

INDUKCJA TOLERANCJI IMMUNOLOGICZNEJ W TRANSPLANTACJI UNACZYNIONYCH NARZĄDÓW ALLOGENICZNYCH*

INDUCTION OF IMMUNOLOGICAL TOLERANCE
IN VASCULARIZED ORGAN TRANSPLANTATION

Małgorzata RICHTER, Bogusław MACHALIŃSKI

Zakład Patologii Ogólnej, Pomorska Akademia Medyczna w Szczecinie

Streszczenie: Przeszczepianie organów unaczynionych stało się rutynowym postępowaniem terapeutycznym ratującym życie wielu chorym ze schyłkową niewydolnością narządów. Jednym z głównych celów immunologii transplantacyjnej jest poszukiwanie skutecznych metod indukowania u biorcy specyficznej tolerancji wobec antygenów dawcy. W badaniach w modelach zwierzęcych wykazano, iż indukcja mieszanego chimeryzmu poprzez transfuzję komórek krwiotwórczych szpiku kostnego może stanowić efektywny sposób rozwoju specyficznej tolerancji immunologicznej dla alloprzeszczepu. W niniejszej pracy przedstawiono historię oraz współczesne osiągnięcia w badaniach nad mechanizmem oraz opracowaniem optymalnego protokołu indukcji mieszanego chimeryzmu u gryzoni i dużych zwierząt. Zawarto również aspekty kliniczne indukcji tolerancji immunologicznej u ludzi oraz potencjalne implikacje terapeutyczne.

Słowa kluczowe: alloprzeszczep, krwiotwórcze komórki macierzyste, mieszany chimeryzm, tolerancja immunologiczna, transplantacja narządów.

Summary: Achieving immunological tolerance is an important goal in the effort to reduce long-term morbidity and mortality in organ transplant recipients. The establishment of mixed chimerism through the transplantation of donor bone marrow cells is an experimental approach for tolerance induction with clinical potential. Permanent, robust donor-specific tolerance has been reliably achieved in various animals models of mixed chimerism. This article reviews the historical background and the progress achieved in recent years in developing mixed chimerism protocols in rodents, large animals and also regards the issue of clinical applications.

Key words: allograft, haematopoietic stem cells, mixed chimerism, immunological tolerance, organ transplantation.

* Praca finansowana z grantu UE nr QLK3-CT-2002-30307 w ramach Stem Cell Therapeutics Excellence Centre.

Wykaz skrótów stosowanych w pracy: **APC** (ang. *Antigen Presentig Cell*) – komórka prezentująca antygen, **BMT** (ang. *Bone Marrow Transplantation*) – przeszczepienie komórek szpiku kostnego, **DST** (ang. *Donor-Specific Transfusion*) – transfuzja specyficznych komórek dawcy, **GVHD** (ang. *Graft Versus Host Disease*) – choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi, **KKM** – krwiotwórcze komórki macierzyste, **TBI** (ang. *Total Body Irradiation*) – napromieniowanie całego ciała, **PCR** (ang. *Polymerase Chain Reaction*) – reakcja łańcuchowa polimerazy

WSTĘP

Transplantacja jest w wielu przypadkach jedyną skuteczną metodą leczenia schyłkowej niewydolności różnych narządów. W ostatnim dwudziestoleciu ogromnym sukcesem w transplantologii było udoskonalenie procedur immunosupresji, które znacznie poprawiły odległe przeżycie i prawidłowe funkcjonowanie przeszczepianych narządów allogenicznych. Z drugiej strony jednak pacjent, poddawany leczeniu immunosupresyjnemu, narażony jest na wiele działań ubocznych, wśród których są infekcje oportunistyczne, nowotwory, uszkodzenie nerek czy zaburzenia metaboliczne [9, 41, 58].

Przyjmuje się, iż kontrola reakcji ostrego odrzucania przeszczepu dzięki wprowadzeniu cyklosporyny A jest w chwili obecnej zadowalająca, nie można natomiast tego odnieść do procesu przewlekłego odrzucania przeszczepu. Po 10 latach, tylko 50% przeszczepów nerek nadal funkcjonuje, a 70% alloprzeszczepów płuc wykazuje pogorszenie już 5 lat od transplantacji [18]. W związku z tym problem przewlekłego odrzucania przeszczepu nadal pozostaje nierozwiązany [34, 36, 41]. Z tych powodów jednym z głównych celów współczesnej transplantologii immunologicznej jest poszukiwanie metod indukcji specyficznej tolerancji wobec antygenów dawcy, która mogłaby skutecznie uchronić pacjenta od późnego odrzucania przeszczepu oraz pozwoliłaby uniknąć przewlekłej terapii lekami immunosupresyjnymi [9, 10, 36].

Tolerancję immunologiczną można wytworzyć między innymi poprzez wszczepienie komórek allogenicznych gospodarzowi, poddanemu wcześniej immunosupresji za pomocą leków (np. cyklosporyna A, steroidy), naświetlań promieniami gamma czy przeciwciał antylimfocytarnych (globulina antylimfocytarna, przeciwciała anti-CD4). Aby podtrzymać stan tolerancji, należy uzyskać pewien stopień chimeryzmu, czyli współistnienia komórek od genetycznie różnych osobników. Stan ten najłatwiej jest osiągnąć, jeżeli wszczepiane komórki są zdolne do samoodnowy jak krwiotwórcze komórki macierzyste (KKM) [36].

W niniejszej pracy zostanie omówiona w skrócie historia wielu prób indukcji tolerancji immunologicznej poprzez wytworzenie mieszanego chimeryzmu oraz przedstawione zostaną najnowsze osiągnięcia dotyczące tej metody w badaniach w modelu zwierzęcym oraz u ludzi.

RODZAJE CHIMERYZMU I MECHANIZMY JEGO POWSTAWANIA

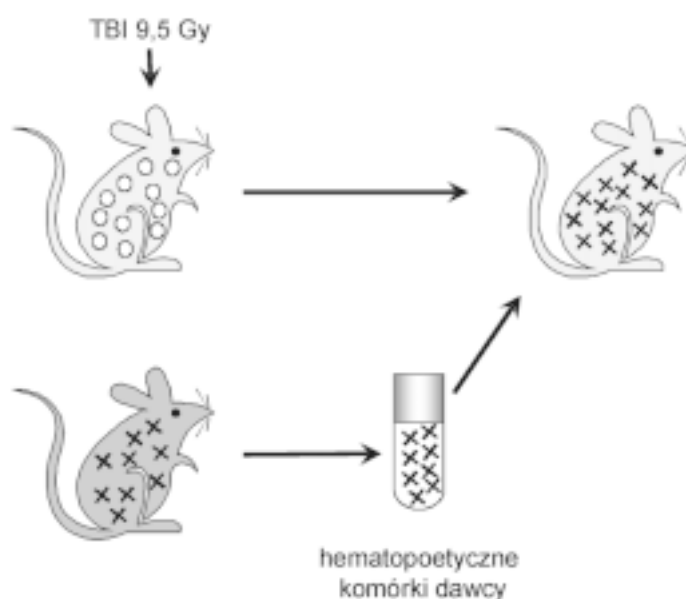
Zgodnie z mitologią grecką chimera była przedstawiana jako stworzenie składające się z głowy i szyi lwa, ciała kozy i ogona węża [18, 59]. Według innych starożytnych kultur podobne stworzenia istniały również w Indiach jako Koziorożec, czyli skrzyżowanie lwa, słonia i węża oraz w Chinach jako kombinacja kobiety i węża, zwana Fu-Hsi [18, 59]. Najślawniejszą polską chimera jest natomiast warszawska Syrena, czyli połączenie kobiety i ryby.

Z medycznego punktu widzenia chimeryzm określany jest jako stan współistnienia w jednym organizmie dwóch genetycznie różnych populacji komórek, które mają zdolność różnicowania i prawidłowego wzajemnego funkcjonowania. Chimeryzm może pojawić się spontanicznie lub jako konsekwencja interwencji medycznej [3, 54, 58]. Spontaniczny chimeryzm można zaobserwować u bliźniąt, kiedy w życiu płodowym występuje połączenie pomiędzy naczyniami dwóch łożysk. Natomiast sztucznie indukowany chimeryzm można osiągnąć w różny sposób w zależności od rodzaju, jaki chce się uzyskać (tab. 1) [54, 58].

W pełnym chimeryzmie układ krwiotwórczy gospodarza jest zastąpiony całkowicie przez układ krwiotwórczy dawcy wskutek zastosowania całkowitej mieloablacji u gospodarza (ryc. 1). W związku z tym obecność pełnego chimeryzmu jest związana z nieprawidłowym funkcjonowaniem pierwotnej odpowiedzi immunologicznej oraz dużym ryzykiem wystąpienia choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi GVHD (ang. *graft versus host disease*).

TABELA 1. Definicje i charakterystyka poszczególnych rodzajów chimeryzmu

Rodzaje chimeryzmu	Definicja	Komentarz
Chimeryzm	obecność obcych hematopoetycznych komórek u danego osobnika	
Mikrochimeryzm	obecność u biorcy hematopoetycznych komórek dawcy < 1%	może wystąpić spontanicznie po allogenicznym przeszczepieniu narządu unaczynionego.
Makrochimeryzm		
a) pełny chimeryzm	wszystkie hematopoetyczne komórki obecne u biorcy pochodzą od dawcy, 100%	powstaje w wyniku allogenicznego przeszczepienia szpiku po wcześniejszym przygotowaniu immunoablacyjnym
b) mieszany chimeryzm	współistnienie hematopoetycznych komórek pochodzących zarówno od dawcy, jak i od biorcy, 1 < komórki dawcy < 100%	powstaje po przeszczepieniu KKM po wcześniejszym immunosupresyjnym przygotowaniu biorcy

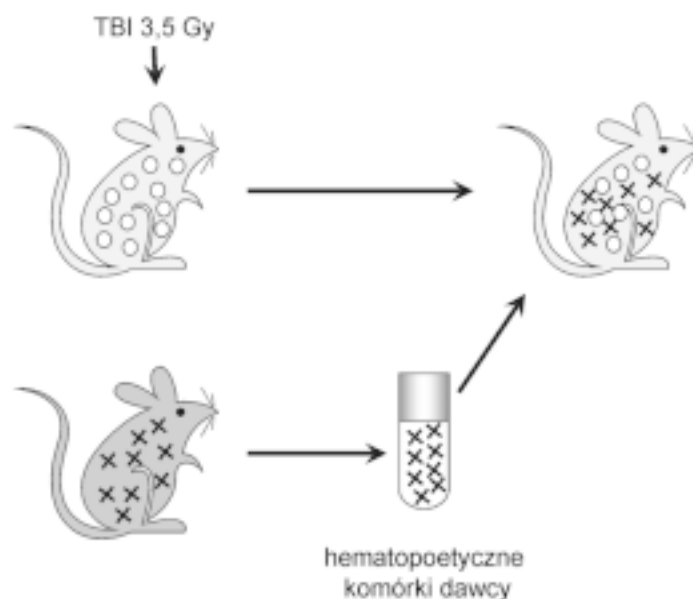


RYCINA 1. Mechanizm powstawania pełnego chimeryzmu u myszy. Przeszczepienie komórek hematopoetycznych pochodzących od dawcy po wcześniejszym immunoablacyjnym przygotowaniu biorcy

Ponadto, śmiertelność 7–10% związana z przygotowaniem ablacyjnym biorcy wyklucza zastosowanie tej metody w allogenicznych przeszczepach narządów unaczynionych i jest w chwili obecnej zarezerwowana głównie dla chorób nowotworowych układu krwiotwórczego oraz poważnych zaburzeń odporności [18, 47, 58].

Z punktu widzenia immunologii transplantacyjnej indukcja stabilnego, mieszanego chimeryzmu poprzez infuzję KKM odgrywa istotną rolę w strategiach wytworzenia specyficznej tolerancji immunologicznej wobec antygenów dawcy. W mieszanym chimeryzmie układ krwiotwórczy dawcy współistnieje z układem krwiotwórczym biorcy (ryc. 2). Mieszany chimeryzm indukuje specyficzną tolerancję immunologiczną, jest ponadto związany z lepszą immunokompetencją organizmu gospodarza oraz ze stosunkowo większą odpornością na GVHD w porównaniu z pełnym chimeryzmem [18, 47, 54]. Może być osiągnięty za pomocą łagodniejszej immunosupresji pozwalającej na powszechne zastosowanie kliniczne, np. poprzez częściowe naświetlania promieniami gamma, użycie przeciwciał antylimfocytarnych lub kostymulującej terapii blokującej. Powyższe metody poddawane są w ostatnich latach intensywnym badaniom przez różne ośrodki kliniczne i naukowo-badawcze na całym świecie [9, 36, 57].

Trzeci rodzaj chimeryzmu, mikrochimeryzm, pojawia się spontanicznie u biorców alloprzeszczepów jako rezultat pierwotnej obecności krwiotwórczych komórek dawcy (tzw. leukocytów pasażerskich) przenoszonych razem z przeszczepianym narządem [41, 43, 58]. Ten rodzaj chimeryzmu może być wykrywany za pomocą techniki PCR (ang. *polymerase chain reaction*). Nie potwierdzono jednak do tej pory znaczącej przydatności mikrochimeryzmu w indukcji tolerancji wobec antygenów alloprzeszczepu [3, 27, 59].



RYCINA 2. Mechanizm powstawania mieszanego chimeryzmu u myszy. Przeszczerpienie KKM pochodzących od dawcy po wcześniejszym częściowym immunosupresyjnym przygotowaniu biorcy

RYS HISTORYCZNY

Spontaniczne pojawienie się chimeryzmu i tolerancji jako pierwszy zaobserwował Owen ze współpracownikami, który udowodnił, że komórki posiadające antygeny „własne” i „obce” mogą powstać u tego samego osobnika. W 1945 r. Owen opisał „doświadczenie w naturze” u nieidentycznych bliźniaczych cieląt rasy „freemartin”. Wymieniały one KKM przez naczynia krwionośne wspólnego łożyska i w związku z tym każde ze zwierząt posiadało markery erytrocytarne obu cieląt. Przez całe życie wykazywały one tolerancję na bliźniacze komórki, co manifestowało się niezdolnością do wytworzenia przeciwciał przeciwko odpowiednim antygenom erytrocytarnym [27, 38]. Wkrótce Billingham i wsp. dowiedli, że większość badanych bliźniąt była rasy „freemartin” wykazuje pełną akceptację przeszczepów skórnych pochodzących od siebie wzajemnie, pomimo iż różnią się pod względem genetycznym [5].

Ekperymentalne potwierdzenie wcześniejszych obserwacji uzyskano w 1953 r., kiedy Billingham, Brent i Medwar wywołali tolerancję immunologiczną na skórne allo-przeszczepy (przeszczepy, które są genetycznie różne, ale pochodzą od tego samego gatunku) u myszy, którym podali dożylnie w życiu płodowym krwiotwórcze komórki allogeniczne od przyszłego dawcy skóry [4].

Na początku lat siedemdziesiątych Opelz i wsp. zaobserwowali, iż wielokrotne, niespecyficzne transfuzje krwi, jak również specyficzne pochodzące od dawców przeszczepianych narządów [33] prowadziły do znacznie lepszego przeżycia przesz-

czepianych narządów allogenicznych. Powyższe badania pozwoliły skonsolidować hipotezę dotyczącą użycia krwiotwórczych komórek w celu indukcji specyficznej tolerancji immunologicznej w transplantologii [32, 33].

Początkowo wielokrotne próby wywołania tolerancji u dorosłych biorców często kończyły się niepowodzeniami, dopiero ustalenie roli, jaką odgrywa w całym procesie właściwe, wcześniejsze przygotowanie biorcy przyczyniło się do znaczącej poprawy osiągniętych wyników [18]. Monaco i Wood jako pierwsi wykazali, iż indukcja specyficznej tolerancji na skórne przeszczepy może być osiągnięta u dorosłych myszy, które zostały pozbawione grasicy i potraktowane przeciwciałami antylimfocytarnymi, a następnie otrzymały frakcję limfoidalnych komórek pozyskanych wcześniej od mysz – mieszańców (hybryd). Późniejsze eksperymenty na dorosłych myszach, które otrzymały w terapii globulinę antylimfocytarną, wykazały, iż podane w infuzji dożylniej niskie dawki ($10\text{--}50 \times 10^6$) krwiotwórczych komórek szpiku także indukują lepsze przeżycie przeszczepu skórnoego bez cech GVHD [30]. Następne podobne doświadczenia na dorosłych psach i małpach ugruntowały przekonanie o dużej roli chimeryzmu w mechanizmie indukcji tolerancji immunologicznej na przeszczepy allogeniczne narządów unaczynionych [7, 50] i stały się punktem wyjścia do rozważań nad powszechnym zastosowaniem u ludzi.

POSTULOWANY MECHANIZM WYTWORZENIA TOLERANCJI IMMUNOLOGICZNEJ PRZEZ INDUKCJĘ STABILNEGO MIESZANEGO CHIMERYZMU

Tolerancja immunologiczna jest to stan braku osobniczej swoistej odpowiedzi immunologicznej, podczas gdy odpowiedź wobec antygenów nieswoistych jest zachowana i funkcjonuje prawidłowo. Stan ten jest bardzo pożądanym jako względnie fizjologiczny w transplantologii w porównaniu z nieswoistymi czynnikami immunosupresyjnymi, które blokując reakcję odrzucania przeszczepu zmniejszają równocześnie odporność na infekcje oraz wywołują całą gamę innych efektów niepożądanych [36].

Swoista tolerancja immunologiczna jest indukowana uprzednią ekspozycją na antygen. W przypadku mieszanego chimeryzmu indukcję specyficznej tolerancji u biorców alloprzeszczepu można uzyskać poprzez wszczepienie krwiotwórczych komórek szpiku kostnego wzbogaconych najlepiej we frakcję KKM, ale pozbawionych komórek adherentnych i limfocytów. Zdolność KKM do samoodnowy pozwala układowi immunologicznemu gospodarza na ciągły kontakt z obcym antygenem, a usunięcie komórek adherentnych i limfocytów zmniejsza ryzyko wystąpienia GVHD [58].

Wytworzenie i podtrzymywanie stanu tolerancji w mechanizmie mieszanego chimeryzmu odbywa się wewnątrzgrasiczo poprzez centralną klonalną delecję [53]. Jest to jeden z fizjologicznych mechanizmów w ludzkim organizmie, dzięki któremu wytwarzana jest tolerancja na własne antygeny. Komórki T, które wykazują antygenowo swoiste receptory o wysokim stopniu powinowactwa do wewnątrzgrasiczych antygenów

własnych, są eliminowane w drodze apoptozy. Natomiast autoreaktywne komórki T o niskim powinowactwie oraz komórki z receptorami swoistymi dla antygenów niewystępujących wewnątrzgrasiczo dojrzewają i dołączają do obwodowej puli komórek T [36, 37, 58].

Ogromną rolę w podtrzymywaniu stanu tolerancji przypisuje się komórkom dendrytycznym szpiku kostnego dawcy, których głównym zadaniem jest prezentacja antygenów w grasicy [51, 52].

Tolerancja w mieszanych chimerach zależy więc przede wszystkim od ciągłej obecności w grasicy komórek dendrytycznych pochodzących od dawcy, które pośredniczą w mechanizmie centralnej klonalnej delecji z udziałem komórek dawcy. Dzięki temu wewnątrzgrasiczo eliminowane są nie tylko autoreaktywne limfocyty T gospodarza, ale również populacja limfocytów T wykazująca antygenowo swoiste receptory o wysokim stopniu powinowactwa do antygenów przeszczepu. Tolerancja na antygeny przeszczepu trwa więc tak długo, dopóki w szpiku kostnym pula krwiotwórczych komórek pochodzących od dawcy będzie współistniała z komórkami gospodarza.

W ten sposób w mieszanych chimerach nowo powstałe dojrzałe limfocyty T, które przeszły selekcję wewnątrzgrasiczą, wykazują trwałą tolerancję wobec antygenów dawcy. Należy jednak pamiętać, że dojrzałe reaktywne limfocyty T gospodarza, które odgrywają kluczową rolę w odrzucaniu przeszczepu, powinny być usunięte lub inaktywowane przed transplantacją narządu oraz wszczepieniem KKM. Niestety powszechnie stosowana w tym celu nieswoista immunosupresja w postaci naświetlań promieniami gamma, leków immunosupresyjnych czy przeciwciał antylimfocytarnych pozostawia pacjenta w stanie znacznie obniżonej odporności immunologicznej i zwiększa ryzyko infekcji, dopóki nie powstanie w grasicy nowa pula komórek T [28, 40]. W związku z tym poszukiwania skutecznych metod swoistej immunosupresji są nadal przedmiotem intensywnych badań w dziedzinie immunologii transplantacyjnej.

Od niedawna specyficzna eliminacja dojrzałych limfocytów T uzyskiwana jest w drodze równoczesnego zablokowania kostymulacji limfocytów T (ang. *costimulatory blockade*) oraz wszczepienia komórek szpiku kostnego (BMT, ang. *Bone Marrow Transplantation*).

INDUKCJA TOLERANCJI W MECHANIZMIE BLOKOWANIA KOSTYMULACJI LIMFOCYTÓW T ORAZ RÓWNOCZESNEJ TRANSPLANTACJI KOMÓREK SZPIKU KOSTNEGO

Blokowanie kostymulacji, czyli dodatkowych sygnałów potrzebnych do aktywacji limfocytów T, pozwoliło po raz pierwszy na indukcję stabilnego mieszanego chimeryzmu unikając silnej nieswoistej immunosupresji [57]. W powyższym eksperymencie myszy potraktowano niską dawką TBI (3 Gy), a następnie otrzymały one standardową dawkę komórek szpiku kostnego dawcy oraz pojedynczą dawkę przeciwciała monoklonalnego anty-CD154 (anty-CD40L) i CTLA-4Ig. W rezultacie otrzymano stan stabilnego mieszanego chimeryzmu oraz silną tolerancję na alloprzeszczep.

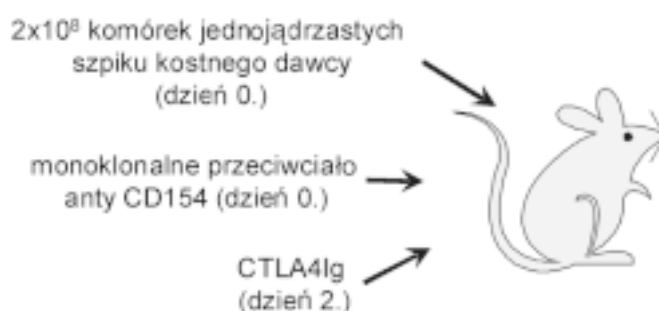
Zastosowanie tego protokołu miało na celu wyeliminowanie reaktywnych limfocytów T biorcy w drodze obwodowej klonalnej delecji przez blokowanie mechanizmów kostymulacji limfocytów T, które zależą głównie od cząsteczek CD40L, CD28 i CTLA-4 na powierzchni limfocyty T. Kostymulacja limfocytów T oznacza, że potrzebny jest drugi sygnał oprócz tego, który wywołał indukcję przez TCR po połączeniu się z antygenem MHC klasy II obecnym na powierzchni komórki prezentującej antygen APC (ang. *Antigen Presenting Cell*). Ten drugi sygnał nasila proliferację komórek T oraz funkcje efektorowe, takie jak produkcja limfokin i cytoliza.

Obecnie wiadomo, iż najsilniejszym sygnałem biorącym udział w kostymulacji limfocytów T jest połączenie się antygeny CD40 na powierzchni APC z jego ligandem na powierzchni limfocytów T zwanym CD40L (CD154). Wiązanie ligandu CD40L na powierzchni limfocyty T przez przeciwciała anti-CD154 prowadzi więc do zablokowania najsilniejszego sygnału aktywacji limfocytów T przez APC.

W kostymulacji może brać udział wiele innych cząsteczek powierzchniowych komórek T, ale szczególnie duże znaczenie pośród nich odgrywa szereg B7-CD28/CTLA-4. CD28 ulega stałej ekspresji na powierzchni komórki T, natomiast CTLA-4 obecne jest na powierzchni dopiero po jej aktywacji. Antygeny B-7 obecne na powierzchni APC łączą się z CD28 powodując stabilizację sygnałów aktywacji limfocytów T. Stymulacja CD28 prowadzi do produkcji IL-2, ekspresji receptora dla IL-2 i progresji w cyklu życiowym pobudzonych komórek T. Natomiast CTLA-4, będąca alternatywnym receptorem dla B7, jest białkiem regulacyjnym ograniczającym aktywację limfocytów T. Cząsteczka CD28 początkowo łączy się z B7, co prowadzi do aktywacji limfocytów T, lecz pojawiająca się następnie zwiększona ekspresja CTLA-4 doprowadza do interakcji CTLA-4/B7, co w konsekwencji ogranicza poziom aktywacji. Wiązanie zatem CTLA-4 przez przeciwciała CTLA-4Ig na powierzchni komórki blokuje odpowiedzi zależne od CD28 i powoduje zahamowanie syntezy IL-2. Usunięcie IL-2 prowadzi natomiast do nieuchronnej śmierci komórki [36, 56].

Mechanizm blokowania kostymulacji w podobnych protokołach został użyty także w innych eksperymentach, gdzie również uzyskano zadowalające wyniki badań [1, 12, 56, 57]. Niemniej jednak, jak wykazano w późniejszych pracach, próby zastosowania tej metody osobno (tj. bez jednoczesnego przeszczepienia KKM) nie dały pozytywnych rezultatów w indukcji pierwotnej tolerancji na przeszczep skóry u myszy ani tolerancji wobec przeszczepu nerek u małp [58]. Wobec powyższego, mechanizm blokowania kostymulacji wydaje się być użyteczny w indukowaniu mieszanego chimeryzmu, jedynie w skojarzeniu z BMT.

Jednym z najnowszych osiągnięć w tej dziedzinie była indukcja długotrwałego mieszanego chimeryzmu i tolerancji na przeszczep skóry w mechanizmie blokowania kostymulacji limfocytów T bez użycia jakiegokolwiek poprzedzającej cytoredukcyjnej terapii biorcy (np. TBI lub leków immunosupresyjnych). Jedynym warunkiem było zastosowanie dużych dawek jednojądrzastych komórek szpiku kostnego. Zgodnie z tym protokołem myszy otrzymały 2×10^8 komórek szpiku kostnego oraz pojedyncze dawki przeciwciał anti-CD154 oraz CTLA-4Ig (ryc. 3) [55, 58].



RYCINA 3. Indukcja mieszanego chimeryzmu oraz tolerancji immunologicznej u myszy w mechanizmie blokowania kostymulacji limfocytów T oraz równoczesnej transplantacji komórek szpiku kostnego (CTLA4Ig – przeciwciała przeciwko cząsteczce powierzchniowej CTLA4)

W ostatnich miesiącach opisano strategię indukcji tolerancji u myszy w mechanizmie blokowania kostymulacji jedynie z użyciem pojedynczych dawek przeciwciał anti-CD40L (CD154) i anti-CD8 oraz BMT uzyskując długotrwałe przyjęcie przeszczepu skórno-dawcy (powyżej 100 dni) [22]. Pozwoliło to na wytworzenie szybkiej i stabilnej tolerancji zarówno limfocytów CD8, jak i CD4 wobec antygenów dawcy. W kolejnej modyfikacji przeciwciała anti-CD8 zostały zastąpione użyciem DST (ang. *Donor-Specific Transfusion*) oraz TBI w dawce 3 Gy uzyskując podobny efekt [46]. W powyższych doświadczeniach stwierdzono, iż tolerancja wobec antygenów dawcy występuje niemal natychmiast po dokonaniu BMT. Dowodem tego był fakt prawidłowego przyjęcia alloprzeszczepu płata skórno-dawcy przeszczepionego w drugim dniu od zabiegu infuzji komórek krwiotwórczych oraz odrzucenie podobnego przeszczepu pochodzącego od trzeciego, niespokrewnionego szczepu wsobnego myszy [23].

Ostatnie doniesienia wskazują na udział dodatkowych jeszcze mechanizmów odgrywających rolę w indukowaniu szybkiej tolerancji wobec antygenów dawcy. Jeden z nich może być związany z początkową anergią reaktywnych limfocytów CD4 biorcy wywołwaną przez komórki hematopoetyczne dawcy i ich następczą delecją w obecności przeciwciał anti-CD40L. Ponadto, kluczową rolę przypisuje się od niedawna regulatorowym limfocytom T, które również biorą udział w powstawaniu obwodowej tolerancji na alloantygeny przeszczepów unaczynionych [23, 24].

W chwili obecnej trwają intensywne badania mające na celu dokładne wyjaśnienie wszystkich powyższych mechanizmów indukcji tolerancji. Możliwe, iż niektóre elementy z opisanych strategii znajdą się wkrótce w standardowych protokołach transplantologicznych u ludzi.

MECHANIZMY INDUKCJI TOLERANCJI U GRYZONI

Postęp w dziedzinie indukcji tolerancji immunologicznej w mechanizmie stabilnego mieszanego chimeryzmu był rezultatem wielu badań przeprowadzonych w modelu zwierzęcym zarówno u gryzoni, jak i u dużych zwierząt.

W jednym z przykładowych eksperymentów myszy-biorcy otrzymywały monoklonalne przeciwciała (mAb) anty-CD4 i anty CD8 w celu wyeliminowania populacji cytotoksycznych limfocytów T gospodarza. Następnie, okolice grasicy myszy-biorców zostały naświetlone promieniami gamma w dawce 7 Gy, a całe ciało TBI 3 Gy. Tak przygotowanym zwierzętom podano dożylnie standardową dawkę komórek szpiku kostnego od dawcy niespokrewnionego ($\sim 15 \times 10^6$ komórek/mysz). W opisanym protokole myszy wykazywały tolerancję wobec skórnych przeszczepów allogenicznych oraz obecność stabilnego mieszanego chimeryzmu, a mimo to nadal pozostały immunokompetentne. Zostało to potwierdzone reakcją odrzucenia przeszczepu skórniego pochodzącego od trzeciego szczepu wsobnego [39].

W kolejnych doświadczeniach wykazano, iż napromienianie grasicy może być zastąpione dodatkową dawką monoklonalnych przeciwciał antylimfocytarnych [1, 50] lub kostymulacyjną terapią blokującą (CTLA4Ig i przeciwciała monoklonalne anty-CD154), co znacznie zmniejszyło toksyczność przygotowania biorcy [49, 57].

W innym przypadku TBI myszy biorcy zostało zastąpione pojedynczą, skojarzoną dawką chemioterapeutyków (dimetylan myleranu i cyklofosfamid). Tutaj również osiągnięto stan mieszanego chimeryzmu oraz specyficzną tolerancję na przeszczep skórny [11].

Choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi jest jednym z głównych klinicznych problemów allogenicznych przeszczepów szpiku, mimo to w powyższych doświadczeniach nie była obserwowana [47]. Można to wytłumaczyć poprzez uprzednie dokładne oczyszczenie wszczepianego szpiku kostnego z dojrzałych komórek T lub zastosowanie kostymulującej terapii blokującej w momencie BMT [52, 53, 54, 57].

Pomimo wielokrotnie podejmowanych nieablacyjnych metod przygotowania gryzoni do przeszczepienia, nie zdołano odstąpić od początkowych dawek mielosupresji czy nieswoistej eliminacji limfocytów T [9, 10, 11, 28, 31, 44]. Jeden z pomysłów dotyczył zastosowania infuzji bardzo dużych dawek allogenicznych, krwiotwórczych komórek szpiku kostnego w celu uniknięcia TBI. W eksperymencie tym myszy biorcy zostały poddane terapii antylimfocytarnymi przeciwciałami monoklonalnymi oraz selektywnemu napromienianiu grasicy. Następnie otrzymały dużą liczbę ($174 \times 10^6/\text{kg m.c.}$) krwiotwórczych komórek szpiku kostnego dawcy w infuzji dożylniej. U 80% badanych myszy zaobserwowano wysoki poziom chimeryzmu oraz indukcję specyficznego tolerancji na alloprzeszczep [48].

Naukowcy byli jednak zgodni, iż barierą w zastosowaniu powyższej metody u ludzi byłoby niewątpliwie pozyskiwanie tak dużej liczby komórek hematopoetycznych szpiku kostnego od potencjalnych dawców narządów. Zwłaszcza, że większość narządów allogenicznych jest rutynowo pobierana od zmarłych dawców. Opracowanie w ostatnim czasie nowej metody pozyskiwania komórek krwiotwórczych od heparynizowanych dawców narządów pozwala jednak mieć nadzieję na pokonanie w przyszłości tej przeszkody [25, 35].

Próby uniknięcia napromieniania organizmu gospodarza czy użycia leków cytotoksycznych w powyższych eksperymentach dowiodły jednoznacznie, iż prawidłowe wszczepienie krwiotwórczych komórek dawcy wymaga odpowiedniego przygotowania organizmu biorcy. Potwierdziły się zatem przypuszczenia, iż niskie dawki terapii

mielosupresyjnej są niezbędne do indukcji długotrwałego stabilnego chimeryzmu w modelu mysim [30, 39, 53].

INDUKCJA TOLERANCJI U DUŻYCH ZWIERZĄT

Skomplikowane nieablacyjne metody indukcji tolerancji poprzez ustanowienie mieszanego chimeryzmu do niedawna nie były stosowane u dużych zwierząt [58]. Wątpliwości te zostały wyeliminowane jednak przez Fuchimoto i wsp., którzy jako pierwsi zastosowali kostymulującą terapię blokującą w celu usunięcia limfocytów T u świń. W tym modelu stabilny mieszany chimeryzm oraz specyficzna tolerancja na antygeny dawcy w przeszczepie skórny została uzyskana po eliminacji limfocytów T immunotoksyną skoniugowaną z przeciwciałem anti-CD3, frakcjonowanym TBI (3 Gy) oraz napromienianiem grasicy (7 Gy) [17]. W kolejnym eksperymencie ci sami naukowcy spróbowali zastosować podobną metodę indukcji mieszanego chimeryzmu, z pominięciem TBI. Okazało się, iż nie ma przeszkód w stosowaniu nieablacyjnych metod w celu indukcji tolerancji u dużych zwierząt [14].

Podobne doświadczenia u psów były wielokrotnie przeprowadzane przez Storba i wsp. Początkowo, w celu przygotowania biorcy, zastosowano TBI w dawce 2 Gy oraz skojarzoną terapię cyklosporyną A i mykofenolanem mofetylu przez pierwszy tydzień począwszy od BMT. Po zmodyfikowaniu tego protokołu, włączyli do indukcji terapię CTLA4-Ig, zmniejszając TBI do 1 Gy. W obu przypadkach zaobserwowano stabilny mieszany chimeryzm i długotrwałą tolerancję na przeszczep skórny [45, 46].

Próby indukcji mieszanego chimeryzmu zostały podjęte również u małp *Cynomolgus* z gatunku makak (*Macacca fascicularis*). Według opisanego protokołu małpy były przygotowywane do przeszczepienia przy użyciu globuliny antylimfocytarnej, TBI (3 Gy), napromieniania grasicy (7 Gy) oraz splenektomii bezpośrednio przed transplantacją szpiku i nerek od tego samego dawcy. Dodatkowo przez następne 4 tygodnie otrzymywały cyklosporynę A. Chimeryzm identyfikowano we krwi biorców do 68 dnia po BMT, a średnie przeżycie przeszczepu wyniosło ponad 6 lat. W dalszym etapie modyfikacja tego protokołu, zawierająca krótką terapię przeciwciałem monoklonalnym anti-CD154, pozwoliła uniknąć splenektomii i równocześnie zwiększyła poziom chimeryzmu [19, 20, 21].

Powyższe badania wykazały, iż stan stabilnego mieszanego chimeryzmu może być skutecznie i bezpiecznie indukowany również w badaniach modelowych na dużych zwierzętach.

ASPEKTY KLINICZNE INDUKCJI TOLERANCJI IMMUNOLOGICZNEJ U LUDZI

Pierwszą kliniczną próbę zastosowania krwiotwórczych komórek szpiku kostnego dawcy razem z przeszczepem narządów unaczynionych u ludzi podjął Monaco w 1976 r. w Bostonie. Równoczesny przeszczep nerki i komórek szpiku kostnego dawcy został

poprzedzony w tym przypadku terapią z użyciem poliklonalnej globuliny antylimfocytarnej. W rezultacie zaobserwowano stosunkowo dłuższe przeżycia przeszczepów u pacjentów z grupy badanej w porównaniu z grupą kontrolną [30].

Następnie Barber i wsp. opisali swoje zachęcające wyniki badań u biorców przeszczepów nerek, którzy otrzymali równocześnie komórki szpiku kostnego od zmarłych dawców. Pacjenci ci zostali poddani poprzedzającej terapii lekami immunosupresyjnymi (cyklosporyna A, azatiopryna, prednison) oraz otrzymali krótki cykl z użyciem poliklonalnej globuliny antylimfocytarnej. Również tym razem uzyskano znaczną poprawę w przeżyciu przeszczepów (od 3 do 32 miesięcy, ze średnią 16 miesięcy) z kilkoma epizodami odrzucenia [2, 29].

Podobne wyniki uzyskał Fontes i jego współpracownicy z Pittsburgha, którzy podjęli kliniczną próbę indukcji chimeryzmu u biorców przeszczepów allogenicznych różnych organów unaczynionych (nerka, wątroba, serce, wyspy trzustkowe). W okresie okołoperacyjnym biorcy otrzymywali w infuzji dożylniej niespreparowany szpik kostny dawców ($3 \times 10^8/\text{kg}$ m. c.) i byli poddawani konwencjonalnej immunosupresji (takrolimus i prednison) [13, 34].

Dużym sukcesem klinicznym może się pochwalić Spitzer, który wraz ze współpracownikami dokonał allotransplantacji nerki i szpiku kostnego u 56-letniej kobiety w końcowym stadium niewydolności nerek z rozpoznaniem szpiczaka mnogiego. Przygotowanie pacjentki do przeszczepienia zawierało cykl immunosupresji w postaci napromieniania grasicy, podania antytymocytarnej globuliny oraz cyklofosfamidu. Chimeryzm nie trwał dłużej niż 105 dni od transplantacji, lecz mimo to u pacjentki nie zaobserwowano ostrego lub przewlekłego odrzucenia przeszczepu [42].

Do chwili obecnej najwięcej sukcesów w dziedzinie indukcji tolerancji na alloprzeszczepy narządów unaczynionych osiągnął zespół Ronaldo Garcii-Morales z Uniwersytetu w Miami, gdzie od 1994 r. realizowany jest z powodzeniem program równoczesnego przeszczepiania narządów (wątroby, nerek, trzustki, jelita) oraz krwiotwórczych komórek szpiku kostnego. Biorcy przeszczepów poddawani są wcześniejszemu przygotowaniu w postaci 10-dniowej terapii indukcyjnej monoklonalnym przeciwciałem OKT3 oraz terapii lekami immunosupresyjnymi (takrolimus, metyloprednizolon, mykofenolan mofetylu). Infuzja komórek szpiku kostnego dawcy następuje dwa razy: w okresie okołoperacyjnym oraz pomiędzy 10 a 14 dniem od operacji. Następnie poziom mieszanego chimeryzmu jest oceniany przy użyciu metody reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). W wynikach tych badań zaobserwowano między innymi znamienne korelację pomiędzy długotrwałe utrzymującym się wysokim poziomem chimeryzmu i odległym przeżyciem przeszczepionych narządów [6, 8, 15, 16, 26].

PODSUMOWANIE

Kluczowe odkrycia ostatnich lat potwierdziły znaczącą rolę mieszanego chimeryzmu w rozwoju specyficznej tolerancji immunologicznej u biorców przeszczepionych narządów nie tylko w modelu mysim i u dużych zwierząt, ale również u ludzi. W ostatnim czasie znaczne ulepszenie protokołów przeszczepiania krwiotwórczych

komórek szpiku kostnego w konstelacji z przeszczepianymi narządami allogenicznymi bardzo zredukowało ryzyko potencjalnej toksyczności w porównaniu z wcześniejszymi metodami [18, 54]. W związku z nadzieją na powszechne zastosowanie u ludzi pewne aspekty indukcji tolerancji w mechanizmie mieszanego chimeryzmu czekają nadal na udoskonalenie ze strony naukowców. Należą tu przede wszystkim badania mechanizmów BMT pod osłoną blokowania kostymulacji limfocytów T biorcy, oraz izolacja możliwie największej i najczystszej frakcji KKM ze szpiku kostnego od zmarłych potencjalnych dawców przeszczepów allogenicznych.

Ustalenie protokołu indukcji mieszanego chimeryzmu poprzez BMT z następowym blokowaniem kostymulacji limfocytów T było niewątpliwie jednym z największych osiągnięć w tej dziedzinie w ostatnich latach i najbardziej zbliżyło nas do celu, jakim jest bezpieczna indukcja i długotrwały stan tolerancji immunologicznej w transplantacji allogenicznych narządów unaczynionych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ADAMS AB, DURHAM MM, KEAN L. Costimulation blockade, busulfan, and bone marrow promote titratable macrochimerism, induce transplantation tolerance, and correct genetic hemoglobinopathies with minimal myelosuppression. *J Immunol* 2001; **167**: 1103–1111.
- [2] BARBER WH, MANKIND JA, LASKOW DA, DEIRHOI MH, JULIAN BA, CURTIS JJ, DIETHELM AG. Long-term results of controlled prospective study with transfusion of donor-specific bone marrow in 57 cadaveric renal allograft recipients. *Transplantation* 1991; **51**: 70–75.
- [3] BARTA A, BATAI A, KELMEN E, LENGYEL L, REMENYI P, SIPOS A, TORBAGYI E, AVALOS M, FEKETE E, FOLDI J, PALDI-HARIS P, TAMASKA J, GYODI E, RAJCZY K, HOFFER I, JAKAB J, PETRANYI GG, PALOCZI K. Immunological importance of chimerism in transplantation: new conditioning protocol in BMT and development of chimeric state. *Hum Immunol* 2000; **61**: 101–110.
- [4] BILLINGHAM RE, BRENT L, MEDAWAR PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 1953; **172**: 603–606.
- [5] BILLINGHAM RE, LAMPKIN HG, MEDAWAR PB, WILLIAMS HL. Tolerance of homografts, twin diagnosis and freemartin conditions in cattle. *Heredity* 1952; **6**: 201.
- [6] BURKE GW, RICORDI C, KARATZAS T, CARRENO M, CIANCIO G, COKER D, QUIAN T, SELVAGGI G, ALEJANDRO R, SKYLER JS, TZAKIS A, ROTH D, NERY J, MILLER J. Donor bone marrow infusion in simultaneous pancreas/kidney transplant recipients: a preliminary study. *Transplant Proc* 1995; **27**: 3121–3122.
- [7] CARIDIS DT, LIEGEOIS A, BARRET I, MONACO AP. Enhanced survival of canine renal allografts of ALS-treated dogs given bone marrow. *Transplant Proc* 1973; **5**: 671–674.
- [8] CIANCIO G, MILLER J, GARCIA-MORALES R, CARRENO M, BURKE III GW, ROTH D, KUPIN W, TZAKIS AG, RICORDI C, ROSEN A, FULLER L, ESQUENAZI V. Six-year clinical effect of donor bone marrow infusions in renal transplant patients. *Transplantation* 2001; **71**: 827–835.
- [9] DE VARIES-VAN DER ZWAN A, BESSELING AC, DE WAAL LP, BOOG CJP. Specific tolerance induction and transplantation: A single day protocol. *Blood* 1997; **89**: 2596–2601.
- [10] DE VARIES-VAN DER ZWAN A, VAN DER POL MA, BESSELING AC, DE WAAL LP, BOOG CJP. Hematopoietic stem cells can induce specific skin graft acceptance across a full MHC barrier. *Bone Marrow Transplant* 1998; **22**: 91–98.
- [11] DE VARIES-VAN DER ZWAN A, VAN DER POL MA, DE WALL LP, BOOG CJP. An alternative conditioning regimen for induction of specific skin graft tolerance across full major histocompatibility complex barriers. *Transplant Immunol* 1998; **6**: 147–151.

- [12] DURHAM MM, BINGAMAN AW, ADAMS AB. Administration of anti-CD40 ligand and donor bone marrow leads to hematopoietic chimerism and donor-specific tolerance without cytoreductive conditioning. *J Immunol* 2000; **165**: 1–4.
- [13] FONTES P, RAO A, DEMETRIS J, ZEEVI A, TRUCCO M, CARROL P, RYBKA W, RUDERT WA, RICORDI C, DODSON F, TZAKIS A, TODO S, ABU-ELMAGD K, JORDAN M, FUNG JJ, STARZL TE. Bone marrow augmentation of donor-cell chimerism in kidney, liver, heart and pancreas islet transplantation. *Lancet* 1994; **344**: 151–155.
- [14] FUCHIMOTO Y, HUANG CA, SHIMIZU A. Mixed chimerism without whole body irradiation in large animal model. *J Clin Invest* 2001; **05**:1779–1789.
- [15] GARCIA-MORALES R, CARRENO M, MATHEW J, CIROCCO R, ZUCKER K, CIANCIO G, BURKE G, ROTH D, TEMPLE D, FULLER L, ESQUENAZI V, ESKIND L, KENYON NS, RICORDI C, TZAKIS A, MILLER J. Continuing observations on the regulatory effects of donor-specific bone marrow cell infusions and chimerism in kidney transplant recipients. *Transplantation* 1998; **65**: 956–965.
- [16] GARCIA-MORALES R, ESQUENAZI V, ZUCKER K, GOMEZ CI, FULLER L, CARRENO R, ALAMO A, KARATZAS T, BURKE III GW, CIANCIO G, TEMPLE D, FERNANDEZ H, RICORDI C, TZAKIS A, MILLER J. An assessment of the effects of cadaver donor bone marrow on kidney allograft recipient blood cell chimerism by a novel technique combining PCR and flow cytometry. *Transplantation* 1996; **62**: 1149–1160.
- [17] HUANG C, FUCHIMOTO Y, SCHEIER-DOLBERG R, MURPHY MC, NEVILLE DM, SACHS DH AND JR. Stable mixed chimerism and tolerance using nonmyeloablative preparative regimen in large-animal model. *J Clin Invest* 2000; **105**: 173–181.
- [18] JACQUET EG, SCHANIE CL, FUGIER- VIVIER I, WILLER SS, ILDSTAD ST. Facilitating cells as a venue to establish mixed chimerism and tolerance. *Pediatr Transplant* 2003; **7**: 348–357.
- [19] KAWAI T, COSIMI B, COLVIN RB, POWELSON J, EASON J, KOZLOWSKI T, SYKES M, TANAKA M, SACHS D. Mixed allogeneic chimerism and renal allograft tolerance in cynomolgus monkeys. *Transplantation* 1995; **59**: 256–262.
- [20] KAWAI T, ABRAHAMIAN G, SOGAWA H, WEE S, BOSKOVIC S, NADAZDIN O, MANIYYEDI S, WEYMOUTH D, KO D, COLVIN R, SACHS D, COSIMI A. Costimulatory blockade for induction of mixed chimerism and renal allograft tolerance in non-human primates. *Transplantation* 2000; **69**: 370–376.
- [21] KIMIKAWA M, SACHS D, COLVIN R, BARTHOLOMEW A, KAWAI T, COSIMI B. Modifications of the conditioning regimen for achieving mixed chimerism and donor-specific tolerance in cynomolgus monkeys. *Transplantation* 1997; **64**: 709–716.
- [22] KURTZ J, ITO H, SHAFFER J, SYKES M. Mechanisms involved in establishment of tolerance through costimulatory blockade and BMT: lack of requirement for CD40L-mediated signaling for tolerance or deletion of donor-reactive CD4 cells. *Am J Transplantation* 2001; **1**: 339–349.
- [23] KURTZ J, SHAFFER J, LIE A, ANOSOVA N, BENICHOU G, SYKES M. Mechanisms of early peripheral CD4 T-cell tolerance induction by anti-CD154 monoclonal antibody and allogeneic bone marrow transplantation: evidence for energy and deletion but not regulatory cells. *Blood* 2004; **103**: 4336–4343.
- [24] KURTZ J, WEKERLE T, SYKES M. Tolerance in mixed chimerism – a role for regulatory cells? *Trends Immunol* 2004; **25**: 518–523.
- [25] MACHALINSKI B., KIJOWSKI J., MARLICZ W., GONTAREWICZ A., MARKIEWSKI M., PACZKOWSKI M., KOPKOWSKI A., MAJKA M., OSTROWSKI M., RATAJCZAK M.Z. Heparinized cadaveric organ donors (HCOD) - a potential source of hematopoietic cells for transplantation and gene therapy. *Transplantation* 2001; **71**: 1003–1007.
- [26] MATHEW J, GARCIA-MORALES R, FULLER L, ROSEN A, CIANCIO G, BURKE GW, CARRENO M, TEMPLE D, TZAKIS AG, RICORDI C, MILLER J, ESQUENAZI V. Donor bone marrow-derived chimeric cells present in renal transplant recipients infused with donor marrow. *Transplantation* 2000; **70**: 1675–1682.
- [27] MATHEW M, MILLER J. Immunoregulatory role of chimerism in clinical organ transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001; **28**: 115–119.
- [28] MAYUMI H, GOOD RA. Long-lasting skin allograft tolerance in adult mice induced across fully allogeneic (multimajor H-2 plus multiminor histocompatibility) antigen barriers by a tolerance-inducing method using cyclophosphamide. *J Exp Med* 1989; **169**: 213–238.

- [29] MCDANIEL DO, NAFTILAN J, HULVEY K, SHANEYFELT S, LEMONS JA, LAGOO-DEENADAY-ALAN S, HUDSON S, DIETHELM AG, BARBER WH. Peripheral blood chimerism in renal allograft recipients transfused with donor bone marrow *Transplantation* 1994; **57**: 852–856.
- [30] MONACO AP, WOOD ML. Studies on heterologous antilymphocyte serum in mice: VII. Optimal cellular antigen for induction of immunologic tolerance with ALS. *Transplant Proc* 1970; **2**: 489–496.
- [31] MURASE N, DEMETRIS AJ, FUJISAKI S, TANABE M, QUING Y, TODO S, STARZL TE. Bone marrow augmentation for heart, liver, and small bowel transplantation: prolongation of graft survival and incidence of graft-versus-host disease. *Transplant Proc* 1995; **27**: 174–175.
- [32] OPELZ GMD, SENGAR DPS, MICKY MR, TERASAKI PI. Effect of blood transfusion on subsequent kidney transplant. *Transplant Proc* 1973; **5**: 253–259.
- [33] OPELZ GMD, TERASAKI PHD. Improvement of kidney-graft survival with increased numbers of blood transfusions. *New Engl J Med* 1978; **229**: 799–803.
- [34] RAO AS, FONTES P, ZEEVI, TRUCCO M, DODSON FS, RYBKA WB, SHAPIRO R, JORDAN M, PHAM SM, RILO HL, SESKEY T, TODO S, SCANTLEBURY V, VIVAS C, DEMETRIS AJ, FUNG JJ, STARZL TE. Augmentation of chimerism in whole organ recipients by simultaneous infusion of bone marrow cells. *Transplant Proc* 1995; **27**: 210–212.
- [35] RICORDI C, KARATZAS T, NERY J, WEBB M, SELVAGGI G, FERNANDEZ L, KHAN FA, RUIZ P, SCHIFF E, OLSON L, FERNANDEZ H, BEAN J, ESQUENAZI V, MILLER J, TZAKIS AG. High-dose donor bone marrow infusions to enhance allograft survival. *Transplantation* 1997; **63**: 7–11.
- [36] ROITT I, BROSTOFF J, MALE D. Immunologia. Wydaw. Lekarskie PZWL 2000, rozdział 14, 27.
- [37] SACHS DH. Mixed chimerism as an approach to transplantation tolerance. *Clin Immunol* 2000; **95**: 63–68.
- [38] SALVATIERRA OJR, VINCENZI F, AMEND W, POTTER D, IWAKI Y, OPELZ G, TERASAKI P, DUCA R, COCHRUM K, HANES D, STONEY RJ, FEDUSKA NJ. Deliberate donor-specific blood transfusions prior to living related renal transplantations. *Ann Surg* 1980; **192**: 543–552.
- [39] SHARABI Y, ABRAHAM VS, SYKES M, SACHS DH. Mixed allogeneic chimeras prepared by a non-myeloablative regimen: requirement for chimerism to maintain tolerance. *Bone Marrow Transplant* 1992; **9**: 191–197.
- [40] SHARABI Y, SACHS D. Mixed chimerism and permanent specific transplantation tolerance induced by a nonlethal preparative regimen. *J Exp Med* 1989; **169**: 493–502.
- [41] SPITZER TR. Nonmyeloablative allogeneic stem cell transplant strategies and role of mixed chimerism. *The Oncologist* 2000; **5**: 215–223.
- [42] SPITZER TR, DELMONICO F, TOLKOFF-RUBIN N, MCAFEE S, SACKSTEIN R, SAIDMAN S, COLBY C, SYKES M, SACHS DH, COSMI AB. Combined histocompatibility leukocyte antigen-matched donor bone marrow and renal transplantation for multiple myeloma with end stage renal disease: the induction of allograft tolerance through mixed lymphohematopoietic chimerism. *Transplantation* 1999; **68**: 480–484.
- [43] STARZL TE, DEMETRIUS MT, TURRUCO M, MURASE N, RICORDI C, ILDSTAD S, RAMOS H, TODO S, TZAKIS A, FUNG JJ, NALESNIK M, ZEEVI A, RUDERT WA, KOCOVA M. Cell migration and chimerism after whole-organ transplantation: the basis of graft acceptance. *Hepatology* 1992; **17**: 1127–1139.
- [44] STEWARD FM, ZHONG S, WUU J. Lymphohematopoietic engraftment in minimally myeloablated hosts. *Blood* 1998; **91**: 3681–3687.
- [45] STORB R, YU C, WAGNER J. Stable mixed hematopoietic chimerism in DLA-identical littermate dogs given sublethal total body irradiation before and pharmacological immunosuppression after marrow transplantation. *Blood* 1997; **89**: 3048–3054.
- [46] STORB R, YU C, ZAUCHA JM. Stable mixed chimerism in dogs given donor antigen, CTLA4Ig, and 100 cGy total body irradiation before and pharmacologic immunosuppression after marrow transplant. *Blood* 1999; **94**: 2523–2529.
- [47] SYKES M. Mixed chimerism and transplant tolerance. *Immunity* 2001; **14**: 417–424.
- [48] SYKES M, SZOT G, SWENSON K, PEARSON D. Induction of high levels of allogeneic hematopoietic reconstitution and donor-specific tolerance without myelosuppressive conditioning. *Nature Med* 1997; **3**: 783–787.
- [49] TAKEUCHI Y, ITO H, KURTZ J, WERKELE T, HO L, SYKES M. Earlier low-dose TBI or DST overcomes CD8 T-cell mediated alloresistance to allogeneic marrow in recipients of anti-CD40L. *Am J Transplant* 2004; **4**: 31–40

- [50] THOMAS JM, CARVER FM, FOIL MB. Renal allograft tolerance induced with ATG and donor bone marrow in out-bred rhesus monkeys. *Transplantation* 1983; **36**: 104–106.
- [51] TOMITA Y, KHAN A, SYKES M. Mechanism by which additional monoclonal antibody injections overcome the requirement for thymic irradiations to achieve mixed chimerisms in mice receiving bone marrow transplantation after conditioning with anti-T cell mAbs and 3 Gy whole body irradiation. *Transplantation* 1996; **61**:477–485.
- [52] TOMITA Y, KHAN A, SYKES M. Role of intrathymic clonal deletion and peripheral anergy in transplantation tolerance induced by bone marrow transplantation in mice conditioned with a non-myeloablative regimen. *J Immunol* 1994; **153**: 1087–1098.
- [53] TOMITA Y, SACHS DH, SYKES M. Myelosuppressive conditioning is required to achieve engraftment of pluripotent stem cells contained in moderate doses of syngeneic bone marrow. *Blood* 1994; **83**: 939–948.
- [54] WEKERLE T, BLAHA P, ASARI R, SCHMID M, KISS CH, ROTH E, MIHLBACHER F. Tolerance induction through mixed chimerism. *Eur Surg* 2002; **34**: 131–136.
- [55] WEKERLE T, KURTZ J, ITO H. Allogeneic bone marrow transplantation with co-stimulatory blockade induces macrochimerism and tolerance without cytoreductive host treatment. *Nat Med* 2000; **6**: 464–469.
- [56] WEKERLE T, SAYEGH M, CHANRAKER A, SWENSON KG, ZHAO Y, SYKES M. Role of peripheral clonal deletion in tolerance induction with bone marrow transplantation and costimulatory blockade. *Transplant Proc* 2000; **31**: 680.
- [57] WEKERLE T, SAYEGH M, HILL J, ZHAO Y, CHANDRAKER A, SWENSON KG, ZHAO G, SYKES M. Extrathymic T cell deletion and allogeneic stem cell engraftment induced with costimulatory blockade is followed by central T cell tolerance. *J Exp Med* 1998; **187**: 2037–2044.
- [58] WEKERLE T, SYKES M. Mixed chimerism and transplantation tolerance. *Annu Rev Med* 2001; **52**: 352–370.
- [59] WOOD K, SACHS DH. Chimerism and transplantation tolerance: cause and effect. *Immunol Today* 1996; **15**: 584–588.

Redaktor prowadzący – Barbara Płytycz

Otrzymano: 22.07.2004 r.

Przyjęto: 10.01.2005 r.

Zakład Patologii Ogólnej Pomorskiej Akademii Medycznej

Al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin