**, Wang LJ., Marek-Trzonkowska N., Krzystyniak A., Wardowska A., Millis JM., Trzonkowski P., Witkowski P. **Influence of pharmacological immunomodulatory agents on CD4(+)CD25(high)FoxP3(+) T regulatory cells in humans.** *Int Immunopharmacol.* 2013, 16, 3, 364-370.



9 Wykaz prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

---

Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik IF: **2,711**  
Punktacja ministerstwa: **30,000**

6. Marek N., Krzystyniak A., Ergenc I., Cochet O., Misawa R., Wang LJ., **Gołąb K.**, Wang X., Kilimnik G., Hara M., Kizilel S., Trzonkowski P., Millis JM., Witkowski P. **Coating human pancreatic islets with CD4(+)**CD25(high)**CD127(-) regulatory T cells as a novel approach for the local immunoprotection.** Ann Surg. 2011 254, 3, 512-518.

Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik IF: **7,188**  
Punktacja ministerstwa: **50,000**

7. **Gołąb K.**, Kizilel S., Bal T., Hara M., Zielinski M., Grose R., Savari O., Wang XJ., Wang LJ., Tibudan M., Krzystyniak A., Marek-Trzonkowska N., Millis JM., Trzonkowski P., Witkowski P. **Improved coating of pancreatic islets with regulatory T cells to create local immunosuppression by using the biotin-polyethylene glycol-succinimidyl valeric acid ester molecule.** Transplant Proc. 2014, 46, 6, 1967-1971.

Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik IF: **0,984**  
Punktacja ministerstwa: **15,000**

## 1. WPROWADZENIE

### 1.1. Trzustka i funkcja wysp trzustkowych

Trzustka jest organem, który spełnia funkcje gruczołu zewnątrzwydzielniczego oraz wewnątrzwydzielniczego (dokrewnego). Jako gruczoł zewnątrzwydzielniczy produkuje sok trzustkowy, zawierający enzymy trawiące białka, kolagen i rozkładające kwasy nukleinowe. W trzustce produkowane są także hormony, stąd funkcja trzustki jako gruczołu dokrewnego. Hormony te wytwarzane są przez komórki zgromadzone w skupiskach, umiejscowione nieregularnie wśród tkanki o funkcjach zewnątrzwydzielniczych. Nazywane są one wyspami trzustkowymi lub od nazwiska ich odkrywcy – wyspami Langerhansa. Wyspy trzustkowe składają się w 60% z komórek  $\beta$ , produkujących insulinę, w 20% z komórek  $\alpha$ , produkujących glukagon, w 5% z komórek  $\delta$ , produkujących somatostatynę oraz w mniej niż 5% z komórek F, wytwarzających polipeptyd trzustkowy. Pojedyncze wyspy trzustkowe oplecione są siecią naczyń krwionośnych, doprowadzających składniki odżywcze do komórek i odprowadzających wytwarzane hormony. Wyspy trzustkowe posiadają ponadto własne unerwienie. Funkcjonują one zatem jako mikro-narządy.

Istotną funkcją, jaką pełnią wyspy trzustkowe jest utrzymanie odpowiedniego poziomu glukozy we krwi (glikemii). Komórki  $\beta$  oraz  $\alpha$  reagują na stężenie glukozy i wydzielają odpowiednie ilości insuliny oraz glukagonu, aby utrzymać stan normoglikemii, wynoszący u zdrowego człowieka na czczo 70-99 mg/dl. Gdy funkcja komórek  $\beta$  jest upośledzona, nie dochodzi do wytwarzania odpowiedniej ilości insuliny. W efekcie glukoza nie dociera do komórek i pozostaje we krwi, gdzie jej stężenie rośnie (hiperglikemia). Przewlekła hiperglikemia prowadzi następnie do uszkodzenia lub zaburzenia czynności wielu narządów, w tym nerek, serca, naczyń krwionośnych i oczu.

### 1.2. Cukrzyca typu 1

Cukrzyca jest chorobą, której głównym objawem jest hiperglikemia. Ze względu na etiopatogenezę oraz przebieg choroby, można wyróżnić jej kilka typów. Jednym z nich jest cukrzyca typu 1, w której dochodzi do niszczenia przez układ immunologiczny chorego komórek  $\beta$ , i w konsekwencji do deficytu insuliny. W tej sytuacji koniecznością dla chorego staje się dostarczanie egzogennej insuliny w postaci wstrzyknięć podskórnych. Stąd też ten typ cukrzycy określa się mianem insulinozależnej. Chorzy muszą ponadto wielokrotnie w ciągu dnia kontrolować poziom glukozy we krwi w celu dostosowania dawek insuliny do pory dnia oraz ilości i jakości spożywanych pokarmów. Pomimo tego, u dużej grupy chorych nie jest możliwe sterowanie

odpowiednim stężeniem glukozy we krwi tak, jak jest to w przypadku obecności w organizmie prawidłowo funkcjonujących wysp trzustkowych. Część pacjentów, stosujących terapię insulinową cierpi na napady hipoglikemii. Chory może nie być świadomy, że poziom glukozy w jego krwi spadł poniżej 50 mg/dl, natomiast sytuacja taka stanowi realne zagrożenie dla jego zdrowia i życia. Podczas napadu hipoglikemii może dojść do zaburzeń świadomych reakcji, braku kontaktu z otoczeniem, jak również całkowitej utraty świadomości. W skrajnych przypadkach, gdy do zdarzeń takich dochodzi w nocy, podczas snu, może dojść do zgonu chorego, tzw. 'dead-in-bed' (śmierć w łóżku) [1].

Jedynymi do tej pory istniejącymi metodami, które mogą zastąpić funkcję komórek  $\beta$  na okres kilku lat i zwolnić chorych od obowiązku codziennej podaży egzogennej insuliny oraz uchronić przed nieświadomymi napadami hipoglikemii jest przeszczep trzustki lub wysp trzustkowych.

### **1.3. Przeszczep trzustki w cukrzycy typu 1**

Pierwszy przeszczep trzustki wykonano w roku 1966 i od tego czasu operacji takich przeprowadzono ponad 42 000 na całym świecie [2]. Standardowo, przeszczep trzustki wykonuje się u pacjentów chorych na cukrzycę typu 1 w trzech różnych przypadkach. W około 70% są to osoby, które poddawane są równoczesnej transplatacji nerki i trzustki. W związku z przeszczepem nerki i tak wymagany jest u nich zabieg operacyjny oraz konieczność zastosowania immunosupresji. Kolejną grupę chorych stanowią ci, u których przeszczep trzustki wykonywany jest po przeszczepie nerki, np. od żyjącego dawcy. Podobnie jak w powyższej grupie, pacjenci tacy stosują już leki immunosupresyjne i nie jest konieczna dodatkowa indukcja tolerancji przed przeszczepem trzustki [3]. Transplatację samej trzustki bez uprzedniej lub równoczesnej transplatacji nerki wykonuje się rzadko, jedynie u chorych cierpiących z powodu niekontrolowanych epizodów hipoglikemii, ale tylko u około 5% pacjentów z tej grupy [4]. Liczba zgonów w pierwszym roku po przeszczepie trzustki, stanowi mniej niż 5% wszystkich przypadków. Dzięki poprawie technik chirurgicznych i terapii immunosupresyjnej, przeciętnie po 5 latach do 71% przeszczepów nadal spełnia swoje funkcje [2].

Pomimo ulepszeń w transplatacji trzustki, zabieg ten wciąż jest skomplikowany pod względem chirurgicznym i charakteryzuje się znacznym ryzykiem komplikacji i powikłań oraz często koniecznością ponownej operacji w przypadku ich wystąpienia. Dodatkowo, pacjenci po przeszczepie trzustki wymagają dożywotniego przyjmowania leków immunosupresyjnych, zwiększających ryzyko nowotworzenia, wtórnych zakażeń czy zaburzeń ze strony układu neurologicznego i pokarmowego. Co więcej, leki te nie zawsze

skutkują, dlatego nawet pomimo ich stosowania może dojść do odrzucenia przeszczepu, a wtedy koniecznością staje się ponowny zabieg operacyjny [5].

#### **1.4. Przeszczep wysp trzustkowych jako alternatywna metoda terapii cukrzycy typu 1**

##### **1.4.1. Historia i obecny status przeszczepu wysp trzustkowych**

Pomysły terapii cukrzycy typu 1 wyizolowanymi fragmentami trzustki, które produkowałyby w organizmie chorego insulinę pojawiły się już pod koniec lat 90-tych XIX wieku. W 1894 roku, brytyjski lekarz Watson Williams wszczepił pod skórę 15-latkę, u którego występowały objawy ketoacydozy, fragmenty z trzustki owcy. Kondycja chłopca na kilka dni się poprawiła, ale ksenotransplant został odrzucony, a chłopiec zmarł wskutek infekcji i postępowania choroby [6]. W 1924 roku z kolei, w czasopiśmie Lancet pojawiło się doniesienie o transplantacji fragmentów ludzkiej trzustki [7].

Krótko po tym, jak potwierdzono, że to właśnie wyspy Langerhansa są tymi, w których produkowana jest insulina, rozpoczęto próby ich izolacji. Jednym z pionierów tej technologii był polski lekarz patolog – Profesor Moskalewski, który w roku 1965, zaraz po doniesieniu o próbach dysekcji wysp trzustkowych ssaków [8], opracował metodę enzymatycznej izolacji wysp trzustkowych z trzustki świnki morskiej [9]. Metodę tę rozwinął Paul Lacy i jako pierwszy dokonał zakończonego sukcesem przeszczepu wysp trzustkowych u szczura [10] [11], następnie u małp [12], co stopniowo przyczyniło się do ugruntowania potencjalnej skuteczności izolacji i przeszczepiania wysp trzustkowych.

Metody opracowane przez Lacy'ego zostały zaadaptowane klinicznie przez zespół Uniwersytetu w Minesocie i zaowocowały w 1977 roku pierwszym raportem o przeszczepie wysp trzustkowych u człowieka przy jednoczesnej podaży azatiopryny i kortykosteroidów jako immunosupresji [13]. Pierwsze doniesienie z kolei o tym, że pacjent cierpiący na cukrzycę typu 1 nie wymaga terapii egzogenną insuliną po przeszczepie wysp trzustkowych pochodzi z roku 1980 [14]. Pomimo pierwszych nielicznych sukcesów uzyskania inulinoniezależności po przeszczepie wysp trzustkowych, raport Międzynarodowego Rejestru Przeszczepów Wysp z 1999 roku podawał, że spośród 267 transplantacji przeprowadzonych od roku 1990, mniej niż 10% biorców uzyskało insulinoniezależność trwającą dłużej niż 1 rok [15].

Przełom nastąpił w 2000 roku po opublikowaniu przez grupę z Edmonton raportu, w którym siedmiu pacjentów w okresie do roku po przeszczepie wysp trzustkowych nie wymagało podawania insuliny [16]. Różnice pomiędzy poprzednimi metodami izolacji i przeszczepu wysp trzustkowych, a opisanymi według tzw. „Protokołu Edmonton” polegały głównie na zastosowaniu większej ilości wyizolowanych wysp (pochodzących od różnych dawców i podanych w 2-

3 odległych w czasie infuzjach) oraz zmianie protokołu terapii immunosupresyjnej i rezygnacji z działających diabetogennie glikokortykoidów na rzecz daklizumabu (monoklonalne przeciwciało anty-CD25), nowo wprowadzonego do transplantacji sirolimusu (rapamycyna, inhibitor kinazy mTOR) oraz niskich dawek takrolimusu (inhibitor kalcyneuryny) [16].

Pomimo znacznego ulepszenia metody transplantacji wysp trzustkowych, długofalowe obserwacje wykazały, że wciąż mniej niż 10% spośród 65 pacjentów, którzy otrzymali przeszczepy wysp trzustkowych w ośrodku Edmonton utrzymało insulinoniezależność przez 5 lat po ostatnim przeszczepie. Jednakże, u 80% pacjentów odnotowano obecność C-peptydu, świadcząca o produkcji endogennej insuliny, a tym samym o zachowaniu funkcji pewnej ilości przeszczepionych wysp, co z kolei przyczynia się do lepszej kontroli poziomu glukozy we krwi i wyeliminowania napadów hipoglikemii [17]. Podobne wyniki uzyskało 9 międzynarodowych ośrodków badawczych, które wspólnie stosowały „Protokół Edmonton”. To znaczy, tylko 14% pacjentów spośród 36 po przeszczepie wysp trzustkowych pozostało insulinoniezależnych w 2 lata po przeszczepie, ale u większości pacjentów odnotowano obecność C-peptydu i obniżenie poziomu glikowanej hemoglobiny ( $HbA_{1c}$ ), co świadczy o poprawie kontroli glikemii po przeszczepie wysp [18].

W 1999 roku przy wsparciu JDRF (Juvenile Diabetes Research Foundation) zawiązano Centralny Rejestr Przeszczepu Wysp (CITR; Collaborative Islet Transplant Registry) w celu oceny oraz monitorowania bezpieczeństwa i rezultatów przeszczepów wysp trzustkowych. Najnowszy, ósmy raport tego rejestru podsumowuje wyniki zebrane po przeprowadzeniu transplantacji u 864 pacjentów (686 pacjentów po transplantacji samych wysp i 178 z równoczesnym przeszczepem nerki) w latach 1999-2012 w 37 centrach ze Stanów Zjednoczonych, Australii i Europy.

W grupie faworyzowanej (pacjenci powyżej 35 lat, z poziomem  $HbA_{1c}$  <8,5%, wymagający <43 U/kg insuliny przed przeszczepem, po określonej immunosupresji, i którzy otrzymali powyżej 500 000 ekwiwalentów wysp; IEQ), 55% osób utrzymało insulinoniezależność 5 lat po przeszczepie. Raport ten podkreśla także, że u większości pacjentów doszło do spadku poziom  $HbA_{1c}$  oraz istotnego obniżenia częstotliwości napadów ciężkiej hipoglikemii [19]. Należy mimo wszystko podkreślić, że wraz z upływem czasu, odsetek pacjentów, którzy po przeszczepie wysp trzustkowych utrzymali stan insulinoniezależności w trzech latach po przeszczepie wzrósł z 27% w latach 1999-2002, do 37% w latach 2003 - 2006 i do 44% w latach 2007-2010 [20]. Co więcej, znacznie większa ilość pacjentów przeszczepionych w latach 2007 -2010 utrzymała poziom C-peptydu na czczo powyżej 0,3 ng/ml, co świadczy o funkcjonowaniu przeszczepionych wysp trzustkowych. Ponadto, pacjentów tych charakteryzował niższy poziom  $HbA_{1c}$  w porównaniu z chorymi, którzy otrzymali wyspy w poprzednich latach [20]. Wyniki te dowodzą, że metody

izolacji i transplantacji wysp trzustkowych oraz protokoły terapii immunosupresyjnej w ostatnich latach zostały znacznie udoskonalone.

#### 1.4.2. Metoda izolacji wysp trzustkowych

Izolacja wysp trzustkowych to skomplikowany proces, wymagający jednoczesnej pracy kilku techników, który może trwać nawet do 10 godzin. Musi on się odbywać w specjalnych warunkach, zapewniających sterylność tak, aby przygotowane wyspy, które mają trafić do pacjenta były wolne od obecności bakterii czy też bakteryjnej endotoksyny. Dlatego też izolacje wysp trzustkowych odbywają się w tzw. czystych laboratoriach (*clean room*), w których liczba zanieczyszczeń, takich jak pył, kurz, bakterie, spory bakteryjne jest ściśle limitowana i systematycznie kontrolowana.

Sam proces izolacji wysp trzustkowych rozpoczyna się, gdy trzustka trafia do laboratorium; przy czym laboratorium należy przed każdą izolacją odpowiednio przygotować oraz sporządzić świeże odczynniki, które będą używane podczas izolacji tak, aby sam proces przeprowadzić możliwie w jak najkrótszym czasie. Jest to ważne ze względu na tzw. czas zimnego niedokrwienia pobieranej trzustki (*cold ischemia time*). Powinien on być możliwie jak najkrótszy, aby wyspy trzustkowe nie zostały nadtrawione przez wydostające się z komórek egzokrynnych enzymy trawienne lub zniszczone wskutek braku odpowiedniej wymiany gazowej w niedokrwionym organie.

Podczas pierwszego etapu po transferze trzustki do czystego laboratorium, organ jest oczyszczany z pozostałości tkanki tłuszczowej, naczyń krwionośnych, czasami również fragmentu dwunastnicy i śledziony. Następnie wykonuje się kaniulację przewodu trzustkowego jako przygotowanie do kolejnego etapu, czyli perfuzji. Perfuzja polega na pompowaniu pod kontrolowanym ciśnieniem enzymu kolagenazy przez przewód trzustkowy w celu wstępnego uwolnienia wysp trzustkowych z tkanki śródpecherzykowej. Po tym etapie trzustka jest cięta na fragmenty o wielkości około 1-2 cm, które trafiają do tzw. komory Ricordi'ego (*Ricordi chamber*), w której następuje dynamiczny przepływ enzymu kolagenazy w obiegu zamkniętym. Należy podkreślić, że dopiero na tym etapie enzym jest podgrzewany do temperatury 36,6°C i tym samym ulega aktywacji; uprzednie etapy wykonywane są w kontrolowanej niskiej temperaturze tak, aby nie doszło do nadtrawienia wysp trzustkowych. W komorze Ricordi'ego dochodzi do trawienia mechanicznego i enzymatycznego. Podczas tego etapu co 1-2 minuty monitoruje się stopień trawienia, pobiera próbki i pod mikroskopem, po wybarwieniu roztworem ditazonu (barwiącym na czerwono insulinę), obserwuje się ilość uwolnionych wysp oraz ich jakość. Na tej podstawie decyduje się, w którym momencie przerwać trawienie. Określenie odpowiedniego momentu, w którym należy to zrobić jest niezwykle ważne – zbyt szybko przerwane trawienie będzie skutkować uzyskaniem wysp trzustkowych nieoczyszczonych z tkanki egzogennej, a co za tym idzie zbyt



dużą ilością tkanki, która nie może zostać bezpiecznie przeszczepiona. Z kolei zbyt późne przerwanie trawienia spowoduje nadtrawienie wysp trzustkowych, co diametralnie wpływa na pogorszenie ich jakości, a tym samym może dyskwalifikować wyspy do przeszczepu. W momencie zatrzymania trawienia, obniżona zostaje temperatura w komorze Ricordiego, a strawiona tkanka jest zbierana do dużej objętości pożywki hodowlanej zawierającej surowicę, aby zneutralizować działanie enzymu. Kolejnym etapem jest oczyszczenie wysp trzustkowych poprzez wirowanie w ciągłym gradiencie stężeń. Ten etap ma na celu odseparowanie wysp trzustkowych od tkanki o funkcjach zewnątrzwydzielniczych. Upřednio, zebrana podczas trawienia tkanka jest kilkakrotnie płukana w celu usunięcia pozostałości kolagenazy. Podczas wirowania w gradiencie zbierane są frakcje, które różnią się między sobą czystością, tj. proporcją wysp do tkanki egzokrynnej. Następnie szacuje się procentową zawartość wysp trzustkowych w każdej z frakcji, a po zwirowaniu ocenia się wielkość uzyskanej tkanki w każdej z nich. Po ocenie, poszczególne frakcje łączy się w następujące klasy czystości: o wysokiej czystości (> 59% wysp trzustkowych), średniej czystości (> 59-40% wysp trzustkowych) oraz niskiej czystości (39-31% wysp trzustkowych). Z każdej z klas czystości pobierane są próbki i obliczana jest ilość wysp wyrażona przez tzw. ekwiwalent wysp trzustkowych (*islet equivalent quantity*; IEQ). Na podstawie uzyskanego IEQ, jakości wyizolowanych wysp i ilości tkanki widocznej po zwirowaniu i usunięciu nadsącza z każdej z frakcji ocenia się, czy wyspy mogą zostać przeszczepione danemu pacjentowi. Jako minimum zwykle przeszczepia się 5000 IEQ na kg masy ciała pacjenta, które po zwirowaniu i usunięciu nadsącza zajmują objętość nie większą niż 10 ml. Wyspy umieszcza się następnie w pożywce hodowlanej do czasu przygotowania pacjenta do przeszczepu i rozpoczęcia terapii immunosupresyjnej. Ze względu na jakość i przeżywalność wysp, istotnym elementem ich hodowli są częste zmiany pożywki hodowlanej (minimum co 12 h), mające na celu usunięcie metabolitów uwolnianych podczas procesu izolacji przez poddane stresowi wyspy.

W dniu przeszczepu, poszczególne klasy czystości wysp trzustkowych zostają kilkakrotnie przepłukane. Zaznaczyć trzeba, że unika się wirowania wysp w celu zmniejszenia ryzyka ich uszkodzenia, a przy każdym etapie płukania czeka się, aż tkanka samoistnie ulegnie sedymentacji i dopiero wtedy usuwa się nadsącz. Każda z klas czystości zostaje poddana badaniom mikrobiologicznym na obecność bakterii Gram +/- . Następnie przygotowujemy jest produkt końcowy, który ma zostać podany pacjentowi. W tym celu wyspy z poszczególnych klas czystości są zawieszane w 100 ml pożywki do transplantacji zawierającej serum. Przed połączeniem, dokonuje się decyzji, jak przygotować produkt do transplantacji. Zwykle, wyspy podaje się w jednym worku infuzyjnym. Jednak, gdy objętość wysp o niskiej klasie czystości jest znaczna, nie łączy się klas razem i przygotowuje do infuzji w osobnych

workach. Pacjentowi podaje się w takim wypadku najpierw wyspy o wysokiej klasie czystości, a następnie o niskiej, monitorując przy tym ciśnienie w żyłę wrotnej, przez którą wyspy są podawane. W przypadku, gdy ciśnienie ulegnie znacznemu podwyższeniu, można przerwać infuzję. Przygotowanie wysp trzustkowych w dwóch różnych workach infuzyjnych, gdy objętość danej klasy jest duża ma taką zaletę, że zapewnia podanie przynajmniej części produktu, jeżeli dojdzie do podniesienia ciśnienia w żyłę wrotnej.

Następnie pobiera się próbki do oceny jakości produktu końcowego i jego ewentualnej kwalifikacji do przeszczepu. Badania te obejmują określenie żywotności wysp trzustkowych, IEQ, zawartości endotoksyny, sterylność produktu (barwienie Gram +/-). Końcowy produkt zawierający wyspy trzustkowe zawieszono w pożywce suplementowanej heparyną, obliczoną na podstawie masy ciała pacjenta, podawany jest przez żyłę wrotną do wątroby przez cewnik pod kontrolą radiologiczną. Zabieg wykonywany jest w znieczuleniu miejscowym.

### **1.4.3. Czynniki wpływające na powodzenie izolacji i przeszczepu wysp trzustkowych**

Do powodzenia izolacji wysp trzustkowych i sukcesu klinicznego przeszczepu wysp przyczynia się wiele czynników. Każdy z etapów, począwszy od wyboru odpowiedniego dawcy trzustki, przez sposób pobrania organu i jego transportu do laboratorium, izolację wysp trzustkowych oraz ich hodowlę przed transplantacją jest niezwykle ważny. Co więcej, aby w organizmie biorcy, wyspy mogły spełniać w pełni swoją funkcję i skutecznie regulować poziom glukozy we krwi, przeszczepiona musi zostać ich odpowiednia liczba, która najczęściej wyraża się poprzez ilość IEQ podanych na kilogram masy ciała pacjenta. Do tego z kolei, aby przeszczepione wyspy mogły podjąć funkcję w organizmie dawcy, konieczna jest skuteczna terapia immunosupresyjna, która zapobiegnie odrzucaniu przeszczepu.

#### **1.4.3.1. Ocena dawcy i jakości trzustki**

Ewaluacja i wybór odpowiedniego dawcy trzustki jest ważny ze względu na fakt, że pozwala jeszcze przed pobraniem organu ocenić, czy izolacja wysp z trzustki od danego dawcy ma szansę dać odpowiednią ilość wysp do przeszczepu, a tym samym uniknąć wydatkowania czasu, materiałów i środków finansowych na nieskuteczną izolację. Od samych początków izolacji wysp trzustkowych próbowano określić parametry zarówno dotyczące dawcy, jak i jakości organu, które mogłyby pomóc w ocenie czy dany organ będzie się nadawał do izolacji wysp czy nie. Do najczęstszych kryteriów branych pod



uwagę można zaliczyć: wiek dawcy, wskaźnik masy ciała (BMI – *Body Mass Index*), przyczynę śmierci, historię leczenia, dawkę przyjętych leków wazopresyjnych, wyniki laboratoryjne określające poziom kreatyniny, bilirubiny, lipazy, amylazy, HbA<sub>1c</sub>, wstępny czas zimnego niedokrwienia organu, wielkość trzustki, zawartość tkanki tłuszczowej, urazy organu, jakość pobrania oraz metodę prezerwacji podczas transportu organu. W różnych ośrodkach badano wpływ jednego lub kilku z tych czynników na powodzenie izolacji wysp trzustkowych [21–26], ale wnioski z tych badań są niejednokrotnie sprzeczne, co może być spowodowane małą ilością przanalizowanych izolacji w pojedynczym ośrodku.

Ośrodek Edmonton w 2005 roku opracował algorytm punktowy, który pozwala na efektywną ocenę czy izolacja wysp od danego dawcy ma szansę na powodzenie czy nie [27]. Według tego systemu branych jest pod uwagę wiele czynników i parametrów dawcy jak i organu, i przyznawane są punkty, zgodnie z wagą ich wpływu na powodzenie izolacji wysp. Trzustka od potencjalnego dawcy oceniana jest w skali od 0 do 100. Grupa z Edmonton zaproponowała, że w przypadku wartości >80 szansa na efektywną izolację wysp wynosi ponad 50%. Natomiast, gdy dawca i organ oceniany jest na >90, szansa na izolację, w której uzyska się znacząca ilość wysp dobrej jakości, nadających się do przeszczepu wynosi 100% [27].

System ten nadal jest walidowany w innych ośrodkach i oceniana jest jego przydatność [28–30].

#### **1.4.3.2. Proces izolacji**

Jak opisano powyżej, proces izolacji wysp trzustkowych jest złożony i każdy z etapów jest istotny, aby można było uzyskać wyspy w ilości i jakości, pozwalającej na przeszczep.

Sam etap, w którym trzustka jest transportowana do laboratorium odgrywa ważną rolę. Słaba penetracja tlenu do tkanki naraża wyspy trzustkowe na hipoksję i może skutkować zredukowaną przeżywalnością izolowanych wysp. Dlatego też opracowano metodę konserwacji trzustki na granicy dwóch płynów – roztworu UW (*University of Wisconsin solution*) oraz perfluorokarbonu, który wspomaga transport tlenu do organu [31]. Wciąż jednak trwają badania nad ulepszeniem metody transportu, poprzez na przykład wykorzystanie urządzeń do wymiany gazowej [32] czy zastosowanie innych związków wspomagających wymianę tlenową [33].

Wybór właściwego enzymu trawiącego podczas izolacji wysp trzustkowych ma również ogromne znaczenie. Enzym o zmniejszonej aktywności nie pozwoli na uwolnienie wysp z tkanki zewnątrzwydzielniczej, a zbyt duża aktywność doprowadzi do fragmentacji izolowanych wysp. W różnych ośrodkach używane

są różne enzymy: kolagenaza NB1 (Serva), Liberaza MTF (Roche), kolagenaza Clzyme™ (VitaCyte) [34–39], a kluczową rolę odgrywa tu po prostu doświadczenie danego ośrodka w użyciu poszczególnego z enzymów.

Kolejny niezwykle istotny etap izolacji to wirowanie w gradiencie ciągłym, aby oczyścić wyspy trzustkowe z tkanki egzokrynnej. Stosowane są dwa rodzaje gradientów: sporządzony z roztworu UW i Biocoll'u o gęstości 1,1 g/ml (Biochrom AG) lub w oparciu o użycie roztworu jodiksanolu (OptiPrep™, SigmaAldrich). Oba dają podobne wyniki, jeżeli chodzi o ilość oczyszczonych wysp, ale wykazano, że ten ostatni redukuje ilość uwalnianych cytokin i chemokin, wpływając na żywotność wyizolowanych wysp [40–42].

#### **1.4.3.3. Miejsce przeszczepu**

Obecnie infuzji wysp trzustkowych dokonuje się zwykle przez żyłę wrotną do wątroby. Miejsce to, pomimo, że jest uważane za optymalne, posiada swoje wady. Wyspy trzustkowe narażone są tam na natychmiastową reakcję zapalną poprzez kontakt ze składnikami krwi. Szacuje się, że w wyniku tej reakcji dochodzi do zniszczenia znacznej ilości przeszczepionych wysp w zaledwie kilka godzin po przeszczepie [43]. Efekt ten mógłby zostać wyeliminowany, gdyby wyspy przeszczepiono w miejsce, gdzie nie ma bezpośredniego kontaktu z krwią. Alternatywne miejsca infuzji takie jak: śledziona, torebka nerki, trzustka, jama otrzewnowa, grasica, szpik kostny, przestrzeń śródmięśniowa [44–49] były testowane z różnym rezultatem. Każde z tych miejsc posiada swoje wady i zalety [50]. Największym problemem we wszystkich tych potencjalnych miejscach infuzji wysp trzustkowych jest stworzenie środowiska, które sprzyjałoby waskularyzacji wysp, a które jednocześnie byłoby immunologicznie uprzywilejowane [51]. Dlatego też badania pre-kliniczne i kliniczne nad poszukiwaniem alternatywnych miejsc przeszczepu powinny być nadal prowadzone, aby udało się określić to najbardziej optymalne.

#### **1.4.3.4. Wzbudzenie tolerancji i immunosupresja**

Przeszczepione wyspy trzustkowe narażone są w organizmie biorcy na atak ze strony niespecyficznego odpowiadzi immunologicznej, a także obecnej wcześniej odpowiadzi autoimmunologicznej oraz indukowanej pojawieniem się przeszczepu odpowiadzi allogenicznego. Dlatego też, zastosowanie odpowiedniego protokołu immunosupresji, który pozwoli na utrzymanie przeszczepu i podjęcie przez wyspy trzustkowe funkcji jest szczególnie skomplikowanym zagadnieniem. Dodatkowo, niektóre z leków immunosupresyjnych upośledzają funkcję komórek  $\beta$  i mają działanie diabetogenne [52]. Dużym przełomem w immunosupresji podczas przeszczepu wysp trzustkowych była rezygnacja ze

szkodliwych steroidów wg protokołu Edmonton na rzecz, daklizumabu, sirolimusu oraz małych dawek takrolimusu [53]. Jednak, protokół ten nie pozwala wciąż na osiągnięcie długotrwałej insulinoniezależności przez pacjentów po przeszczepie [17]. Dlatego też na przestrzeni ostatnich lat poszukuje się i testuje nowe środki biologiczne oraz strategie immunologiczne, które pozwolą na poprawę wyników transplantacji wysp trzustkowych.

W celu zapewnienia przeżywalności i podjęcia funkcji przez przeszczepione wyspy trzustkowe stosuje się m.in. przeciwciała monoklonalne, blokery sygnałów ko-stymulacji, terapię antagonistami dla receptorów cytokin, enkapsulację, terapie komórkowe, regulujące odpowiedź immunologiczną, jak również leki hamujące aktywność i/lub proliferację limfocytów T [54]. Współcześnie stosowane strategie zapobiegające odrzuceniu przeszczepu wysp trzustkowych łączą najczęściej kilka terapii, mających na celu wzbudzenie tolerancji immunologicznej (np. globulina antytymocytarna, przeciwciało anti-CD52 – alemtuzumab, przeciwciało anti-CD3), zahamowanie odpowiedzi zapalnej (np. przeciwciało anti-TNF- $\alpha$ , blokery receptorów dla chemokiny CXCL8), utrzymanie stanu immunosupresji (np. inhibitory kalcyneuryny, blokery sygnałów kostymulacji, inhibitory szlaku kinazy mTOR (*mammalian target of rapamycin*), MMF (mykofenolan mofetylu)).

**Przeciwciało anti-CD25** – wiąże się z podjednostką  $\alpha$  receptora dla IL-2 na aktywowanych limfocytach i hamuje w ten sposób ich dalszą proliferację [55]. Na rynek wypuszczono dwa leki będące monoklonalnymi przeciwciałami anti-CD25: daklizumab (Zenapax, Roche) i basiliximab (Simulect, Novartis); obecnie Zenapax jest wycofany z obrotu na obszarze Unii Europejskiej. Sukces protokołu Edmonton polegający na uzyskaniu przez pacjentów po przeszczepie wysp trzustkowych insulinoniezależności, to w głównej mierze zmiana immunosupresji z diabetogennych steroidów właśnie na daklizumab w połączeniu z tacrolimusem i sirolimusem [53]. Jednakże, po 5 latach od transplantacji większość pacjentów ponownie wymagała podawania egzogennej insuliny, co świadczy o utracie funkcji przeszczepu [18]. Przeciwciało anti-CD25 działa na limfocyty o wysokiej ekspresji receptora dla IL-2, czyli również na limfocyty T regulatorowe [56], a tym samym przyczynia się do blokowania naturalnych mechanizmów regulacji odpowiedzi immunologicznej. Dodatkowo zaobserwowano, że zastosowanie daklizumabu prowadzi do limfopenii z podwyższoną produkcją cytokin IL-7 i IL-15, które z kolei stymulują proliferację auto- i allo-reaktywnych limfocytów T CD8+. W sytuacji, kiedy lek jednocześnie hamuje proliferację komórek Treg, zaczyna brakować naturalnego mechanizmu kontrolującego działanie limfocytów T CD8+ [57,58]. W związku z powyższym oraz z faktem, że w 2009 roku daklizumab został wycofany z rynku, prowadzone są badania innych terapii immunosupresyjnych w przeszczepie wysp trzustkowych.

**Globulina antytymocytarna** (ATG – *anti-thymocyte globulin*) to oczyszczona frakcja przeciwciał IgG z pozyskiwana surowicy zwierząt (królika lub konia) immunizowanych ludzkimi limfocytami T lub tymocytami [59]. Działa ona na antygeny znajdujące się na powierzchni limfocytów T i prowadzi do ich niszczenia poprzez różne mechanizmy: aktywację dopełniacza, cytotoksyczność zależną od przeciwciał, indukcję apoptozy czy też wywołując zmiany w ekspresji receptorów chemokin na powierzchni limfocytów [60,61]. Globulina antytymocytarna jest dostępna jako lek immunosupresyjny od ponad 25 lat. Jednak zainteresowanie jej zastosowaniem w terapii indukcji tolerancji wzrosło w ostatnich latach, szczególnie po odkryciu, że ma ona wpływ na podwyższenie odsetka limfocytów T regulatorowych, które posiadają właściwości immunosupresyjne [62,63]. Badania kliniczne, w których zastosowano ATG oraz daklizumab do indukcji tolerancji u biorców wysp trzustkowych wykazały, że włączenie tych leków do protokołu pozwala na osiągnięcie insulinoniezależności już po jednej infuzji wysp nawet u 100% pacjentów [64]. Podobne wyniki, przeprowadzone jednak na mniejszej grupie pacjentów uzyskała grupa, która w swoim protokole immunosupresji zastosowała ATG, inhibitor TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  jako terapię hamującą odpowiedź zapalną oraz MMF [40]. Dodatkowo, ATG jest obecnie testowana u pacjentów z nowo zdiagnozowaną cukrzycą typu 1 jako terapia zapobiegająca postępowi choroby (ClinicalTrials.gov, NCT00515099) w ramach II fazy badań klinicznych.

**Przeciwciało anty-CD52 (alemtuzumab, Campath-1)** – CD52 jest antygenem występującym na powierzchni wszystkich limfocytów [65]. W związku z tym, alemtuzumab znalazł szerokie zastosowanie zarówno w terapii białaczek limfocytarnych i prolimfocytarnych, w chorobach o podłożu autoimmunologicznym – stwardnieniu rozsianym, reumatoidalnym zapaleniu stawów, jak i w transplantacji nerek. W transplantacji wysp trzustkowych alemtuzumab wraz z takrolimusem i MMF był testowany przez grupę Edmonton po wycofaniu z rynku używanego wcześniej do indukcji tolerancji w tym ośrodku daklizumabu. Grupa ta odnotowała wzrost odsetka pacjentów insulinoniezależnych 5 lat po przeszczepie i osiągnęła podobne wyniki, jak w przypadku transplantacji całej trzustki [66].

**Przeciwciało anty-CD3** działa w sposób dwufazowy. W fazie pierwszej prowadzi do spadku liczby limfocytów T, wykazując działanie immunosupresyjne, a następnie indukuje powstawanie komórek Treg, które poprzez produkcję antyzapalnej IL-10 i TGF- $\beta$  przeciwdziałają reakcji zapalnej i autoimmunologicznej. Badania pre-kliniczne na zwierzętach wykazały, że terapia anty-CD3 ma korzystne działanie w mysich modelach allo-transplantacji oraz cukrzycy typu 1 [67,68]. Grupa z Uniwersytetu w Minesocie testowała przeciwciało anty-CD3 (teplizumab) w zestawieniu z sirolimusem i niską dawką takrolimusu w transplantacji wysp trzustkowych. Czterech z sześciu przeszczepionych pacjentów nie wymagało podawania insuliny po przeszczepie.

U czterech pacjentów insulinoniezależnych zanotowano istotny spadek liczby komórek T CD4+ z równoczesnym wzrostem odsetka limfocytów Treg, co sugeruje, że doszło do rozwoju środowiska tolerogenicznego [69]. Nowsze badania, w których testowano teplizumab w połączeniu z przeciwciałami przeciwko limfocytom T oraz inhibitorem TNF- $\alpha$  pokazały potencjalną skuteczność takiej terapii w przeszczepie wysp trzustkowych (uzyskanie insulinoniezależności) [70]. Jak każda terapia immunosupresyjna, tak i zastosowanie przeciwciała anty-CD3 wiąże się z występowaniem efektów ubocznych, z których najczęściej występujące to gorączka, bóle głowy i mięśni, wysypka oraz wymioty.

**Inhibitory TNF- $\alpha$**  – TNF- $\alpha$  jest cytokiną, która pełni ważną funkcję w procesach zapalnych i odpowiedzi immunologicznej poprzez m.in. indukcję syntezy innych cytokin, produkcję przeciwciał przez limfocyty B, stymulację produkcji białek ostrej fazy w wątrobie, indukcję apoptozy komórek nowotworowych [71]. TNF- $\alpha$  ma ponadto negatywny wpływ na funkcjonowanie komórek  $\beta$ , a efekt ten może zostać zatrzymany poprzez zastosowanie inhibitora TNF- $\alpha$  [72]. Udowodniono również, że terapia przeciwciałami anty-TNF- $\alpha$  prowadzi do wzrostu odsetka komórek Treg we krwi obwodowej [73]. W praktyce klinicznej stosowane są obecnie dwa leki hamujące działanie TNF- $\alpha$ , tj. etanercept oraz infliksymab. Etanercept był testowany w połączeniu z innymi lekami jako terapia immunosupresyjna w przeszczepie wysp trzustkowych m.in. na Uniwersytecie w Miami, w Minesocie i na Uniwersytecie Illinois [74–76]. Pierwszym ośrodkiem, który osiągnął obiecujące wyniki była grupa w Minesocie. Do indukcji tolerancji zastosowali oni etanercept połączony z daklizumabem i ATG. Przeszczep otrzymało ośmiu pacjentów i żaden z nich nie wymagał podawania insuliny rok po przeszczepie wysp trzustkowych i nie stwierdzono u nich niekontrolowanych napadów hipoglikemii [77].

**Inhibitor IL-1 (anakinra)** – anakinra jest rekombinowanym białkiem, antagonistą ludzkiego receptora IL-1. Interleukina-1 jest cytokiną prozapalną, stymulującą odpowiedź immunologiczną. Co więcej, IL-1 niekorzystnie wpływa na funkcję, proliferację i żywotność komórek  $\beta$  [78]. Badania kliniczne, w których wykorzystano blokery IL-1 i TNF- $\alpha$  przy jednoczesnej terapii takrolimusem i MMF w połączeniu z indukcją opartą o zastosowanie ATG w przeszczepie wysp trzustkowych, pokazały obiecujące wyniki [40]. Dodatkowo, grupa ta, podczas oczyszczania wysp podczas wirowania w gradiencie ciągłym wykorzystywała jodiksanol, który, jak już wcześniej wspomniano, redukuje ilość wydzielanych cytokin przez wyspy trzustkowe. Praca ta zatem wskazuje na ważny problem odpowiedzi zapalnej w odrzucaniu przeszczepu wysp trzustkowych. Ograniczeniem w interpretacji tych wyników jest mała liczba pacjentów (n=3) poddanych transplantacji.

**Inhibitor szlaku CXCL8 (reparixin)** – interleukina 8 (CXCL8) jest chemokiną, która łączy się z receptorami CXCR1 i CXCR2 [79]. Wykazano, że u biorców wysp trzustkowych IL-8 odgrywa istotną rolę w rekrutacji

neutrofilów oraz komórek NK (*Natural Killer cells*) do miejsca przeszczepu, co następnie prowadzi do rozwoju odpowiedzi zapalnej. Na mysim modelu syngenicznego oraz allogenicznego przeszczepu wysp trzustkowych udowodniono, że blokada receptorów CXCR1 i CXCR2 wpływa na przeżywalność przeszczepu [80]. Inhibitor receptorów CXCR1/2 znany jest jako lek reparixin (Dompe). Wyniki fazy II badań klinicznych, w których testowano wyżej wymieniony lek w przeszczepie wysp trzustkowych (ClinicalTrials.gov, NCT01220856) łącznie z ATG, metylprednizolonem, MMF, takrolimusem i rapamycyną wykazały, że pacjenci leczeni zgodnie z tym protokołem mają lepszą kontrolę glikemii, wyższy poziom C-peptydu i jednocześnie wymagają niższych dawek insuliny w porównaniu z grupą kontrolną [80]. Obecnie trwa III faza badań klinicznych (ClinicalTrials.gov, NCT01817959), mająca na celu potwierdzenie korzyści wynikających ze stosowania reparixinu w przeszczepie wysp trzustkowych, w które zaangażowanych jest kilka instytucji na świecie, m.in. Uniwersytet w Chicago, Uniwersytet w Uppsali oraz Instytut San Raffaele w Mediolanie.

**Inhibitory kalcyneuryny (takrolimus, cyklosporyna)** – kalcyneuryna jest białkiem, uczestniczącym w szlaku aktywacji limfocytów T. Funkcja tego białka została zidentyfikowana po odkryciu mechanizmów działania dwóch leków immunosupresyjnych: cyklosporyny A (CsA) oraz takrolimusu (FK506) [81]. Leki te hamują aktywację i dalszą proliferację limfocytów T poprzez inhibicję syntezy m.in. IL-2, IL-3, IL-4, IFN- $\gamma$  w tych komórkach [82,83]. Cyklosporyna A była testowana u osób z nowo zdiagnozowaną cukrzycą typu 1. Zaobserwowano, że proces niszczenia komórek  $\beta$  był hamowany u pacjentów poddanych terapii cyklosporyną, a pacjenci wymagali niższych dawek egzogennej insuliny. Niemniej jednak efekt ten był krótkotrwały, a lek wykazywał silne działanie nefrotoksyczne [52,84].

Z kolei takrolimus w połączeniu z sirolimusem był stosowany np. we wspomnianym wcześniej „Protokole Edmonton” [53]. Wykazano jednak później, że takrolimus ma działanie toksyczne względem komórek  $\beta$  oraz podobnie do cyklosporyny, upośledza funkcję nerek [85]. Dodatkowo, hamuje proces rewaskularyzacji wyizolowanych wysp trzustkowych [86]. Niemniej jednak na podstawie siódmego raportu CIT, który podsumowuje wyniki przeszczepów wysp trzustkowych, przy których stosowano ATG, etanercept oraz sirolimus i takrolimus, stwierdzono, że takrolimus i sirolimus podawane w niskiej dawce, nie są toksyczne dla wysp trzustkowych [87].

**Sirolimus (rapamycyna, inhibitor kinazy mTOR)** – rapamycyna jako inhibitor kinazy mTOR hamuje aktywację i proliferację limfocytów T poprzez blokowanie szlaku sygnalizacji zależnego od IL-2 [88]. W większości protokołów immunosupresyjnych w przeszczepie wysp trzustkowych wykorzystuje się sirolimus w połączeniu z takrolimusem lub MMF [66]. Z jednej strony, rapamycyna korzystnie wpływa na funkcję limfocytów T regulatorowych [89-92], a tym samym wspomaga naturalne mechanizmy immunosupresji w



organizmie pacjenta, ale z drugiej strony upośledza funkcjonowanie wysp trzustkowych, ich regenerację i re-waskularyzację [93-95]. Należy również dodać, że z zastosowaniem rapamycyny wiąże się wiele efektów ubocznych takich jak: leukopenia, trombocytopenia, anemia, hypercholesterolemia, niestrawność, występowanie biegunek, wysypki skórnej, aft w jamie ustnej czy zaburzenia cyklu menstruacyjnego u kobiet [18,94,96]. Terapia immunosupresyjna rapamycyną w przeszczepie wysp trzustkowych może zatem przynosić zarówno korzyści, jak i wywoływać skutki negatywne, a efekt ten może być różny w zależności od pacjenta. Z tego względu rozwiązaniem może tu być opracowanie terapii immunosupresyjnej, która będzie dostosowana do konkretnego, indywidualnego pacjenta [93].

**Mykofenolan mofetylu (MMF, CellCept)** – w związku z wyżej opisanymi faktami dotyczącymi toksyczności względem komórek  $\beta$  oraz efektami ubocznymi terapii takrolimusem i sirolimusem jako leków do utrzymania stanu immunosupresji, coraz częściej zamiast takiej terapii, stosuje się MMF. Lek ten jest stosowany sam lub w połączeniu z niskimi dawkami takrolimusu czy sirolimusu [50]. MMF blokuje szlak syntezy nukleotydów guaninowych, hamując w ten sposób syntezę DNA. Komórkami szczególnie wrażliwymi na MMF są limfocyty.[97]. Zastąpienie takrolimusu przez MMF eliminuje efekt niszczenia wysp, co jest szczególnie ważne w przypadku transplantacji małej ilości IEQ na kg masy ciała pacjenta. Dodatkowo MMF, w przeciwieństwie do takrolimusu nie wykazuje efektów nefrotoksycznych. Skuteczność MMF przy transplantacji minimalnej ilości wysp na kg masy ciała potwierdziły badania przeprowadzone na Uniwersytecie w Minesocie. Ośmiu pacjentów, u których w ramach protokołu immunosupresyjnego w przeszczepie wysp trzustkowych zastosowano ATG w połączeniu z daklizumabem i etanerceptem do indukcji tolerancji i MMF wraz z sirolimusem do utrzymania immunosupresji nie wymagało podawania insuliny i nie zaobserwowano u nich napadów hipoglikemii. Pięciu pacjentów z tej grupy pozostało insulinoniezależnych dłużej niż rok po przeszczepie [77]. Negatywnym aspektem stosowania MMF w przeszczepie wysp trzustkowych może być fakt, że związek ten, jak udowodniono, ma hamujący wpływ na neogenezę wysp przez blokowanie proliferacji komórek prekursorowych [98].

**Blokery kostymulacji** – aby naiwny limfocyt T został zaktywowany w wyniku kontaktu ze swoistym antygenem prezentowanym w kontekście MHC (główny układ zgodności tkankowej – *Major Histocompatibility Complex*) niezbędne są dwa sygnały: pochodzący z rozpoznania antygeny przez receptor TCR (receptor limfocytów T – *T Cell Receptor*) oraz drugi, pochodzący z receptorów ko-stymulacyjnych. Do przekazania sygnału kostymulacyjnego niezbędna jest interakcja pomiędzy receptorem CD28 na powierzchni limfocyta T, a receptorem CD80 (B7.1) lub CD86 (B7.2) na powierzchni komórki prezentującej antygen (APC – *Antigen Presenting Cell*) [99]. Limfocyty, po

pierwszym zetknięciu ze swoistym antygenem nabywają także ekspresję receptora CTLA-4 (antygen 4 związany z cytotoksycznymi limfocytami T – *cytotoxic T cell antigen*). Połączenie CTLA-4 z receptorem CD80 lub CD86 na komórce APC prowadzi do zahamowania aktywności limfocyta, przy czym ekspresja CTLA-4 jest proporcjonalna do siły sygnału z TCR [100]. Blokada kostymulacji, prowadząca do zahamowania aktywacji i proliferacji limfocytów stanowi atrakcyjną strategię immunosupresyjną. W transplantacji wysp trzustkowych próbowano włączyć 3 różne blokery kostymulacji do protokołów immunosupresyjnych: abatacept (białko fuzyjne będące połączeniem fragmentu Fc ludzkiej immunoglobuliny IgG1 i zewnątrzkomórkowej domeny CTLA-4), belatacept (druga generacja białka fuzyjnego Fc IgG1 i CTLA-4) oraz efalizumab przeciwciało monoklonalne anti-LFA-1 (antygen 1 związany z funkcją limfocytów – *Lymphocyte Function-Associated Antigen 1*) blokujące bezpośredni kontakt komórek APC i limfocytów T podczas prezentacji antygeny [50,66]. Uniwersytet w San Francisco zanotował obiecujące wyniki przeszczepu wysp trzustkowych stosując belatacept lub efalizumab wraz z ATG i MMF lub sirolimusem. Wszyscy pacjenci (n=5), którym podawano immunosupresję opartą o belatacept uzyskali insulinoniezależność po jednym przeszczepie wysp. U jednego z pacjentów po 305 dniach od transplantacji, trzeba było zastosować insulinę w obniżonych dawkach, ale po drugim przeszczepie wysp trzustkowych uzyskał ponownie insulinoniezależność. Pacjenci po terapii efalizumabem (n=5) również nie wymagali podaży egzogennej insuliny przez ponad rok po przeszczepie, ale u dwóch z nich do osiągnięcia tego rezultatu konieczne były dwie transplantacje wysp. Dodatkowo, u żadnego z pacjentów, ani po terapii belataceptem, ani efalizumabem nie zaobserwowano efektów ubocznych [101]. Efalizumab został wycofany z użytku klinicznego z powodu zanotowania przypadku postępującej wieloogniskowej leukoencefalopatii po terapii tym lekiem, więc długofalowe skutki stosowania nie są znane [66]. Jeżeli chodzi o belatacept, to niedawno ukończono badania kliniczne w ramach CIT (CIT-04), w których zastosowano ten lek wraz z basiliximabem i MMF (ClinicalTrials.gov; NCT00468403). Wyniki tych badań nie zostały jeszcze podane.

#### **1.4.4. W kierunku nowych metod indukcji tolerancji immunologicznej w przeszczepie wysp trzustkowych**

Jak opisano powyżej, w transplantacji wysp trzustkowych obecnie testuje się wiele różnych terapii i kombinacji leków chemicznych i biologicznych w celu zapewnienia ochrony przeszczepu. Żadna z tych terapii jednak nie jest stuprocentowo skuteczna. Co więcej, stosowaniu wielu leków wiąże się z występowaniem szeregu skutków ubocznych. Komplikacje wynikające z terapii immunosupresyjnej i jej niecałkowita skuteczność są ważnymi czynnikami,



które nie pozwalają na stosowanie przeszczepu wysp trzustkowych jako rytynowej metody leczenia określonej grupy pacjentów z cukrzycą typu 1. Dlatego też wciąż trwają poszukiwania innych strategii, które zapewnią ochronę przeszczepionych wysp trzustkowych na poziomie allo- i autogenicznym.

#### **1.4.4.1. Enkapsulacja wysp trzustkowych**

Jedną ze strategii ochrony przeszczepianych wysp trzustkowych przed atakiem ze strony układu immunologicznego biorcy jest mechaniczna izolacja. Pojedyncze wyspy trzustkowe mogą być opłaszczone różnego rodzaju materiałami zarówno syntetycznymi, jak i biologicznymi (mikroenkapsulacja) lub przeszczepiane wyspy mogą być razem umieszczone w sztucznym urządzeniu (makroenkapsulacja) [50]. Enkapsulacja ma na celu stworzenie bariery nieprzepuszczalnej dla przeciwciał i komórek, aby ochronić przeszczep przed atakiem ze strony układu immunologicznego, a jednocześnie umożliwić przepływ małych cząsteczek takich jak insulina i glukoza, aby przeszczepione wyspy miały zapewnioną odpowiednią wymianę tlenową i dostęp do składników odżywczych. Przy wyborze odpowiedniego materiału do enkapsulacji należy wziąć pod uwagę zrealizowanie powyższych celów, a przy tym należy również rozważyć takie czynniki jak: miejsce transplantacji, metodę enkapsulacji, zachowanie funkcji wysp, wytrzymałość materiału, jego czystość oraz powtarzalność metody [102]. Dlatego też testowano różne materiały pochodzenia biologicznego, jak: kolagen, hialuronian, fibryna, alginian, agarozę i chitosan oraz syntetycznego, jak: kwas poliakrylamidowy, tlenek polietylenu, alkohol poliwinylowy, polifosfazeny, polipeptydy i ich pochodne [103] na różnych modelach zwierzęcych, m.in. na myszach NOD (*Non-Obese Diabetic mice*), szczurach Wistar i Lewis, psach, koniach i ssakach naczelnych. Część metod enkapsulacji testowanych z sukcesem na gryzoniach okazało się być nieskutecznych w badaniach na większych zwierzętach [104]. Między innymi dlatego też badań klinicznych wykorzystujących metodę enkapsulacji przeszczepianych wysp przeprowadzono niewiele. Pierwszą próbę przeszczepienia wysp trzustkowych opłaszczonych otoczką alginianową przeprowadzono w 1994 roku. Pacjentowi podano wyspy w dwóch infuzjach (pierwsza: 10 000 IEQ/kg, druga po pół roku: 5 000 IEQ/kg). Po drugiej dawce wysp pacjent wymagał podawania jedynie 1-2 jednostek insuliny dziennie (przed transplantacją używał 40-50 jednostek), a po 9 miesiącach osiągnął insulinoniezależność [105]. Ograniczeniem w interpretacji, czy przeszczepione wyspy trzustkowe nie zostały odrzucone dzięki enkapsulacji jest fakt, że pacjent otrzymywał już leki immunosupresyjne w związku z wcześniejszym przeszczepem nerki. W 1994 roku przeprowadzono jeszcze jedno badanie kliniczne, w którym podskórnym przeszczepiono wyspy trzustkowe po uprzedniej makroenkapsulacji, tj. po zamknięciu wysp w specjalnym urządzeniu

zbudowanym z włókniaka. Z powodu małej ilości przeszczepionych wysp (150-200 IEQ) nie uzyskano znacznej poprawy metabolizmu glukozy u żadnego z pacjentów, ale po usunięciu urządzenia od pacjentów, udowodniono, że wyspy zachowały żywotność i funkcję [106]. Kilka lat później przeprowadzono pierwsze badania kliniczne, w którym człowiekowi podano podskórnie świńskie wyspy trzustkowe zamknięte wraz z komórkami Sertoliego w urządzeniu wykonanym z kolagenu. U żadnego z pacjentów (n=12) nie zaobserwowano komplikacji wynikających z ksenotransplantacji. U połowy pacjentów zanotowano obniżenie zapotrzebowania na egzogenną insulinę po przeszczepie, utrzymującą się do 4 lat, a dwóch pacjentów uzyskało insulinoniezależność na kilka miesięcy. Co więcej, kiedy po 3 latach u jednego z pacjentów poddanych terapii skontrolowano przeszczepione urządzenie, stwierdzono w nim nadal obecność funkcjonalnych komórek  $\beta$  [107]. Przeszczep opłaszczonych obcogatunkowych wysp testowano jeszcze kilkakrotnie głównie w badaniach klinicznych przeprowadzonych przez firmę Living Cell Technologies Ltd. Spotkały się one jednak z krytyką, szczególnie z powodu braku wyników wskazujących na produkowanie insuliny przez przeszczepione do jamy otrzewnej wyspy trzustkowe wyizolowane od świni [103]. Wyniki badań z ostatnich lat, w których przeszczepiano ludzkie wyspy po enkapsulacji nie dają również zbyt zachęcających wyników, ale wskazują na bezpieczeństwo tej metody oraz, że opłaszczanie ma potencjał blokowania niszczenia przeszczepu przez układ immunologiczny biorcy. W 2006 roku opublikowano rezultaty badania, w którym dwóch chorych z cukrzycą typu 1 otrzymało wyspy poddane mikroenkapsulacji z zastosowaniem mikrosfer alginianowych. W obu przypadkach zanotowano obniżenie poziomu glukozy na czczo i redukcję zapotrzebowania na egzogenną insulinę. Żaden z pacjentów nie uzyskał jednak insulinoniezależności [108]. Rezultaty kolejnego badania, w którym 4 chorych otrzymało wyspy opłaszczone alginianem baru były jeszcze mniej satysfakcjonujące. U żadnego z pacjentów nie zaobserwowano poprawy metabolizmu glukozy, jak również nie wykryto C-peptydu, który wskazywałby na podjęcie funkcji przez przeszczepione wyspy. Po 16 miesiącach wykryto, że wyspy opłaszczone alginianem zostały w organizmie pacjentów otoczone tkanką włóknistą i uległy nekrozie [109]. Nowsze wyniki badań z dootrzewnową transplantacją wysp mikroenkapsulowanych w alginianie sodu potwierdzają, że metoda ta jest bezpieczna i skutecznie chroni przed rozwojem specyficznych przeciwciał przeciwko przeszczepowi. U biorców (n=4) stwierdzono obecność C-peptydu, spadek poziomu glukozy na czczo i HbA<sub>1c</sub> oraz redukcję zapotrzebowania na egzogenną insulinę. Jeden z pacjentów uzyskał okresową insulinoniezależność [110].

Wyniki przeprowadzonych badań dają nadzieję, że enkapsulacja może być potencjalną metodą ochrony przeszczepianych wysp przed odrzuceniem bez konieczności przyjmowania leków immunosupresyjnych. Jednakże, badania te różnią się znacznie, jeżeli chodzi o metodę enkapsulacji, ilość przeszczepionych

wysp oraz stan pacjentów. Dlatego trudno wyciągnąć jednoznaczne wnioski, czy metoda ta ma rzeczywiście szansę zastąpić dotychczasowe terapie immunosupresyjne stosowane w przeszczepie wysp trzustkowych.

#### **1.4.4.2. Immunomodulacja w oparciu o komórki macierzyste**

Komórki macierzyste są komórkami o zdolnościach do samoodnawiania się przez podziały komórkowe i różnicowania się w dojrzałe, wyspecjalizowane komórki [111]. W terapii cukrzycy typu 1 ich potencjał może znaleźć zastosowanie w strategiach regeneracji komórek  $\beta$ . Dodatkowo udowodniono, że niektóre rodzaje komórek macierzystych posiadają właściwości immunomodulacyjne, co może być wykorzystane z kolei do hamowania destrukcji komórek  $\beta$  i do indukcji środowiska tolerogenicznego w przeszczepie wysp trzustkowych [112–114]. Co więcej, komórki macierzyste wspomagają rewaskularyzację i proces angiogenezy, co byłoby dodatkowym atutem ich zastosowania w transplantacji wysp trzustkowych [115]. W terapii cukrzycy typu 1 próbowano użyć autologicznych hematopoetycznych komórek macierzystych (HSCs – *Hematopoietic Stem Cells*). Celem tej terapii nie była regeneracja wysp trzustkowych, lecz odnowienie układu immunologicznego pacjentów. Chorzy zakwalifikowani do leczenia otrzymywali najpierw leki mobilizujące HSCs ze szpiku do krwi obwodowej. Następnie komórki te były kolekcjonowane podczas leukaferozy i mrożone. W kolejnym etapie pacjenci otrzymywali chemioterapię niemieloablacyjną, której zadaniem było zniszczenie autoreaktywnych limfocytów, po czym podawano im własne, uprzednio zebrane i zamrożone HSCs w celu regeneracji układu immunologicznego [116,117]. Po takiej terapii około 66% pacjentów uzyskało okresową insulinoniezależność, która trwała nawet 4 lata. Wyniki różnych ośrodków, w których prowadzona jest ta terapia wskazują, że przeszczep autologicznych HSCs chroni komórki  $\beta$  trzustki przed reakcją autoimmunologiczną (podwyższony poziom C-peptydu, niższe wartości HbA<sub>1c</sub> i spadek zapotrzebowania na egzogenną insulinę w porównaniu z wynikami sprzed terapii) [116-118]. Niemniej jednak, metoda ta nie jest skuteczna u wszystkich chorych, a leki immunosupresyjne stosowane podczas chemioterapii stanowią realne zagrożenie dla życia pacjenta (1 przypadek śmiertelny), poza tym mogą prowadzić do trwałej niepłodności.

W transplantacji wysp trzustkowych zastosowano natomiast allogeniczne HSCs do wzbudzenia chimeryzmu mieszanego, czyli sytuacji, w której w szpiku kostnym i krwi obwodowej biorcy obecne są zarówno jego własne komórki, jak również komórki pochodzące od dawcy [119]. Celem takiego działania jest indukcja tolerancji immunologicznej [120]. Badania kliniczne przeprowadzone w ośrodku w Miami, w USA, gdzie biorcy wysp trzustkowych otrzymali allogeniczne HSCs wraz z terapią immunosupresyjną opartą o alemtuzumab nie potwierdziły jednak skuteczności tego podejścia. Nie uzyskano bowiem

chimeryzmu hematopoetycznego, a tym samym nie udało się zapobiec odrzuceniu przeszczepu [121]. Obecnie prowadzi się szereg badań pre-klinicznych na modelach zwierzęcych w celu wytworzenia chimeryzmu mieszanego, a tym samym stworzenia środowiska tolerogenicznego w organizmie biorcy. Stosowane obecnie strategie, poza komórkami macierzystymi biorcy włączają do protokołu terapii również leki takie, jak np. przeciwciało monoklonalne anty-CD154 lub anty-CD3/CD8, co ma na celu uzyskanie większego i bardziej i trwałego chimeryzmu mieszanego [122].

Mówiąc o komórkach macierzytych w terapii cukrzcy należy również wspomnieć o mezenchymalnych komórkach macierzystych (MSCs – *Mesenchymal Stem Cells*), które posiadają funkcje pro-angiogenne i immunomodulacyjne, predysponujące je do zastosowania także w przeszczepie wysp trzustkowych. MSCs mają zdolność hamowania proliferacji limfocytów T i B oraz komórek NK; wpływają na aktywność komórek dendrytycznych oraz indukują proliferację limfocytów T regulatorowych [114, 123]. Dodatkowo, komórki te wydzielają cytokiny przeciwzapalne i o działaniu immunosupresyjnym, oraz produkują czynniki pro-angiogenne [124–126]. Mają one zatem zdolność hamowania reakcji zapalnej, sprzyjają regeneracji komórek  $\beta$ , inhibicji odpowiedzi immunologicznej zarówno o podłożu allo-, jak i autogenicznym, a badania prekliniczne na modelach zwierzęcych potwierdziły, że terapia MSCs poprawia skuteczność przeszczepu wysp trzustkowych [122].

Obecnie prowadzone są badania kliniczne mające na celu potwierdzenie bezpieczeństwa ko-transplantacji wysp trzustkowych z MSCs jako terapii cukrzycy typu 1 (ClinicalTrials.gov; NCT00646724).

Najnowsze wyniki badań dotyczących właściwości immunomodulacyjnych i regeneracyjnych komórek macierzystych skłaniają ku optymistycznemu postrzeganiu wykorzystania tego typu terapii w przeszczepie wysp trzustkowych. Koniecznym jest jednak potwierdzenie bezpieczeństwa takiego leczenia, ewentualnych skutków ubocznych, określenie skutecznej dawki i opracowanie jednoznacznych, efektywnych protokołów izolacji i namnażania komórek macierzystych.

#### 1.4.4.3. Indukcja tolerancji przez komórki T regulatorowe (Tregs)

Komórki T regulatorowe (Tregs – *T regulatory cells*) stanowią ważny komponent układu odpornościowego, który nie bierze bezpośrednio udziału w ochronie organizmu przed potencjalnie szkodliwymi czynnikami obcymi, ale który chroni przed rozwojem nadmiernej reakcji immunologicznej, mogącej doprowadzić do zniszczenia własnych tkanek organizmu [127–130]. Dlatego też ich obecność i wzmożona aktywność jest pożądana w chorobach o podłożu autoimmunologicznym, jak również u biorców narządów, ponieważ hamują one zarówno reakcje auto- jak i allogeniczne, indukując tolerancję własnych i obcych tkanek [131].

Pierwsze spekulacje na temat istnienia limfocytów supresorowych, które poprzez inhibicję aktywności limfocytów efektorowych regulują odpowiedź immunologiczną, pojawiły się we wczesnych latach 70. XX wieku [132-134]. Jednak w związku z tym, że nie dało się scharakteryzować i określić ich specyficznych markerów, hipotezę o istnieniu limfocytów supresorowych podawano przez lata w wątpliwość [135]. Dopiero w połowie lat 90. XX wieku Sakaguchi potwierdził, że grupa komórek o fenotypie CD4+CD25+ pełni ważną rolę w immunoregulacji, a ich usunięcie prowadzi do rozwoju schorzeń autoimmunologicznych [136]. Co więcej, odkrycie markera transkrypcyjnego FoxP3, specyficznego dla komórek Treg ugruntowało pogląd o komórkach T regulatorowych [137–139]. Poziom ekspresji FoxP3 w komórkach Treg koreluje z ich supresyjną aktywnością [140], a brak tego markera jest odpowiedzialny za rozwój wielonarządowych schorzeń autoimmunologicznych, co widać wyraźnie w przypadku szczepu myszy *scurfy* oraz u osób ze sprzężonym z chromosomem X zespołem dysregulacji immunologicznej, poliendokrynopatii i enteropatii (IPEX – *Immunodysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked Syndrome*) [141–143].

Komórki T regulatorowe stanowią kilka procent, zwykle mniej niż 10% wszystkich limfocytów T CD4+ we krwi obwodowej [144]. Komórki Treg są populacją heterogenną. Można wśród nich wyróżnić: naturalne komórki Treg (nTregs) i indukowane (iTregs). Pierwsze z nich są generowane w grasicy – nTregs [145], a drugie w obwodowych narządach limfatycznych pod wpływem kontaktu z antygenem prezentowanym przez komórki APC w odpowiednim środowisku cytokinowym [146]. Różnią się one również pod względem ekspresji markerów powierzchniowych. nTregs posiadają ekspresję czynnika transkrypcyjnego Helios i FoxP3 oraz wysoką ekspresję cząsteczki CD25, podczas gdy iTregs są Helios negatywne [131]. Niedawno wykazano również różnice epigenetyczne w obrębie genu FoxP3 pomiędzy dwoma typami komórek Treg. Określono mianowicie, że nTregs wyróżnia stała demetylacja specyficznego regionu w obrębie locus genu *foxp3* nazywanego TSDR (T<sub>reg</sub>-specific-demethylated region) [147,148]. Obecnie trwają badania nad określeniem dokładnych mechanizmów działania supresyjnego obydwu populacji komórek Treg. Wiadomo, że obie populacje mogą hamować aktywność efektorowych limfocytów T CD4+, T CD8+, B, komórek NK, komórek dendrytycznych, makrofagów i neutrofilów [149,150]. Znanych jest kilka mechanizmów supresorowych komórek Treg i prawdopodobnie są one konsekwencją heterogenności komórek, na które działają limfocyty Treg, [151]. Można do nich zaliczyć: kompetywną blokadę sygnału kostymulacji przez wiązanie CTLA-4 do CD80 i 86, a następnie modulację funkcji komórek dendrytycznych poprzez interakcję CTLA-4-CD80/CD86, wydzielanie cytokin immunosupresyjnych: IL-10, IL-35, syntezę TGF-β (zarówno w formie sekrecyjnej, jak i związanej z błoną komórkową), wydzielanie granzymu i



perforyny, inhibicję proliferacji limfocytów T poprzez bezpośredni transfer cyklicznego AMP (adenozynomonofosforan) do wnętrza aktywowanych limfocytów T CD4+ i T CD8+, konkurencję o IL-2 (mitogen limfocytów T), indukcjęIDO (*indoleamine 2,3-dioxygenase*) w komórkach APC, produkcję białka LAG3 (*lymphocyte-activation gene 3*), które hamuje proliferację i aktywację limfocytów T w podobny sposób do CTLA-4 [150–152].

Rola komórek Treg w tolerancji immunologicznej przeszczepów allogenicznych stała się przedmiotem wielu badań [153–155]. Wyniki uzyskane na modelach zwierzęcych wskazują, że komórki Treg indukują allotolerancję i w konsekwencji hamują odrzucanie przeszczepu [156,157]. Skuteczność i możliwość szerokiego zastosowania terapii komórkami Treg udowodniono również na modelach zwierzęcych choroby przeszczep przeciw gospodarzowi – GvHD (*Graft versus Host Disease*) [158–162] oraz schorzeń autoimmunologicznych [163–166]. W ciągu ostatnich kilku lat bezpieczeństwo terapii komórkami Treg potwierdzono w kilku badaniach klinicznych, z czego badania naszego zespołu były pierwszymi badaniami na świecie, w których komórki Treg użyto z powodzeniem najpierw w terapii GvHD, a następnie w cukrzycy typu 1 [167–169].

Badania na modelach zwierzęcych udowodniły, że komórki Treg pełnią ważną rolę w patogenezie cukrzycy typu 1. Usunięcie komórek Treg u myszy NOD powoduje gwałtowny rozwój cukrzycy o podłożu autoimmunologicznym. Z kolei podanie komórek Treg pozwala na zahamowanie postępu choroby [170–172]. Jednak informacje dotyczące roli komórek Treg w patogenezie cukrzycy typu 1 u ludzi są niejednoznaczne. Część opublikowanych do tej pory prac wskazuje, że liczba tych komórek u chorych na cukrzycę typu 1 jest obniżona, część, że jest podwyższona, a jeszcze inne donoszą, że jest taka sama jak u osób zdrowych. Sprzeczne są również informacje na temat funkcjonalności komórek Treg u tej grupy pacjentów [173]. Nie da się jednak tych wyników obiektywnie porównać, gdyż różnią się one pod względem markerów, które brane były pod uwagę w celu identyfikacji komórek Treg, a przede wszystkim badano chorych w różnym czasie od pierwszej manifestacji cukrzycy, co niewątpliwie ma wpływ na stan aktywacji i wyczerpania układu immunologicznego oraz samych komórek Treg. Dodatkowo, większość badań dotyczyło limfocytów Treg we krwi obwodowej, natomiast istotne z punktu widzenia patogenezy cukrzycy zmiany mogą dotyczyć komórek Treg obecnych w węzłach chłonnych trzustki [173,174]. Istnieje także pogląd, że funkcja i liczba komórek Treg nie ulega zmianie w cukrzycy typu 1, lecz problem stanowią komórki efektorowe, które ulegają hiperaktywacji i są odporne na mechanizmy supresorowe komórek Treg [175,176]. Niemniej jednak, pierwsze badanie kliniczne z zastosowaniem komórek Treg u dzieci ze świeżo zdiagnozowaną cukrzycą typu 1, które przeprowadził nasz zespół badawczy wskazują, że terapia limfocytami Treg chroni komórki  $\beta$  przed zniszczeniem na przestrzeni lat i znacznie poprawia

kontrolę glikemii [177,178]. Obecnie trwają także badania kliniczne, w których komórki Treg podawane są dorosłym (ClinicalTrials.gov; NCT01210664).

Badania prekliniczne i kliniczne dotyczące zastosowania komórek Treg w przeszczepach allogenicznych i w schorzeniach o podłożu auto-immunologicznym pozwalają stwierdzić, że terapia ta może przynieść szczególne korzyści w transplatacji wysp trzustkowych. Wynika to z faktu, że komórki Treg mają zdolność hamowania nie tylko odpowiedzi na allogeniczny przeszczep, jakim są wyspy pochodzące od dawcy, ale mają też zdolność hamowania mechanizmów, które wcześniej doprowadziły do zniszczenia własnych komórek  $\beta$  pacjenta. Pierwsze badania prekliniczne na humanizowanych modelach mysich przeszczepu wysp trzustkowych udowodniły, że ludzkie komórki Treg mogą być skutecznym narzędziem w indukcji tolerancji immunologicznej i przyczynić się do eliminacji lub zmniejszenia dawki stosowanych do tej pory leków immunosupresyjnych, które, jak to zostało omówione powyżej, powodują szereg skutków ubocznych [179,180]. Mając na względzie obecny stan wiedzy i prace przygotowawcze wielu zespołów, należy się spodziewać, że pierwsze badania kliniczne, w których komórki Treg zostaną podane pacjentom po przeszczepie wysp trzustkowych zostaną wkrótce zainicjowane. Aby zwiększyć szansę powodzenia takiej terapii, obie metody, zarówno izolacji i transplatacji wysp trzustkowych, jak i ekspansji komórek Treg wymagają optymalizacji do warunków klinicznych i określenia czynników, które mogą poprawić ich skuteczność.

## 2. CELE PRACY

**Celem pracy było opracowanie i optymalizacja nowej terapii komórkowej w cukrzycy typu 1 w oparciu o przeszczep wysp trzustkowych z zastosowaniem komórek T regulatorowych do indukcji tolerancji immunologicznej.**

Zadanie to realizowano poprzez:

- optymalizację wyboru dawcy trzustki w celu poprawy wydajności izolacji wysp trzustkowych - określenie nowego czynnika selekcji dawcy
- modyfikację protokołu ekspansji komórek Treg zgodną z warunkami dobrej praktyki laboratoryjnej (*Good Laboratory Practice*; GLP) - dobór pożywki hodowlanej
- dobór metody krioprezewacji komórek Treg, która mogłaby zostać wykorzystana do celów klinicznych
- analizę wpływu wybranych leków immunosupresyjnych stosowanych w przeszczepie wysp trzustkowych na komórki Treg
- opracowanie metody lokalnej immunoprotekcji wysp trzustkowych z wykorzystaniem komórek Treg



### 3. NAJWAŻNIEJSZE SPOSTRZEŻENIA Z PREZENTOWANYCH PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

#### 3.1. Wzrost dawcy trzustki jako dodatkowy czynnik przy wyborze odpowiedniego dawcy, wpływający na powodzenie izolacji wysp trzustkowych

Wang LJ., Cochet O., Wang XJ., Krzystyniak A., Misawa R., **Golab K.**, Tibudan M., Grose R., Savari O., Millis JM., Witkowski P. **Donor height in combination with islet donor score improves pancreas donor selection for pancreatic islet isolation and transplantation.** *Transplant Proc.* 2014, 46, 6, 1972-1974.

Na powodzenie izolacji i transplantacji wysp trzustkowych wpływa szereg czynników i każdy etap, zarówno izolacji, jak i transplantacji ma tu znaczenie. Już sam wybór odpowiedniego organu, z którego zostaną wyizolowane wyspy jest niezmiernie ważny. Pozwala bowiem uniknąć nieskutecznych izolacji, zakończonych uzyskaniem niewystarczającej ilości wysp dobrej jakości, nie pozwalających na transplantację, a tym samym zaoszczędzić nakłady finansowe, materiały i czas.

Od początku ery izolacji ludzkich wysp trzustkowych próbowano określić czynniki wpływające na jej powodzenie, a zwłaszcza parametry, które pozwoliłyby ocenić czy użycie danego organu może dać pożądaną ilość wysp dobrej jakości [24,30,181–185]. W 2005 roku ośrodek w Edmonton zaproponował kompleksowy system punktowej oceny potencjalnego dawcy – IDS (*Islet Donor Score*), mający na celu poprawę selekcji organów, które mogą zapewnić izolację trzustkową zakończoną sukcesem [27]. System ten bierze pod uwagę wiele czynników i przyznaje punkty w zależności od wagi znaczenia danego czynnika. Są to między innymi: wiek, BMI, wyniki badań morfologicznych krwi, historia leczenia, przyczyna śmierci dawcy, metoda pobrania organu oraz czas zimnego niedokrwienia [27].

Nasz zespół badawczy zaproponował dodanie wzrostu dawcy jako niezależnego czynnika, który wraz z analizą IDS pozwoli na wybór odpowiedniego dawcy trzustki, aby zapewnić skuteczną izolację wysp. Przeanalizowaliśmy 22 izolacje wysp trzustkowych dokonane w naszym ośrodku w latach 2011-2012. Parametry dawcy zostały zebrane na podstawie danych umieszczonych w sieci UNOS (*United Network for Organ Sharing*). Wyniki IDS zostały zanalizowane według tabeli udostępnionej przez Zespół Izolacji Wysp Trzustkowych z Uniwersytetu Alberta, Edmonton, Kanada.

**Tabela 1.** Punktowa ocena dawcy trzustki – IDS (*Islet Donor Score*) na podstawie systemu opracowanego przez zespół z Uniwersytetu Alberta, Edmonton, Kanada [27].

PARAMETR	PUNKTY (max)	PUNKTY W ZALEŻNOŚCI OD PARAMETRU					
		<20	20 - 25	26 -35	36 - 55	56 - 65	> 65
Wiek (lata)	20	<20	20 - 25	26 -35	36 - 55	56 - 65	> 65
		15	15	15	20	10	5
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	15	<20	20.1 - 25	25.1 - 30	30.1 - 35	> 35	
		5	10	12	15	12	
Czas zimnego niedokrwienia - CIT (godziny)	15	< 3	3 - 8	8.1 - 12	> 12		
		12.5	15	10	5		
Wyniki badania krwi*	5	w normie	markery specyficzne poza normą**	inne markery poza normą***	markery specyficzne i inne markery poza normą		
		5	2	4	0		
Historia leczenia	5	brak	zatrzymanie akcji serca	nadużywanie alkoholu	nadciśnienie tętnicze		
		5	-15	3	-10		
Pobyt w szpitalu (dni)	5	< 2	2-4	5 - 7	>8 dni		
		5	3	2	0		
Leki wazopresyjne (liczba użytych)	5	0	1	2	≥3		
		5	3	0	-5		
Przyczyna zgonu	20	anoksja (niedotlenienie krwi)	obrażenia ciała z urazami jamy brzusznej	obrażenia ciała bez urazów jamy brzusznej	zdarzenie naczyniowo-mózgowe		
		0	8	10	20		
Zespół pobierający organ	10					własny	inny niż własny
						10	5
<b>Suma (OCENA)</b>	<b>100</b>						

\* wartości prawidłowe według lokalnych standardów

\*\* markery specyficzne to: poziom glukozy, amylazy, lipazy. Wartości poza normą w stanie Illinois, USA: glukoza >200 mg/dl (lub >11,1 mmol/l); amylaza >200 U/l; lipaza >190 U/l

\*\*\* inne markery to: AST (aminotransferaza asparaginowa), ALT (aminotransferaza alaninowa), kreatynina, BUN (azot mocznika we krwi – *Blood Urea Nitrogen*). Wartości

poza normą w stanie Illinois, USA: AST >40 IU/l; ALT >50 IU/l; kreatynina >1.38 mg/dl; BUN >24 mg/l.

Na podstawie 22 przeprowadzonych przez nas izolacji zestawiliśmy informacje dotyczące ilości uzyskanych wysp wyrażone przez IEQ z wagą trzustki, faktem czy wyspy zostały zakwalifikowane do przeszczepu w oparciu o IDS, jak również włączyliśmy do analizy wzrost każdego dawcy trzustki. Do określenia zależności pomiędzy wymienionymi danymi w analizie statystycznej posłużono się współczynnikiem korelacji Pearsona.

Podczas wszystkich izolacji wysp trzustkowych, do których użyto trzustek od dawców z IDS większym niż 80 uzyskano więcej niż 300 000 IEQ. 80% (4/5) wysp trzustkowych wyizolowanych od tych dawców zostało przeszczepionych. Wszyscy dawcy w tej grupie charakteryzowali się wzrostem  $179 \pm 3$  cm. Gdy IDS było mniejsze niż 80, tylko w 17% przypadków (3/17) udało się uzyskać więcej niż 300 000 IEQ. Wszystkie trzy izolacje zakończone zostały transplantacją. W tych trzech przypadkach, pomimo IDS <80, wzrost dawcy wynosił >175 cm. Analiza statystyczna zebranych przez nas danych pozwoliła stwierdzić, że wzrost dawcy jest niezależnym parametrem, który koreluje z wagą trzustki, IDS oraz uzyskaną ilością wysp wyrażoną w IEQ przed- oraz po oczyszczeniu wysp na gradiencie ciągłym.

**Tabela 2.** Analiza korelacji pomiędzy wzrostem dawcy a: IEQ przed- (Pre-IEQ) i po oczyszczeniu wysp w gradiencie (Post-IEQ), IDS i wagą trzustki (n=22).

Wzrost dawcy	Pre-IEQ	Post-IEQ	IDS	Waga trzustki
r	0,5486	0,5534	0,5919	0,4882
P	0,0082	0,0093	0,0037	0,02121

Skróty: IEQ – *islet equivalent*, ekwiwalent wysp trzustkowych; IDS – *Islet Donor Score*, punktowa ocena dawcy trzustki.

Źródło:

1) Wang LJ., Cochet O., Wang XJ., Krzystyniak A., Misawa R., Golab K., Tibudan M., Grose R., Savari O., Millis JM., Witkowski P. Donor height in combination with islet donor score improves pancreas donor selection for pancreatic islet isolation and transplantation. *Transplant Proc.* 2014, 46, 6, 1972-1974.

W parametrach branych pod uwagę w IDS w przypadku BMI dawcy można przyznać 15 punktów ze 100, gdy jest ono w zakresie 30,1-35 [27]. Jednak, na podstawie BMI nie da się jednoznacznie przewidzieć wagi trzustki i ilości wysp trzustkowych, które będzie można z niej wyizolować. Trzustka u dawców z BMI w takim zakresie może bowiem zawierać tkankę tłuszczową, nie zawierając większej ilości wysp. Aby zwiększyć przewidywalność wagi trzustki od danego dawcy, a tym samym ilość wysp trzustkowych w organie zaproponowaliśmy dodanie wzrostu jako kolejnego parametru przy ocenie potencjalnych dawców trzustki. System IDS pozwala stwierdzić, że przy punktacji większej niż 80

szanse na transplantację wysp trzustkowych po izolacji wynoszą 50% [27]. W naszym ośrodku otrzymywaliśmy podobne wyniki, gdy sam IDS był brany pod uwagę. Jednak, w niniejszej pracy udowodniliśmy, że wzrost dawcy jako niezależny parametr jest skorelowany z wagą trzustki oraz ilością ekwiwalentów wysp trzustkowych uzyskanych podczas izolacji. Co więcej, gdy brany jest pod uwagę wzrost dawcy ( $179 \pm 3$  cm) wraz z IDS, częstotliwość transplantacji po izolacji wysp trzustkowych wzrasta do 80%. Nasza analiza wskazuje, że wzrost dawcy powinien być brany pod uwagę podczas oceny dawcy trzustki według IDS, aby zapewnić optymalną selekcję organu, która zapewni izolację wysp trzustkowych zakończoną transplantacją.

### **3.2. Komórki T regulatorowe jak narzędzie terapeutyczne do indukcji tolerancji immunologicznej w przeszczepie wysp trzustkowych**

Krzystyniak A., Gołab K., Witkowski P., Trzonkowski P. **Islet cell transplant and the incorporation of Tregs.** *Curr Opin Organ Transplant.* 2014, 19, 6, 610-615.

Transplantacja wysp trzustkowych może być skuteczną metodą terapii cukrzycy typu 1, szczególnie u pacjentów, u których cukrzyca towarzyszą napady nieświadomej hipoglikemii. Pomimo ulepszeń w samej metodzie izolacji wysp oraz przełomu jaki nastąpił po opublikowaniu protokołu Edmonton, który zakładał wyeliminowanie diabetogennych steroidów jako leków immunosupresyjnych przy transplantacji wysp trzustkowych [53], wciąż nie jest to metoda w pełni skuteczna, a główny problem stanowi konieczność stosowania dożywotniej immunosupresji, często związanej, jak to opisano powyżej, z wieloma skutkami ubocznymi.

W naszej pracy spróbaliśmy określić potencjał i szanse terapii komórkami Treg do zapobiegania odrzucania przeszczepu wysp trzustkowych na podstawie wyników dotychczas przeprowadzonych badań preklinicznych i wiedzy dotyczącej komórek Treg. Zidentyfikowaliśmy także problemy, które mogą być związane z taką terapią i podjeliśmy próbę przedstawienia możliwych rozwiązań.

Jednym z problemów do rozważenia podczas transplantacji wysp trzustkowych z jednoczesną infuzją komórek Treg jest miejsce podania zarówno wysp, jak i komórek Treg. Podane dożylnie limfocyty Treg mogą mieć ograniczoną zdolność migracji do miejsca przeszczepu, a następnie do węzłów chłonnych, co z kolei, jak udowodniono, jest warunkiem koniecznym, aby mogły one skutecznie hamować odpowiedź komórek T efektorowych [186]. Jeżeli chodzi o wyspy trzustkowe, to w miejscach przeszczepu, gdzie dochodzi do bezpośredniego kontaktu wysp z krwią, narażone są one na atak ze strony odpowiedzi nieswoistej i układu dopełniacza [187], z czego ostatni nie jest w pełni hamowany przez komórki Treg. Rozwiązaniem może być tu jednoczesny przeszczep wysp trzustkowych i komórek Treg w miejsce, gdzie nie ma bezpośredniego kontaktu z krwią obwodową, takie jak: szpik kostny, mięśnie

szkieletowe, trzustka, torebka nerki. W przypadku jednoczesnego podania komórek Treg i wysp trzustkowych w wyżej wymienione miejsca problem stanowić może akumulacja insuliny, która wpływa negatywnie na sekrecję IL-10 przez komórki Treg [188], co jest z kolei jednym z ważnych mechanizmów supresorowych tych komórek. Potencjalnie, podawanie egzogennej insuliny pacjentowi w pierwszych dniach po transplantacji, mogłoby zahamować produkcję insuliny przez przeszczepione komórki  $\beta$ , a komórki Treg do czasu odstawienia insulinoterapii mogłyby znajdować się już w węzłach chłonnych i rozpocząć działanie supresorowe. Innym rozwiązaniem zapewniającym pożądaną migrację limfocytów Treg, może być stymulacja tej migracji przez zastosowanie chemokin, np. CCL22 (*Chemokine (C-C motif) Ligand 22*; chemokina 22 typu C-C). Badania na transgenicznym modelu mysich charakteryzujących się ekspresją genu CCL22 w wyspach trzustkowych wykazały, że może to być skuteczna metoda hamująca rozwój cukrzycy [189] oraz zapewniająca ochronę przeszczepionych wysp [190]. Klinicznie, wyspy trzustkowe mogłyby być opłaszczane polimerami zawierającymi chemokiny lub przeszczepiane jednocześnie z mikrosferami, które mają zdolność uwalniania chemokin. Metoda enkapsulacji wysp trzustkowych z zastosowaniem CCL22 lub/i CXCL12 (*C-X-C Chemokine Ligand 22*; chemokina 22 typu C-X-C) jest obecnie optymalizowana przez nasz zespół badawczy. Indukcja migracji komórek Treg do miejsca przeszczepu mogłaby również pozwolić na ograniczenie liczby komórek Treg potrzebnych do skutecznego hamowania odrzucania przeszczepu, gdyż dałaby możliwość, aby więcej limfocytów Treg podjęło funkcję supresorową po migracji do przeszczepu, a następnie do lokalnych węzłów chłonnych.

Wiele nowych publikacji podaje, że antygenowo specyficzne limfocyty Treg są skuteczniejsze w hamowaniu reakcji immunologicznej niż komórki poliklonalne [191–193]. Zastosowanie antygenowo-specyficznych limfocytów Treg mogłoby również zminimalizować ilość tych komórek potrzebnych do indukcji tolerancji immunologicznej. Jednakże, w wypadku przeszczepu wysp trzustkowych, koniecznym byłoby wygenerowanie limfocytów Treg specyficznych pod względem antygenów dawcy, jak i specyficznych antygenów komórek  $\beta$ , które są rozpoznawane przez układ immunologiczny chorego w procesie patogenezy cukrzycy typu 1.

Innym problemem może być logistyka związana z jednoczesną infuzją komórek Treg i przygotowaniem wysp trzustkowych do transplantacji, czyli ich izolacji w zależności od dostępności dawcy organu. W tym wypadku, idealnym rozwiązaniem byłaby krioprezerwacja komórek Treg, a następnie przygotowanie ich do infuzji w momencie dostępności wysp trzustkowych. Jednak, jak to zostanie szerzej omówione później, z krioprezerwacją Tregów wiąże się wiele problemów i wyzwań [194].

Kolejnym zagadnieniem, które zostało omówione w niniejszej publikacji jest bezpieczeństwo terapii komórkami Treg. Podczas dotychczas prowadzonych badań klinicznych nie zanotowano efektów ubocznych towarzyszących infuzji

tych komórek [167,169,178,195]. Co więcej, w jednych z badań udowodniono, że komórki Treg wspomagają wręcz odporność na wirusa cytomegalii u pacjentów po transfuzji hematopoetycznych komórek macierzystych [168]. Długofalowe skutki terapii komórkami Treg nie są jeszcze znane. Należy brać pod uwagę, że limfocyty Treg mogą wspomagać hamowanie odpowiedzi immunologicznej przeciwko komórkom nowotworowym, a tym samym wspierać proces karcenogenezy. Nie ma jednak jednoznacznych wyników, potwierdzających, że infuzja komórek Treg ma takie działanie.

Argumentem przemawiającym za wykorzystaniem komórek Treg do indukcji tolerancji immunologicznej w przeszczepie wysp trzustkowych jest fakt, że jak potwierdzają wyniki badań klinicznych naszego zespołu, mają one zdolność hamowania odpowiedzi autoimmunologicznej w cukrzycy typu 1 [195,178]. Ponadto silnym argumentem potwierdzającym zasadność zainicjowania pierwszych badań klinicznych opartych o jednoczesną transplantację komórek Treg i wysp trzustkowych jest działanie supresorowe komórek Treg w stosunku do odpowiedzi allogenicznej [156,157]. W naszej pracy, podsumowaliśmy ważne zagadnienia i problemy, które mogą pomóc w planowaniu, a następnie interpretacji wyników takich badań.

### 3.3. Optymalizacja ekspansji komórek T regulatorowych poprzez dobór odpowiedniej pożywki hodowlanego

**Gołab K.,** Krzystyniak A., Marek-Trzonkowska N., Misawa R., Wang LJ., Wang X., Cochet O., Tibudan M., Langa P., Millis JM., Trzonkowski P., Witkowski P. (2013) **Impact of culture medium on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>lo/neg</sup> Treg expansion for the purpose of clinical application.** *Int. Immunopharmacol.* 2013, 16, 3, 358-363.

W zdrowym organizmie liczba komórek Treg utrzymuje się na stałym poziomie i wynosi około kilku procent wszystkich limfocytów T CD4<sup>+</sup> w krwi obwodowej [144]. Tymczasem badania prekliniczne pokazują, że aby doszło do skutecznej ochrony przeszczepu przed odrzuceniem, liczba komórek Treg powinna stanowić co najmniej 50% liczby komórek T efektorowych [196,197]. Jedną ze strategii, aby zmienić proporcje komórek Treg do komórek T efektorowych jest infuzja namnożonych *in vitro* komórek Treg [198]. Metody izolacji limfocytów Treg z krwi obwodowej oraz ich namnażania są znane już od pewnego czasu [199–201]. Ostatnie lata przyniosły również rozwój tych metod poprzez między innymi zastosowanie nowych markerów komórek Treg [202,203], które mogą służyć do ich izolacji czy też wykorzystanie sztucznych komórek prezentujących antygen podczas ekspansji do stymulacji proliferacji [204]. Sukces ekspansji komórek Treg jest równoważny z otrzymaniem jak największej liczby tych komórek przy zachowaniu ich fenotypu i funkcjonalności. Cel ten jednak nie jest wciąż w pełni osiągalny przy



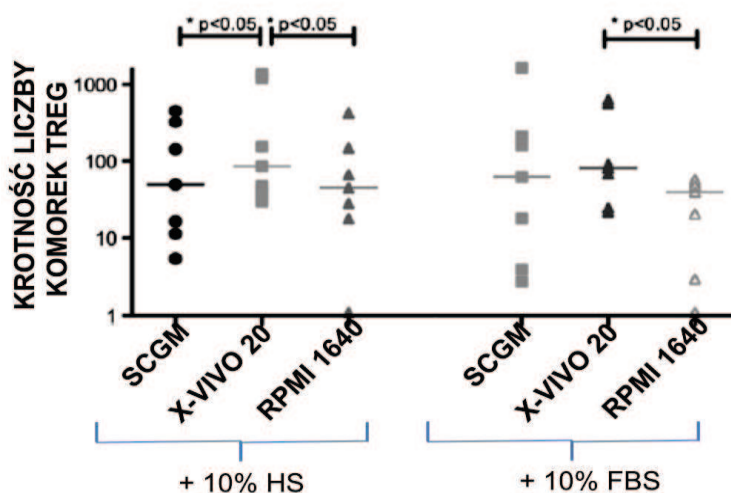
zastosowaniu współcześnie znanych metod. Co więcej, mało wiadomo na temat czynników, które mogą warunkować ten sukces. Jednym z ważnych elementów, które mogą wpływać na powodzenie ekspansji komórek Treg jest zastosowanie odpowiedniej pożywki hodowlanej i jej suplementacja. Opublikowane do tej pory badania wskazują, że pożywka hodowlana ma wpływ na wyniki ekspansji i fenotyp wszystkich limfocytów T CD4+ [205]. W naszej pracy zbadaliśmy i porównaliśmy wpływ kilku dostępnych na rynku pożywek hodowlanych suplementowanych ludzką surowicą (HS – *Human Serum*) lub surowicą bydlęcą (FBS – *Fetal Bovine Serum*) na ekspansję komórek Treg.

Komórki Treg izolowane były z kożuszków płytkowo-leukocytarnych pochodzących od zdrowych dawców (LifeSource, Chicago, USA) w kilkietapowym procesie. Najpierw izolowano jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMCs – *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) poprzez wirowanie w gradiencie gęstości na Ficoll<sup>®</sup>u (1,077 g/ml; AG Biochrom, Berlin, Niemcy), z których następnie pozyskiwano limfocyty T CD4+ metodą negatywnej izolacji immunomagnetycznej (zestaw Human CD4+ T Cell Enrichment; Stem Cell Technologies, Vancouver, Kanada). Następnie limfocyty T CD4+ znakowano przeciwciałami monoklonalnymi i sortowano je zgodnie z fenotypem CD4+CD3+CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>lo</sup>/-CD8-CD16-CD19- przy użyciu sortera komórkowego FACSAria III (BD Bioscience, San Jose, USA). Wyizolowane komórki Treg były liczone i równo dzielone do hodowli w następujących pożywkach: X-VIVO 20 (Lonza, Walkersville, USA), SCGM (CellGenix, Freiburg, Niemcy), RPMI 1640 (Cellgro, Manassas, USA), które były suplementowane albo HS w stężeniu 10%, albo FBS w takiej samej ilości i zawierały IL-2 (1000 U/ml). Komórki Treg w każdej z kombinacji były namnażane przez 17 dni i stymulowane kulkami magnetycznymi opłaszczonymi przeciwciałami anty-CD3 i anty-CD28 (LifeTechnologies, Carlsbad, USA), które były dodawane w pierwszym i siódmym dniu hodowli. Podczas ekspansji monitorowaliśmy fenotyp komórek Treg w każdej hodowli poprzez analizę ekspresji markerów: CD4, CD3, CD25, CD127, CD45RA, CD62L oraz FoxP3 z zastosowaniem cytometrii przepływowej. Po upływie 17 dni komórki Treg były zbierane i liczone, aby określić intensywność ich proliferacji w każdej z prowadzonych hodowli. Dodatkowo, aby sprawdzić, czy funkcjonalność komórek Treg została zachowana, wykonywaliśmy test hamowania proliferacji komórek T efektorowych przez limfocyty Treg. Podczas tego testu komórki Treg mieszane były z komórkami T efektorowymi wybarwionymi uprzednio barwnikiem CFSE (*carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*) w proporcjach 1:1, 1:2, 1:8. CFSE jest związkami, który wnika do cytoplazmy i przekazywany jest do komórek potomnych w równych częściach. W związku z tym obniżenie fluorescencji barwnika w komórkach odzwierciedla stopień ich proliferacji. Limfocyty były ponadto stymulowane IL-2 oraz kulkami magnetycznymi opłaszczonymi przeciwciałami anty-CD3 i anty-CD28 i hodowane razem przez 4 dni. Następnie, rozcieńczenie CFSE mierzone było z zastosowaniem cytometru przepływowego.



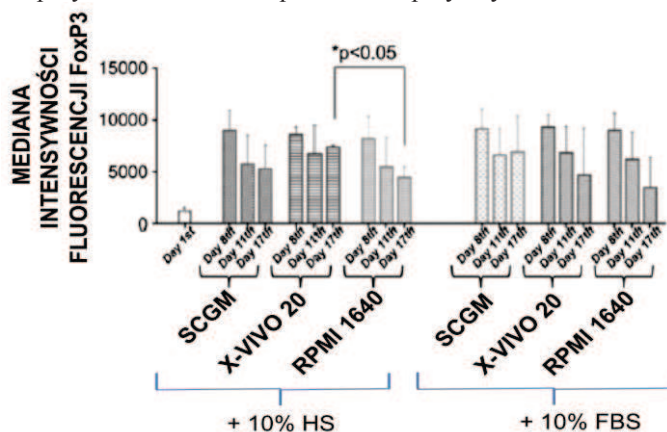
Z zebranych przez nas danych wynika, że zastosowanie do hodowli pożywki X-VIVO 20, która spełnia kryteria GLP daje najlepsze wyniki, jeżeli chodzi o otrzymanie jak największej liczby komórek Treg. Liczba podwojeń limfocytów Treg hodowanych w pożywce X-VIVO 20 suplementowanej 10% HS wynosiła 86, podczas gdy w przypadku pożywek SCGM 10% HS i RPMI 1640 10% HS wynosiły one odpowiednio 49 i 45. Podobnie wysoką liczbę podwojeń dla pożywki X-VIVO 20 otrzymaliśmy, kiedy pożywka suplementowana była 10% FBS – liczba podwojeń wyniosła wówczas 82.

**Rycina 1.** Wzrost liczby komórek Treg po 17 dniach ekspansji *in vitro* w zależności od użytego medium hodowlanego i suplementacji. Dane pochodzą z 7 przeprowadzonych niezależnych eksperymentów. Liniami zaznaczono medianę liczby podwojeń komórek Treg. Wartość p obliczono za pomocą testu kolejności par Wilcoxon.



Co więcej, komórki Treg hodowane w pożywce X-VIVO 20 z 10% HS charakteryzowały się najwyższym poziomem ekspresji czynnika transkrypcyjnego FoxP3 mierzonym jako intensywność fluorescencji barwnika związanego z przeciwciałem anti-FoxP3.

**Rycina 2.** Różnice w ekspresji FoxP3 w dniach 1, 8, 11 i 17 ekspansji komórek Treg w zależności od użytego medium hodowlanego i suplementacji. Dane przedstawiają medianę intensywności fluorescencji i pochodzą z co najmniej 5 niezależnych eksperymentów. Wartość p obliczono przy użyciu testu Manna-Whitneya.



Jeżeli chodzi o inne markery komórek Treg, to nie odnotowaliśmy znaczącego wpływu pożywki hodowlanej i zastosowanej surowicy na ich ekspresję. Procent komórek o fenotypie CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>lo/-</sup> w populacji Treg był utrzymany na wysokim poziomie przez całą ekspansję. Zaobserwowaliśmy jedynie zmniejszenie frekwencji komórek CD45RA<sup>+</sup> wraz z czasem trwania hodowli, co może być wynikiem stymulacji i oznacza, że w jej wyniku odsetek komórek naiwnych w hodowli sukcesywnie spada. Ten efekt nasz i inne zespoły badawcze zaobserwowały już wcześniej [206,207].

Komórki Treg po ekspansji we wszystkich zastosowanych przez nas warunkach wykazały zdolność hamowania proliferacji komórek T efektorowych.

Niniejsza praca pozwoliła na określenie, że pożywka hodowlana ma wpływ na potencjał ekspansji komórek T regulatorowych. Dobór odpowiedniej pożywki pozwoli na optymalizację ekspansji komórek Treg, a co za tym idzie umożliwi otrzymanie jak największej liczby tych komórek bez zmiany najistotniejszych cech fenotypu i funkcji, co jest niezwykle ważnym czynnikiem wpływającym na sukces terapii komórkami Treg.

### 3.4. Krioprezerwacja komórek T regulatorowych na skalę kliniczną – problemy i wyzwania

**Golab K.**, Leveson-Gower D., Wang XJ., Grzanka J., Marek-Trzonkowska N., Krzystyniak A., Millis JM., Trzonkowski P., Witkowski P. **Challenges in cryopreservation of regulatory T cells (Tregs) for clinical therapeutic applications.** *Int Immunopharmacol.* 2013, 16, 3, 371-375.

Z praktycznego punktu widzenia, terapia komórkami Treg, w szczególności jako narzędzie do indukcji tolerancji immunologicznej w przeszczepie wysp trzustkowych byłaby znacznie ułatwiona, gdyby komórki te lub populacje, z których możnaby je wyizolować były zamrażane i przechowywane w bankach komórek aż do czasu, kiedy zajdzie potrzeba podania ich pacjentowi. Takie rozwiązanie pomogłoby w planowaniu terapii, przygotowaniu pacjenta oraz umożliwiłoby ewentualne ponowne infuzje komórek Treg, niezmienionych pod wpływem terapii immunosupresyjnej zastosowanej u pacjenta [200,208].

W naszej pracy omówiliśmy problemy i wyzwania związane z krioprezerwacją komórek T regulatorowych oraz komórek, które mogą być przechowywane jako materiał wyjściowy do ich izolacji. Szczególną uwagę poświęciliśmy potencjalnym efektom mrożenia/rozmrzania na zachowanie żywotności, fenotypu i funkcjonalności przez populację komórek Treg, co może mieć znaczący wpływ przy krioprezerwacji mającej na celu zastosowanie kliniczne.

Jako materiał wyjściowy do izolacji komórek Treg mogą służyć wyizolowane z krwi pacjenta komórki PBMC. W istocie, w wielu badaniach klinicznych, w których zastosowano komórki Treg, komórki te selekcjonowano właśnie z wcześniej wyizolowanych PBMCs [169,201,209]. Jednak, jak pokazują badania, w których oceniano wpływ krioprezerwacji na odsetek komórek Treg w PBMCs, liczba ta spada po rozmrożeniu próbek [210–212]. Nie wiadomo czy jest to związane z niestabilnością specyficznych markerów komórek Treg (CD25, CD127, FoxP3) podczas krioprezerwacji, czy z samą wrażliwością populacji na proces mrożenia/rozmrzania. Dodatkowo, podczas izolacji komórek Treg z PBMCs narażone są one na inne czynniki, takie jak: wiązanie przeciwciał, przepływ przez kolumny magnetyczne lub/i pole elektryczne w sorterze, wielokrotne wirowania i płukania, co może przyczynić się do obniżenia ich żywotności i funkcjonalności. W efekcie liczba uzyskanych komórek Treg może być niewystarczająca do zainicjowania ekspansji na skalę kliniczną.

Dodatkowym problemem, który należy rozważyć przy zastosowaniu krioprezerwacji w terapii komórkami Treg jest sam wpływ mrożenia/rozmrzania na zachowanie funkcjonalności przez komórki. Jak pokazują badania przeprowadzone na PBMCs, mrożenie może upośledzać proliferację, sekrecję cytokin, produkcję białek i ekspresję mRNA. Wymienia się kilka mechanizmów, które są za to odpowiedzialne. Są to między innymi: stres oksydacyjny, uszkodzenie przez formujące się w komórce kryształy lodu,

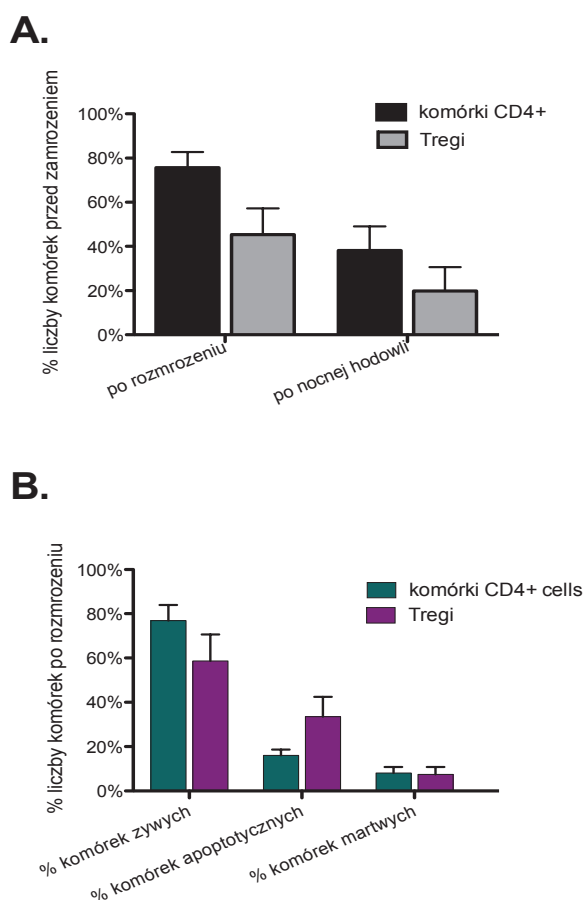
zmiany osmozy oraz homeostazy jonowej sodu i potasu, jak również zainicjowanie szlaku apoptozy [213]. Poważnym zagrożeniem ze strony krioprezerwacji, jeśli chodzi o funkcję komórek Treg, jest zaburzona po mrożeniu produkcja cytokin, szczególnie interleukiny-10 (IL-10), co udowodniono w badaniach na PBMC [214]. Sekrecja IL-10 jest natomiast jednym z istotnych mechanizmów supresorowych komórek Treg [215]. Co więcej, na podstawie badań wpływu mrożenia/rozmrażania na komórki PBMC, zauważono, że po rozmrożeniu spada frekwencja komórek z ekspresją selektyny L (CD62L) [216,217] oraz receptora 5 chemokin typu C-C (CCR5 – *Chemokine (C-C motif) receptor 5*). Obydwa te markery pełnią kluczową rolę w aktywności komórek Treg. Brak ekspresji CCR5 na limfocytach Treg związany jest z ograniczoną zdolnością hamowania odpowiedzi immunologicznej w GvHD [218], a brak CD62L wpływa negatywnie na migrację tych komórek do węzłów chłonnych [219], co w konsekwencji może istotnie redukować ich zdolności supresorowe, zwłaszcza wpływ na prezentację antygenów przez APC oraz aktywację naiwnych limfocytów T efektorowych.

W publikacjach naukowych można znaleźć niewiele informacji na temat mrożenia wyizolowanych już komórek Treg. Jednoznaczna interpretacja wyników jest też ograniczona, ponieważ różnią się one znacznie metodologią oraz etapem, na którym komórki Treg poddawano krioprezerwacji. Jednak, jak również zasugerowano w jednej z publikacji, mrożenie komórek Treg i rozmrażanie ich w odpowiednim momencie, kiedy wszystko jest gotowe do infuzji, byłoby niezmiernym ułatwieniem w terapii komórkami Treg [200]. Autorzy tej pracy próbowali mrozić komórki Treg wyizolowane za pomocą immunomagnetycznej deplekcji komórek CD8+, a następnie selekcji pozytywnej komórek CD25+ z zastosowaniem tej samej metody. Po rocznym przechowywaniu tak wyizolowanych komórek w ciekłym azocie, limfocyty Treg były rozmrażane. Ich żywotność wynosiła wówczas 70-80%, lecz nie wykazywały właściwości supresorowych w teście *in vitro*, nawet po kilkudniowej hodowli. Dopiero stymulacja i ekspansja przywracały rozmrożonym komórkom Treg zdolności immunosupresyjne [200]. W badaniach klinicznych, w których użyto komórki Treg izolowane z krwi pępowinowej w terapii GvHD, komórki te zamrażano po ekspansji w celu użycia ich do kolejnej infuzji [167]. Niestety, o ile po pierwszej infuzji komórek Treg pochodzących bezpośrednio z hodowli zaobserwowano wzrost ich odsetka we krwi obwodowej, to po podaniu komórek poddanych uprzednio krioprezerwacji nie stwierdzono już tego efektu. Przed podaniem limfocytów Treg, zarówno świeżych, jak i rozmrożonych autorzy analizowali ich żywotność. W przypadku krioprezerwowanych komórek Treg była ona niższa niż w przypadku komórek świeżych, lecz nadal była względnie wysoka i wynosiła ponad 50% [167]. Wy tłumaczeniem dlaczego mimo to nie stwierdzono wzrostu frekwencji limfocytów Treg we krwi obwodowej po drugiej infuzji może być apoptoza tych komórek zainicjowana przez krioprezerwację/rozmrażanie. W badaniach żywotności z jodkiem propidyny/oranżem akrydyny, które

zastosowano w omawianych badaniach klinicznych [167] można oznaczyć jedynie odsetek komórek martwych oraz żywych, bez możliwości identyfikacji komórek dopiero wchodzących na szlak apoptozy [220].

Jak przedstawiłam powyżej, wiedza dotycząca wpływu krioprezerwacji na komórki Treg lub komórki, które mogłyby być przechowywane w celu ich izolacji jest ograniczona i trudno wyciągnąć jednoznaczne wnioski oraz opracować na podstawie tych wyników protokół, który mógłby być zastosowany w terapii komórkami Treg. Z moich własnych obserwacji wynika, że komórki Treg są bardzo wrażliwe na proces mrożenia/rozmrażania. W naszym ośrodku testowaliśmy dwie strategie, które mogą być zastosowane przy przechowywaniu komórek przeznaczonych do terapii: 1). krioprezerwacja wyizolowanych komórek T CD4+, z których po rozmrożeniu sortowane i namnażane byłyby dopiero komórki Treg oraz 2). krioprezerwacja komórek Treg po ekspansji, a następnie kontynuacja stymulacji i dalsze namnażanie po ich rozmrożeniu (Karolina Gołąb, nieopublikowane wyniki). Po rozmrożeniu komórek przechowywanych zgodnie z opisanymi powyżej procedurami, uzyskaliśmy żywotność wynoszącą odpowiednio 76% i 45%. Procent odzyskanych po rozmrożeniu komórek obniżył się jeszcze bardziej po przeprowadzonej przez noc hodowli komórkowej do 38% w przypadku mrożenia komórek T CD4+ i 20% w przypadku komórek Treg. W naszych badaniach, oprócz sprawdzania żywotności komórkowej po krioprezerwacji, wykonaliśmy wspólną analizę żywotności i apoptozy. Z analizy tej wynika, że pomimo niewielkiego odsetka komórek martwych zaraz po rozmrożeniu (<10%), zarówno w przypadku komórek T CD4+ jak i Treg, w znacznej części komórek dochodzi do zainicjowania procesu apoptozy – 25% dla rozmrożonych komórek T CD4+ i 41% dla limfocytów Treg. Ten znaczny odsetek komórek apoptotycznych może tłumaczyć dlaczego w następnym dniu hodowli doszło do tak istotnego spadku liczby rozmrożonych komórek, o czym wspomniano powyżej (Karolina Gołąb, nieopublikowane wyniki).

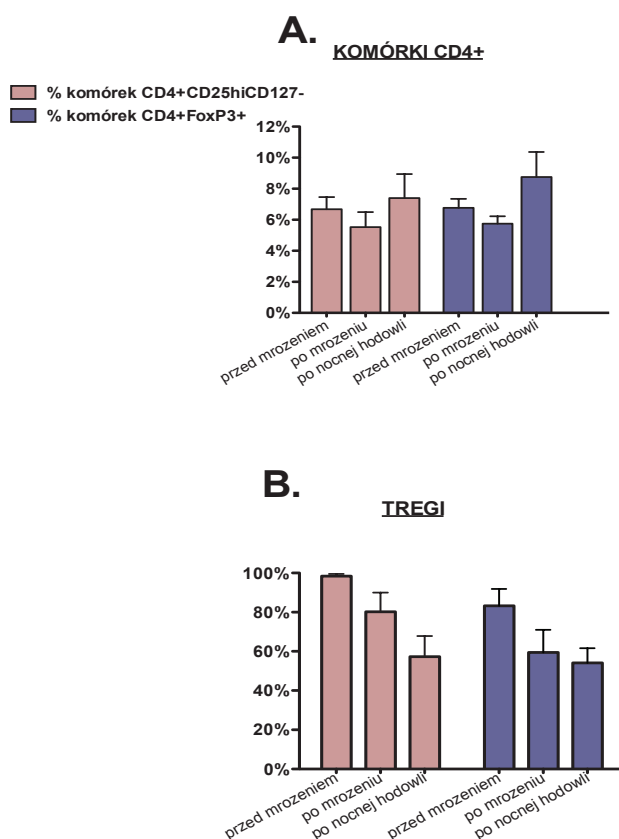
**Rycina 3.** A – Odsetek komórek odzyskanych w przypadku krioprezerwacji limfocytów T CD4+ (czarne kolumny) oraz komórek Treg mrożonych po ekspansji (szare kolumny). Przedstawiono wyniki uzyskane zaraz po rozmrożeniu oraz po nocnej hodowli. B – Frekwencja komórek żywych, apoptotycznych i martwych wśród komórek T CD4+ oraz namnożonych limfocytów Treg zaraz po rozmrożeniu. Dane przedstawiają średnią arytmetyczną z odchyleniem standardowym i pochodzą co najmniej z 3 niezależnych eksperymentów.



Ponadto, zaobserwowaliśmy zmiany frekwencji komórek o fenotypie charakterystycznym dla limfocytów Treg, tj. CD25hiCD127lo/-FoxP3+ przed, po rozmrożeniu oraz po nocnej hodowli. W przypadku komórek T CD4+ odsetek populacji CD25hiCD127lo/- spadł z 7% do 6% po rozmrożeniu. Podobne wyniki odnotowaliśmy w przypadku populacji FoxP3+. Po nocnej hodowli z kolei, odsetek komórek CD25hiCD127lo/- oraz FoxP3+ wśród komórek T CD4+ wyniósł odpowiednio 7% i 10%. W przypadku rozmrożonych komórek Treg, procent komórek z ekspresją CD25hiCD127lo/- spadł z 98% do

80% po rozmrożeniu, odsetek komórek Treg FoxP3+ obniżył się z 85% do 60%. Po nocnej hodowli, odsetek obu populacji spadł jeszcze niżej, tj. do 57% dla komórek CD25hiCD127lo/- i 54% dla komórek FoxP3+ (Karolina Gołąb, nieopublikowane wyniki).

**Rycina 4.** Porównanie odsetka komórek o fenotypie CD25hiCD127lo/- oraz FoxP3+ przed mrożeniem z wartościami po rozmrożeniu i po nocnej hodowli w przypadku, kiedy mrożono A – komórki T CD4+, B – komórki Treg po ekspansji. Dane przedstawiają średnią arytmetyczną z odchyleniem standardowym i pochodzą z co najmniej 3 niezależnych eksperymentów.



Mimo, że krioprezerwacja prowadziła do obniżenia żywotności zarówno komórek T CD4+ jak i namnożonych wcześniej komórek Treg, to limfocyty Treg, które przeżyły proces mrożenia/rozmrożenia w obu metodach krioprezerwacji charakteryzowały się dobrą, stałą ekspresją markera FoxP3 (>80%) podczas ekspansji oraz proliferacją na poziomie 100 podwojeń po 13 dniach hodowli, co nie różni się od wyników, które nasz ośrodek uzyskuje w przypadku komórek świeżych. Po przeprowadzeniu testów funkcjonalnych



zaobserwowaliśmy jednak, że komórki Treg wyizolowane z zamrożonych uprzednio limfocytów T CD4+ charakteryzował bardzo ograniczony potencjał supresorowy w przeciwieństwie do limfocytów Treg, które pochodziły z czystych mrożonych hodowli komórek Treg. Spostrzeżenie to stanowi istotną wskazówkę dla przyszłych badań klinicznych, w których krioprezervacja jest elementem protokołu. Prawdopodobnie przyczyną tego zjawiska są trudności w izolacji czystej populacji komórek Treg z mrożonych limfocytów T CD4+, ponieważ, jak wspomniano wcześniej, mrożenie/rozmrzanie komórek zmienia ekspresję ich markerów powierzchniowych (Karolina Gołąb, nieopublikowane wyniki).

W naszych nieopublikowanych jeszcze badaniach, zaobserwowaliśmy, że komórki Treg mogą być mrożone i przechowywane po uprzedniej izolacji i namnożeniu, ale po rozmrożeniu należy poddać je ponownej stymulacji oraz ekspansji, aby wyrównać straty liczby komórek związane z apoptozą oraz zapewnić im czas potrzebny do przywrócenia ich pierwotnego fenotypu i aktywności. Zaproponowana strategia może znaleźć zastosowanie w aplikacjach klinicznych, gdyż pozwala na przechowywanie nadmiaru komórek Treg pozostałych po pierwszej ekspansji w celu użycia ich do kolejnej infuzji.

### **3.5. Wpływ wybranych leków immunosupresyjnych na komórki T regulatorowe**

Wang XJ., Leveson-Gower D., **Golab K.**, Wang LJ., Marek-Trzonkowska N., Krzystyniak A., Wardowska A., Millis JM. Trzonkowski P., Witkowski P. **Influence of pharmacological immunomodulatory agents on CD4(+)CD25(high)FoxP3(+) T regulatory cells in humans.** *Int Immunopharmacol.* 2013, 16, 3, 364-370.

W transplantacji, wciąż jeden z największych problemów stanowi zastosowanie odpowiednich leków immunosupresyjnych tak, aby skutecznie zahamować reakcję odrzucania przeszczepu, a przy tym zminimalizować skutki uboczne. Jak potwierdza wiele badań, komórki Treg mają potencjał, aby zastąpić terapię lekami immunosupresyjnymi, gdyż są one zdolne do indukcji długotrwałej tolerancji immunologicznej. Co więcej, uważa się, że z terapią komórkami Treg wiążą się minimalne skutki uboczne [221]. Jako, że zastosowanie komórek Treg w transplantacji jest wciąż nowatorskim rozwiązaniem, w pierwszych badaniach klinicznych łączących infuzję wysp trzustkowych z komórkami Treg terapia ta będzie zapewne połączona z dotychczas stosowanymi lekami immunosupresyjnymi. Przy doborze protokołu immunosupresyjnego, który zostanie zastosowany łącznie z komórkami Treg, trzeba będzie wziąć pod uwagę wpływ używanych leków na funkcję i liczbę komórek Treg. Na pewno należy unikać terapeutyków, które działają toksycznie na limfocyty Treg. Optymalnym rozwiązaniem byłby natomiast wybór leków wspomagających działanie i stymulujących proliferację komórek Treg.

W naszej publikacji zaprezentowaliśmy i streściliśmy opublikowane doniesienia na temat wpływu najczęściej stosowanych leków immunosupresyjnych w transplantologii na populację komórek Treg.

**Tabela 3.** Wpływ wybranych leków immunosupresyjnych na komórki Treg na podstawie: Wang XJ., Leveson-Gower D., Golab K., Wang LJ., Marek-Trzonkowska N., Krzystyniak A., Wardowska A., Millis JM. Trzonkowski P., Witkowski P. Influence of pharmacological immunomodulatory agents on CD4(+)CD25(high)FoxP3(+) T regulatory cells in humans. *Int Immunopharmacol.* 2013, 16, 3, 364-370.

Lek	Wpływ na komórki Treg	Literatura
<b>Leki stosowane w protokole indukcji immunosupresji</b>		
<b>Globulina antytymocytarna (ATG)</b>	Zmiana równowagi komórki Treg/komórki T efektorowe na korzyść limfocytów Treg, prawdopodobnie poprzez wyższą oporność komórek Treg na działanie ATG.	[222–232]
<b>Przeciwciało anti-CD52 (alemtuzumab)</b>	Przechylenie równowagi komórki Treg/komórki T efektorowe na korzyść limfocytów Treg, gdyż komórki Treg charakteryzują się wzmożoną opornością na działanie tego leku; efekt promujący komórki Treg jest słabszy niż w przypadku ATG.	[233–239]
<b>Przeciwciało anti-CD3</b>	Selektywna deplecja limfocytów T efektorowych wpływa korzystnie na równowagę komórki Treg/ komórki T efektorowe, przez co wzrasta odsetek limfocytów Treg; wyniki badań pochodzą głównie z badań w chorobach autoimmunologicznych.	[240–242]
<b>Przeciwciało anti-CD25 (IL-2r; receptor IL-2)</b>	Redukcja liczby komórek Treg poprzez zablokowanie receptora istotnego dla rozwoju i funkcji tych komórek; niektóre badania wskazują, że przeciwciało anti-CD25 nie wpływa na ekspresję czynnika FoxP3 i proporcja komórek FoxP3+ po zastosowaniu anti-CD25 nie ulega zmianie.	[56,233,243–247]
<b>Leki stosowane do zahamowania odpowiedzi zapalnej</b>		
<b>Przeciwciała anti-TNF-<math>\alpha</math></b>	Wzrost odsetka komórek Treg oraz poprawa ich funkcji supresorowej poprzez wzrost ekspresji czynnika FoxP3; wyniki pochodzą głównie z badań, w których anti-TNF- $\alpha$ zastosowano w terapii chorób autoimmunologicznych.	[248–254]

<b>Inhibitor IL-1</b>	Wzrost odsetka komórek Treg przy jednoczesnym obniżeniu liczby komórek Th17 i Th1; wyniki pochodzą z zastosowania terapii inhibiorem IL-1 w reumatoidalnym zapaleniu stawów.	[255]
<b>Leki stosowane do utrzymania stanu immunosupresji</b>		
<b>Inhibitory kalcyneuryny</b>	Redukcja liczby komórek Treg poprzez zahamowanie ich proliferacji, jednak bez potwierzonego wpływu na ekspresję czynnika FoxP3.	[256–262]
<b>Białko fuzyjne CTLA-4 (CTLA4-Ig)</b>	Negatywny wpływ na proliferację naturalnych limfocytów Treg (nTreg) poprzez blokadę sygnału przekazywanego przez receptor CD28; jednak przy zastosowaniu CTLA-4-Ig w transplantacji nerek, liczba komórek FoxP3+ była wyższa niż w przypadku terapii inhibitorami kalcyneuryny.	[263,264]
<b>Mykofenolan mofetylu (MMF)</b>	Obniżenie liczby i odsetka komórek Treg; jednak w większości badań, z których pochodzą wyniki, MMF zastosowano w terapii łącznie z innym lekiem, trudno więc oceniać wpływ samego MMF na komórki Treg; są jednak publikacje, w których wykazano, że lek ten nie zmienia liczby, odsetka ani funkcji limfocytów Treg.	[226,265–271]
<b>Steroidy</b>	Brak wpływu na liczbę i odsetek komórek Treg; istnieją doniesienia, mówiące o wzroście liczby komórek Treg po zastosowaniu steroidów.	[253,272,273]
<b>Inhibitory szlaku mTOR</b>	Wzrost liczby komórek Treg; badania <i>in vitro</i> wskazują, że leki te mogą także wpływać korzystnie na zdolności supresorowe komórek Treg.	[231,265,274–278]
<b>Inne leki</b>		
<b>IL-2</b>	Wzrost liczby komórek Treg przy zastosowaniu odpowiedniej dawki IL-2; obecnie prowadzonych jest kilka badań klinicznych, w których IL-2 podawana jest w celu zwiększenia liczby komórek Treg w chorobach autoimmunologicznych.	[279–285]; ClinicalTrials.gov NCT02424396, NCT01988506, NCT02200445, NCT02265809

Z przeprowadzonych dotychczas badań wynika, że leki immunosupresyjne mogą mieć znaczący wpływ na liczbę i funkcję komórek Treg. Ma to ważne znaczenie przy planowaniu badań klinicznych z zastosowaniem terapii komórkami Treg do indukcji tolerancji immunologicznej w przeszczepie wysp trzustkowych i nie tylko. Znajomość tego wpływu pozwoli na wybór odpowiednich leków, które nie doprowadzą do niszczenia podawanych komórek Treg, a dodatkowo mogą wspomóc ich przetrwanie i funkcję. Z dostępnych danych wynika więc, że zastosowanie ATG w protokole indukcji, a następnie terapia lekami z grupy anty-TNF- $\alpha$  (do tłumienia odpowiedzi zapalnej) oraz inhibitora szlaku mTOR (do podtrzymania stanu immunosupresji) może okazać się optymalną metodą immunosupresji u biorców wysp trzustkowych i komórek Treg.

### 3.6. Metoda lokalnej immunoprotekcji wysp trzustkowych z wykorzystaniem komórek T regulatorowych i jej optymalizacja

Marek N., Krzystyniak A., Ergenc I., Cochet O., Misawa R., Wang LJ., **Gołąb K.**, Wang X., Kilimnik G., Hara M., Kizilel S., Trzonkowski P., Millis JM., Witkowski P. **Coating human pancreatic islets with CD4(+)CD25(high)CD127(-) regulatory T cells as a novel approach for the local immunoprotection.** *Ann Surg.* 2011 254, 3, 512-518.

**Gołąb K.**, Kizilel S., Bal T., Hara M., Zielinski M., Grose R., Savari O., Wang XJ., Wang LJ., Tibudan M., Krzystyniak A., Marek-Trzonkowska N., Millis JM., Trzonkowski P., Witkowski P. **Improved coating of pancreatic islets with regulatory T cells to create local immunosuppression by using the biotin-polyethylene glycol-succinimidyl valeric acid ester molecule.** *Transplant Proc.* 2014, 46, 6, 1967-1971.

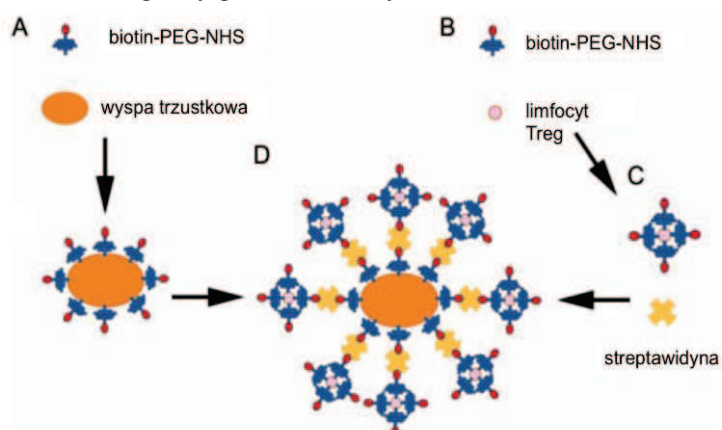
Jednym z problemów wynikających z dożylniej drogi podania komórek Treg w celu indukcji tolerancji immunologicznej w przeszczepie wysp trzustkowych może okazać się ograniczona zdolność migracji tych komórek do miejsca przeszczepu, a w konsekwencji nieskuteczna ochrona wysp przed odrzuceniem. Pomocnym rozwiązaniem tego problemu mogłoby być umiejscowienie komórek Treg wraz z wyizolowanymi wyspami trzustkowymi jeszcze przed podaniem pacjentowi tak, aby mieć pewność, że komórki te będą mogły działać dokładnie w miejscu, w którym zlokalizowany jest przeszczep.

Podczas naszych badań, które są przedmiotem niniejszych prac, opracowaliśmy metodę, w której wyizolowane wyspy trzustkowe opłaszczane są komórkami Treg za pomocą technik bioinżynierii.

W celu przyłączenia komórek Treg do powierzchni wyizolowanych ludzkich wysp trzustkowych poddaliśmy osobno modyfikacji zarówno komórki Treg, jak i wyspy trzustkowe stosując skoniugowany z biotyną polimer glikolu etylenowego zawierający resztę NHS (biotyna-PEG-NHS, *biotin-poly(ethylene glycol)-N-hydroxysuccinimide ester*). Biotyna-PEG-NHS wiąże się z

powierzchniowymi białkami błony komórkowej modyfikowanych komórek za pośrednictwem wiązań N-amidowych. Następnie, stosowaliśmy streptawidynę, która ma wysokie powinowactwo do biotyny w celu połączenia komórek Treg z wyspami trzustkowymi.

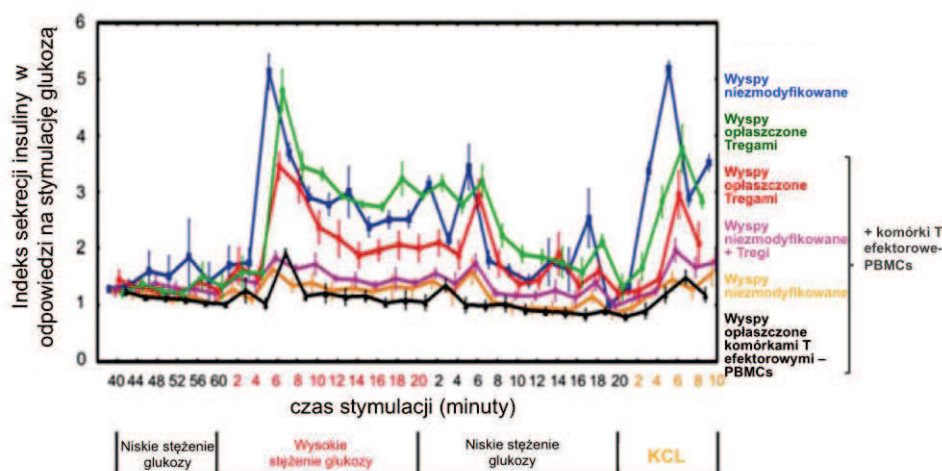
**Rycina 5.** Schemat ukazujący metodę opłaszczania wysp trzustkowych komórkami Treg. Dołączanie cząsteczek biotyna-PEG-NHS do powierzchni A – wysp trzustkowych, B – komórek Treg; C – dodanie streptawidyny do komórek Treg; D – połączenie komórek Treg z wyspami trzustkowymi.



Za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej oraz konfokalnej udowodniliśmy, że opłaszczenie wysp trzustkowych komórkami Treg jest możliwe. Podczas analizy uzyskanych zdjęć, widać, że komórki Treg równomiernie pokrywają powierzchnię wysp trzustkowych.

Następnie wykazaliśmy, że po procesie opłaszczania wyspy trzustkowe zachowują zarówno żywotność, jak i swoją funkcję, co potwierdziliśmy poprzez analizę zdolności opłaszczonych wysp do wydzielania insuliny w odpowiedzi na dynamicznie zmieniające się stężenia glukozy. Pod tym względem wyspy opłaszczone komórkami Treg nie różniły się od wysp, które nie zostały poddane modyfikacji. Dodatkowo wykazaliśmy, że metoda ta ma potencjał, aby skutecznie hamować odpowiedź immunologiczną i chronić wyspy trzustkowe przed atakiem ze strony komórek T efektorowych. W hodowli *in vitro* wyspy opłaszczone komórkami Treg ekspozowane były na działanie allogenicznych PBMC wzbogaconych w limfocyty T efektorowe, a następnie ich działanie oceniane było w dynamicznym teście stymulacji glukozą. Zaobserwowaliśmy, że wyspy opłaszczone komórkami Treg, w przeciwieństwie do niezmodyfikowanych wysp oraz wysp opłaszczonych PBMC i komórkami T efektorowymi zachowały swoją funkcję po ekspozycji na działanie allogenicznych leukocytów. Na uwagę zasługuje fakt, że komórki Treg skuteczniej chroniły wyspy trzustkowe, kiedy były związane z powierzchnią wysp (opłaszczone wyspy), niż kiedy dodaliśmy je w zawieszynie do niezmodyfikowanych wysp.

**Rycina 6.** Sekrecja insuliny przez wyspy trzustkowe opłaszczone komórkami Treg po hodowli z allogenicznymi PBMC wzbogaconymi w komórki T efektorowe jest zachowana. Diagram przedstawia wyniki dynamicznego testu stymulującego wydzielanie insuliny. Wyspy niezmodyfikowane, których odpowiedź przedstawiona jest za pomocą niebieskiej linii oraz wyspy opłaszczone komórkami Treg -zielona linia- nie były ekspozowane na działanie allogenicznych leukocytów i stanowią kontrole. Spośród testowanych przez nas metod ochrony jedynie wyspy opłaszczone komórkami Treg zachowały swoją funkcję (czerwona linia) po ekspozycji na działanie allogenicznych leukocytów. Dane przedstawiają średnią arytmetyczną indeksu stymulacji z błędem standardowym.



Udowodniliśmy także, że wyspy trzustkowe opłaszczone komórkami Treg są mniej immunogenne niż wyspy niezmodyfikowane i mają zdolność hamowania wydzielania IFN- $\gamma$  przez allogeniczne komórki T efektorowe. Również komórki Treg dodane do wspólnej hodowli komórek T efektorowych i niezmodyfikowanych wysp trzustkowych hamowały wydzielanie IFN- $\gamma$ , lecz aktywność ta była ograniczona. Wyniki te potwierdzają, że komórki Treg na powierzchni wysp tworzą skuteczną barierę immunoprotekcyjną.

W kolejnej pracy do modyfikacji powierzchni komórek Treg i wysp trzustkowych użyliśmy polimer glikolu etylenowego zawierający resztę SVA i biotynę (biotyna-PEG-SVA – *biotin-poly(ethylene glycol)-succinimidyl valeric acid ester*) jako alternatywą do zastosowanej wcześniej biotyny-PEG-NHS. Obie molekuly mają zdolność tworzenia wiązań N-amidowych z białkami błony komórkowej, ale grupa funkcyjna SVA charakteryzuje się większą stabilnością w wodnych roztworach, gdyż ma ponad 40-krotnie dłuższy okres półtrwania. Biorąc pod uwagę tę właściwość SVA, postanowiliśmy sprawdzić, czy zastosowanie biotyny-PEG-SVA zwiększy efektywność opłaszczania wysp komórkami Treg bez jednoczesnego wpływu na przeżywalność i funkcjonalność wysp trzustkowych.

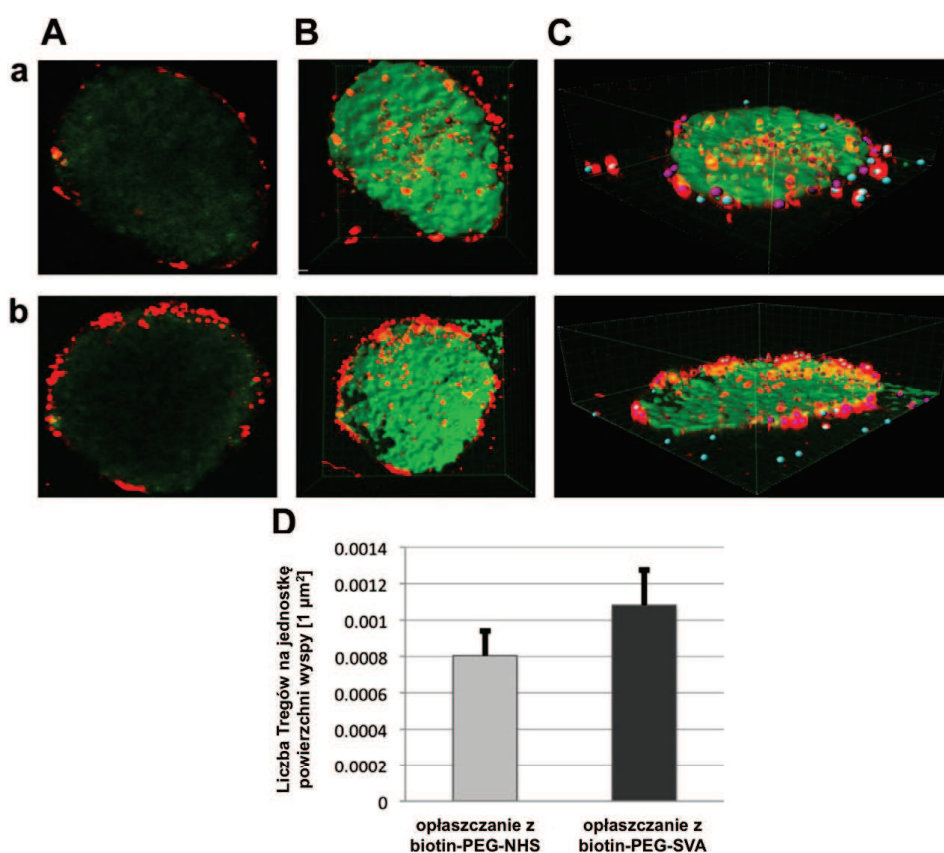


Aby sprawdzić czy stosując biotynę-PEG-SVA uda nam się podobnie, jak w przypadku biotyny-PEG-NHS połączyć wyspy trzustkowe z komórkami Treg, wybarwilismy komórki Treg czerwonym barwnikiem DiI przed procedurą opłaszczania. Barwnik ten wykazuje czerwoną fluorescencję jedynie w komórkach żywych. Co więcej, po wnikięciu do wnętrza komórki, barwnik ten nie wydostaje się z niej na zewnątrz. Fakt zastosowania tego barwnika pozwolił nam na wyeliminowanie wątpliwości czy sygnał na powierzchni wysp trzustkowych pochodzi rzeczywiście z komórek Treg. Zdjęcia wykonane po opłaszczeniu wysp komórkami Treg pokazują, że zarówno w przypadku zastosowania cząsteczki biotyna-PEG-NHS jak i biotyna-PEG-SVA jesteśmy w stanie przyłączyć komórki Treg do powierzchni wysp trzustkowych. .

W celu wykonania analizy porównawczej efektywności opłaszczania wysp komórkami Treg z zastosowaniem obu związków, wykonaliśmy rekonstrukcję 3D opłaszczonych wysp na podstawie przekrojów uzyskanych w mikroskopie konfokalnym. Następnie w programie Imaris policzyliśmy liczbę komórek Treg przypadających na jednostkę powierzchni wyspy trzustkowej, wykorzystując fakt, że wyspy posiadają autofluorescencję, szczególnie przy naświetlaniu światłem o długości fali 488 nm. Analiza ta wykazała, że opłaszczanie z zastosowaniem biotyny-PEG-SVA pozwala na zwiększenie liczby dołączonych do powierzchni wysp komórek Treg o 40%.



**Rycina 7.** Porównanie efektywności opłaszczania wysp trzustkowych komórkami Treg przy zastosowaniu a (górny panel) – biotyny-PEG-NHS i b (dolny panel) – biotyny-PEG-SVA. A – wybrane zdjęcia z mikroskopu konfokalnego wysp opłaszczonych komórkami Treg; na czerwono wybarwione komórki Treg, na zielono powierzchnia wyspy trzustkowej uchwycona dzięki autofluorescencji. B – rekonstrukcja 3D wyspy opłaszczonej komórkami Treg. C – Analiza ilościowa komórek Treg dołączonych do powierzchni wyspy trzustkowej. D – Porównanie efektywności opłaszczania wysp trzustkowych na podstawie analizy ilościowej przyłączonych na jednostkę powierzchni wyspy komórek Treg. Dane przedstawiają średnią arytmetyczną z odchyleniem standardowym i pochodzą z trzech niezależnych eksperymentów.



Co więcej, zaobserwowaliśmy, że opłaszczanie wysp trzustkowych z zastosowaniem biotyny-PEG-SVA jest mniej szkodliwe dla wysp niż kiedy używana był biotyna-PEG-NHS. Ponadto, w dynamicznym teście stymulującym wydzielanie insuliny uzyskaliśmy wyższe wartości dla kiedy wyspy opłaszczane były z zastosowaniem biotyna-PEG-SVA niż w przypadku, kiedy użyliśmy w tym celu biotyny-PEG-NHS.

Wyniki te wskazują, że opłaszczanie wysp trzustkowych z zastosowaniem biotyny-PEG-SVA jest nie tylko efektywniejsze, ale nie upośledza funkcji

opłaszczonych wyspy w porównaniu do poprzednio użytego polimeru biotyna-PEG-NHS.

W obu pracach wykazaliśmy, że opracowane przez nas metody opłaszczania wysp trzustkowych komórkami Treg są efektywne a ich wprowadzenie do badań *in vivo* może się przynieść do zwiększenia skuteczności ochrony przeszczepianych wysp przed atakiem ze strony układu immunologicznego i tym samym zapobiec odrzuceniu przeszczepu.

#### 4. WNIOSKI

- Wysoki wzrost dawcy trzustki związany jest z wyższą wydajnością izolacji wysp; włączenie wzrostu dawcy jako parametru służącego do oceny jakości pobieranej trzustki pozwala na dokładniejsze oszacowanie ilości wysp uzyskanych po izolacji.
- Zastosowanie pożywki X-VIVO 20 spełniającej standardy dobrej praktyki laboratoryjnej (GLP) pozwala na uzyskanie większej liczby komórek Treg z jednoczesnym zachowaniem ich charakterystycznego fenotypu i funkcji supresorowej po ekspansji.
- W celu zapewnienia dobrej jakości i czystości populacji komórek Treg po rozmrożeniu do krioprezewacji należy przeznaczać czyste wyizolowane populacje komórek Treg oraz poddawać je ponownej stymulacji i ekspansji po rozmrożeniu. Zastosowanie powyższego protokołu umożliwi krioprezewację komórek Treg do celów klinicznych bez utraty ich funkcji i ryzyka zanieczyszczenia populacji limfocytami T efektorowymi.
- Zastosowanie globuliny antytomocytarnej (ATG) w protokole indukcji, a następnie terapia lekami z grupy anty-TNF- $\alpha$  w celu stłumienia odpowiedzi zapalnej oraz zastosowanie rapamycyny do podtrzymania stanu immunosupresji może stanowić optymalną metodą immunosupresji u biorców wysp trzustkowych i komórek Treg, jako, że leki te mają stymulujący wpływ na liczbę i aktywność komórek Treg.
- Zastosowanie związków biotyna-PEG-NHS oraz biotyna-PEG-SVA pozwala na przyłączenie komórek Treg do powierzchni wyizolowanych ludzkich wysp trzustkowych i chroni wyspy przed atakiem allogenicznego leukocytów. Wprowadzenie opracowanej metody lokalnej immunoprotekcji wysp trzustkowych do badań klinicznych ma szansę zapewnić lepszą ochronę przeszczepionym wyspom z jednoczesnym obniżeniem dawek standardowo stosowanych leków immunosupresyjnych.

**5. WYKAZ CYTOWANEGO PIŚMIENNICTWA**

- 1 Secret AM, Becker DJ, Kelsey SF, LaPorte RE, Orchard TJ. Characterizing sudden death and dead-in-bed syndrome in Type 1 diabetes: analysis from two childhood-onset Type 1 diabetes registries. *Diabet Med* 2011;28:293–300. doi:10.1111/j.1464-5491.2010.03154.x.
- 2 Gruessner RWG, Gruessner AC. What defines success in pancreas and islet transplantation-insulin independence or prevention of hypoglycemia? A review. *Transplant Proc* 2014;46:1898–9. doi:10.1016/j.transproceed.2014.06.004.
- 3 Gruessner AC, Sutherland DE, Dunn DL, Najarian JS, Humar A, Kandaswamy R, et al. Pancreas after kidney transplants in posturemic patients with type I diabetes mellitus. *J Am Soc Nephrol JASN* 2001;12:2490–9.
- 4 Gruessner RWG, Gruessner AC. The current state of pancreas transplantation. *Nat Rev Endocrinol* 2013;9:555–62. doi:10.1038/nrendo.2013.138.
- 5 Boggi U, Rosati CM, Marchetti P. Follow-up of secondary diabetic complications after pancreas transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2013;18:102–10. doi:10.1097/MOT.0b013e32835c28c5.
- 6 Williams P. Notes on diabetes treated with extract and by grafts of sheep's pancreas. *Br Med J* 1894;2:1303–4.
- 7 Pybus F. Notes on suprarenal and pancreatic grafting. *Lancet* 1924:550–1.
- 8 Hellerstroem C. A method for the microdissection of intact pancreatic islets of mammals. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1964;45:122–32.
- 9 Moskalewski S. Isolation and culture of the islets of langerhans of the guinea pig. *Gen Comp Endocrinol* 1965;44:342–53.
- 10 Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 1967;16:35–9.
- 11 Ballinger WF, Lacy PE. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery* 1972;72:175–86.
- 12 Scharp DW, Murphy JJ, Newton WT, Ballinger WF, Lacy PE. Transplantation of islets of Langerhans in diabetic rhesus monkeys. *Surgery* 1975;77:100–5.
- 13 Najarian JS, Sutherland DE, Matas AJ, Steffes MW, Simmons RL, Goetz FC. Human islet transplantation: a preliminary report. *Transplant Proc* 1977;9:233–6.
- 14 Largiadèr F, Kolb E, Binswanger U. A long-term functioning human pancreatic islet allotransplant. *Transplantation* 1980;29:76–7.
- 15 Brendel M, Hering B, Schulz A, Bretzel R. International Islet Transplant Registry report 1999.
- 16 Shapiro AMJ, Lakey JRT, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, et al. Islet Transplantation in Seven Patients with Type 1 Diabetes Mellitus Using a Glucocorticoid-Free Immunosuppressive Regimen. *N Engl J Med* 2000;343:230–8. doi:10.1056/NEJM200007273430401.
- 17 Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 2005;54:2060–9.
- 18 Shapiro AMJ, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med* 2006;355:1318–30. doi:10.1056/NEJMoa061267.
- 19 Collaborative Islet Transplant Registry. Eighth Annual CITR Report 2014.
- 20 Barton FB, Rickels MR, Alejandro R, Hering BJ, Wease S, Naziruddin B, et al. Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999–2010. *Diabetes Care* 2012;35:1436–45. doi:10.2337/dc12-0063.

- 
- 21 Agrawal A, Gurusamy K, Powis S, Gray DW, Fuller B, Davidson BR. A meta-analysis of the impact of the two-layer method of preservation on human pancreatic islet transplantation. *Cell Transplant* 2008;17:1315–22.
- 22 Brandhorst H, Brandhorst D, Hering BJ, Federlin K, Bretzel RG. Body mass index of pancreatic donors: a decisive factor for human islet isolation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes Off J Ger Soc Endocrinol Ger Diabetes Assoc* 1995;103 Suppl 2:23–6. doi:10.1055/s-0029-1211388.
- 23 Kim SC, Han DJ, Kang CH, We YM, Back JH, Kim YH, et al. Analysis on donor and isolation-related factors of successful isolation of human islet of Langerhans from human cadaveric donors. *Transplant Proc* 2005;37:3402–3. doi:10.1016/j.transproceed.2005.09.055.
- 24 Lakey JR, Warnock GL, Rajotte RV, Suarez-Alamazor ME, Ao Z, Shapiro AM, et al. Variables in organ donors that affect the recovery of human islets of Langerhans. *Transplantation* 1996;61:1047–53.
- 25 Niclauss N, Bosco D, Morel P, Demuylder-Mischler S, Brault C, Milliat-Guittard L, et al. Influence of donor age on islet isolation and transplantation outcome. *Transplantation* 2011;91:360–6.
- 26 Ponte GM, Pileggi A, Messinger S, Alejandro A, Ichii H, Baidal DA, et al. Toward maximizing the success rates of human islet isolation: influence of donor and isolation factors. *Cell Transplant* 2007;16:595–607.
- 27 O’Gorman D, Kin T, Murdoch T, Richer B, McGhee-Wilson D, Ryan EA, et al. The standardization of pancreatic donors for islet isolations. *Transplantation* 2005;80:801–6.
- 28 Balamurugan AN, Naziruddin B, Lockridge A, Tiwari M, Loganathan G, Takita M, et al. Islet Product Characteristics and Factors Related to Successful Human Islet Transplantation From the Collaborative Islet Transplant Registry (CITR) 1999–2010. *Am J Transplant* 2014;14:2595–606. doi:10.1111/ajt.12872.
- 29 Hilling DE, Bouwman E, Terpstra OT, Marang-van de Mheen PJ. Effects of donor-, pancreas-, and isolation-related variables on human islet isolation outcome: a systematic review. *Cell Transplant* 2014;23:921–8. doi:10.3727/096368913X666412.
- 30 Witkowski P, Liu Z, Cernea S, Guo Q, Poumian-Ruiz E, Herold K, et al. Validation of the scoring system for standardization of the pancreatic donor for islet isolation as used in a new islet isolation center. *Transplant Proc* 2006;38:3039–40. doi:10.1016/j.transproceed.2006.08.143.
- 31 Kuroda Y, Morita A, Fujino Y, Tanioka Y, Ku Y, Saitoh Y. Restoration of pancreas graft function preserved by a two-layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) cold storage method after significant warm ischemia. *Transplantation* 1993;55:227–8.
- 32 Scott WE, O’Brien TD, Ferrer-Fabrega J, Avgoustiniatos ES, Weegman BP, Anazawa T, et al. Persufflation Improves Pancreas Preservation When Compared With the Two-Layer Method. *Transplant Proc* 2010;42:2016–9. doi:10.1016/j.transproceed.2010.05.092.
- 33 Brandhorst H, Asif S, Andersson K, Theisinger B, Andersson HH, Felldin M, et al. A new oxygen carrier for improved long-term storage of human pancreata before islet isolation. *Transplantation* 2010;89:155–60. doi:10.1097/TP.0b013e3181c9266c.

- 
- 34 Brandhorst H, Friberg A, Nilsson B, Andersson HH, Felldin M, Foss A, et al. Large-scale comparison of Liberase HI and collagenase NB1 utilized for human islet isolation. *Cell Transplant* 2010;19:3–8. doi:10.3727/096368909X477507.
- 35 Caballero-Corbalán J, Friberg AS, Brandhorst H, Nilsson B, Andersson HH, Felldin M, et al. Vitacyte collagenase HA: a novel enzyme blend for efficient human islet isolation. *Transplantation* 2009;88:1400–2. doi:10.1097/TP.0b013e3181bd1441.
- 36 Kin T, Johnson PRV, Shapiro AMJ, Lakey JRT. Factors influencing the collagenase digestion phase of human islet isolation. *Transplantation* 2007;83:7–12. doi:10.1097/01.tp.0000243169.09644.e6.
- 37 O’Gorman D, Kin T, Pawlick R, Imes S, Senior PA, Shapiro AMJ. Clinical islet isolation outcomes with a highly purified neutral protease for pancreas dissociation. *Islets* 2013;5:111–5. doi:10.4161/isl.25222.
- 38 Shimoda M, Noguchi H, Naziruddin B, Fujita Y, Chujo D, Takita M, et al. Assessment of human islet isolation with four different collagenases. *Transplant Proc* 2010;42:2049–51. doi:10.1016/j.transproceed.2010.05.093.
- 39 Szot GL, Lee MR, Tavakol MM, Lang J, Dekovic F, Kerlan RK, et al. Successful clinical islet isolation using a GMP-manufactured collagenase and neutral protease. *Transplantation* 2009;88:753–6. doi:10.1097/TP.0b013e3181b443ae.
- 40 Matsumoto S, Takita M, Chaussabel D, Noguchi H, Shimoda M, Sugimoto K, et al. Improving efficacy of clinical islet transplantation with iodixanol-based islet purification, thymoglobulin induction, and blockage of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . *Cell Transplant* 2011;20:1641–7. doi:10.3727/096368910X564058.
- 41 Mita A, Ricordi C, Miki A, Barker S, Khan A, Alvarez A, et al. Purification method using iodixanol (OptiPrep)-based density gradient significantly reduces cytokine chemokine production from human islet preparations, leading to prolonged beta-cell survival during pretransplantation culture. *Transplant Proc* 2009;41:314–5. doi:10.1016/j.transproceed.2008.10.059.
- 42 Mita A, Ricordi C, Messinger S, Miki A, Misawa R, Barker S, et al. Antiproinflammatory effects of iodixanol (OptiPrep)-based density gradient purification on human islet preparations. *Cell Transplant* 2010;19:1537–46. doi:10.3727/096368910X516600.
- 43 Rajab A. Islet Transplantation: Alternative Sites. *Curr Diab Rep* 2010;10:332–7. doi:10.1007/s11892-010-0130-6.
- 44 Cantarelli E, Piemonti L. Alternative transplantation sites for pancreatic islet grafts. *Curr Diab Rep* 2011;11:364–74. doi:10.1007/s11892-011-0216-9.
- 45 Espes D, Eriksson O, Lau J, Carlsson P-O. Striated muscle as implantation site for transplanted pancreatic islets. *J Transplant* 2011;2011:352043. doi:10.1155/2011/352043.
- 46 Maffi P, Balzano G, Ponzoni M, Nano R, Sordi V, Melzi R, et al. Autologous pancreatic islet transplantation in human bone marrow. *Diabetes* 2013;62:3523–31. doi:10.2337/db13-0465.
- 47 Merani S, Toso C, Emamaullee J, Shapiro AMJ. Optimal implantation site for pancreatic islet transplantation. *Br J Surg* 2008;95:1449–61. doi:10.1002/bjs.6391.

- 
- 48 Posselt AM, Barker CF, Tomaszewski JE, Markmann JF, Choti MA, Naji A. Induction of donor-specific unresponsiveness by intrathymic islet transplantation. *Science* 1990;249:1293–5.
- 49 Rajab A. Islet Transplantation: Alternative Sites. *Curr Diab Rep* 2010;10:332–7. doi:10.1007/s11892-010-0130-6.
- 50 Chhabra P, Sutherland DER, Brayman KL. Overcoming barriers in clinical islet transplantation: Current limitations and future prospects. *Curr Probl Surg* 2014;51:49–86. doi:10.1067/j.cpsurg.2013.10.002.
- 51 Pepper AR, Gala-Lopez B, Ziff O, Shapiro AMJ. Revascularization of Transplanted Pancreatic Islets and Role of the Transplantation Site. *J Immunol Res* 2013;2013:e352315. doi:10.1155/2013/352315.
- 52 Gill RG, Bishop NH. Clinical islet transplantation: where immunity and metabolism intersect? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2012;19:249–54. doi:10.1097/MED.0b013e328355a2ec.
- 53 Shapiro AMJ, Lakey JRT, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, et al. Islet Transplantation in Seven Patients with Type 1 Diabetes Mellitus Using a Glucocorticoid-Free Immunosuppressive Regimen. *N Engl J Med* 2000;343:230–8. doi:10.1056/NEJM200007273430401.
- 54 Chhabra P, Brayman KL. Current status of immunomodulatory and cellular therapies in preclinical and clinical islet transplantation. *J Transplant* 2011;2011:637692. doi:10.1155/2011/637692.
- 55 Vincenti F, Kirkman R, Light S, Bumgardner G, Pescovitz M, Halloran P, et al. Interleukin-2-receptor blockade with daclizumab to prevent acute rejection in renal transplantation. Daclizumab Triple Therapy Study Group. *N Engl J Med* 1998;338:161–5. doi:10.1056/NEJM199801153380304.
- 56 Okita R, Yamaguchi Y, Ohara M, Hironaka K, Okawaki M, Nagamine I, et al. Targeting of CD4+CD25high cells while preserving CD4+CD25low cells with low-dose chimeric anti-CD25 antibody in adoptive immunotherapy of cancer. *Int J Oncol* 2009;34:563–72.
- 57 Van Belle T, von Herrath M. Immunosuppression in islet transplantation. *J Clin Invest* 2008;118:1625–8. doi:10.1172/JCI35639.
- 58 Monti P, Scirpoli M, Maffi P, Ghidoli N, De Taddeo F, Bertuzzi F, et al. Islet transplantation in patients with autoimmune diabetes induces homeostatic cytokines that expand autoreactive memory T cells. *J Clin Invest* 2008;118:1806–14. doi:10.1172/JCI35197.
- 59 Beiras-Fernandez A, Thein E, Hammer C. Induction of immunosuppression with polyclonal antithymocyte globulins: an overview. *Exp Clin Transplant Off J Middle East Soc Organ Transplant* 2003;1:79–84.
- 60 Genestier L, Fournel S, Flacher M, Assossou O, Revillard J-P, Bonnefoy-Berard N. Induction of fas (Apo-1, CD95)-mediated apoptosis of activated lymphocytes by polyclonal antithymocyte globulins. *Blood* 1998;91:2360–8.
- 61 Michallet M-C, Preville X, Flacher M, Fournel S, Genestier L, Revillard J-P. Functional antibodies to leukocyte adhesion molecules in antithymocyte globulins. *Transplantation* 2003;75:657–62. doi:10.1097/01.TP.0000053198.99206.E6.
- 62 Lopez M, Clarkson MR, Albin M, Sayegh MH, Najafian N. A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Am Soc Nephrol JASN* 2006;17:2844–53. doi:10.1681/ASN.2006050422.



- 
- 63 Toso C, Edgar R, Pawlick R, Emamaullee J, Merani S, Dinyari P, et al. Effect of different induction strategies on effector, regulatory and memory lymphocyte sub-populations in clinical islet transplantation. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant* 2009;22:182–91. doi:10.1111/j.1432-2277.2008.00746.x.
- 64 Hering BJ, Kandaswamy R, Ansite JD, Eckman PM, Nakano M, Sawada T, et al. Single-donor, marginal-dose islet transplantation in patients with type 1 diabetes. *JAMA J Am Med Assoc* 2005;293:830–5. doi:10.1001/jama.293.7.830.
- 65 Elsner J, Höchstetter R, Spiekermann K, Kapp A. Surface and mRNA expression of the CD52 antigen by human eosinophils but not by neutrophils. *Blood* 1996;88:4684–93.
- 66 McCall M, Shapiro AMJ. Update on Islet Transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2:a007823. doi:10.1101/cshperspect.a007823.
- 67 Chatenoud L. CD3-specific antibody-induced active tolerance: from bench to bedside. *Nat Rev Immunol* 2003;3:123–32. doi:10.1038/nri1000.
- 68 Chatenoud L, Thervet E, Primo J, Bach JF. Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:123–7.
- 69 Hering BJ, Kandaswamy R, Harmon JV, Ansite JD, Clemmings SM, Sakai T, et al. Transplantation of cultured islets from two-layer preserved pancreases in type 1 diabetes with anti-CD3 antibody. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 2004;4:390–401.
- 70 Bellin MD, Barton FB, Heitman A, Harmon JV, Kandaswamy R, Balamurugan AN, et al. Potent Induction Immunotherapy Promotes Long-Term Insulin Independence After Islet Transplantation in Type 1 Diabetes. *Am J Transplant* 2012;12:1576–83. doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03977.x.
- 71 Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003;3:745–56. doi:10.1038/nri1184.
- 72 Farney AC, Xenos E, Sutherland DE, Widmer M, Stephanian E, Field MJ, et al. Inhibition of pancreatic islet beta cell function by tumor necrosis factor is blocked by a soluble tumor necrosis factor receptor. *Transplant Proc* 1993;25:865–6.
- 73 Boschetti G, Nancey S, Sardi F, Roblin X, Flourié B, Kaiserlian D. Therapy with anti-TNF $\alpha$  antibody enhances number and function of Foxp3+ regulatory T cells in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:160–70. doi:10.1002/ibd.21308.
- 74 Faradji RN, Tharavani T, Messinger S, Froud T, Pileggi A, Monroy K, et al. Long-term insulin independence and improvement in insulin secretion after supplemental islet infusion under exenatide and etanercept. *Transplantation* 2008;86:1658–65. doi:10.1097/TP.0b013e31818fe448.
- 75 Gangemi A, Salehi P, Hatipoglu B, Martellotto J, Barbaro B, Kuechle JB, et al. Islet transplantation for brittle type 1 diabetes: the UIC protocol. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 2008;8:1250–61. doi:10.1111/j.1600-6143.2008.02234.x.
- 76 Hering BJ, Kandaswamy R, Ansite JD, Eckman PM, Nakano M, Sawada T, et al. Single-donor, marginal-dose islet transplantation in patients with type 1 diabetes. *JAMA* 2005;293:830–5. doi:10.1001/jama.293.7.830.

- 
- 77 Hering BJ, Kandaswamy R, Ansite JD, Eckman PM, Nakano M, Sawada T, et al. Single-donor, marginal-dose islet transplantation in patients with type 1 diabetes. *JAMA* 2005;293:830–5. doi:10.1001/jama.293.7.830.
- 78 Mandrup-Poulsen T. Interleukin-1 antagonists and other cytokine blockade strategies for type 1 diabetes. *Rev Diabet Stud RDS* 2012;9:338–47. doi:10.1900/RDS.2012.9.338.
- 79 Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* 2001;250:91–104.
- 80 Citro A, Cantarelli E, Maffi P, Nano R, Melzi R, Mercalli A, et al. CXCR1/2 inhibition enhances pancreatic islet survival after transplantation. *J Clin Invest* 2012;122:3647–51. doi:10.1172/JCI63089.
- 81 Klee CB, Ren H, Wang X. Regulation of the Calmodulin-stimulated Protein Phosphatase, Calcineurin. *J Biol Chem* 1998;273:13367–70. doi:10.1074/jbc.273.22.13367.
- 82 Schreiber SL, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* 1992;13:136–42. doi:10.1016/0167-5699(92)90111-J.
- 83 Wiederrecht G, Lam E, Hung S, Martin M, Sigal N. The mechanism of action of FK-506 and cyclosporin A. *Ann N Y Acad Sci* 1993;696:9–19.
- 84 Chatenoud L, Warncke K, Ziegler A-G. Clinical immunologic interventions for the treatment of type 1 diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2. doi:10.1101/cshperspect.a007716.
- 85 Gillard P, Ling Z, Mathieu C, Crenier L, Lannoo M, Maes B, et al. Comparison of sirolimus alone with sirolimus plus tacrolimus in type 1 diabetic recipients of cultured islet cell grafts. *Transplantation* 2008;85:256–63. doi:10.1097/TP.0b013e31815e8926.
- 86 Nishimura R, Nishioka S, Fujisawa I, Shiku H, Shimada M, Sekiguchi S, et al. Tacrolimus inhibits the revascularization of isolated pancreatic islets. *PloS One* 2013;8:e56799. doi:10.1371/journal.pone.0056799.
- 87 Rickels MR, Liu C, Shlansky-Goldberg RD, Soleimanpour SA, Vivek K, Kamoun M, et al. Improvement in  $\beta$ -Cell Secretory Capacity After Human Islet Transplantation According to the CIT07 Protocol. *Diabetes* 2013;62:2890–7. doi:10.2337/db12-1802.
- 88 Morice WG, Wiederrecht G, Brunn GJ, Siekierka JJ, Abraham RT. Rapamycin inhibition of interleukin-2-dependent p33cdk2 and p34cdc2 kinase activation in T lymphocytes. *J Biol Chem* 1993;268:22737–45.
- 89 Monti P, Scirpoli M, Maffi P, Piemonti L, Secchi A, Bonifacio E, et al. Rapamycin monotherapy in patients with type 1 diabetes modifies CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T-cells. *Diabetes* 2008;57:2341–7. doi:10.2337/db08-0138.
- 90 Muller YD, Mai G, Morel P, Serre-Beinier V, Gonelle-Gispert C, Yung GP, et al. Anti-CD154 mAb and rapamycin induce T regulatory cell mediated tolerance in rat-to-mouse islet transplantation. *PloS One* 2010;5:e10352. doi:10.1371/journal.pone.0010352.
- 91 Pothoven KL, Kheradmand T, Yang Q, Houlihan JL, Zhang H, Degutes M, et al. Rapamycin-conditioned donor dendritic cells differentiate CD4CD25Foxp3 T cells in vitro with TGF-beta1 for islet transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 2010;10:1774–84. doi:10.1111/j.1600-6143.2010.03199.x.

- 
- 92 Zhang W, Zhang D, Shen M, Liu Y, Tian Y, Thomson AW, et al. Combined administration of a mutant TGF-beta1/Fc and rapamycin promotes induction of regulatory T cells and islet allograft tolerance. *J Immunol Baltim Md 1950* 2010;185:4750–9. doi:10.4049/jimmunol.1000769.
- 93 Berney T, Secchi A. Rapamycin in islet transplantation: friend or foe? *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant* 2009;22:153–61. doi:10.1111/j.1432-2277.2008.00743.x.
- 94 Zahr E, Molano RD, Pileggi A, Ichii H, San Jose S, Bocca N, et al. Rapamycin impairs beta-cell proliferation in vivo. *Transplant Proc* 2008;40:436–7. doi:10.1016/j.transproceed.2008.02.011.
- 95 Zhang N, Su D, Qu S, Tse T, Bottino R, Balamurugan AN, et al. Sirolimus is associated with reduced islet engraftment and impaired beta-cell function. *Diabetes* 2006;55:2429–36. doi:10.2337/db06-0173.
- 96 Hafiz MM, Faradji RN, Froud T, Pileggi A, Baidal DA, Cure P, et al. Immunosuppression and procedure-related complications in 26 patients with type 1 diabetes mellitus receiving allogeneic islet cell transplantation. *Transplantation* 2005;80:1718–28.
- 97 Dalal P, Grafals M, Chhabra D, Gallon L. Mycophenolate mofetil: safety and efficacy in the prophylaxis of acute kidney transplantation rejection. *Ther Clin Risk Manag* 2009;5:139–49.
- 98 Gao R, Ustinov J, Korsgren O, Otonkoski T. Effects of immunosuppressive drugs on in vitro neogenesis of human islets: mycophenolate mofetil inhibits the proliferation of ductal cells. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 2007;7:1021–6. doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01728.x.
- 99 Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med* 1998;338:1813–21. doi:10.1056/NEJM199806183382506.
- 100 Clarkson MR, Sayegh MH. T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance. *Transplantation* 2005;80:555–63.
- 101 Posselt AM, Bellin MD, Tavakol M, Szot GL, Frassetto LA, Masharani U, et al. Islet transplantation in type 1 diabetics using an immunosuppressive protocol based on the anti-LFA-1 antibody efalizumab. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 2010;10:1870–80. doi:10.1111/j.1600-6143.2010.03073.x.
- 102 De Vos P, Hamel AF, Tatarkiewicz K. Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets. *Diabetologia* 2002;45:159–73. doi:10.1007/s00125-001-0729-x.
- 103 Robles L, Storrs R, Lamb M, Alexander M, Lakey JRT. Current status of islet encapsulation. *Cell Transplant* 2014;23:1321–48. doi:10.3727/096368913X670949.
- 104 Scharp DW, Marchetti P. Encapsulated islets for diabetes therapy: history, current progress, and critical issues requiring solution. *Adv Drug Deliv Rev* 2014;67-68:35–73. doi:10.1016/j.addr.2013.07.018.
- 105 Soon-Shiong P, Heintz RE, Merideth N, Yao QX, Yao Z, Zheng T, et al. Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation. *Lancet* 1994;343:950–1.
- 106 Scharp DW, Swanson CJ, Olack BJ, Latta PP, Hegre OD, Doherty EJ, et al. Protection of encapsulated human islets implanted without immunosuppression

- in patients with type I or type II diabetes and in nondiabetic control subjects. *Diabetes* 1994;43:1167–70.
- 107 Valdés-González RA, Dorantes LM, Garibay GN, Bracho-Blanchet E, Mendez AJ, Dávila-Pérez R, et al. Xenotransplantation of porcine neonatal islets of Langerhans and Sertoli cells: a 4-year study. *Eur J Endocrinol Eur Fed Endocr Soc* 2005;153:419–27. doi:10.1530/eje.1.01982.
- 108 Calafiore R, Basta G, Luca G, Lemmi A, Montanucci MP, Calabrese G, et al. Microencapsulated pancreatic islet allografts into nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes: first two cases. *Diabetes Care* 2006;29:137–8.
- 109 Tuch BE, Keogh GW, Williams LJ, Wu W, Foster JL, Vaithilingam V, et al. Safety and Viability of Microencapsulated Human Islets Transplanted Into Diabetic Humans. *Diabetes Care* 2009;32:1887–9. doi:10.2337/dc09-0744.
- 110 Basta G, Montanucci P, Luca G, Boselli C, Noya G, Barbaro B, et al. Long-term metabolic and immunological follow-up of nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes treated with microencapsulated islet allografts: four cases. *Diabetes Care* 2011;34:2406–9. doi:10.2337/dc11-0731.
- 111 Ullah I, Baregundi Subbarao R, Rho G-J. Human Mesenchymal Stem Cells - Current trends and future prospective. *Biosci Rep* 2015. doi:10.1042/BSR20150025.
- 112 Barcala Tabarozzi AE, Castro CN, Dewey RA, Sogayar MC, Labriola L, Perone MJ. Cell-based interventions to halt autoimmunity in type 1 diabetes mellitus. *Clin Exp Immunol* 2013;171:135–46. doi:10.1111/cei.12019.
- 113 Fändrich F, Ungefroren H. Customized cell-based treatment options to combat autoimmunity and restore beta-cell function in type 1 diabetes mellitus: current protocols and future perspectives. *Adv Exp Med Biol* 2010;654:641–65. doi:10.1007/978-90-481-3271-3\_28.
- 114 Fiorina P, Voltarelli J, Zavazava N. Immunological applications of stem cells in type 1 diabetes. *Endocr Rev* 2011;32:725–54. doi:10.1210/er.2011-0008.
- 115 Sordi V, Piemonti L. Mesenchymal Stem Cells as Feeder Cells for Pancreatic Islet Transplants. *Rev Diabet Stud RDS* 2010;7:132–43. doi:10.1900/RDS.2010.7.132.
- 116 Couri CEB, Oliveira MCB, Stracieri ABPL, Moraes DA, Pieroni F, Barros GMN, et al. C-peptide levels and insulin independence following autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA* 2009;301:1573–9. doi:10.1001/jama.2009.470.
- 117 Snarski E, Milczarczyk A, Torosian T, Paluszewska M, Urbanowska E, Król M, et al. Independence of exogenous insulin following immunoablation and stem cell reconstitution in newly diagnosed diabetes type I. *Bone Marrow Transplant* 2011;46:562–6. doi:10.1038/bmt.2010.147.
- 118 D’Addio F, Valderrama Vasquez A, Ben Nasr M, Franek E, Zhu D, Li L, et al. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in new-onset type 1 diabetes: a multicenter analysis. *Diabetes* 2014;63:3041–6. doi:10.2337/db14-0295.
- 119 Zetterquist H, Mattsson J, Uzunel M, Näsman-Björk I, Svenberg P, Tammik L, et al. Mixed chimerism in the B cell lineage is a rapid and sensitive indicator of minimal residual disease in bone marrow transplant recipients with pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2000;25:843–51. doi:10.1038/sj.bmt.1702337.

- 
- 120 Tezza S, Ben Nasr M, Vergani A, Valderrama Vasquez A, Maestroni A, Abdi R, et al. Novel immunological strategies for islet transplantation. *Pharmacol Res Off J Ital Pharmacol Soc* 2014. doi:10.1016/j.phrs.2014.06.016.
- 121 Mineo D, Ricordi C, Xu X, Pileggi A, Garcia-Morales R, Khan A, et al. Combined islet and hematopoietic stem cell allotransplantation: a clinical pilot trial to induce chimerism and graft tolerance. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 2008;8:1262–74. doi:10.1111/j.1600-6143.2008.02230.x.
- 122 Chhabra P, Brayman KL. Stem Cell Therapy to Cure Type 1 Diabetes: From Hype to Hope. *Stem Cells Transl Med* 2013;2:328–36. doi:10.5966/sctm.2012-0116.
- 123 Abdi R, Fiorina P, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes* 2008;57:1759–67. doi:10.2337/db08-0180.
- 124 Bell GI, Broughton HC, Levac KD, Allan DA, Xenocostas A, Hess DA. Transplanted human bone marrow progenitor subtypes stimulate endogenous islet regeneration and revascularization. *Stem Cells Dev* 2012;21:97–109. doi:10.1089/scd.2010.0583.
- 125 Davis NE, Hamilton D, Fontaine MJ. Harnessing the immunomodulatory and tissue repair properties of mesenchymal stem cells to restore  $\beta$  cell function. *Curr Diab Rep* 2012;12:612–22. doi:10.1007/s11892-012-0305-4.
- 126 Ezquer FE, Ezquer ME, Parrau DB, Carpio D, Yañez AJ, Conget PA. Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type 1 diabetic mice. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2008;14:631–40. doi:10.1016/j.bbmt.2008.01.006.
- 127 Corthay A. How do Regulatory T Cells Work? *Scand J Immunol* 2009;70:326–36. doi:10.1111/j.1365-3083.2009.02308.x.
- 128 Josefowicz SZ, Lu L-F, Rudensky AY. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annu Rev Immunol* 2012;30:531–64. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623.
- 129 Shevach EM. Regulatory T cells in autoimmunity\*. *Annu Rev Immunol* 2000;18:423–49. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.423.
- 130 Shevach EM. Biological functions of regulatory T cells. *Adv Immunol* 2011;112:137–76. doi:10.1016/B978-0-12-387827-4.00004-8.
- 131 Hall BM. T Cells: Soldiers and Spies-The Surveillance and Control of Effector T Cells by Regulatory T Cells. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN* 2015. doi:10.2215/CJN.06620714.
- 132 Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 1970;18:723–37.
- 133 Gershon RK, Kondo K. Infectious immunological tolerance. *Immunology* 1971;21:903–14.
- 134 Gershon RK, Cohen P, Hencin R, Liebhaver SA. Suppressor T cells. *J Immunol Baltim Md* 1950 1972;108:586–90.
- 135 Möller G. Do suppressor T cells exist? *Scand J Immunol* 1988;27:247–50.
- 136 Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains

- (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol Baltim Md 1950* 1995;155:1151–64.
- 137 Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330–6. doi:10.1038/ni904.
- 138 Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057–61. doi:10.1126/science.1079490.
- 139 Khattri R, Cox T, Yasayko S-A, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003;4:337–42. doi:10.1038/ni909.
- 140 Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 2005;22:329–41. doi:10.1016/j.immuni.2005.01.016.
- 141 Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001;27:20–1. doi:10.1038/83713.
- 142 Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 2001;27:18–20. doi:10.1038/83707.
- 143 Ziegler SF. FOXP3: Of Mice and Men. *Annu Rev Immunol* 2006;24:209–26. doi:10.1146/annurev.immunol.24.021605.090547.
- 144 Fujimaki W, Takahashi N, Ohnuma K, Nagatsu M, Kurosawa H, Yoshida S, et al. Comparative Study of Regulatory T Cell Function of Human T Cells from Thymocytes, Cord Blood, and Adult Peripheral Blood. *J Immunol Res* 2008;2008:e305859. doi:10.1155/2008/305859.
- 145 Schwartz RH. Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat Immunol* 2005;6:327–30. doi:10.1038/ni1184.
- 146 Karim M, Kingsley CI, Bushell AR, Sawitzki BS, Wood KJ. Alloantigen-induced CD25+CD4+ regulatory T cells can develop in vivo from CD25-CD4+ precursors in a thymus-independent process. *J Immunol Baltim Md 1950* 2004;172:923–8.
- 147 Baron U, Floess S, Wieczorek G, Baumann K, Grützkau A, Dong J, et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur J Immunol* 2007;37:2378–89. doi:10.1002/eji.200737594.
- 148 Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol* 2007;5:e38. doi:10.1371/journal.pbio.0050038.
- 149 Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* 2009;21:1105–11. doi:10.1093/intimm/dxp095.
- 150 Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol* 2008;9:239–44. doi:10.1038/ni1572.
- 151 Benoist C, Mathis D. Treg cells, life history, and diversity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4:a007021. doi:10.1101/cshperspect.a007021.



- 
- 152 Kaczorowski M, Jutel M. Human T Regulatory Cells: On the Way to Cognition. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2013;61:229–36. doi:10.1007/s00005-013-0217-2.
- 153 Akl A, Luo S, Wood KJ. Induction of transplantation tolerance—the potential of regulatory T cells. *Transpl Immunol* 2005;14:225–30. doi:10.1016/j.trim.2005.03.011.
- 154 Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol Baltim Md 1950* 2002;168:1080–6.
- 155 Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003;3:199–210. doi:10.1038/nri1027.
- 156 Ma A, Qi S, Song L, Hu Y, Dun H, Massicotte E, et al. Adoptive transfer of CD4+CD25+ regulatory cells combined with low-dose sirolimus and anti-thymocyte globulin delays acute rejection of renal allografts in Cynomolgus monkeys. *Int Immunopharmacol* 2011;11:618–29. doi:10.1016/j.intimp.2010.11.001.
- 157 Pu L-Y, Wang X-H, Zhang F, Li X-C, Yao A-H, Yu Y, et al. Adoptive transfusion of ex vivo donor alloantigen-stimulated CD4(+)CD25(+) regulatory T cells ameliorates rejection of DA-to-Lewis rat liver transplantation. *Surgery* 2007;142:67–73. doi:10.1016/j.surg.2007.02.014.
- 158 Cohen JL, Trenado A, Vasey D, Klatzmann D, Salomon BL. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp Med* 2002;196:401–6.
- 159 Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* 2003;9:1144–50. doi:10.1038/nm915.
- 160 Ermann J, Hoffmann P, Edinger M, Dutt S, Blankenberg FG, Higgins JP, et al. Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood* 2005;105:2220–6. doi:10.1182/blood-2004-05-2044.
- 161 Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* 2002;196:389–99.
- 162 Trenado A, Charlotte F, Fisson S, Yagello M, Klatzmann D, Salomon BL, et al. Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *J Clin Invest* 2003;112:1688–96. doi:10.1172/JCI17702.
- 163 Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol Baltim Md 1950* 2002;169:4712–6.
- 164 Mottet C, Uhlig HH, Powrie F. Cutting Edge: Cure of Colitis by CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *J Immunol* 2003;170:3939–43.
- 165 Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, Finger EB, Szot G, Ye J, et al. In Vitro-expanded Antigen-specific Regulatory T Cells Suppress Autoimmune Diabetes. *J Exp Med* 2004;199:1455–65. doi:10.1084/jem.20040139.



- 166 Tarbell KV, Yamazaki S, Olson K, Toy P, Steinman RM. CD25+ CD4+ T Cells, Expanded with Dendritic Cells Presenting a Single Autoantigenic Peptide, Suppress Autoimmune Diabetes. *J Exp Med* 2004;199:1467–77. doi:10.1084/jem.20040180.
- 167 Trzonkowski P, Bieniaszewska M, Juścińska J, Dobyszuk A, Krzystyniak A, Marek N, et al. First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127- T regulatory cells. *Clin Immunol Orlando Fla* 2009;133:22–6. doi:10.1016/j.clim.2009.06.001.
- 168 Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Castellino F, Bonifacio E, et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood* 2011;117:3921–8. doi:10.1182/blood-2010-10-311894.
- 169 Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, McKenna DH, Hippen KL, Curtsinger J, et al. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood* 2011;117:1061–70. doi:10.1182/blood-2010-07-293795.
- 170 Jaeckel E, von Boehmer H, Manns MP. Antigen-specific FoxP3-transduced T-cells can control established type 1 diabetes. *Diabetes* 2005;54:306–10. doi:10.2337/db04-1252.
- 171 Sarween N, Chodos A, Raykundalia C, Khan M, Abbas AK, Walker LSK. CD4+CD25+ cells controlling a pathogenic CD4 response inhibit cytokine differentiation, CXCR-3 expression, and tissue invasion. *J Immunol Baltim Md 1950* 2004;173:2942–51.
- 172 Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, Finger EB, Szot G, Ye J, et al. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 2004;199:1455–65. doi:10.1084/jem.20040139.
- 173 Tan T, Xiang Y, Chang C, Zhou Z. Alteration of regulatory T cells in type 1 diabetes mellitus: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2014;47:234–43. doi:10.1007/s12016-014-8440-0.
- 174 Ferraro A, Soggi C, Stabilini A, Valle A, Monti P, Piemonti L, et al. Expansion of Th17 cells and functional defects in T regulatory cells are key features of the pancreatic lymph nodes in patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2011;60:2903–13. doi:10.2337/db11-0090.
- 175 Lawson JM, Tremble J, Dayan C, Beyan H, Leslie RDG, Peakman M, et al. Increased resistance to CD4+CD25hi regulatory T cell-mediated suppression in patients with type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* 2008;154:353–9. doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03810.x.
- 176 Schneider A, Rieck M, Sanda S, Pihoker C, Greenbaum C, Buckner JH. The effector T cells of diabetic subjects are resistant to regulation via CD4+ FOXP3+ regulatory T cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 2008;181:7350–5.
- 177 Marek-Trzonkowska N, Myśliwiec M, Siebert J, Trzonkowski P. Clinical application of regulatory T cells in type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 2013;14:322–32. doi:10.1111/pedi.12029.
- 178 Marek-Trzonkowska N, Myśliwiec M, Dobyszuk A, Grabowska M, Derkowska I, Juścińska J, et al. Therapy of type 1 diabetes with CD4+CD25highCD127-regulatory T cells prolongs survival of pancreatic islets — Results of one year follow-up. *Clin Immunol* 2014;153:23–30. doi:10.1016/j.clim.2014.03.016.
- 179 Wu DC, Hester J, Nadig SN, Zhang W, Trzonkowski P, Gray D, et al. Ex vivo expanded human regulatory T cells can prolong survival of a human islet

- allograft in a humanized mouse model. *Transplantation* 2013;96:707–16. doi:10.1097/TP.0b013e31829fa271.
- 180 Xiao F, Ma L, Zhao M, Huang G, Miranda V, Dorling A, et al. Ex vivo expanded human regulatory T cells delay islet allograft rejection via inhibiting islet-derived monocyte chemoattractant protein-1 production in CD34+ stem cells-reconstituted NOD-scid IL2rynull mice. *PloS One* 2014;9:e90387. doi:10.1371/journal.pone.0090387.
- 181 Benhamou PY, Watt PC, Mullen Y, Ingles S, Watanabe Y, Nomura Y, et al. Human islet isolation in 104 consecutive cases. Factors affecting isolation success. *Transplantation* 1994;57:1804–10.
- 182 Kaddis JS, Danobeitia JS, Niland JC, Stiller T, Fernandez LA. Multicenter analysis of novel and established variables associated with successful human islet isolation outcomes. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 2010;10:646–56. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02962.x.
- 183 Kin T, Murdoch TB, Shapiro AMJ, Lakey JRT. Estimation of pancreas weight from donor variables. *Cell Transplant* 2006;15:181–5.
- 184 Sakuma Y, Ricordi C, Miki A, Yamamoto T, Pileggi A, Khan A, et al. Factors that affect human islet isolation. *Transplant Proc* 2008;40:343–5. doi:10.1016/j.transproceed.2007.12.019.
- 185 Toso C, Oberholzer J, Ris F, Triponez F, Bucher P, Demirag A, et al. Factors affecting human islet of Langerhans isolation yields. *Transplant Proc* 2002;34:826–7.
- 186 Zhang N, Schröppel B, Lal G, Jakubzick C, Mao X, Chen D, et al. Regulatory T cells sequentially migrate from inflamed tissues to draining lymph nodes to suppress the alloimmune response. *Immunity* 2009;30:458–69. doi:10.1016/j.immuni.2008.12.022.
- 187 Nilsson B, Ekdahl KN, Korsgren O. Control of instant blood-mediated inflammatory reaction to improve islets of Langerhans engraftment. *Curr Opin Organ Transplant* 2011;16:620–6. doi:10.1097/MOT.0b013e32834c2393.
- 188 Han JM, Patterson SJ, Speck M, Eshes JA, Levings MK. Insulin inhibits IL-10-mediated regulatory T cell function: implications for obesity. *J Immunol Baltim Md 1950* 2014;192:623–9. doi:10.4049/jimmunol.1302181.
- 189 Montane J, Bischoff L, Soukhatcheva G, Dai DL, Hardenberg G, Levings MK, et al. Prevention of murine autoimmune diabetes by CCL22-mediated Treg recruitment to the pancreatic islets. *J Clin Invest* 2011. doi:10.1172/JCI43048.
- 190 Vågesjö E, Christoffersson G, Waldén TB, Carlsson P-O, Essand M, Korsgren O, et al. Immunological shielding by induced recruitment of regulatory T-lymphocytes delays rejection of islets transplanted in muscle. *Cell Transplant* 2015;24:263–76. doi:10.3727/096368914X678535.
- 191 Wan X, Zaghoulani H. Antigen-specific therapy against type 1 diabetes: mechanisms and perspectives. *Immunotherapy* 2014;6:155–64. doi:10.2217/imt.13.172.
- 192 Sagoo P, Ali N, Garg G, Nestle FO, Lechler RI, Lombardi G. Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med* 2011;3:83ra42. doi:10.1126/scitranslmed.3002076.
- 193 Golshayan D, Jiang S, Tsang J, Garin MI, Mottet C, Lechler RI. In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells promote

- experimental transplantation tolerance. *Blood* 2007;109:827–35. doi:10.1182/blood-2006-05-025460.
- 194 Golab K, Leveson-Gower D, Wang X-J, Grzanka J, Marek-Trzonkowska N, Krzystyniak A, et al. Challenges in cryopreservation of regulatory T cells (Tregs) for clinical therapeutic applications. *Int Immunopharmacol* 2013;16:371–5. doi:10.1016/j.intimp.2013.02.001.
- 195 Marek-Trzonkowska N, Mysliwiec M, Dobyszyk A, Grabowska M, Techmanska I, Juscinska J, et al. Administration of CD4+CD25highCD127- Regulatory T Cells Preserves  $\beta$ -Cell Function in Type 1 Diabetes in Children. *Diabetes Care* 2012;35:1817–20. doi:10.2337/dc12-0038.
- 196 Hara M, Kingsley CI, Niimi M, Read S, Turvey SE, Bushell AR, et al. IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950* 2001;166:3789–96.
- 197 Graca L, Thompson S, Lin C-Y, Adams E, Cobbold SP, Waldmann H. Both CD4(+)/CD25(+) and CD4(+)/CD25(-) regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance. *J Immunol Baltim Md 1950* 2002;168:5558–65.
- 198 Tang Q, Lee K. Regulatory T-cell therapy for transplantation: how many cells do we need? *Curr Opin Organ Transplant* 2012;17:349–54. doi:10.1097/MOT.0b013e328355a992.
- 199 Trzonkowski P, Szaryńska M, Myśliwska J, Myśliwski A. Ex vivo expansion of CD4(+)/CD25(+) T regulatory cells for immunosuppressive therapy. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 2009;75:175–88. doi:10.1002/cyto.a.20659.
- 200 Peters JH, Preijers FW, Woestenenk R, Hilbrands LB, Koenen HJPM, Joosten I. Clinical grade Treg: GMP isolation, improvement of purity by CD127 Depletion, Treg expansion, and Treg cryopreservation. *PloS One* 2008;3:e3161. doi:10.1371/journal.pone.0003161.
- 201 Putnam AL, Brusko TM, Lee MR, Liu W, Szot GL, Ghosh T, et al. Expansion of human regulatory T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2009;58:652–62. doi:10.2337/db08-1168.
- 202 Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 2006;203:1701–11. doi:10.1084/jem.20060772.
- 203 Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 2007;110:1225–32. doi:10.1182/blood-2006-12-064527.
- 204 Hippen KL, Merkel SC, Schirm DK, Sieben CM, Sumstad D, Kadidlo DM, et al. Massive ex vivo expansion of human natural regulatory T cells (T(regs)) with minimal loss of in vivo functional activity. *Sci Transl Med* 2011;3:83ra41. doi:10.1126/scitranslmed.3001809.
- 205 Carlens S, Gilljam M, Remberger M, Aschan J, Christensson B, Dilber MS. Ex vivo T lymphocyte expansion for retroviral transduction: influence of serum-free media on variations in cell expansion rates and lymphocyte subset distribution. *Exp Hematol* 2000;28:1137–46.
- 206 Ukena SN, Höpting M, Velaga S, Ivanyi P, Grosse J, Baron U, et al. Isolation strategies of regulatory T cells for clinical trials: phenotype, function, stability, and expansion capacity. *Exp Hematol* 2011;39:1152–60. doi:10.1016/j.exphem.2011.08.010.

- 207 Marek N, Bieniaszewska M, Krzystyniak A, Juścińska J, Myśliwska J, Witkowski P, Hellmann A, Trzonkowski P. The time is crucial for ex vivo expansion of T regulatory cells for therapy. *Cell Transplant* 2011;20:1747-58. doi: 10.3727/096368911X566217.
- 208 Daniele N, Scerpa MC, Landi F, Caniglia M, Miele MJ, Locatelli F, et al. T(reg) cells: collection, processing, storage and clinical use. *Pathol Res Pract* 2011;207:209–15. doi:10.1016/j.prp.2011.02.003.
- 209 Marek-Trzonkowska N, Mysliwiec M, Dobyszek A, Grabowska M, Techmanska I, Juscinska J, et al. Administration of CD4+CD25highCD127- Regulatory T Cells Preserves  $\beta$ -Cell Function in Type 1 Diabetes in Children. *Diabetes Care* 2012;35:1817–20. doi:10.2337/dc12-0038.
- 210 Seale AC, de Jong BC, Zaidi I, Duvall M, Whittle H, Rowland-Jones S, et al. Effects of cryopreservation on CD4+ CD25+ T cells of HIV-1 infected individuals. *J Clin Lab Anal* 2008;22:153–8. doi:10.1002/jcla.20234.
- 211 Elkord E. Frequency of human T regulatory cells in peripheral blood is significantly reduced by cryopreservation. *J Immunol Methods* 2009;347:87–90. doi:10.1016/j.jim.2009.06.001.
- 212 Sattui S, de la Flor C, Sanchez C, Lewis D, Lopez G, Rizo-Patrón E, et al. Cryopreservation modulates the detection of regulatory T cell markers. *Cytometry B Clin Cytom* 2012;82:54–8. doi:10.1002/cyto.b.20621.
- 213 Mallone R, Mannering SI, Brooks-Worrell BM, Durinovic-Belló I, Cilio CM, Wong FS, et al. Isolation and preservation of peripheral blood mononuclear cells for analysis of islet antigen-reactive T cell responses: position statement of the T-Cell Workshop Committee of the Immunology of Diabetes Society. *Clin Exp Immunol* 2011;163:33–49. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04272.x.
- 214 Kvarnström M, Jenmalm MC, Ekerfelt C. Effect of cryopreservation on expression of Th1 and Th2 cytokines in blood mononuclear cells from patients with different cytokine profiles, analysed with three common assays: an overall decrease of interleukin-4. *Cryobiology* 2004;49:157–68. doi:10.1016/j.cryobiol.2004.06.003.
- 215 Yamaguchi T, Wing JB, Sakaguchi S. Two modes of immune suppression by Foxp3+ regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Semin Immunol* 2011;23:424–30. doi:10.1016/j.smim.2011.10.002.
- 216 Weinberg A, Song L-Y, Wilkening C, Sevin A, Blais B, Louzao R, et al. Optimization and limitations of use of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells for functional and phenotypic T-cell characterization. *Clin Vaccine Immunol CVI* 2009;16:1176–86. doi:10.1128/ CVI.00342-08.
- 217 Costantini A, Mancini S, Giuliodoro S, Butini L, Regnery CM, Silvestri G, et al. Effects of cryopreservation on lymphocyte immunophenotype and function. *J Immunol Methods* 2003;278:145–55.
- 218 Wysocki CA, Jiang Q, Panoskaltis-Mortari A, Taylor PA, McKinnon KP, Su L, et al. Critical role for CCR5 in the function of donor CD4+CD25+ regulatory T cells during acute graft-versus-host disease. *Blood* 2005;106:3300–7. doi:10.1182/blood-2005-04-1632.
- 219 Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008;133:775–87. doi:10.1016/j.cell.2008.05.009.

- 
- 220 Mascotti K, McCullough J, Burger S r. HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. *Transfusion (Paris)* 2000;40:693–6. doi:10.1046/j.1537-2995.2000.40060693.x.
- 221 Trzonkowski P. All Roads Lead to T Regulatory Cells. *Transplantation* 2011;91:150–1. doi:10.1097/TP.0b013e3181ffbb24.
- 222 Lu Y, Suzuki J, Guillioli M, Umland O, Chen Z. Induction of self-antigen-specific Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in the periphery by lymphodepletion treatment with anti-mouse thymocyte globulin in mice. *Immunology* 2011;134:50–9. doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03466.x.
- 223 Minamimura K, Gao W, Maki T. CD4<sup>+</sup> regulatory T cells are spared from deletion by antilymphocyte serum, a polyclonal anti-T cell antibody. *J Immunol Baltim Md 1950* 2006;176:4125–32.
- 224 D’Addio F, Yuan X, Habicht A, Williams J, Ruzek M, Iacomini J, et al. A novel clinically relevant approach to tip the balance toward regulation in stringent transplant model. *Transplantation* 2010;90:260–9.
- 225 Kaplan J, Woodworth L, Smith K, Coco J, Vitsky A, McPherson J. Therapeutic benefit of treatment with anti-thymocyte globulin and latent TGF-beta1 in the MRL/lpr lupus mouse model. *Lupus* 2008;17:822–31. doi:10.1177/0961203308091635.
- 226 LaCorcia G, Swistak M, Lawendowski C, Duan S, Weeden T, Nahill S, et al. Polyclonal rabbit antithymocyte globulin exhibits consistent immunosuppressive capabilities beyond cell depletion. *Transplantation* 2009;87:966–74. doi:10.1097/TP.0b013e31819c84b8.
- 227 Liu Z, Fang Y, Wang X, Wang P, Yun P, Xu H. Upregulation of molecules associated with T-regulatory function by thymoglobulin pretreatment of human CD4<sup>+</sup> cells. *Transplantation* 2008;86:1419–26. doi:10.1097/TP.0b013e318187c2e5.
- 228 Shimony O, Nagler A, Gellman YN, Refaeli E, Rosenblum N, Eshkar-Sebban L, et al. Anti-T lymphocyte globulin (ATG) induces generation of regulatory T cells, at least part of them express activated CD44. *J Clin Immunol* 2012;32:173–88. doi:10.1007/s10875-011-9599-2.
- 229 Krystufkova E, Sekerkova A, Striz I, Brabcova I, Girmanova E, Viklicky O. Regulatory T cells in kidney transplant recipients: the effect of induction immunosuppression therapy. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 2012;27:2576–82. doi:10.1093/ndt/gfr693.
- 230 Bestard O, Cassis L, Cruzado JM, Torras J, Franquesa M, Gil-Vernet S, et al. Costimulatory blockade with mTor inhibition abrogates effector T-cell responses allowing regulatory T-cell survival in renal transplantation. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant* 2011;24:451–60. doi:10.1111/j.1432-2277.2011.01223.x.
- 231 Morelon E, Lefrançois N, Besson C, Prévautel J, Brunet M, Touraine J-L, et al. Preferential increase in memory and regulatory subsets during T-lymphocyte immune reconstitution after Thymoglobulin induction therapy with maintenance sirolimus vs cyclosporine. *Transpl Immunol* 2010;23:53–8. doi:10.1016/j.trim.2010.04.004.
- 232 Tang Q, Leung J, Melli K, Lay K, Chuu EL, Liu W, et al. Altered balance between effector T cells and FOXP3<sup>+</sup> HELIOS<sup>+</sup> regulatory T cells after thymoglobulin induction in kidney transplant recipients. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant* 2012;25:1257–67. doi:10.1111/j.1432-2277.2012.01565.x.

- 233 Bloom DD, Chang Z, Fechner JH, Dar W, Polster SP, Pascual J, et al. CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells increase de novo in kidney transplant patients after immunodepletion with Campath-1H. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 2008;8:793–802. doi:10.1111/j.1600-6143.2007.02134.x.
- 234 Rao A, Kamani N, Filipovich A, Lee SM, Davies SM, Dalal J, et al. Successful bone marrow transplantation for IPEX syndrome after reduced-intensity conditioning. *Blood* 2007;109:383–5. doi:10.1182/blood-2006-05-025072.
- 235 Dorsey MJ, Petrovic A, Morrow MR, Dishaw LJ, Sleasman JW. FOXP3 expression following bone marrow transplantation for IPEX syndrome after reduced-intensity conditioning. *Immunol Res* 2009;44:179–84. doi:10.1007/s12026-009-8112-y.
- 236 Matthews K, Lim Z, Afzali B, Pearce L, Abdallah A, Kordasti S, et al. Imbalance of effector and regulatory CD4 T cells is associated with graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation using a reduced intensity conditioning regimen and alemtuzumab. *Haematologica* 2009;94:956–66. doi:10.3324/haematol.2008.003103.
- 237 Morales J, Bono MR, Fierro A, Iñiguez R, Zehnder C, Roseblatt M, et al. Alemtuzumab induction in kidney transplantation: clinical results and impact on T-regulatory cells. *Transplant Proc* 2008;40:3223–8. doi:10.1016/j.transproceed.2008.03.066.
- 238 Watanabe T, Masuyama J, Sohma Y, Inazawa H, Horie K, Kojima K, et al. CD52 is a novel costimulatory molecule for induction of CD4+ regulatory T cells. *Clin Immunol Orlando Fla* 2006;120:247–59. doi:10.1016/j.clim.2006.05.006.
- 239 Lopez M, Clarkson MR, Albin M, Sayegh MH, Najafian N. A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Am Soc Nephrol JASN* 2006;17:2844–53. doi:10.1681/ASN.2006050422.
- 240 Ke Y, Jiang G, Sun D, Kaplan HJ, Shao H. Anti-CD3 antibody ameliorates experimental autoimmune uveitis by inducing both IL-10 and TGF- $\beta$  dependent regulatory T cells. *Clin Immunol Orlando Fla* 2011;138:311–20. doi:10.1016/j.clim.2010.12.016.
- 241 Notley CA, McCann FE, Inglis JJ, Williams RO. ANTI-CD3 therapy expands the numbers of CD4+ and CD8+ Treg cells and induces sustained amelioration of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:171–8. doi:10.1002/art.25058.
- 242 Bresson D, Togher L, Rodrigo E, Chen Y, Bluestone JA, Herold KC, et al. Anti-CD3 and nasal proinsulin combination therapy enhances remission from recent-onset autoimmune diabetes by inducing Tregs. *J Clin Invest* 2006;116:1371–81. doi:10.1172/JCI27191.
- 243 Okawaki M, Yamaguchi Y, Okita R, Ohara M, Okada M. Dose-finding study of anti-CD25 antibody for targeting regulatory T cells in locoregional immunotherapy of malignant effusion. *Hiroshima J Med Sci* 2008;57:37–46.
- 244 Bluestone JA, Liu W, Yabu JM, Laszik ZG, Putnam A, Belingheri M, et al. The effect of costimulatory and interleukin 2 receptor blockade on regulatory T cells in renal transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 2008;8:2086–96. doi:10.1111/j.1600-6143.2008.02377.x.



- 245 Libetta C, Portalupi V, Margiotta E, Sepe V, Canevari M, Meloni F, et al. Regulatory T cells in kidney transplant recipients. *G Ital Nefrol Organo Uff Della Soc Ital Nefrol* 2009;26 Suppl 45:S54–7.
- 246 Wang Z, Shi B-Y, Qian Y-Y, Cai M, Wang Q. Short-term anti-CD25 monoclonal antibody administration down-regulated CD25 expression without eliminating the neogenetic functional regulatory T cells in kidney transplantation. *Clin Exp Immunol* 2009;155:496–503. doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03847.x.
- 247 Hoerning A, Köhler S, Jun C, Lu J, Fu J, Tebbe B, et al. Cyclosporin but not everolimus inhibits chemokine receptor expression on CD4+ T cell subsets circulating in the peripheral blood of renal transplant recipients. *Clin Exp Immunol* 2012;168:251–9. doi:10.1111/j.1365-2249.2012.04571.x.
- 248 Boschetti G, Nancey S, Sardi F, Roblin X, Flourié B, Kaiserlian D. Therapy with anti-TNF $\alpha$  antibody enhances number and function of Foxp3+ regulatory T cells in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:160–70. doi:10.1002/ibd.21308.
- 249 Chen X, Bäuml M, Männel DN, Howard OMZ, Oppenheim JJ. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 2007;179:154–61.
- 250 Li Z, Arijis I, De Hertogh G, Vermeire S, Noman M, Bullens D, et al. Reciprocal changes of Foxp3 expression in blood and intestinal mucosa in IBD patients responding to infliximab. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:1299–310. doi:10.1002/ibd.21229.
- 251 Wang J, van Dongen H, Scherer HU, Huizinga TWJ, Toes REM. Suppressor activity among CD4+,CD25++ T cells is discriminated by membrane-bound tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum* 2008;58:1609–18. doi:10.1002/art.23460.
- 252 Huang Z, Yang B, Shi Y, Cai B, Li Y, Feng W, et al. Anti-TNF- $\alpha$  therapy improves Treg and suppresses Teff in patients with rheumatoid arthritis. *Cell Immunol* 2012;279:25–9. doi:10.1016/j.cellimm.2012.09.001.
- 253 Calleja S, Cordero-Coma M, Rodriguez E, Llorente M, Franco M, Ruiz de Morales JG. Adalimumab specifically induces CD3(+) CD4(+) CD25(high) Foxp3(+) CD127(-) T-regulatory cells and decreases vascular endothelial growth factor plasma levels in refractory immuno-mediated uveitis: a non-randomized pilot intervention study. *Eye Lond Engl* 2012;26:468–77. doi:10.1038/eye.2011.320.
- 254 Xueyi L, Lina C, Zhenbiao W, Qing H, Qiang L, Zhu P. Levels of Circulating Th17 Cells and Regulatory T Cells in Ankylosing Spondylitis Patients with an Inadequate Response to Anti-TNF- $\alpha$  Therapy. *J Clin Immunol* n.d.:1–11. doi:10.1007/s10875-012-9774-0.
- 255 Niu X, He D, Deng S, Li W, Xi Y, Xie C, et al. Regulatory immune responses induced by IL-1 receptor antagonist in rheumatoid arthritis. *Mol Immunol* 2011;49:290–6. doi:10.1016/j.molimm.2011.08.020.
- 256 Trzonkowski P, Zilvetti M, Chapman S, Wieckiewicz J, Sutherland A, Friend P, et al. Homeostatic repopulation by CD28-CD8+ T cells in alemtuzumab-depleted kidney transplant recipients treated with reduced immunosuppression. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 2008;8:338–47. doi:10.1111/j.1600-6143.2007.02078.x.



- 257 Verdonk RC, Haagsma EB, Jonker MR, Bok LIH, Zandvoort JH, Kleibeuker JH, et al. Effects of different immunosuppressive regimens on regulatory T-cells in noninflamed colon of liver transplant recipients. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:703–9. doi:10.1002/ibd.20087.
- 258 Fourtounas C, Dousdampanis P, Sakellarakis P, Rodi M, Georgakopoulos T, Vlachojannis JG, et al. Different immunosuppressive combinations on T-cell regulation in renal transplant recipients. *Am J Nephrol* 2010;32:1–9. doi:10.1159/000313940.
- 259 Wang H, Zhao L, Sun Z, Sun L, Zhang B, Zhao Y. A potential side effect of cyclosporin A: inhibition of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in mice. *Transplantation* 2006;82:1484–92. doi:10.1097/01.tp.0000246312.89689.17.
- 260 Miroux C, Moralès O, Carpentier A, Dharancy S, Conti F, Boleslawski E, et al. Inhibitory effects of cyclosporine on human regulatory T cells in vitro. *Transplant Proc* 2009;41:3371–4. doi:10.1016/j.transproceed.2009.08.043.
- 261 Levitsky J, Gallon L, Miller J, Tambur AR, Leventhal J, Flaa C, et al. Allospecific regulatory effects of sirolimus and tacrolimus in the human mixed lymphocyte reaction. *Transplantation* 2011;91:199–206. doi:10.1097/TP.0b013e318200e97.
- 262 Miroux C, Morales O, Ghazal K, Othman SB, de Launoit Y, Pancré V, et al. In vitro effects of cyclosporine A and tacrolimus on regulatory T-cell proliferation and function. *Transplantation* 2012;94:123–31. doi:10.1097/TP.0b013e3182590d8f.
- 263 Furuzawa-Carballeda J, Lima G, Alberú J, Palafox D, Uribe-Urbe N, Morales-Buenrostro LE, et al. Infiltrating cellular pattern in kidney graft biopsies translates into forkhead box protein 3 up-regulation and p16INK4 $\alpha$  senescence protein down-regulation in patients treated with belatacept compared to cyclosporin A. *Clin Exp Immunol* 2012;167:330–7. doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04504.x.
- 264 Charbonnier L-M, Vokaer B, Lemaître PH, Field KA, Leo O, Le Moine A. CTLA4-Ig restores rejection of MHC class-II mismatched allografts by disabling IL-2-expanded regulatory T cells. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 2012;12:2313–21. doi:10.1111/j.1600-6143.2012.04184.x.
- 265 Levitsky J, Miller J, Wang E, Rosen A, Flaa C, Abecassis M, et al. Immunoregulatory profiles in liver transplant recipients on different immunosuppressive agents. *Hum Immunol* 2009;70:146–50. doi:10.1016/j.humimm.2008.12.008.
- 266 Gandolfo MT, Jang HR, Bagnasco SM, Ko G-J, Agreda P, Soloski MJ, et al. Mycophenolate mofetil modifies kidney tubular injury and Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell trafficking during recovery from experimental ischemia-reperfusion. *Transpl Immunol* 2010;23:45–52. doi:10.1016/j.trim.2010.04.002.
- 267 Wu T, Zhang L, Xu K, Sun C, Lei T, Peng J, et al. Immunosuppressive drugs on inducing Ag-specific CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) Treg cells during immune response in vivo. *Transpl Immunol* 2012;27:30–8. doi:10.1016/j.trim.2012.05.001.
- 268 Tipton AJ, Baban B, Sullivan JC. Female spontaneously hypertensive rats have greater renal anti-inflammatory T lymphocyte infiltration than males. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2012;303:R359–67. doi:10.1152/ajpregu.00246.2012.

- 269 Meloni F, Morosini M, Solari N, Bini F, Vitulo P, Arbustini E, et al. Peripheral CD4+ CD25+ Treg cell expansion in lung transplant recipients is not affected by calcineurin inhibitors. *Int Immunopharmacol* 2006;6:2002–10. doi:10.1016/j.intimp.2006.07.019.
- 270 Zeiser R, Nguyen VH, Beilhack A, Buess M, Schulz S, Baker J, et al. Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. *Blood* 2006;108:390–9. doi:10.1182/blood-2006-01-0329.
- 271 Van Leuven SI, van Wijk DF, Volger OL, de Vries J-PPM, van der Loos CM, de Kleijn DVP, et al. Mycophenolate mofetil attenuates plaque inflammation in patients with symptomatic carotid artery stenosis. *Atherosclerosis* 2010;211:231–6. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.01.043.
- 272 Moraes-Fontes MF, Rebelo M, Caramalho I, Zelenay S, Bergman M-L, Coutinho A, et al. Steroid treatments in mice do not alter the number and function of regulatory T cells, but amplify cyclophosphamide-induced autoimmune disease. *J Autoimmun* 2009;33:109–20. doi:10.1016/j.jaut.2009.03.008.
- 273 Yüksek M, Erol F, Güloğlu D, Doğu F, Elhan AH, Babacan E, et al. Regulatory T cell levels in children with asthma. *Turk J Pediatr* 2011;53:532–6.
- 274 Noris M, Casiraghi F, Todeschini M, Cravedi P, Cugini D, Monteferrante G, et al. Regulatory T cells and T cell depletion: role of immunosuppressive drugs. *J Am Soc Nephrol JASN* 2007;18:1007–18. doi:10.1681/ASN.2006101143.
- 275 Bocian K, Borysowski J, Wierzbicki P, Wyzgal J, Klosowska D, Bialoszewska A, et al. Rapamycin, unlike cyclosporine A, enhances suppressive functions of in vitro-induced CD4+CD25+ Tregs. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 2010;25:710–7. doi:10.1093/ndt/gfp586.
- 276 Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo M-G. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood* 2005;105:4743–8. doi:10.1182/blood-2004-10-3932.
- 277 Hendriks TK, Velthuis JHL, Klepper M, van Gurp E, Geel A, Schoordijk W, et al. Monotherapy rapamycin allows an increase of CD4 CD25 FoxP3 T cells in renal recipients. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant* 2009;22:884–91. doi:10.1111/j.1432-2277.2009.00890.x.
- 278 Ruggenti P, Perico N, Gotti E, Cravedi P, D'Agati V, Gagliardini E, et al. Sirolimus versus cyclosporine therapy increases circulating regulatory T cells, but does not protect renal transplant patients given alemtuzumab induction from chronic allograft injury. *Transplantation* 2007;84:956–64. doi:10.1097/01.tp.0000284808.28353.2c.
- 279 Koulmanda M, Budo E, Bonner-Weir S, Qipo A, Putheti P, Degauque N, et al. Modification of adverse inflammation is required to cure new-onset type 1 diabetic hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:13074–9. doi:10.1073/pnas.0705863104.
- 280 Hallett WHD, Ames E, Alvarez M, Barao I, Taylor PA, Blazar BR, et al. Combination therapy using IL-2 and anti-CD25 results in augmented natural killer cell-mediated antitumor responses. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2008;14:1088–99. doi:10.1016/j.bbmt.2008.08.001.
- 281 Tang Q, Adams JY, Penaranda C, Melli K, Piaggio E, Sgouroudis E, et al. Central role of a defective interleukin-2 production in triggering islet

- autoimmune destruction. *Immunity* 2008;28:687–97. doi:10.1016/j.immuni.2008.03.016.
- 282 Grinberg-Bleyer Y, Baeyens A, You S, Elhage R, Fourcade G, Gregoire S, et al. IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. *J Exp Med* 2010;207:1871–8. doi:10.1084/jem.20100209.
- 283 Goudy KS, Johnson MC, Garland A, Li C, Samulski RJ, Wang B, et al. Inducible adeno-associated virus-mediated IL-2 gene therapy prevents autoimmune diabetes. *J Immunol Baltim Md 1950* 2011;186:3779–86. doi:10.4049/jimmunol.1001422.
- 284 Koreth J, Matsuoka K, Kim HT, McDonough SM, Bindra B, Alyea EP, et al. Interleukin-2 and Regulatory T Cells in Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med* 2011;365:2055–66. doi:10.1056/NEJMoal108188.
- 285 Saadoun D, Rosenzweig M, Joly F, Six A, Carrat F, Thibault V, et al. Regulatory T-Cell Responses to Low-Dose Interleukin-2 in HCV-Induced Vasculitis. *N Engl J Med* 2011;365:2067–77. doi:10.1056/NEJMoal105143.

## 6. STRESZCZENIA PRAC / ABSTRACTS

1. Wang LJ., Cochet O., Wang XJ., Krzystyniak A., Misawa R., **Gołab K.**, Tibudan M., Grose R., Savari O., Millis JM., Witkowski P. **Donor height in combination with islet donor score improves pancreas donor selection for pancreatic islet isolation and transplantation.** *Transplant Proc.* 2014, 46, 6, 1972-1974.

### **Wzrost dawcy jako czynnik, który w połączeniu z ogólną oceną punktową dawcy trzustki pozwala na lepszy wybór dawcy w celu izolacji i transplantacji wysp trzustkowych**

Kluczowym czynnikiem wpływającym na ilość uzyskanych wysp trzustkowych podczas izolacji, a tym samym na powodzenie przeszczepu jest identyfikacja i wybór odpowiedniego dawcy trzustki. Wprowadzenia systemu ogólnej punktowej oceny dawcy podczas selekcji trzutek umożliwiło pozyskiwanie większej ilości wysp trzustkowych podczas izolacji oraz pozwoliło na przeprowadzenie większej liczby przeszczepów. W niniejszej pracy, przeprowadziliśmy analizę, której celem było sprawdzenie czy wzrost dawcy jako niezależny czynnik w połączeniu z ogólną punktową oceną dawcy trzustki może wpłynąć na poprawę selekcji dawców trzustki.

Informacje dotyczące dawców trzustki (n = 22) oraz wyniki izolacji wysp trzustkowych z narządów pobranych od tych dawców przeprowadzonych w latach 2011 – 2012 zostały zebrane i przeanalizowane z wykorzystaniem współczynnika korelacji Pearsona.

Zaobserwowano, że wzrost dawcy stanowił niezależny czynnik, który korelował pozytywnie z masą trzustki, ilością ekwiwalentów wysp trzustkowych otrzymanych podczas izolacji przed oczyszczaniem na gradiencie ciągłym (pre-IEQ), po oczyszczaniu na gradiencie (post-IEQ) oraz z punktacją przyznaną przez system ogólnej oceny dawcy trzustki ( $P < 0,05$ ). W przypadku, kiedy wzrost dawcy trzustki wynosił  $179 \pm 3$  cm a ogólna punktowa ocena dawcy trzustki osiągała wartości  $> 80$ , odsetek klinicznych transplantacji wysp uzyskanych od takich dawców wynosił 80%.

### **Donor height in combination with islet donor score improves pancreas donor selection for pancreatic islet isolation and transplantation**

To maximize the islet isolation yield for successful islet transplantation, the key task has been to identify an ideal pancreas donor. Since implementation of the islet donor score in donor selection, we have consistently obtained higher islet yields and transplantation rates. In this study, we tested whether assessing donor height as an independent variable in combination with the donor score could improve the pancreas donor selection.

Donor and islet isolation information (n = 22) were collected and studied between 2011 and 2012. Pearson correlation analysis was used in statistical analysis.

Donor height as an independent variable was significantly correlated to the weight of the pancreas, pre-Islet Equivalents (pre-IEQ), post-IEQ, and IDS ( $P < 0,05$ ). When donor with height of  $179 \pm 3$  cm was selected in combination with  $IDS > 80$ , the clinical islet transplantation rate reached 80%.

2. Krzystyniak A., Gołab K., Witkowski P., Trzonkowski P.: **Islet cell transplant and the incorporation of Tregs.** *Curr Opin Organ Transplant.* 2014, 19, 6, 610-615. praca przeglądowa

### **Przeszczep wysp trzustkowych z zastosowaniem komórek Treg**

#### *Cel pracy*

Komórki T regulatorowe w organizmie człowieka pełnią istotną rolę w utrzymaniu immunologicznej homeostazy i tolerancji obwodowej względem obcych antygenów. Odpowiedź immunologiczna przeciw alloantygenom i nawrót odpowiedzi przeciw antygenom wysp trzustkowych przyczyniają się do dysfunkcji przeszczepionych wysp trzustkowych. Dlatego też, zastosowanie komórek Treg ma szansę znacznie poprawić przeżywalność i funkcję przeszczepianych wysp trzustkowych. W niniejszej pracy, szczegółowo przeanalizowaliśmy i przedstawiliśmy wyzwania związane z zastosowaniem namnożonych *ex vivo* komórek Treg w przeszczepie wysp trzustkowych.

#### *Najnowsze doniesienia*

Systemowe podanie komórek Treg może wiązać się z trudnościami w migracji tych komórek do miejsca przeszczepu, co ma kluczowe znaczenie dla indukcji tolerancji i ochrony przeszczepu. Obecny sposób podawania wysp trzustkowych przez żyłę wrotną niesie ze sobą pewne ograniczenia, jeżeli chodzi o możliwość równoczesnej transplantacji komórek Treg wraz z wyspami. W celu zmaksymalizowania terapeutycznego potencjału komórek Treg w przeszczepie wysp trzustkowych metody transplantacji wysp powinny zostać dopracowane i odpowiednio dostosowane. Co więcej, ważnym aspektem pozwalającym na zastosowanie komórek Treg w terapii klinicznej jest ich krioprezewacja, która zapewniałaby ich dostępność w czasie przeszczepu wysp trzustkowych.

#### *Podsumowanie*

Zgodnie ze współczesnym doświadczeniem i obecnie stosowaną technologią można stwierdzić, że jednoczesny przeszczep wysp trzustkowych i komórek Treg jest możliwy i ma ogromny potencjał, który może zostać wykorzystany w celu poprawy przeżywalności i funkcji przeszczepianych wysp. Procedura ta niesie ze sobą również szansę na istotne obniżenie dawek lub całkowite wyeliminowanie konwencjonalnej terapii immunosupresyjnej, a co za tym idzie

poprawę jakości życia pacjentów po przeszczepie wysp. Dlatego też stanowi ona interesujące podejście, warte zainicjowania w badaniach klinicznych.

### **Islet cell transplant and the incorporation of Tregs**

#### *Purpose of review*

T regulatory cells (Tregs) play a central role in maintaining immune homeostasis and peripheral tolerance to foreign antigens in humans. The immune response to alloantigens and recurrence of autoimmunity contribute to pancreatic islet transplant dysfunction, hence the adoptive transfer of Tregs has the potential to significantly improve islet graft survival. In this review, we provide an in-depth analysis of challenges associated with the application of ex-vivo expanded Tregs therapy in pancreatic islet transplant.

#### *Recent findings*

Tregs administered systemically may poorly migrate to the site of transplantation, which is critical for tolerance induction and graft protection. Intraportal administration of pancreatic tissue exerts some limitations on the ability to cotransplant Tregs at the same site of islet transplantation. In order to maximize therapeutic potential of Tregs, islet transplantation protocols may need additional refinement. Further to this, the Tregs may require cryopreservation in order to make them readily available at the same time as islet transplant.

#### *Summary*

On the basis of current experience and technology, the combination of islet and Treg cotransplantation is feasible and has great potential to improve islet graft survival. The possibility to wean off, or withdraw, traditional immunosuppressive agents and improve patient quality of life makes it an interesting avenue to be pursued.

- 3. Gołab K.,** Krzystyniak A., Marek-Trzonkowska N., Misawa R., Wang LJ., Wang X., Cochet O., Tibudan M., Langa P., Millis JM., Trzonkowski P., Witkowski P. (2013) **Impact of culture medium on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>lo/neg</sup> Treg expansion for the purpose of clinical application.** *Int. Immunopharmacol.* 2013, 16, 3, 358-363.

#### **Wpływ pożywki hodowlanej na ekspansję komórek Treg o fenotypie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>lo/neg</sup> hodowanych do celów klinicznych**

Stosunkowo niedawno odkryta populacja limfocytów T regulatorowych charakteryzuje się ekspresją czynnika transkrypcyjnego FoxP3. Komórki te znalazły zastosowanie terapeutyczne w chorobie przeszczep przeciw gospodarzowi oraz w profilaktyce cukrzycy typu 1. Terapia komórkami Treg stanowi atrakcyjne, alternatywne podejście do tradycyjnie stosowanej immunoterapii.

W naszej pracy zbadaliśmy jak typ pożywki hodowlanej oraz zastosowanej surowicy wpływa na ilość i jakość komórek Treg otrzymanych po ekspansji in vitro. W badaniu porównywane były 3 komercyjnie dostępne pożywki hodowlane: RPMI 1640 (Cellgro; Manassas VA, USA), SCGM (Cellgenix; Freiburg, Germany) oraz X-VIVO 20 (Lonza; Walkersville, MD, USA), które były suplementowane ludzką surowicą (HS, ang. Human Serum, 10%) lub surowicą bydlęcą (FBS – *Fetal Bovine Serum*, 10%). Ocenie podlegała liczba podwojeń komórek Treg oraz ich fenotyp analizowany na podstawie pomiaru ekspresji następujących markerów: FoxP3, CD25, CD127, CD62L i CD45RA.

Spośród wszystkich testowanych pożywek, zastosowanie X-VIVO 20 suplementowanej HS dało największy wzrost liczby komórek Treg po 17-dniowej ekspansji (mediana podwojeń komórek wynosiła 86, zakres 30-1365). Co więcej, wyizolowane z zastosowaniem sortera komórkowego poliklonalne komórki Treg o fenotypie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>lo</sup>/neg, hodowane w wyżej wymienionej pożywce charakteryzowała najwyższa ekspresja czynnika FoxP3 (mediana procentu komórek FoxP3<sup>+</sup> wynosiła 66,8%, zakres 56-84,8%). Nie zaobserwowano wpływu rodzaju użytej surowicy na intensywność proliferacji komórek Treg.

Podsumowując, wzrost liczby komórek Treg podczas ekspansji jest zależny od typu użytej pożywki hodowlanej. Liczby komórek Treg uzyskane po ekspansji w obecności ludzkiej lub bydlęcej surowicy nie różniły się.

#### **Impact of culture medium on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>lo</sup>/neg Treg expansion for the purpose of clinical application**

A recently discovered population of lymphocytes, called T regulatory cells (Tregs), is characterized by expression of transcription factor Forkhead box P3 (FoxP3). These cells have been successfully used as therapeutic treatments and prophylaxis for graft-versus-host disease (GVHD) and diabetes and might become an attractive alternative to traditional immunotherapy.

Here we evaluated how the type of culture medium and the type of serum can influence yield and quality of Tregs after in vitro expansion. We compared Treg fold of expansion and their phenotypical characteristics including expression of FoxP3, CD25, CD127, CD62L and CD45RA in three commercially available culture media (RPMI 1640 (Cellgro; Manassas VA, USA), SCGM (Cellgenix; Freiburg, Germany), and X-VIVO 20 (Lonza; Walkersville, MD, USA) with addition of human serum (HS, 10%) or fetal bovine serum (FBS, 10%).

Among the tested media, X-VIVO 20 supplemented with HS produced the highest yield after 17 days of in vitro expansion (a median of 86-fold expansion, range 30–1365) and highest level of FoxP3 expression (a median of 66.8% of positive cells, range 56–84.8%) in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>lo</sup>/neg FACS sorted polyclonal Tregs. There was no difference in Tregs yield whether HS or FBS serum was used.



In conclusion, the yield of the ex vivo expanded Tregs is related to the type of media applied. Supplementation of the culture with FBS or human serum is equally beneficial.

- Golab K., Leveson-Gower D., Wang XJ., Grzanka J., Marek-Trzonkowska N., Krzystyniak A., Millis JM., Trzonkowski P., Witkowski P. Challenges in cryopreservation of regulatory T cells (Tregs) for clinical therapeutic applications.** *Int Immunopharmacol.* 2013, 16, 3, 371-375.

#### **Wyzwania związane z krioprezerwacją komórek T regulatorowych przeznaczonych do terapii klinicznych**

Obiecujące wyniki pierwszych badań klinicznych z zastosowaniem komórek T regulatorowych po ekspansji ex vivo spowodowały wzrost zainteresowania tego typu terapią komórkową. Ponadto, kilka nowych badań klinicznych opartych o zastosowanie komórek Treg jest obecnie w fazie przygotowań. Metody izolacji i ekspansji komórek Treg były badane i zostały zoptymalizowane do tego stopnia, że pozwalają na otrzymanie wystarczającej liczby tych komórek w warunkach spełniających standardy Dobrej Praktyki Produkcyjnej. Terapia wykorzystująca komórki Treg mogłaby jednak jeszcze bardziej się rozwinąć, gdyby komórki Treg można było mrozić i przechowywać do czasu podania. Byłoby to bardziej praktyczne rozwiązanie w stosunku do obecnie preferowanej infuzji świeżo wyizolowanych i namnożonych komórek Treg.

Nasza obecna wiedza dotycząca wpływu krioprezerwacji na odzyskanie odpowiedniej liczby komórek Treg, ich przeżywalność oraz aktywność jest wciąż ograniczona. Na podstawie badań wpływu krioprezerwacji na jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMCs, ang. Peripheral Blood Mononuclear Cells) można wnioskować, że mrożenie i rozmrażanie może mieć szkodliwy wpływ na komórki Treg, ponieważ może obniżyć znacznie ich żywotność, zmieniać sekrecję cytokin oraz wpływać niekorzystnie na eksresję markerów powierzchniowych, niezbędnych dla stabilności i prawidłowego funkcjonowania tej populacji komórek. W związku z tym, optymalne metody krioprezerwacji komórek Treg w połączeniu z ich ekspansją w celu zastosowania klinicznego powinny być wciąż badane i zdefiniowane.

### **Challenges in cryopreservation of regulatory T cells (Tregs) for clinical therapeutic applications**

Promising results of initial studies applying ex-vivo expanded regulatory T cell (Treg) as a clinical intervention have increased interest in this type of the cellular therapy and several new clinical trials involving Tregs are currently on the way. Methods of isolation and expansion of Tregs have been studied and optimized to the extent that such therapy is feasible, and allows obtaining sufficient numbers of Tregs in the laboratory following Good Manufacturing Practice (GMP) guidelines. Nevertheless, Treg therapy could even more rapidly evolve if Tregs could be efficiently cryopreserved and stored for future infusion or expansions rather than utilization of only freshly isolated and expanded cells as it is preferred now.

Currently, our knowledge regarding the impact of cryopreservation on Treg recovery, viability, and functionality is still limited. Based on experience with cryopreserved peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), cryopreservation may have a detrimental effect on Tregs, can decrease Treg viability, cause abnormal cytokine secretion, and compromise expression of surface markers essential for proper Treg function and processing. Therefore, optimal strategies and conditions for Treg cryopreservation in conjunction with cell culture, expansion, and processing for clinical application still need to be investigated and defined.

5. Wang XJ., Leveson-Gower D., **Golab K.**, Wang LJ., Marek-Trzonkowska N., Krzystyniak A., Wardowska A., Millis JM. Trzonkowski P., Witkowski P. **Influence of pharmacological immunomodulatory agents on CD4(+)CD25(high)FoxP3(+) T regulatory cells in humans.** *Int Immunopharmacol.* 2013, 16, 3, 364-370.

### **Wpływ farmakologicznych środków immunomodulacyjnych na ludzkie komórki T regulatorowe o fenotypie CD4(+)CD25(high)FoxP3(+)**

Komórki T regulatorowe pełnią kluczową rolę w indukcji tolerancji immunologicznej przeszczepianych narządów. W związku z ich immunosupresyjnymi właściwościami, komórki Treg po ekspansji mogą być użyte jako terapia komórkowa i zapewnić atrakcyjną strategię kontroli przewlekłego odrzucania przeszczepu, której zastosowanie może przyczynić się do wyeliminowania farmakologicznej immunosupresji. Terapia komórkami Treg jest nowatorskim rozwiązaniem, dlatego na początku komórki Treg będą musiały być zastosowane w połączeniu z dostępnymi środkami farmakologicznymi, aby skutecznie chronić przeszczep przed odrzucaniem. Istnieją jednak leki, dla których wykazano, że mają właściwości wspomagające

funkcję i proliferację komórek Treg. W warunkach klinicznych protokoły immunosupresji dobierane są odpowiednio do rodzaju przeszczepianego narządu, jak również pod uwagę brane są także indywidualne cechy pacjenta i jego odpowiedzi immunologicznej. W naszej pracy przeglądowej przedstawiliśmy wpływ najczęściej stosowanych leków immunosupresyjnych na populację komórek Treg.

W związku z tym, że najczęściej stosuje się połączenie kilku środków immunosupresyjnych jednocześnie, aby zablokować odrzucanie przeszczepu, trudno jest na podstawie obecnych doniesień, określić wpływ pojedynczego leku na komórki Treg. Jednakże, wyniki przeprowadzonych badań preklinicznych i klinicznych wskazują, że globulina antytymocytarna jako lek do indukcji tolerancji oraz inhibitory szlaku mTOR do utrzymania stanu immunosupresji wykazują najkorzystniejszy wpływ na populację komórek Treg we krwi obwodowej. Spośród innych leków, które mają działanie wspomagające komórki Treg, przeciwciało anti-TNF $\alpha$ , stosowane klinicznie (w chorobach o podłożu autoimmunologicznym) już od wielu lat, wydaje się być optymalnym wyborem do zastosowania wraz z terapią komórkami Treg w transplantacji.

#### **Influence of pharmacological immunomodulatory agents on CD4(+)CD25(high)FoxP3(+) T regulatory cells in humans**

T regulatory cells (Tregs) play a critical role in the immunologic tolerance to the graft in transplantation. Thus, due to their immunosuppressive capability, ex vivo expanded Tregs may be used as a cellular therapy and an attractive novel strategy to control chronic rejection and eliminate need for lifelong pharmacological immunosuppression. Since Treg therapy is still in its infancy, initially Tregs still need to be applied in combination with pharmacological agents to prevent rejection. Fortunately, some of the medications have been shown to enhance the function and number of Tregs. In the clinic, different immunosuppressive regimens are used for individual patients for different types of organ transplantation. In this review, we present the most commonly used pharmacological agents for immunosuppression and discuss how they affect the Treg population. It is extremely difficult to dissect the effect of single agent on Tregs population in clinical settings since usually the combination of several medications is applied at the same time for graft protection. Nevertheless, experimental and clinical data indicate that thymoglobulin as immunosuppressive induction and mTOR inhibitors as immunosuppressive maintenance agents have the most beneficial effect on Treg population in the blood. Among supplemental agents promoting Tregs, anti-TNF $\alpha$  preparations have been in clinical use (in autoimmune diseases) for many years, so they are optimal candidates for testing in transplant settings in combination with Treg based cellular therapy.

6. Marek N., Krzystyniak A., Ergenc I., Cochet O., Misawa R., Wang LJ., **Gołab K**, Wang X., Kilimnik G., Hara M., Kizilel S., Trzonkowski P., Millis JM., Witkowski P. **Coating human pancreatic islets with CD4(+)CD25(high)CD127(-) regulatory T cells as a novel approach for the local immunoprotection.** *Ann Surg.* 2011 254, 3, 512-518.

**Oplaszczanie ludzkich wysp trzustkowych komórkami T regulatorowymi o fenotypie CD4(+)CD25(high)CD127(-) jako nowa strategia lokalnej immunoprotekcji**

*Cel pracy:* Opracowanie nowej strategii lokalnej immunosupresji poprzez przyłączenie komórek T regulatorowych o fenotypie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-</sup> do powierzchni wysp trzustkowych przeznaczonych do przeszczepu.

*Wprowadzenie:* Namnożone ex vivo komórki Treg mają zdolność kontroli reakcji allogenicznej i autoimmunologicznej. Dlatego też terapia komórkami Treg może stanowić bardziej efektywną ochronę przeszczepianych wysp trzustkowych przed atakiem ze strony układu immunologicznego niż obecnie stosowane środki immunosupresyjne. Lokalne zastosowanie komórek Treg może poprawić ich skuteczność i ułatwić wprowadzenie metody do badań klinicznych.

*Metody:* Wyizolowane ludzkie wyspy trzustkowe były oplaszczane allogenicznymi namnażanymi ex vivo komórkami Treg przy użyciu polimeru glikolu etylenowego skoniugowanego z biotyną (biotin-PEG-NHS) oraz streptawidyny.

*Wyniki:* Oplaszczanie wysp trzustkowych komórkami Treg nie miało wpływu na żywotność wysp (>90% w teście z dioctanem fluoresceiny i jodkiem propidyny) oraz na profil sekrecji insuliny podczas testu dynamicznej perfuzji. Po inkubacji in vitro z allogenicznymi komórkami T efektorowymi, oplaszczone komórkami Treg wyspy trzustkowe zachowały swoją funkcję, wydzielając więcej insuliny w porównaniu z wyspami nie poddanymi modyfikacji, wyspami oplaszczonymi komórkami T efektorowymi lub gdy komórki Treg jedynie dodano do hodowli wysp, nie wiążąc obu typów komórek ze sobą ( $P < 0,05$ ). Dodatkowo, w teście immunoenzymatycznym ELISPOT (ang. Enzyme-linked Immunosorbent Spot) wykazano, że wyspy oplaszczone komórkami Treg hamują wydzielanie interferonu  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) przez komórki T efektorowe (porównanie wydzielania IFN- $\gamma$  przez wyspy oplaszczone i niezmodyfikowane ( $99 \pm 7$  i  $151 \pm 8$  , odpowiednio;  $P < 0,01$ ).

*Podsumowanie:* W niniejszej pracy po raz pierwszy wykazaliśmy, że komórki T regulatorowe mogą zostać połączone z komórkami docelowymi z zachowaniem ich żywotności, funkcji i aktywności supresorowej. Jeżeli skuteczność tej metody zostanie potwierdzona na modelu zwierzęcym, oplaszczanie wysp trzustkowych komórkami Treg może stać się alternatywną metodą lub ulepszeniem tradycyjnie stosowanej immunosupresji.

**Coating human pancreatic islets with CD4(+)CD25(high)CD127(-) regulatory T cells as a novel approach for the local immunoprotection**

*Objectives:* To develop a novel approach for local immunoprotection using CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-</sup> T regulatory cells (Tregs) attached to the surface of the islets before transplantation.

*Background:* Tregs expanded ex vivo can control allo and autoreactivity, therefore, Treg-based therapy may offer more effective protection for transplanted islets from immunologic attack than currently used immunosuppression. Local application of Tregs can make such therapy more clinically feasible and efficient.

*Methods:* Human islets were isolated and coated with allogeneic ex vivo expanded Tregs using biotin-poly(ethylene glycol)-N-hydroxysuccinimide ester (biotin-PEG-NHS) and streptavidin as binding molecules.

*Results:* Coating pancreatic islets with Tregs did not affect islet viability (>90% fluorescein diacetate/propidium iodide) or the insulin secretion profile in dynamic islet perfusion assays. After in vitro incubation with allogeneic T effector cells, Treg-coated islets revealed preserved function with higher insulin secretion compared with controls-native islets, coated islets with T effector cells or when Tregs were added to the culture, but not attached to islets ( $P < 0.05$ ). In addition, the Enzyme-linked immunosorbent spot (ELISPOT) assay revealed suppression of interferon (IFN)- $\gamma$  secretion, when T effector cells were challenged with Treg-coated islets comparing to controls ( $99 \pm 7$  vs  $151 \pm 8$  dots, respectively;  $P < 0.01$ ).

*Conclusions:* We demonstrated, for the first time, the ability to bind immune regulatory cells to target cells with preservation of their viability and function and protective activity against immune attack. If successfully tested in an animal model, local delivery of immunoprotective Tregs on the surface of transplanted pancreatic islets may be an alternative or improvement to the currently used immunosuppression.

- 7. Gołab K.,** Kizilel S., Bal T., Hara M., Zielinski M., Grose R., Savari O., Wang XJ., Wang LJ., Tibudan M., Krzystyniak A., Marek-Trzonkowska N., Millis JM., Trzonkowski P., Witkowski P. **Improved coating of pancreatic islets with regulatory T cells to create local immunosuppression by using the biotin-polyethylene glycol-succinimidyl valeric acid ester molecule.** *Transplant Proc.* 2014, 46, 6, 1967-1971.

**Optimalizacja metody opłaszczania wysp trzustkowych komórkami T regulatorowymi w celu stworzenia lokalnej immunosupresji poprzez zastosowanie skoniugowanego z biotyną polimeru glikolu etylenowego będącego estrem sukcyimidowym kwasu walerianowego**

*Wprowadzenie.* W naszych wcześniejszych badaniach wykazaliśmy, że komórki T regulatorowe mogą być przyłączone do powierzchni wysp trzustkowych, tworząc w ten sposób system lokalnej immunoprotekcji. Dalsza optymalizacja tej metody może wpłynąć na poprawę efektywności opłaszczania wysp komórkami Treg, a co za tym idzie wydłużyć przeżywalność i funkcjonowanie przeszczepu. Celem naszej pracy było zwiększenie ilości komórek Treg przyłączanych do powierzchni wysp bez wpływu na żywotność oraz funkcję opłaszczanych wysp trzustkowych.

*Metody.* Powierzchnia komórek Treg i wysp trzustkowych była modyfikowana za pomocą skoniugowanego z biotyną polimeru glikolu etylenowego zawierającego resztę NHS (biotyna-PEG-NHS) lub skoniugowanego z biotyną polimeru glikolu etylenowego zawierającego resztę SVA (biotyna-PEG-SVA). Następnie, wyspy trzustkowe były inkubowane ze strapytywidyną jako cząsteczką łączącą komórki Treg z wyspami trzustkowymi. W celu wizualizacji komórki Treg przed połączeniem z wyspami były barwione barwnikiem CellTracker CM-DiI, a po opłaszczaniu wyspy analizowano z zastosowaniem skanującego laserowego mikroskopu konfokalnego. Liczbę komórek Treg przyłączonych do powierzchni wysp w przeliczeniu na jednostkę powierzchni analizowano z zastosowaniem oprogramowaniem Imaris. Aby ocenić funkcjonalność opłaszczonych wysp trzustkowych przeprowadzono test dynamicznej stymulacji sekrecji insuliny.

*Wyniki.* Opłaszczanie wysp trzustkowych komórkami Treg z użyciem cząsteczki biotyna-PEG-SVA pozwoliło na przyłączenie o 40% większej liczby komórek Treg w przeliczeniu na 1  $\mu\text{m}^2$  powierzchni wyspy trzustkowej. Przeżywalność wysp trzustkowych po procesie opłaszczania z zastosowaniem obu związków była porównywalna, ale funkcja wysp po opłaszczaniu z zastosowaniem biotyna-PEG-SVA była lepiej zachowana niż w przypadku, gdy wykorzystano biotyna-PEG-NHS. Sekrecja insuliny w odpowiedzi na różne stężenia glukozy była o 62% wyższa w przypadku wysp opłaszczonych metodą wykorzystującą biotyna-PEG-SVA, niż kiedy wyspy opłaszczono stosując biotyna-PEG-NHS.

*Wnioski.* Opłaszczanie wysp trzustkowych komórkami Treg przy użyciu związku biotyna-PEG-SVA jest metodą efektywniejszą oraz pozwala na zachowanie funkcjonalności opłaszczonych wysp na lepszym poziomie niż w przypadku stosowania związku biotyna-PEG-NHS. Optymalizacja metody opłaszczania wysp trzustkowych komórkami Treg może wpłynąć na poprawę skuteczności tego nowego podejścia do immunoprotekcji przeszczepianych wysp, a co za tym idzie umożliwić jej dostosowanie do celów klinicznych.

**Improved coating of pancreatic islets with regulatory T cells to create local immunosuppression by using the biotin-polyethylene glycol-succinimidyl valeric acid ester molecule**

*Background.* We showed that T regulatory (Treg) cells can be attached to the surface of pancreatic islets providing local immunoprotection. Further optimization of the method can improve coating efficiency, which may prolong graft survival. In this study, we compared the effectiveness of two different molecules used for binding of the Tregs to the surface of pancreatic islets. Our aim was to increase the number of Treg cells attached to islets without compromising islets viability and function.

*Methods.* The cell surface of human Treg cells and pancreatic islets was modified using biotinpolyethylene glycol-N-hydroxylsuccinimide (biotin-PEG-NHS) or biotin-PEG-succinimidyl valeric acid ester (biotin-PEG-SVA). Then, islets were incubated with streptavidin as islet/Treg cells binding molecule. Treg cells were stained with CellTracker CM-DiL dye and visualized using a Laser Scanning Confocal Microscope. The number of Treg cells attached per islets surface area was analyzed by Imaris software. The effect of coating on islet functionality was determined using the glucose-stimulated insulin response (GSIR) assay.

*Results.* The coating procedure with biotin-PEG-SVA allowed for attaching 40% more Treg cells per 1 mm<sup>2</sup> of islet surface. Although viability was comparable, function of the islets after coating using the biotin-PEG-SVA molecule was better preserved than with NHS molecule. GSIR was 62% higher for islets coated with biotin-PEG-SVA compared to biotin-PEG-NHS.

*Conclusion.* Coating of islets with Treg cells using biotin-PEG-SVA improves effectiveness with better preservation of the islet function. Improvement of the method of coating pancreatic islets with Treg cells could further facilitate the effectiveness of this novel immunoprotective approach and translation into clinical settings.



