

Imunoregulacijsko delovanje matičnih celic iz kostnega mozga in njihova možna uporaba pri transplantaciji organov

Immunoregulatory properties of bone marrow stem cells and their potential use in solid organ transplantation

Maja Martinuč,¹ Matjaž Jeras²

¹ Nefrološki oddelek, Splošna bolnišnica »Dr. Franca Derganca« Nova Gorica, Ul. padlih borcev 13a, 5290 Šempeter pri Gorici

² Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Štajmerjeva 6 1000 Ljubljana

Korespondenca/

Correspondence:

Maja Martinuč,
Splošna bolnišnica »Dr. Franca Derganca« Nova Gorica, Ul. padlih borcev 13a, 5290 Šempeter pri Gorici
tel: +386 31 339 445
e-mail: maja.martinuc@gmail.com

Ključne besede:

presaditev ledvic, himerizem, toleranca, imunosupresija

Key words:

kidney transplantation, chimerism, tolerance, immunosuppression

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2010; 79: 354–361

Prispelo: 6. jan. 2010,
Sprejeto: 27. jan. 2010

Izvleček

Izhodišča: Čeprav je preživetje bolnikov s presajeno ledvico boljše kot pri dializnih bolnikih, pa z dolgoročnimi rezultati presaditev še vedno ne moremo biti zadovoljni, predvsem zaradi zapletov, povezanih s kroničnim zavrnitvenim odzivom in neželenimi učinki imunosupresivnega zdravljenja. Z vzpostavitvijo specifične imunske tolerance na darovalčeve tkivne antigene bi lahko preprečili oziroma izrazito omilili vse omejenje težave.

Zaključki: Po uporabi krvotvornih matičnih celic iz kostnega mozga darovalca pred presaditvijo organa so s poskusi na laboratorijskih živalih ustvarili mešani himerizem, ki označuje vzpostavitev imunske tolerance prejemnika na tkivne antigene presadka. V preglednem članku bomo predstavili mehanizme, ki vodijo do vzpostavitve imunske tolerance, ter vlogo matičnih celic iz kostnega mozga v tem procesu, poleg tega pa tudi prepreke, s katerimi se srečujemo pri poskusih uvajanja rutinske uporabe matičnih celic pri ljudeh za običajno zdravljenje.

Abstract

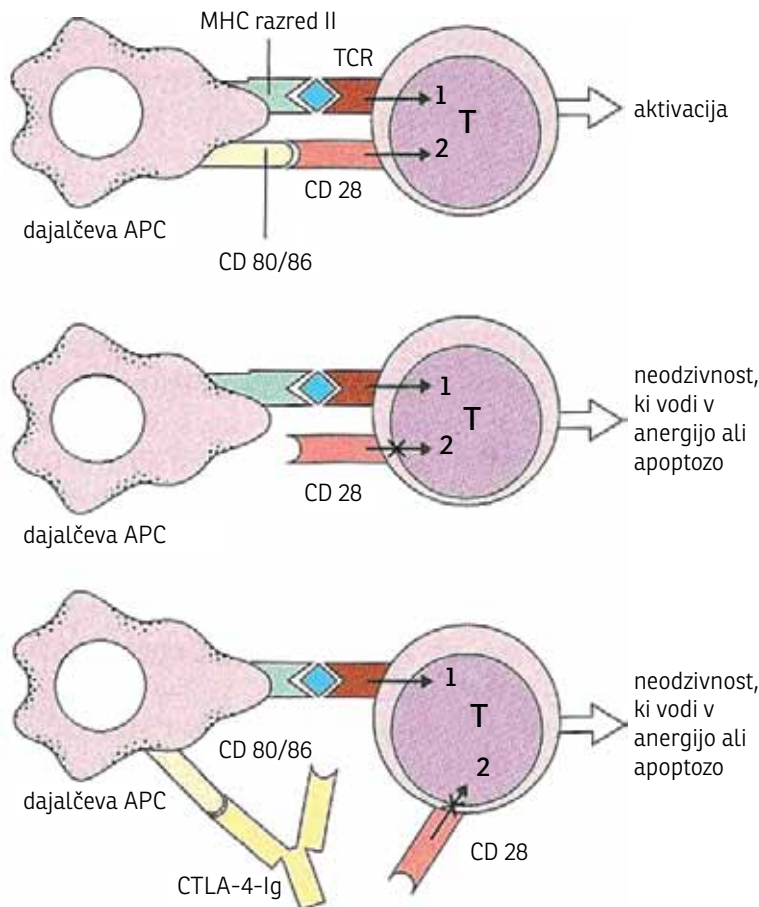
Background: Long-term results of organ transplantation remain rather unsatisfactory, mainly because of chronic rejection and complications associated with side effects of immunosuppressive therapy. Induction of specific immunotolerance to donor alloantigens would greatly diminish or prevent these problems.

Conclusions: Tolerance to allograft has been successfully induced in laboratory animals by first transplanting bone marrow hematopoietic stem cells from the prospective organ donor into the recipient, thereby creating a mixed chimera in which donor's and recipient's hematopoieses co-exist and tolerate each other. However, so far, the results of attempts to extend such studies from laboratory animals to humans have not been very successful. In the present article we review different mechanisms involved in the onset of immune tolerance as well as the immunoregulatory potential of bone-marrow-derived stem cells transplanted simultaneously with the organ graft (kidney). We also elucidate key problems related to the induction of tolerance in humans and describe the first encouraging experimental results in humans simultaneously receiving renal and hematopoietic stem cell grafts.

Uvod

Presaditev ledvic je danes edini način zdravljenja končne ledvične odpovedi, če seveda ne upoštevamo hemodializnih metod. Čeprav so tehnike presaditve in imunosupresivnega zdravljenja v zadnjih petdesetih letih zelo napredovale, z njimi še vedno ne dosežemo zelenih rezultatov, saj sta tako zadovoljivo delovanje presadka in preživetje bolnikov po presaditvi razmeroma nizka.^{1,2} Vzrok za to je predvsem imunosupresivno

zdravljenje, ki je sicer zelo učinkovito pri preprečevanju akutnega zavrnitvenega odziva, zahteva pa svojo ceno zaradi nespecifične toksičnosti tovrstnih zdravilnih učinkovin, doživljenjske potrebe po njihovem jemanju ter posledično povišane pojavnosti raka in okužb pri bolnikih s presadki.^{4,5} Zato bi bilo idealno, če bi lahko izzvali in dolgotrajno vzdrževali toleranco gostitelja na presadek, tako da se imunski sistem prejemnika ne bi odzval na darovalčeve tkivne antigene, hkr-



Slika 1: Inhibicija kostimulativnih molekul. Aktiviranje limfocitov T poteka večstopenjsko. Najprej T-celični receptor (TCR) prepozna kompleks molekule MHC z vezanim antigenom. Temu sledi aktiviranje preko kostimulativnih molekul CD28, CD80 in CD86 (naivni limfociti T se z ligandom CD28 vežejo na molekule CD80/CD86, izražene na antigene predstavljajočih celicah – APC). Do aktiviranja limfocitov T ne pride, če nista dejavni obe aktivacijski poti. V eksperimentalnih pogojih se že uspešno zavrli povezavo med CD28 in CD80/86 s tem, da so uporabili antagonistični ligand CTLA-4-Ig, ki se z večjo afiniteto nepovratno veže na CD28 in tako onemogoči interakcijo s CD80/86.

ti pa bi v celoti ohranil sposobnost imunskega odziva na druge antigene.⁴

Pridobljena imunska toleranca

Obstoj tolerance gostitelja na presajeno tkivo je prvi dokazal Medawar s sod. Po vbrizganju alogenskih celic darovalca v novorojeno žival je ta razvila imunsko toleranco na darovalčeva tkiva in nato v celoti sprejela različna darovalčeva tkiva brez uporabe imunosupresivov.¹ Na živalih so uspešno preskusili veliko različnih postopkov za razvoj tolerance, a jih doslej žal še niso uspeli prenesti v klinično prakso.⁵ Poglavitna ovira pri tem je pridobitev neizpodbitnega dokaza za obstoj pridobljene dolgotrajne imunske tolerance pri ljudeh. V živalskih eksperimentalnih modelih namreč take dokaze pridobimo razmeroma enostavno, saj lahko poskusno presajamo različna tkiva različnim prejemnikom in spremljamo njihovo diferencialno aloimunsko odzivnost glede na to, ali imajo že vzpostavljeno imunsko toleranco na tkivne antigene darovalca ali ne.

Seveda na ljudeh takih poskusov večkratnih presaditev ne moremo izvajati.

Obstajajo pa posredni dokazi o obstoju pridobljene tolerance tudi pri ljudeh.^{6,7} Pri določenem številu bolnikov, ki so po presaditvi organov prekinili imunosupresivno zdravljenje, ker ga niso prenašali, namreč niso opazili pričakovanega zavrnitvenega odziva. Obstoj pridobljene tolerance lahko posredno ugotavljamo tudi z vrednotenjem frekvence aloreaktivnih limfocitov T, ki jo lahko merimo pri bolnikih po presaditvi.⁸⁻¹⁰ Nekateri od njih imajo namreč manjše frekvence teh celic, kljub temu pa so se sposobni normalno odzvati na druge aloantigene.

Razvoj različnih pristopov in tehnik za sprožitev tolerance pri ljudeh je pomemben cilj v transplantacijski imunologiji in medicini, zato je predmet številnih raziskav v zadnjem desetletju.

Različni načini vzpostavitve imunske tolerance

O imunski toleranci govorimo takrat, ko se imunski sistem ne odziva na prisotnost določenega tujega antigena. V prvi vrsti je namenjena obrambi pred morebitnimi avtoimunskimi reakcijami, saj imunski sistem naključno proizvaja številne receptorje za prepoznavanje različnih antigenov, ki bi se seveda lahko odzvali tudi s telesu lastnimi beljakovinami.³ Mehanizmi imunske tolerance zajemajo centralno delecijo, ki v času dozorevanja organizma poteka v priželjcu (timusu), in procese, ki zagotavljajo nastanek tolerance oziroma klonske anergije v perifernih limfnih organih.^{6,11} Centralna delecija je proces izbora repertoarja klonsko specifičnih limfocitov T. Poteka tako, da nezreli limfociti T, ki prihajajo v timus s svojimi T-celičnimi receptorji (TCR) prepoznavajo lastne molekule MHC razredov I in II, ki jih na svojih površinah izražajo tam prisotne dendritične celice ter se nanje različno odzivajo. Proces pozitivne selekcije preživijo le celice, ki s svojimi TCR ustrezno prepoznavajo lastne molekule MHC razredov I in II ter nanje vezane avtologne peptide in se nanje ne odzivajo. Na drugi strani pa negativna selekcija poskrbi za dokončno

odstranitev vseh avtoreaktivnih klonov limfocitov T iz repertoarja posameznikovega imunskega sistema.

V organizmu lahko pride tudi do nastanka klonske anergije, pojava, pri katerem limfociti T sicer klonskospecifično prepoznajo določene antigene, vendar se pri tem ne aktivirajo, ampak ostanejo neodzivni ali celo propadejo.^{12,13} Natančnih mehanizmov, ki privedejo do te oblike tolerance, še ni uspelo pojasniti.

Nastanek imunske tolerance bi lahko *in vivo* izzvali tako, da bi imunsko zavrtemu ali nezrelemu prejemniku, na primer novorojenčku, ki še nima dokončno razvitega imunskega sistema, vbrizgali alogenske celice.⁵⁻⁷ Takšen postopek ni uporaben v praksi, saj ne moremo vnaprej napovedati, ali bo v odrasli dobi taka oseba resnično potrebovala presaditev, še težje pa je po tolikšnem času zagotoviti darovalca, zoper katerega smo jo prvotno aloimunizirali. Pri tem pa je izjemno pomembno tudi dejstvo, da so tkivni antigeni MHC razredov I in II, ki jih pri ljudeh označujemo s kratico HLA (Human Leukocyte Antigens), sila raznoliki. Še tako majhne razlike med njimi so lahko izrazito aloimunogene.

Toleranco bi lahko vzpostavili tudi tako, da bi izzvali anergijo imunskih celic na tkivne antigene presadka v periferiji. V tem primeru seveda ne gre za delecijo imunske sposobnih celic v timusu, pač pa bi njihovo neodzivnost lahko dosegli, če bi blokirali kostimulacijske signalne poti, ki so nujne za normalen celični imunski odziv.¹⁴⁻¹⁸ Z vezavo določenih ligandov, npr. CTLA-4-Ig (fuzijski protein liganda za CD80 in CD86, CTLA-4 in Fc dela protitelesa) na kostimulatorne molekule CD80 in CD86, lahko povzročimo anergijo aloreaktivnih celic (Slika 1). Mehanizem nastanka anergije se v tem primeru veže na nadreguliranje imunomodulacijskega encima indolamin-2,3-dioksigenaze-1 (IDO-1), ki razgrajuje molekule triptofana, do katere pride po vezavi CTLA-4-Ig na CD80/86. S tem se prepreči aktiviranje celic T, in sicer tako, da jim IDO-1 odvzame osnovne fiziološke gradnike (triptofan), razgradni metaboliti triptofana pa delujejo neposredno zaviralno na njihovo aktiviranje.¹⁹ Vlogo IDO pri imunski

regulaciji so najprej opazili v placenti, kjer preprečuje zavrnitev zarodka. Z zaviranjem IDO so namreč povzročili njegovo imunsko zavrnitev.

Tretja možnost sprožitve tolerance je uravnavanje odziva na aloantigene. Že dalj časa poznamo imunoregulacijsko sposobnost nekaterih podvrst limfocitov T (Švajger in Jeras), ki jo lahko eksperimentalno dokažemo tako, da jih iz tolerantnih živali prenesemo v naivnega prejemnika, s čimer prenesemo tudi toleranco (Slika 2). Če bi uspeli take celice specifično namnožiti v prejemniku, bi najverjetneje lahko vzpostavili dolgotrajno toleranco *in vivo*.

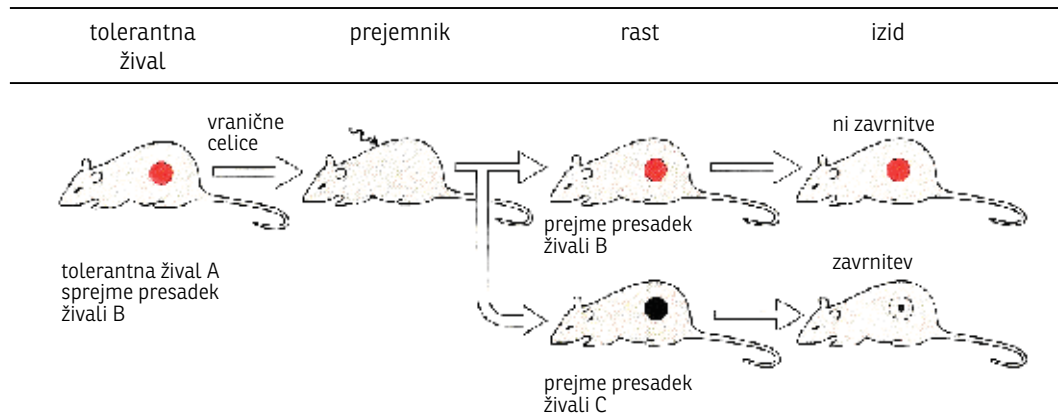
Trenutno v transplantacijski imunologiji in medicini zelo intenzivno preučujejo možnost za vzpostavitev tolerance na presajeni organ (npr. ledvico) s presaditvijo matičnih celic (MC) iz kostnega mozga pred posegom, pri čemer je darovalec MC in presadka ista oseba.¹⁴⁻¹⁷ Po presaditvah krvotvornih matičnih celic (KMC) v določenih pogojih pogosto dokažejo vzpostavitev imunske tolerance, ki se kaže v obliki določene stopnje mešanega himerizma. To pomeni, da v prejemniku hkrati miroljubno sobivajo celice dveh genetsko različnih oseb, njega samega in darovalca KMC.

Uporabo KMC za sprožitev tolerance sicer omejujeta tako toksičnost postopkov priprave prejemnika na presaditev, kot tudi pojav reakcije presadka proti gostitelju (GvHD – Graft versus Host Disease), ki nastopi že ob minimalnem neskladju v molekulah poglobitnega sistema tkivne skladnosti (MHC).¹⁸ Takšno reakcijo lahko sicer omilimo z odstranitvijo celic T iz darovalčevega kostnega mozga, vendar pa s tem tvegamo, da se presadek ne bo prijel, kar seveda lahko privede do smrti prejemnika zaradi prej povzročene aplazije kostnega mozga.

Mešani himerizem kot merilo vzpostavitve imunske tolerance

Iz živalskih eksperimentalnih modelov je znano, da vzpostavljeni stabilni hemo-poetski himerizem zagotavlja toleranco do presajenega organa istega darovalca. Kot smo že omenili, izpostavitve razvijajočega se organizma določenim aloantigenom pri-

Slika 2: Posredovanje imunske tolerance z imunoregulacijskim delovanjem limfocitov T Če presadimo imunoregulacijske celice iz živali A, ki je tolerantna na aloantigene darovalca B, v žival, ki smo jo pred tem obsevali z ionizirajočimi žarki, lahko tak prejemnik brez znakov zavrnitve sprejme različna tkiva darovalca B. Ko bi istemu prejemniku presadili tkiva darovalca C, zoper katera ni razvil tolerance, pa bi prišlo do takojšnjega zavrnitvenega odziva.



vede do trajne tolerance nanje. Doseči tako stopnjo tolerance pri osebkju z že razvitim imunskim sistemom pa je svojevrsten izziv. Za to sta v osnovi potrebni bodisi ablacija ali pa tolerizacija obstoječega imunskega sistema. Imuno- in mieloablacija glodalcev, ki jo dosežejo s smrtnim odmerkom obsevanja celotnega telesa, omogoči, da pride po kasnejši presaditvi tkivno skladnih alogenskih KMC do njihovega prijetja in polne funkcionalnosti. To pomeni, da postane prejemnik popolna hemopoetska himera (darovalčev genotip).⁵

Mešani himerizem se je v primerjavi s popolnim izkazal kot veliko varnejši in uporabnejši za vzpostavitev imunske tolerance prejemnika presadka, razlogov za to pa je več.^{7,16} Mešani himerizem namreč lahko vzpostavimo s pomočjo nemieloablativne priprave prejemnika pred presaditvijo alogenskih KMC, ki je bistveno manj toksičen postopek od popolne mieloablacije. Druga prednost je v ohranjeni imunski pristojnosti mešane himere, saj v prejemniku sočasno obstajata dve populaciji imunskih celic, njegove lastne in darovalčeve. V mešanih himerah potujejo v timus tako prejemnikove kot darovalčeve hemopoetske celice. Tu pride do uničenja tistih napadalnih limfocitov T, ki bi lahko prepoznavali in napadali tako prejemnikove kot darovalčeve antigene, s tem pa do želene obojesmerne tolerizacije. V ta proces so vpletene predvsem dendritične celice kostnega mozga, ki potujejo v timus in imajo veliko večjo sposobnost izvajanja delcijske tolerance kot same timusne stromalne celice. Ker pa so v mešani himeri prisotne tako dajalčeve kot prejemnikove antigene predstavljajoče celice (APC), pote-

ka tako uničenje limfocitov T z veliko večjo učinkovitostjo kot v popolni himeri.

Pri glodalcih lahko stanje mešanega himerizma vzpostavimo na dva načina, in sicer:

- tako, da prej s smrtnim odmerkom obsevani živali vbrizgamo mešanico alogenskih in prejemnikovih KMC s popolnoma odstranjenimi limfociti T, ali pa
- tako, da po popolnem ali delnem obsevanju limfnih organov prejemnika vanj vbrizgamo darovalčeve KMC.

V zadnjih letih pa je močno napredovalo poznavanje minimalnih zahtev za doseganje in vzdrževanje mešanega himerizma kot metode za sprožitev tolerance na izbranega darovalca presadka. To je omogočilo postopno vključitev tega postopka v klinično prakso. Pogoje za vzpostavitev mešanega himerizma shematsko predstavlja Slika 3. Uporabnost te metode izhaja iz ugotovitev, da lahko pri eksperimentalnih živalih dosežemo toleranco in delovanje tkivno popolnoma neskladnega alogenskega kostnega mozga, če prejemnika pred presaditvijo ustrezno pripravimo. To pa pomeni, da moramo uporabiti protitelesa zoper molekule CD4 in CD8, izražene na površinah limfocitov T, v kombinaciji z obsevanjem celotnega telesa s subletalnim odmerkom ali pa alternativno z obsevanjem z minimalno mielosupresivnim odmerkom ter dodatnim selektivnim obsevanjem timusa. S tem ne uničimo celotnega prejemnikovega hemopoetičnega sistema. Zato se lahko, potem, ko se je presajeni darovalčev alogenski kostni mozeg prijel, vzpostavi stanje mešanega himerizma. Cilj številnih raziskav z uporabo živalskih eksperimentalnih modelov je iskanje kar najmanj toksič-

nih postopkov nemieloablativne priprave prejemnika. Tako so med drugim ugotovili, da se selektivnemu obsevanju timusa lahko izognemo tako, da uporabimo bodisi povečan odmerek protiteles proti limfocitom T, ali pa uporabimo zaviralce kostimulatornih molekul.¹⁷ Obsevanje celotnega telesa s subletalnim odmerkom pa lahko nadomestimo z vbrizganjem dovolj velike količine dajalčevih KMC.^{13,15,16} Izsledki raziskav so pokazali, da bi postopek priprave lahko popolnoma nadomestili s sočasno uporabo dovolj velike količine lahko tudi popolnoma tkivno neskladnih KMC v kombinaciji z blokatorji kostimulacijskih molekul CD80/CD86, izraženih na površini APC.

Imunoregulacijsko delovanje mezenhimskih matičnih celic iz kostnega mozga

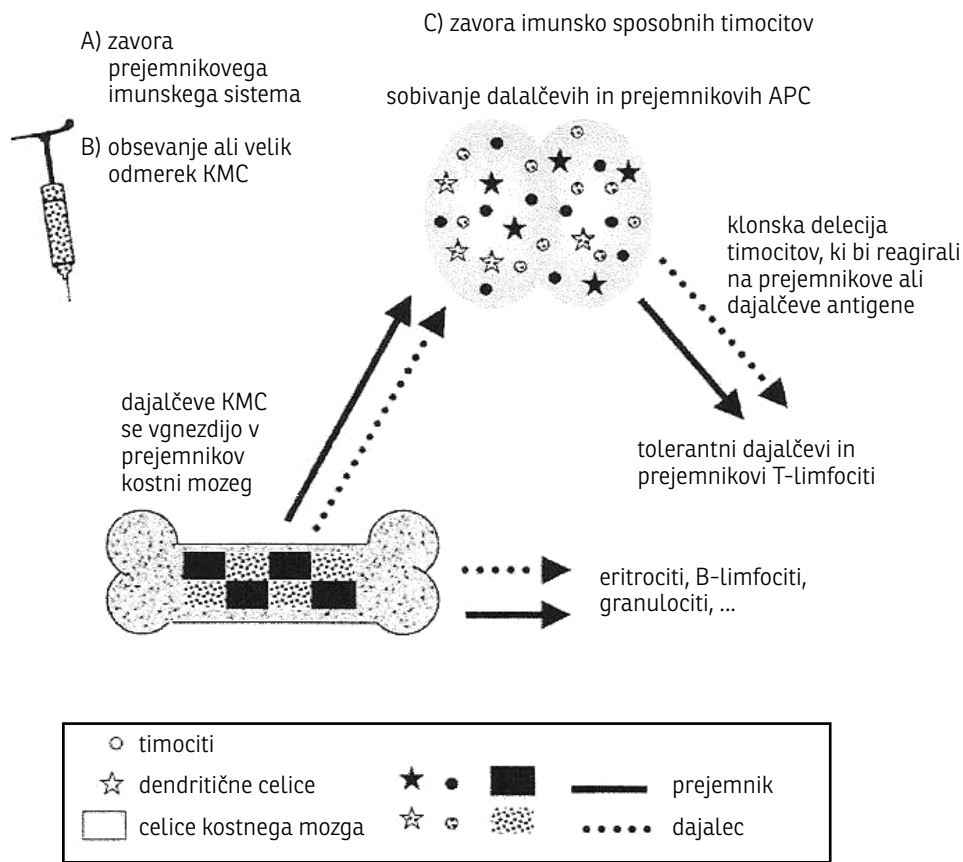
Poleg KMC v zadnjem času veliko preučujejo tudi imunoregulacijski potencial mezenhimskih matičnih celic (MMC) iz kostnega mozga. Znano je, da so MMC sposobne diferencirati v različna mezodermalna tkiva (kostnino, hrustanec, kite, mišice, maščevje in stromo kostnega mozga).²⁰ Hemopoeza v kostnem mozgu je neposredno odvisna od mikrookolja, ki ga oblikujejo različni topni regulacijski dejavniki in citokini, pri čemer slednje zagotavljajo predvsem stromalne celice. Mezenhimske matične celice so pomembne za izboljšanje mikrookolja prejemnikovega kostnega mozga, ki ga kondicioniranje poruši.²⁰⁻²³ Na ta način je omogočena hitrejša in lažja obnova kostnega mozga po presaditvi KMC. Z uporabo MMC bi torej lahko zmanjšali količino za presaditev potrebnih celic in zato bolje izkoristili manjše število KMC, pridobljenih iz popkovnične krvi.²¹ Številni raziskovalci že dalj časa proučujejo vpliv sočasne presaditve MMC in KMC. Šele v zadnjem letu so na voljo objavljeni izsledki prvih kliničnih raziskav na ljudeh, s katerimi so dokazali uspešno sočasno uporabo MMC in KMC iz popkovnične krvi. Ugotovili so, da MMC ne izboljšajo le preživetja, obnovitvene sposobnosti, migracije, ekspanzije in diferenciacije KMC, temveč zmanjšujejo tudi pojavnost in

jakost GvHD.¹⁹ Slednje je posledica njihovega neposrednega imunomodulacijskega učinka.²³⁻²⁹ Mezenhimske matične celice lahko zavrejo vnetno reakcijo z neposrednim zaviranjem T-celičnega odziva in dozorevanja APC. Nedavno so ugotovili, da bi njihov imunomodulacijski učinek lahko povezali z izražanjem t.i. toll-like receptorjev (TLR) in tvorbo določenih protivnetnih citokinov.²⁷ Receptorje TLR primarno izražajo APC, ki z njim prepoznavajo nespecifične patogene antigene. Po vezavi ustreznega antigena na TLR se sprožijo številne poti prirojenega in pridobljenega imunskega odziva. Aktiviranje TLR, izraženih na MMC, povzroči aktiviranje encimaIDO-1, ki preko katabolizma triptofana ustvari večje količine kinureninov, ti pa dokazano zavirajo proliferacijo limfocitov T in APC.¹⁹ Očitno je torej, da imajo MMC zaradi svoje velike plastičnosti velik potencial za naraščajoče potrebe regenerativne medicine, poleg tega pa so tudi možno sredstvo za blaženje oziroma zdravljenje neželenih T-celičnih odzivov (avtoimunske bolezni in bolezni presadka poti gostitelju). Njihova uporabnost pa je še toliko večja zaradi tega, ker jih lahko pridobimo iz odraslih tkiv in jih na sorazmerno preprost način gojimo in razmnožujemo *ex vivo*.^{21,24}

Prve klinične izkušnje z vzpostavitvijo mešanega himerizma pri presajanju organov v humani medicini

Opisane tehnike indukcije imunske tolerance, ki so na glodalcih zelo uspešne, žal še niso dale primerljivih rezultatov pri ljudeh. Tako so pri laboratorijskih živalih uspešno vzpostavili imunsko toleranco po presaditvi solidnih organov potem, ko je že nastal mešani himerizem, ki so ga izzvali z infuzijo hemopoetičnih matičnih celic istega darovalca. Vztrajanje darovalčevih imunskih celic v timusu in perifernih limfnih organih prejemnika je tisto, ki naj bi po načelu centralne delecije omogočalo vzdrževanje imunske tolerance.^{8,15,16} Ta teorija pa velja le za glodalce, saj se je pri raziskavah, opravljenih na ljudeh, izkazala kot pomanjkljiva.

Slika 3: Shematska predstavitev pogojev za vzpostavitev mešanega himerizma (prejemnikove celice so predstavljene v črni, darovalčeve pa v sivi barvi) (A) pred presaditvijo darovalčevih KMC moramo zavreti prejemnikov imunski sistem, da ne pride do zavrnitve presadka; (B) različni postopki kondicioniranja, npr. obsevanje celotnega organizma z ionizirajočimi žarki, uporaba imunosupresivnih zdravil ali velikega odmerka dajalčevih KMC pred presaditvijo so potrebni za vzpostavitev primerne mikrookolja, v katerem bo presadek lahko pričel delovati; (C) z obsevanjem timusa ali z zavrtjem kostimulacijskih molekul moramo funkcionalno onesposobiti imunsko sposobne timusne celice, ki bi sicer zavrnille presajene imunске celice; s tem omogočimo preživetje dajalčevih imunskih celic, ki skupaj s prejemnikovimi sodelujejo pri vzpostavitvi osrednje obojesmerne imunске tolerance na dajalčeve in prejemnikove antigene.



Ugotovili so namreč, da so za vzdrževanje imunске tolerance prejemnika na presadek poleg centralne delecije limfocitov T v timusu izjemno pomembni tudi dodatni, zankrat še neraziskani mehanizmi periferne tolerance.

Nedavno so objavili rezultate prvih poskusov vzpostavitve mešanega himerizma in imunске tolerance pri ljudeh po sočasni presaditvi tkivno (HLA) skladne ledvice in KMC istega darovalca (Scandling in sod.).¹⁵ Za kondicioniranje bolnikov pred presaditvijo so uporabili obsevanje limfnih organov in antitimocitna protitelesa. V študijo so vključili 6 bolnikov s končno ledvično odpovedjo. Po predhodnem kondicioniranju so izvedli sočasno presaditev KMC in tkivno skladne ledvice mrtvega darovalca. Pri vseh bolnikih so po prvem mesecu ugotovili vzpostavitev mešanega himerizma, vendar pa je samo pri enem od njih to stanje vztrajalo do konca spremljanja. Zato so mu po šestih mesecih lahko popolnoma ukini-li imunosupresivno zdravljenje. Pri tem so ohranili normalno delovanje presadka, ki vse do konca opazovanja v študiji, to je 28

mesecev po presaditvi, ni kazal znakov kakršnegakoli zavrnitvenega odziva. Pri drugem bolniku je mesec dni po presaditvi prišlo do ponovnega izbruha osnovne ledvične bolezni (žariščne segmentne glomeruloskleroze), zato je bilo potrebno specifično zdravljenje, zaradi česar so ga izločili iz študije. Tretji bolnik je pet mesecev po presaditvi postopno izgubil mešani himerizem. Pojavili so se blagi zavrnitveni odzivi, tako da so ga pričeli zdraviti s ciklosporinom. Pri četrtem, petem in šestem bolniku so pred presaditvijo delno spremenili postopek kondicioniranja, in sicer tako, da so za 20 % povečali odmerek ionizirajočega sevanja. Kljub temu pa so pri vseh treh dosegli enako raven mešanega himerizma kot pri prvem bolniku. Ker pa so bili ti trije bolniki vključeni v raziskavo kasneje, za sedaj še niso objavili podatkov o poteku njihovega zdravljenja. Glede na dosedanje izsledke študije je torej očitno, da lahko tudi pri ljudeh uspešno vzpostavimo stanje mešanega himerizma. Potrebno pa bo opredeliti najvarnejši in najmanj škodljiv način kondicioniranja in v čim večji meri razjasniti vprašanje, ali je za nastanek imun-

ske tolerance odgovorna centralna delecija specifičnih imunskih celic kot pri eksperimentalnih živalih (glodalcih), ali pa pri tem sodelujejo tudi doslej še nepojasnjeni periferni mehanizmi.

Korak bližje potrditvi te domneve je prišla druga skupna raziskovalcev, ki je petim bolnikom s končno ledvično odpovedjo po nemieloablativnem kondicioniranju sočasno presadili KMC in ledvico.⁸ Vsi darovalci so bili glede tkivne skladnosti haploidentični sorodniki bolnikov. Pri vseh petih prejemnikih so uspešno vzpostavili stanje prehodnega mešanega himerizma. Pri enem bolniku je prišlo do nepopravljivega zavrnitvenega odziva, pri ostalih štirih pa so po 9 do 14 mesecih po presaditvi lahko ukinili vse imunosupresivno zdravljenje, pri čemer je ledvica delovala normalno še 2 do 5 let po posegu. Po ukinitvi imunosupresivnega zdravljenja so preverili fenotipske in funkcijske lastnosti limfocitov T *in vitro*. Pri vseh bolnikih so dokazali njihovo specifično neodzivnost na darovalčeve aloantigene ter povsem normalno odzivnost na druge tuje antigene. V limfocitih T so izmerili visoke koncentracije mRNA za transkripcijski dejavnik FoxP3, značilen za regulacijske celice T (Treg), ki omogočajo in vzdržujejo periferno imunsko toleranco.¹¹ Ob tem pa niso zaznali granicima B, specifičnega citotoksičnega proteina CD8+ limfocitov T, ki se sprošča ob njihovi aktivaciji pri zavrnitvenih odzivih. Glede na te ugotovitve so izoblikovali teorijo, da gre pri vzpostavitvi dolgotrajne imunske tolerance prejemnika na presadek za preskok z mehanizma centralne delecije na mehanizem periferne regulacije. Pri tem naj bi bil mehanizem centralne delecije ključen za vzpostavitev imunske tolerance takoj po presaditvi, mehanizem periferne regulacije, v katerem igrajo osrednjo vlogo Treg, pa v kasnejšem obdobju po presaditvi. Nato pa naj bi bil za vzdrževanje stabilne imunske tolerance ključnega pomena kar presadek sam. Teorijo trenutno preverjajo s poskusi na primatih, prve izsledke pa si lahko obetamo že v kratkem.

Zaključek

Pojav mešanega himerizma pri vzpostavitvi imunske tolerance prejemnika na alogenski tkivni presadek, s katero bi lahko nadomestili nespecifično imunosupresivno zdravljenje, obeta velik napredek v transplantacijski medicini. Postopki, s katerimi so zelo uspešno vzpostavili trajno imunsko toleranco pri eksperimentalnih živalih, zlasti glodalcih, pa so žal še vedno preveč pomanjkljive za uporabo pri ljudeh, pri katerih gre očitno za precej kompleksnejše mehanizme. Vsekakor pa je pomembno, da so s prvimi poskusi že dokazali, da sta vzpostavitev in obstoj dolgotrajne imunske tolerance prejemnika na aloantigene presadka možna tudi pri ljudeh. Pred rutinsko uporabo takšnega pristopa pa bo potrebno natančno raziskati in obvladati vse mehanizme, ki so vključeni v nastanek pridobljene imunske tolerance. Pri tem igra izjemno pomembno vlogo uporaba matičnih celic iz kostnega mozga. S presaditvijo KMC lahko pod ustreznimi pogoji brez večjih težav vzpostavimo stanje mešanega himerizma, veliko pa obeta tudi uporaba ostalih, zlasti mezenhmskih matičnih celic. Dosedanje raziskave na področju omenjenih celic pa so le vrh ledene gore številnih nadaljnjih raziskav na področju vzpostavitve dolgotrajne in stabilne imunske tolerance na definirane aloantigene v transplantacijski medicini.

Literatura

1. Sayegh MH, Carpenter CB. Transplantation 50 years later-progress, challenges and promises. *N Engl J Med* 2004; 351: 2761–6.
2. Oosterlee A, Rahmel A. Eurotransplant international foundation: Annual report 2008. Dosegljivo na: www.eurotransplant.nl/files/annual_report
3. Arnol M, Kandus A, Bren A, Buturović Ponikvar J. Presaditev ledvic–1. dopolnjena izd. Ljubljana: Klinični oddelek za nefrologijo, Interna klinika, univerzitetni klinični center; 2009.
4. Girlanda R, Kirk AD. Frontiers in nephrology: immune tolerance to allografts in humans. *J Am Soc Nephrol* 2007 18: 2242–51.
5. Sykes M, Sachs DH. Mixed chimerism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001; 356: 707–26.
6. Monaco A. The enigma of tolerance and chimerism: variable role of T cells and chimerism in induction of tolerance with bone marrow. *Transplant Proc* 2001; 33: 3837–9.
7. Sykes M. Mixed chimerism and transplant tolerance. *Immunity* 2001; 14: 417–24.

8. Kawi T, Cosimi AB, Spitzer TR, Tolkoff-Rubin N, Suthanthiran M, Saidman SL, et al. HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. *N Engl J Med* 2008; 358: 353–61.
9. Demirkiran A, Bosma BM, Kok A, Baan HJ, Metselaar JN, Ijzermans JNM, et al. Allosuppressive donor CD4+CD25+ regulatory T cells detach from the graft and circulate in recipients after liver transplantation. *J Immunol* 2007 178: 6066–72.
10. Koehn BH, Williams MA, Borom K, Gangappa S, Pearson TC, Ahmed R, et al. Fully MHC-disparate mixed hemopoietic chimeras show specific defects in the control of chronic viral infections. *J Immunol* 2007 179: 2616–26.
11. Švajger U, Jeras M. Celična terapija z regulatornimi limfociti T – celice kot zdravila. *Farm vest* 2009; 143–9.
12. Baxter-Lowe LA, Busch MP. Tracking microchimeric DNA in plasma to diagnose and manage organ transplant rejection. *Clin Chem* 2006 52:559–61.
13. Starzl TE. Immunosuppressive therapy and tolerance of organ allografts. *N Engl J Med* 2008; 358: 407–11.
14. Alexander SI, Smith N, Hu M, Verran D, Shun A, Dorney S, et al. Chimerism and tolerance in a recipient of a deceased donor liver transplant. *N Engl J Med* 2008; 358: 369–74.
15. Scandling JD, Busque S, Dejbakhsh-Jones S, Benike C, Millan MT, Shizuru JA, et al. Tolerance and chimerism after renal and hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 2008; 358: 362–8.
16. Millan MT, Shizuru JA, Hoffman P, Dejbakhsh-Jones S, Scandling JD, Grumet FC, et al. Mixed chimerism and immunosuppressive drug withdrawal after HLA-mismatched kidney and hematopoietic progenitor transplantation. *Transplantation* 2002; 73: 1386–91.
17. Bühler LH, Spitzer TR, Sykes M, Sachs DH, Delmonico FL, Tolkoff-Rubin N, et al. Induction of kidney allograft tolerance after transient lymphohematopoietic chimerism in patients with multiple myeloma and end-stage renal disease. *Transplantation* 2002; 74: 1405–9.
18. Field EH, Strober S. Tolerance, mixed chimerism and protection against graft-versus-host disease after total lymphoid irradiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001; 356: 739–48.
19. MacMillan ML, Blazar BR, DeFor TE, Wagner JE. Transplantation of ex-vivo culture expanded parental haploidentical mesenchymal stem cells to promote engraftment in pediatric recipients of unrelated donor umbilical cord blood: results of a phase I-II clinical trial. *Bone Marrow Transplant* 2009; 43: 447–54.
20. Jiang Y, Jahagirdar NB, Reinhardt LR, Schwartz ER, Keene CD, Ortiz-Gonzalez RX, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41–9.
21. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Kuan-Der L, Shie Liang H, Tain-Hsiung. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004; 103: 1669–75.
22. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm* 2005; 2: 8.
23. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 2005; 105: 2214–9.
24. Jones E, McGonagle D. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. *Rheumatology* 2008; 47: 126–31.
25. Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones S, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in hematopoiesis. *Blood Rev* 2006; 20: 161–71.
26. Opitz CA, Litzemberger UM, Lutz C, Lanz TV, Tritschler I, Köppl A, et al. Toll-like receptor engagement enhances the immunosuppressive properties of humane bone marrow-derived mesenchymal stem cells by inducing indolamine-2,3-dioxygenase-1 via interferon- β and protein kinase R. *Stem Cells* 2009; 27: 909–19.
27. Shizuo A. Toll-like receptor signaling. *JBC* 2003; 40: 38105–8.
28. Shizuo A, Kiyoshi T, Tsuneyasu K. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; 2: 675–80.
29. Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, et al. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 2001; 413: 78–83.