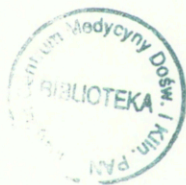


INSTYTUT MEDYCyny DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Marek Durlik

**BIOLOGICZNE ASPEKTY
PRZESZCZEPANIA KOŃCZYNY –
KOLONIZACJA USTROJU BIORCY PRZEZ
PRZESZCZEPIONE KOMÓRKI SZPIKU
I JEJ EFEKTY**

PRACA HABILITACYJNA



LS 248

dublet

H3381

Warszawa 2004

<http://rcin.org.pl>

Podziękowania

Pragnę złożyć gorące podziękowania Prof. dr hab. med. Waldemarowi L. Olszewskiemu za zainspirowanie mnie przed laty pomysłem przeszczepiania kości ze szpikiem w przeszczepionej kończynie. Nie znaleźliśmy wówczas w dostępnym nam piśmiennictwie żadnych prac, które wskazywałyby na możliwość migracji komórek z takiego przeszczepu i zasiedlania jam szpikowych i narządów limfoidalnych biorcy.

Pragnę gorąco podziękować dr hab. n. biol. Barbarze Łukomskiej, dr n. med. Michałowi Maksymowiczowi, dr n. biol. Sławie Janczewskiej oraz dr n. rol. Bożennie Interewicz za pomoc w przygotowaniu materiałów do badań, a także za szereg twórczych dyskusji, które miały wpływ na ostateczny kształt niniejszej pracy.

Pragnę podziękować również Pani Agnieszce Włodarczyk i Pani Krystynie Góreckiej za pomoc w redakcji niniejszej pracy, a także Pani Beacie Kloc za pomoc w opracowaniu przejrzystych i doskonałych od strony graficznej rycin.

Gorąco dziękuję również mojej żonie Prof. dr hab. med. Magdalenie Durlik za cierpliwość okazywaną mi podczas pisania tej pracy oraz za szereg wartościowych rad w procesie jej powstawania.

Chciałbym wreszcie podziękować wszystkim tym z mojego otoczenia, którzy od wielu lat dopingowali mnie do zakończenia pracy habilitacyjnej, bez ich zachęty i stale wywieranej, życzliwej presji niniejsza praca nie zostałaby zakończona prawdopodobnie do dziś.

05.04.2004 rok

Marek Durlik

Przedstawiana praca zawiera w głównej części dane z ostatnio przeprowadzonych przeze mnie badań doświadczalnych lub tych, których byłem współwykonawcą. Dane te nie były dotychczas publikowane. Uwzględnione zostały również dane z uprzednio opublikowanych, z moim udziałem jako wykonawcy, prac, jeśli były one konieczne dla uzyskania całości obrazu opisywanego procesu. Odnośniki do odpowiednich publikacji są zamieszczone w tekście.

Skróty stosowane w opracowaniu: BM: szpik kostny, BMC i.v.: przeszczepienie szpiku w zawiesinie, ζ BMC i.v.: przeszczepienie naświetlonemu biorcy, CML: cytotoksyczność mediowana przez limfocyty (cell mediated cytotoxicity), CsA: cyklosporyna A, DC- komórka dendrytyczna, GvH: graft vs host, reakcja przeszczep-przeciw-gospodarzowi, HLTx (hind-limb transplantation): przeszczepienie kończyny (ze szpikiem), ζ HLTx: przeszczepienie kończyny naświetlonemu biorcy, LIV: wątroba, M: mitomycyna, MLN: węzeł chłonny krezkowy, MLR: mieszana hodowla limfocytów (mixed lymphocyte reaction), SPL: śledziona, TBI: napromienianie całego ciała dawką letalną.

Spis rzeczy

Wprowadzenie	10
Przegląd literatury dotyczącej biologicznych efektów przeszczepiania kończyny oraz szpiku na przeżycie przeszczepów allogenicznych i rozwój choroby przeszczep-przeciw-gospodarzowi ..	13
Doświadczalne przeszczepianie kończyn	14
Obserwacje przedłużenia przeżycia alloprzeszczepów narządów po podaniu komórek szpiku	14
Komórki dendrytyczne szpiku (DC-dendritic cells) i ich tolerogenna rola w alloprzeszczepianiu ...	15
Podawanie komórek szpiku w zawiesinie dla uzyskania tolerancji na alloprzeszczep	15
Przeszczep unaczynionego szpiku (w kończynie) a tolerancja na alloprzeszczep	16
Migracja DC ze szpiku do tkanek i alloprzeszczepu	17
Apoptoza komórek T biocy w następstwie działania DC	17
Komórki T regulacyjne a DC	17
Mikrochimeryzm komórkowy po przeszczepieniu szpiku	17
Tolerancja na przeszczep alogeniczny po przeszczepieniu szpiku przy stosowanej immunosupresji .	18
Odpowiedź biocy przeszczepu kończyny w mieszanej hodowli komórek jednojądrzastych (mixed lymphocyte reaction, MLR)	20
Reakcja przeszczep-przeciw-gospodarzowi (graft-versus-host, GvH) po przeszczepieniu kończyny .	20
Cel badań	22
Opis modelu doświadczalnego	23
Grupy badanych zagadnień	24
Material i metody	25
Zwierzęta	25
Metody	25
Technika przeszczepiania kończyny ze szpikiem (hind-limb transplantation, HLTx)	25
Technika przeszczepiania skóry i serca	26
Napromienianie całego ciała dawką letalną (total body irradiation, TBI)	26
Protokół podawania leków immunosupresyjnych	26
Izolowanie komórek	26
Przeszczepianie izolowanych komórek szpiku (bone marrow cell i.v., BMC i.v.)	26

Dystrybucja w organizmie komórek szpiku znakowanych ^{51}Cr	26
Zasiedlanie narządów limfoidalnych i nie limfoidalnych szpikowymi komórkami denrytycznymi (DC)	27
Ocena fenotypów komórek zasiedlonego szpiku biorcy metodą cytometrii przepływowej ..	28
Ocena cytomorfologiczna i ocena histologiczna wycinków tkanek	28
Mieszana hodowla komórek jednojądrzastych krwi dawcy i biorcy po przeszczepie (MLR) ..	29
Analiza materiału genetycznego dawców BN w tkankach biorców LEW metodą PCR	30
Kryteria odrzucania przeszczepu kończyny	30
Metody statystyczne	31
Wyniki	32
Zasiedlanie szpiku kostnego i narządów limfatycznych biorców przeszczepów syngenicznych kończyn nie poddawanych napromienianiu	32
Zasiedlanie szpiku kostnego i narządów limfatycznych biorców przeszczepów syngenicznych kończyn poddawanych napromienianiu	36
Zasiedlanie węzłów chłonnych kregkowych (MLN)	37
Ocena histologiczna komórek w zasiedlanych narządach limfatycznych u napromieniowanych biorców	37
Dystrybucja komórek szpiku kostnego uwalnianych z ζ HLTx	37
Obrazy odrzucania allogenicznego przeszczepu kończyny wraz ze szpikiem kostnym u biorców leczonych i nieleczonych immunosupresyjnie	43
Czas przeżycia przeszczepów	43
Ocena histologiczna tkanek przeszczepu allogenicznej kończyny u biorcy nieleczonego	44
Ocena histologiczna przeszczepu allogenicznej kończyny u biorcy nieleczonego i leczonego CsA i FK506 (14 dni)	44
Ocena histologiczna przeszczepu allogenicznej kończyny u biorcy leczonego CsA i FK506 (30 dni)	46
Odpowiedź biorcy allogenicznego przeszczepu kończyny na antygeny dawcy w mieszanej hodowli limfocytów (MLR)	49
Osiedlanie się komórek dawcy w tkankach allogenicznego biorcy po HLTx (mikrochimeryzm komórkowy)	50
Dystrybucja DNA dawcy (niekomórkowy mikrochimeryzm) u nieleczonych i leczonych immunosupresyjnie allogenicznych biorców	53
Choroba przeszczep-przeciwno-gospodarzowi (GvH) u nieleczonych i leczonych immunosupresyjnie biorców przeszczepu kończyny i szpiku kostnego	54
Omówienie	55
Streszczenie	62
Literatura	65

Wprowadzenie

Przeszczepianie ludzkich kończyn stało się rzeczywistością (1–4). Do sierpnia 2002 wykonano na świecie, wg oficjalnych danych 8 allogenicznych pojedynczych oraz 4 podwójne przeszczepy ręki. Ponadto wykonano unaczynione przeszczepy allogenicznych kości i stawów u 8 chorych (2,5,6). Liczby te są zapewne wyższe, ponieważ niektóre ośrodki zgłaszają wykonanie przeszczepów dopiero po dłuższych okresach obserwacji. Ostatnie doniesienia dotyczą analizy klinicznego przebiegu procesu przyjmowania się przeszczepu ręki (7–9), mikroskopowych obrazów odrzucania (10–13), a także przywracanie unerwienia przeszczepu i jego funkcjonalnej oceny (14–19). Osobnym zagadnieniem jest problem mikrochimerizmu (20) komórkowego t.j. obecności komórek odpornościowych dawcy w ustroju biorcy i ich wpływu na przeżycie przeszczepu.

Wskazaniem do przeszczepienia ręki są: 1) brak obu rąk (pourazowy, wrodzony (?)). 2) brak jednej ręki i współistniejące zaburzenia wzroku ograniczające podstawowe funkcje życiowe, 3) brak jednej ręki u osobnika z motywacją przywrócenia standardu życia (21–23). Wyzwaniem klinicznym pozostaje także rekonstrukcja uszkodzeń dużych kości i tkanek miękkich spowodowanych urazem, resekcją guza nowotworowego lub wadami wrodzonymi. Ograniczona jest jeszcze znajomość procesów odrzucania kończyny i zapobiegania jej odrzucania. Także brak jest dokładnych obserwacji dotyczących funkcjonalnego połączenia się przeszczepu z biorcą, takich jak powrotu unerwienia, reakcji naczyniowych, funkcji chwytnych, itp.

Przeszczepiona kończyna powinna być traktowana jak złożony (tkankowo) przeszczep allogeniczny (composite tissue allograft, CTTx) (24–26). Wymaga to badań nad immunogennością i kinetyką procesu odrzucania poszczególnych tkanek kończyny po przeszczepieniu. Kończyna zbudowana jest z tkanek pochodzenia endo-, mezo- i ektodermalnego. Jest „złożonym narządem” zbudowanym ze skóry, mięśni, powięzi, kości nerwów, naczyń krwionośnych i limfatycznych. Zawiera ponadto zorganizowaną tkankę limfoidalną w postaci szpiku kostnego i węzłów chłonnych.

Z fizjologicznego punktu widzenia tkanki kończyny wymagają dobrego zaopatrzenia w krew. Są gęsto unerwione i aktywne metabolicznie nawet w czasie

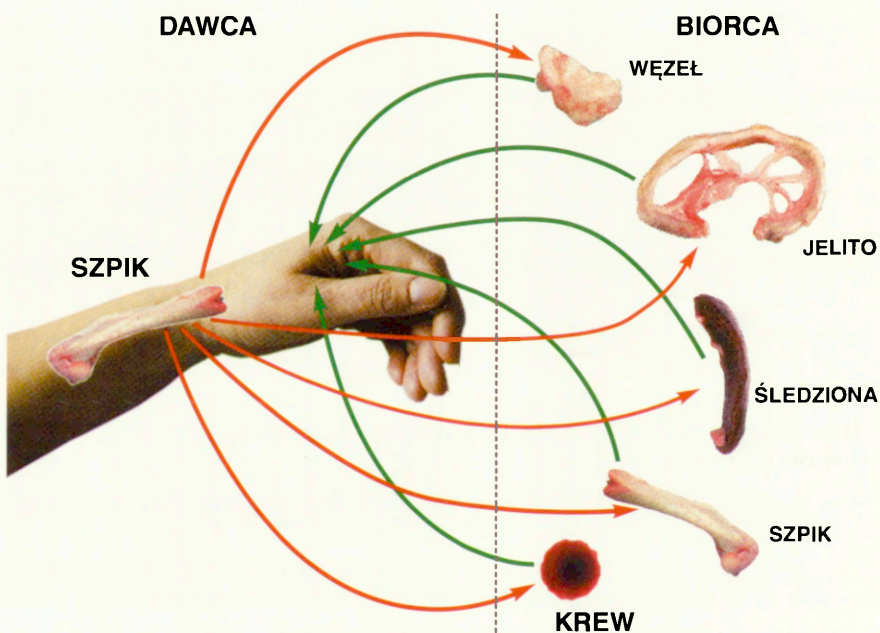
spoczynku. W porównaniu do narządów wewnętrznych kończyny są bardziej narażone na działanie środowiska, ze względu na dużą powierzchnię skóry i bezpośredni kontakt stóp i dłoni z powierzchniami obiektów fizycznych, kolonizowanych przez drobnoustroje i pokryte organicznymi i nieorganicznymi cząsteczkami (27,28). Drobnoustroje normalnie bytujące w skórze i te zasiedlające skórę w kontakcie ze środowiskiem są rozpoznawane i eliminowane przez układ immunologiczny skóry. Na układ immunologiczny kończyny składają się komórki takie jak keratynocyty, komórki Langerhansa, komórki dendrytyczne, makrofagi, krążące limfocyty, śródbłonki naczyń limfatycznych i komórki węzłów chłonnych. Układ ten znajduje się w stanie „ciąglej gotowości immunologicznej”. Jest to następstwem procesu penetracji drobnoustrojów lub ich produktów przez dłoń i podszwawą powierzchnię skóry do głębszych tkanek, a następnie do naczyń i węzłów limfatycznych (28,29). Węzły chłonne pachowe, pachwinowe i biodrowe należą, obok grup węzłów kręzkowych i wnęk płucnych, do największych skupisk tkanki limfoidalnej w ustroju człowieka.

Z immunologicznego punktu widzenia kończyna jest zbiorem tkanek o różnej immunogenności. Najbardziej immunogenna jest skóra, a następnie w kolejności węzły chłonne i komórki szpiku kostnego, leukocyty osadzające się w naczyniach włosowatych, osteoblasty, śródbłonek naczyń, komórki Schwanna i miocyty (30,31). Poza różną siłą pobudzenia przez te komórki odpowiedzi immunologicznej biorcy, należy oczekiwać różnic w kolejności i nasileniu odrzucania poszczególnych tkanek kończyny. Przejściowe przerwanie unerwienia czuciowego i ruchowego w przeszczepionej kończynie także wpływa zarówno na procesy metaboliczne jak i immunologiczne. Kończyna jest więc „anatomicznie i czynnościowo złożonym przeszczepem” i z tego powodu zachodzące w niej procesy immunologiczne powinny być dobrze znane transplantologowi.

Unikalność kończyny jako przeszczepu leży w jej składzie tkankowym. Jest ona, podobnie jak nerka czy serce, przeszczepem narządu, ale także przeszczepem szpiku kostnego. Komórki szpiku kostnego nie tylko dzielą się i dojrzewają w przeszczepie, lecz również migrują do jam szpikowych i narządów limfatycznych biorcy. Kontakt immunologiczny między dawcą a biorcą zachodzi więc nie tylko w samym przeszczepie, ale także w narządach immunologicznych biorcy, w których komórki szpiku dawcy się osiedlają. Interesującą kwestią jest fakt zdolności przeżycia komórek szpiku dawcy w organizmie biorcy allogenicznego przeszczepu i wytworzenia stanu tzw. komórkowego mikrochimizmu (20). Stan mikrochimizmu jest, według niektórych badaczy, związany z rozwojem częściowej tolerancji na alloantygeny dawcy. Jest to dość kontrowersyjna koncepcja. Istnieją obserwacje zarówno potwierdzające jak i zaprzeczające znaczeniu mikrochimizmu jako czynnika wydłużającego przeżycie organu przeszczepionego razem ze szpikiem kostnym (32–35). Uwolnione z przeszczepu komórki szpiku osiedlają się nie tylko w szpiku i narządach limfoidalnych biorcy, ale także w tkankach pierwotnie nielimfoidalnych takich jak skóra, jelita czy płuca

(36). Są to potencjalne miejsca rozwoju choroby przeszczep-przeciwko-gospodarzowi.

Do najważniejszych problemów dotyczących przeszczepiania kończyn, przed którymi stoi współczesna transplantologia należą: proces odrzucania poszczególnych tkanek przeszczepu, reinerwacji przeszczepu w celu przywrócenia funkcji kończyny oraz rozsiew i namnażanie się w organizmie biorcy komórek szpiku przeszczepionych wraz z kością z potencjalnym rozwojem tolerancji na antygeny transplantacyjne dawcy, ale jednocześnie z zagrożeniem rozwoju reakcji gospodarz-przeciwko-przeszczepowi i przeszczep-przeciwko-gospodarzowi w miejscu zgromadzenia się tych komórek (Ryc.1). Uwalnianie komórek szpiku z przeszczepionej kończyny niesie więc ze sobą potencjalną korzyść w postaci wydłużenia przeżycia przeszczepu, prawdopodobnie w związku z obecnością mikrochimeryzmu komórkowego, a w szczególności komórek dendrytycznych dawcy. Jak dotąd brak jest w literaturze doniesień dotyczących procesu uwalniania i osiedlania się u biorcy komórek szpiku z przeszczepionej kończyny oraz efektów tego procesu.



Ryc. 1 Schemat migracji komórek dawcy i biorcy z i do przeszczepu kończyny. Zielone linie wskazują kierunek migracji dawco-specyficznych komórek cytotoksycznych biorcy do wszystkich tkanek przeszczepu (proces odrzucania). Linie czerwone wskazują kierunek migracji komórek szpiku dawcy do narządów limfoidalnych biorcy. W tych narządach mogą one zarówno atakować komórki gospodarza (GvH) jak i być przez nie atakowane (reakcja odrzucania). Przeszczep kończyny przeżywający pod wpływem leczenia supresyjnego biorcy jest stałym źródłem komórek pochodzących ze szpiku i wędrujących do tkanek biorcy

Przegląd literatury dotyczącej biologicznych efektów przeszczepiania kończyny oraz szpiku na przeżycie przeszczepów allogenicznych i rozwój choroby przeszczep-przeciw-gospodarzowi

Przegląd ten zawiera dane z literatury dotyczące zjawisk biologicznych obserwowanych w doświadczeniu i klinice po wprowadzeniu biorcy przeszczepu narządowego komórek szpiku dawcy tego narządu. Dane te stanowiły dla mnie podstawę do rozważań, jakie zjawiska mogą rozwijać się u biorcy po przeszczepieniu kończyny zawierającej szpik kostny.

Przedstawione będą następujące zagadnienia:

- Doświadczalne przeszczepianie kończyn
- Obserwacje przedłużenia przeżycia alloprzeszczepów narządowych po podaniu komórek szpiku
- Komórki dendrytyczne szpiku (DC-dendritic cells) i ich tolerogenna rola w alloprzeszczepianiu
- Podawanie komórek szpiku w zawiesinie dla uzyskania tolerancji na alloprzeszczep
- Przeszczep unaczynionego szpiku (w kończynie) a tolerancja na alloprzeszczep
- Migracja DC ze szpiku do tkanek i alloprzeszczepu
- Aoptoza komórek T biorcy w następstwie działania DC
- Komórki T regulacyjne a DC
- Mikrochimeryzm komórkowy po przeszczepieniu szpiku
- Tolerancja na przeszczep allogeniczny po przeszczepieniu szpiku przy immunosupresji
- Odpowiedź biorcy przeszczepu kończyny w mieszanej hodowli komórek jednojądrzastych (mixed lymphocyte reaction, MLR)
- Reakcja przeszczep-przeciw-gospodarzowi (graft-versus-host, GvH) po przeszczepieniu kończyny

Doświadczalne przeszczepianie kończyn

Pierwsze przeszczepy kończyn były wykonane u psa przez Lapsinskiego w Rosji (37). Po wieloletniej przerwie zaczęto wykonywać badania na szczurach, głównie celem poznania biologii przeszczepu oraz podejmowania przez niego funkcji (26,30–36,38–56). Wkrótce okazało się, iż przeszczep kończyny jest przeszczepem wielotkankowym o różnej immunogenności poszczególnych tkanek, a także, iż jest unaczynionym przeszczepem szpiku, który może wywoływać reakcję GvH, oraz, iż skóra kończyny jest tkanką o szczególnej immunogenności a w niej w szczególności keratynocyty i komórki Langerhansa. Aby obniżyć poziom immunogenności modyfikowano przeszczep kończyny pozbawiając go skóry i przeszczepiając pod skórę (39,57,58). W ten sposób próbowano w ocenie oddzielić reakcję biorcy na przeszczep skóry od reakcji na przeszczep szpiku. Opracowano także technikę przeszczepiania kończyny u myszy (59). Badania nad przeszczepem kości ze szpikiem przeprowadzano m.in. na przeszczepie szczęki (60), piszczeli (61), nasady kości udowej ze stawem kolanowym (62), oraz kości mostka (63).

Obserwacje przedłużenia przeżycia alloprzeszczepów narządowych po podawaniu komórek szpiku

Biologiczne metody wywoływania tolerancji na przeszczep allogeniczny bywają skuteczne jedynie w wybranych modelach zwierzęcych. Nie są natomiast skuteczne w klinice. Pewnym wyjątkiem jest próbowana w klinice metoda podawania przed przeszczepieniem narządu szpiku kostnego od dawcy narządu. Przeszczepy nerek, a w szczególności wątroby, przeżywały przy zmniejszonej dawce środków farmakologicznych u biorców dawco-specyficznego szpiku. Powstały więc biologiczne przesłanki wskazujące na możliwość manipulowania układem odpornościowym biorcy prowadząc do dawco-specyficznego obniżenia reaktywności na alloantygeny. Badania ostatnich lat skoncentrowały się na ocenie roli tzw. makro- i mikrochimeryzmu w przedłużeniu przeżycia przeszczepów. Jak dotychczas nie wydaje się jednak, by mikrochimeryzm był niezależnym czynnikiem warunkującym tolerancję na przeszczep, a tym samym jego dłuższe przeżycie (32–35). Natomiast wydaje się, iż pozytywny efekt podania komórek szpiku wynika z supresyjnego działania rozmieszczonych u biorcy komórek dendrytycznych (DC) szpiku dawcy, wyrażających antygeny klasy II, wywołujących apoptozę dawco-reaktywnych limfocytów T biorcy i wpływających na powstanie klonów komórek regulacyjnych T CD4+25+ (Treg) (64). Obserwacje pojawiania się populacji Treg przeprowadzono także w klinice. Zarówno w doświadczeniu jak i w klinice podaje się komórki szpiku jedno- lub dwukrotnie dożylnie w postaci zawiesiny przed, około lub po przeszczepie narządowym. Przeszczepione komórki rozprzestrzeniają się we wszystkich tkankach biorcy i wywołują pewne niepo-

żądane miejscowe efekty cytokinowe. Z badań doświadczalnych wynika, iż nie dochodzi do tych powikłań po przeszczepieniu unaczynionego szpiku (szpiku w kończynie) (45).

Komórki dendrytyczne szpiku (DC-dendritic cells) i ich tolerogenna rola w alloprzeszczepianiu

Prace doświadczalne przeprowadzone na gryzoniach wyraźnie wskazują na tolerogenny wpływ DC zależny od prezentacji antygeny przez pewne ich subpopulacje (linii limfoidalnej) (65–73). Populacje DC izolowane z różnych tkanek informują i aktywują lokalnie znajdujące się limfocyty T do wytwarzania i wydzielania cytokin. Tolerogenne niedojrzałe (i-immature, iDC) pochodzą z limfoidalnych progenitorów o fenotypie CD8 α i charakteryzują się fenotypem CD8 α CD11c+TCR β . Aktywujące właściwości iDC prowadzą do pobudzenia i proliferacji dawco-specyficznych limfocytów T i ich następnej apoptozy. Pobudzone komórki śródłonkowe zatrzymują iDC. iDC wędrują do ognisk zapalenia oraz przeszczepów allogenicznych. Dojrzeją one pod wpływem zetknięcia z antygenem przeszczepu lub bakterii i przechodzą w postać dojrzałą (m-mature, mDC). DC posiadają receptory CCR1, CCR2, CCR5, CXCR1, IL8R, receptor R dla MIP1 α i MCP1. Wytwarzane chemokiny powodują rekrutację iDC, obniżają ekspresję R na dojrzewających DC. Wiadomo, iż iDC podane dożylnie przedłużają czas przeżycia alloprzeszczepu serca, również u człowieka. Komórki te słabo wyrażają CD83, CD86 i CD40 oraz antygeny klasy II. W mieszanej hodowli obniżają odpowiedź dawco-specyficznych limfocytów T.

Podawanie komórek szpiku w zawiesinie dla uzyskania tolerancji na alloprzeszczep

Podawanie komórek szpiku (BMC) dożylnie w zawiesinie w wielu przypadkach przedłuża przeżycie przeszczepów nerek, serca, trzustki i wątroby u człowieka (64,74–86). Projektanci metody łączyli ten efekt z tzw. makrochimeryzmem. W chwili obecnej istnieje więcej dowodów przeciw niż za pozytywną rolę makro- i mikrochimeryzmu w wywoływaniu obniżonej reaktywności biorcy na alloantygeny dawcy. Natomiast pozytywne efekty można obecnie przypisywać limfoidalnym populacjom komórek nie-T o fenotypie iDC. Same BMC podane biorcy nie przedłużają czasu przeżycia alloprzeszczepu. Podawane z przeciwciałami blokującymi cząsteczki kostymulujące CD154 i CTLA4Ig, oraz ALS, CsA, FK506 wyraźnie przedłużają przeżycie przeszczepu. Wysokie dawki BMC wraz z podaniem przeciwciał eliminujących komórki T i naświetlaniem grasicy wywołują tolerancję. U biorcy dochodzi do obniżenia poziomu dawco-specyficznych komórek T, zaś w śledzienie biorcy stwierdza się zwiększoną obecność komórek dawcy o fenotypie klasy II.

Wzrasta poziom TGF β 1 oraz interferonu gamma (!) U biorcy następuje zwrot w kierunku zwiększonej reprezentacji komórek Th2. Efektywność podawanego szpiku zależy od czasu podania, przed czy po przeszczepie, oraz od ilości podanych komórek. Liczne podania BMC zwiększają szanse przedłużenia przeżycia przeszczepu narządu od tego samego dawcy. W badaniach na myszach podanie BMC 7 dni przed przeszczepem obniża stężenie dawco-specyficznych komórek cytotoksycznych (CD8). Podawanie BMC ogranicza rozwój przewlekłego odrzucania, co obserwowano u ludzi po 6 latach od przeszczepienia nerek. Mikrochimeryzm w krwi wynosił około 1.5%. Obecność komórek T jest niezbędna dla utrzymania tolerancji, podczas gdy wg innych nie jest to niezbędne. Natomiast szpik pozbawiony makrofagów i DC nie wywołuje tolerancji na antygeny dawcy u biorcy. Wieloośrodkowa ocena wpływu podawania dawco-specyficznego szpiku biorcom przeszczepu nerki wykazała niespecyficzne obniżenie reakcji na antygeny dawcy (64).

Przeszczep unaczynionego szpiku (w kończynie) a tolerancja na alloprzeszczep

Unaczyniony przeszczep szpiku to przeszczep w kończynie lub przeszczep kości udowej ze szpikiem. Modele takie zostały opracowane w latach 80-tych przez nas i zagranicą (36,43,45,46,87–100). Unaczyniony przeszczep ma ogromną przewagę nad dożylnym podaniem zawiesiny BMC. BMC w przeszczepianej kości znajdują się w fizjologicznym środowisku, w przestrzennym kontekście z komórkami stromalnymi. Natychmiast po przeszczepieniu tkanka szpikowa podejmuje swą czynność. Prekursory linii komórkowych, w tym i limfoidalnych DC, są uwalniane w następstwie sygnału antygenowego. Komórki te są wspomagane przez cytokiny hemopoetyczne produkowane w szpiku w ilościach dostosowanych do zapotrzebowania (reakcja odrzucania, zapalna). W porównaniu, podana zawiesina BMC nie spełnia tych funkcji w takim zakresie. Co więcej BMC w zawieszynie rozprzestrzenia się w różnych tkankach, również nie-limfoidalnych, gdzie wywołuje reakcję zapalną. Wydaje się więc, iż unaczyniony przeszczep szpiku powinien być idealnym dawcą tolerogennych DC. Liczba uwolnionych komórek z przeszczepu unaczynionego jest bardzo mała, ale skuteczność bardzo wyraźna. Zwykle jest to 1 komórka dawcy na 10000 komórek biorcy. Uwolnione komórki wędrują do miazgi białej śledziony i części korowej węzłów. Pomimo, iż stopniowo komórki biorcy zastępują BMC w przeszczepionej kości, to mikrochimeryzm DC się utrzymuje. Zarówno przeszczepiona kończyna ze szpikiem jak równolegle przeszczepione serce przeżywają dłużej, nawet bez małych dawek immunosupresji. Natomiast podanie ALS, CsA, FK506, przeciwciał przeciw receptorowi T alfa/beta, CTLA4Ig, CD40L i CD28 przynoszą u gryzoni przeżycie przeszczepów powyżej 12 miesięcy. Mikrochimeryzm nie koreluje z czasem przeżycia. Wydaje się, iż BMC, w tym DC, osiadłe w przeszczepie i w tkankach limfoidalnych biorcy i trudne do ilościowej oceny, odgrywają pewną rolę w tolerancji.

Migracja DC ze szpiku do tkanek i alloprzeszczepu

Zarówno DC dawcy jak i biorcy mogą być wykryte w miazdze białej śledziony i rejonach korowych i przykorowych węzłów zajętych przez komórki T, ale nie w rdzeniu (101–105). Ciekawe jest, iż znaczna ilość podanych komórek gromadzi się w węzłach wątrobowych. Topograficzna identyfikacja komórek dawcy i biorcy dokonywana jest za pomocą przeciwciał specyficznych dla szczepu dawcy lub biorcy oraz wykrywania fragmentu Sry-DNA (męskiego) w przypadku męskiego dawcy. Po przeszczepie unaczynionego szpiku DC dawcy gromadzą się w narządach limfoidalnych, i jedynie w niewielkich ilościach w tkankach nie-limfoidalnych. Zasadniają one miejsca przeznaczone dla tkankowych DC, w tym w skórze i sercu.

Apoptoza komórek T biorcy w następstwie działania DC

Niedojrzałe DC inkorporują ciała apoptotyczne i prezentują ich antygen limfocytom cytotoksycznym (106–109). Aktywowane limfocyty ulegają apoptozie. Apoptoza nie prowadzi do dojrzewania DC. Debris apoptotyczne jest bardzo słabym immunogenem. Limfocyty ulegające apoptozie produkują znaczne ilości IL10 o charakterze hamującym reakcje odpornościowe. Dożylnie podawanie apoptotycznych komórek indukuje dawco-specyficzną tolerancję na alloantygeny. DC prezentują na powierzchni ligand dla CD95 odpowiedzialny za apoptozę po spotkaniu z limfocytami z antygenem CD95.

Komórki T regulacyjne a DC

Niedojrzałe DC (iDC) inkorporują antygen z ciałek apoptotycznych, migrują do węzłów chłonnych i indukują powstanie klonów komórek T tzw. regulacyjnych o fenotypie CD4+25+ (36,110–113). Zaprogramowane Treg wędrują do tkanek, gdzie zostają reaktywowane przez DC prezentujące antygen. Ograniczają one poziom reakcji zapalnej. Treg wyrażają także CTLA4 oraz produkują IL10 (hamuje reakcję) i TGFβ (hamuje reakcję). DC typu myeloidalnego a nie limfoidalnego nie mają właściwości tolerogennych.

Mikrochimeryzm komórkowy po przeszczepieniu szpiku

Istnienie mikrochimeryzmu komórkowego wykrywa się praktycznie po przeszczepieniu każdego narządu, który posiada tzw. komórki pasażerowe (passenger cells) lub też po przeszczepieniu szpiku (114–125). Obserwowano istnienie

mikrochimeryzmu komórkowego po przeszczepieniu allogennej kończyny przy różnych protokółach immunosupresji. Przy stosowaniu CsA i przeciwciała przeciw *TCR α* obserwowano we krwi biorcy obecność 12% komórek dawcy, w śledzionie 63%, a w węzłach chłonnych 15% (126). W innych badaniach stwierdzano ok. 20% komórek dawcy we krwi i śledzionie biorcy długo przeżywającego przeszczepu (31). Po podaniu prospektywnemu biorcy komórek szpiku dawcy przed przeszczepieniem poziom mikrochimeryzmu sięgał 20% (127). Przy poziomie powyżej 50% rozwijały się objawy reakcji GvH (128). Po podaniu naświetlalnemu biorcy mieszaniny komórek szpiku dawcy i biorcy bez limfocytów T, a następnie przeszczepienia kończyny poziomu mikrochimeryzmu wynosił od 30% do 80% (129). Podając biorcy przeszczepu FK506 i CsA uzyskano wysoki poziom mikrochimeryzmu sięgający 90%, ale połączony on był z objawami reakcji GvH (32). Mikrochimeryzm komórkowy, który rozwija się po przeszczepieniu szpiku w kończynie w jakimś stopniu moduluje odpowiedź biorcy. Tak jak w przypadkach klinicznych, w doświadczeniu obserwacje pozostają kontrowersyjne. Mikrochimeryzm szpikowy przez podanie przed przeszczepem kończyny komórek szpiku dawcy może obniżać poziom odpowiedzi biorcy (130). Według niektórych (131) obecność szpiku w przeszczepionej kończynie nie ma wpływu na czas przeżycia przeszczepu, jeśli biorca otrzymuje CsA.

Tolerancja na przeszczep allogeniczny po przeszczepieniu szpiku przy stosowanej immunosupresji

Tolerancja na allogeniczny przeszczep kończyny może być wytworzona poprzez podawanie biorcy środków immunosupresyjnych, komórek szpiku dawcy lub połączenia tych dwóch metod. Optymalną metodą byłoby „wstępne leczenie” biorcy podawaniem immunologicznie aktywnych komórek dawcy (komórki pełnego szpiku, komórki dendrytyczne). Niektóre populacje komórek odpornościowych dawcy podawane są biorcy w przeszczepie jako tzw. komórki pasażerowe (komórki krwi dendrytyczne, śródbłonki). Zarówno te podawane jako „wstępne leczenie” jak i pasażerowe wydają się odgrywać jedynie niewielką rolę w przypadku przeszczepów narządów takich jak trzustka, wątroba czy serce. Jak wygląda to w przypadku unaczynionego przeszczepu kończyny ze szpikiem w modelu doświadczalnym i u człowieka? U szczura przeciętny czas przeżycia przeszczepionej kończyny bez immunosupresji lub podawanie antygeny dawcy był dość różny i wynosił: 5 (132), 7 (31), 7 (126), 11 (133), 12 (133) i 12 dni (134). Cyklosporyna przedłużała przeżycie alloprzeszczepu kończyn (40,135,136). Po podaniu cyklosporyny w dawkach 15 mg/kg w. c./dzień przeżycie kończyny, oceniane na podstawie odrzucania skóry, wynosiło w różnych ośrodkach 17 (132), 20 (42), 21 (126), 30 (30), 34 (133), 50 (134), 61 dni (31). Duże zwierzęta wymagają znacznie wyższych dawek CsA/kg. Tolerancja na przeszczep ustaje zwykle w 1 tydzień

po zakończeniu podawania CsA (41), natomiast po podawaniu FK506 w dawce 1mg/kg w. c./dzień różnie: 50 (133), 54 (30), > 90 (132), 150 (133a) 296 (31) dni. FK506 obniżał poziom IL1 α , IL2, IL6, γ IFN, FGF, TGF β mRNA poniżej wartości obserwowanych dla przeszczepów syngenicznych (135). Rapamycyna nie przynosiła takiego efektu (135). Podawanie samej ALS nie przedłużało przeżycia przeszczepu kończyny (136). FK506 odwracał proces odrzucania (132). Po podaniu RS 61443 czas przeżycia wynosił 43 (31) i 40 dni (134). Lek ten był skuteczny w odwracaniu reakcji odrzucania (137). Był również skuteczny w przywracaniu unerwienia kończyny (138). Połączenie CsA i RS61443 dawało przeżycie powyżej 300 dni, ale połączenie było z toksycznością dla komórek szpiku (134). Po podaniu rapamycyny przeżycie nie przekraczało 10 dni (132). Cyklofosfamid nie przedłużał przeżycia przeszczepu. Połączenie FK506 z monofenylem mofetilu i prednisonem dawało przeżycia > 90 dni (138a), zaś z surowicą antylimfacyjną 60–100 dni (32). Deoksypergualina w kombinacji z przeciwciałem przeciw receptorowi T alfa/beta jedynie nieznacznie przedłużała przeżycie przeszczepu kończyny (139).

Kombinacja farmakologicznych i biologicznych metod immunosupresji powodowała wyraźniejsze przedłużenie przeżycia alogenicznego przeszczepu kończyny. Podanie CsA z przeciwciałem blokującym TCR $\alpha\beta$ powodowało przeżycie >100 dni (126). Również połączenie CsA z ALS powodowało podobne przedłużenie przeżycia (140). Przy zgodności silnych antygenów transplantacyjnych u świni małe dawki CsA przez 12 dni pozwalały na osiągnięcie przeżycia kończyny powyżej 100 dni. Drugi przeszczep skóry od tego samego dawcy (przechowywany w zamrożeniu) był jednak nadostro odrzucany (141). To zjawisko rozdzielonej tolerancji obserwowano także po przeszczepianiu innych narządów (142). Podanie naświetlonemu biorcy mieszaniny szpiku dawcy i biorcy pozbawionych limfocytów T przedłużało przeżycie przeszczepu do 195 dni (139). Podanie dawco-specyficznej krwi biorcy przeszczepu leczonego FK506 nie przynosiło synergistycznego efektu (143). Podanie donaczeniowo do macicy komórek szpiku dorosłego dawcy u świni powodowało wytworzenie pełnej tolerancji na złożony przeszczep tkankowy (144). Podanie noworodkowi, późniejszemu biorcy kończyny, szpiku dawcy powodowało przedłużenie przeżycia przeszczepu (bez skóry) do 30 dni (128). Naświetlanie przeszczepu przed implantacją jedynie nieznacznie przedłużało jego przeżycie. Natomiast naświetlanie całego dawcy przedłużało przeżycie powyżej 14 dni (136a). Przeprowadzane były także próby genoterapii, które mogłyby ograniczyć proces odrzucania. Jako wstępny etap udało się transferować tkanki przeszczepu genami reporterowymi beta-galaktozydazy, luciferazy i zielonego fluoroscencyjnego białka GFP (145). Podanie biorcy przed przeszczepem komórek epidermalnych lub makrofagów dawcy skracało czas przeżycia alloprzeszczepu kończyny, wywołując wcześniejszą odpowiedź na antygeny dawcy (146). Natomiast zgodność antygenów transplantacyjnych między dawcą i biorcą znacznie przedłużała przeżycie alloprzeszczepów kończyn (8,147). Usunięcie an-

tygenowo silnej skóry z przeszczepu również przedłużało czas przeżycia (147). Z innych obserwacji wynika, iż przeszczep szpiku w izolowanej kości pozwalał na śledzenie jego roli w mikrochimeryzmie, wytwarzaniu tolerancji i reakcji GvH dokładniej niż w przypadku przeszczepu całej kończyny ze skórą (58).

Odpowiedź biorcy przeszczepu kończyny w mieszanej hodowli komórek jednojądrzastych (mixed lymphocyte reaction, MLR)

Doniesienia dotyczące wyników badań odpowiedzi komórkowej i humoralnej biorcy na przeszczepy allogeniczne kończyny są w literaturze nieliczne. Biorcy otrzymujący FK506 wykazywali obniżoną reaktywność w mieszanej hodowli limfocytów (MLC) oraz brak odpowiedzi w teście cytotoksyczności (CML) (133,143). Obniżenie odpowiedzi obserwowano także w postaci obniżonego wytwarzania przeciwciał przeciw dawcy (22). W badaniach wielośrodkowych wykazano, iż komórki szpiku dawcy o fenotypie CD34 oraz CD38, CD2, CD5, CD1, CD33 hamowały odpowiedź w mieszanej hodowli allogenicznej z limfocytami biorcy (64).

Reakcja przeszczep-przeciw-gospodarzowi (graft-versus-host, GvH) po przeszczepieniu kończyny

Choroba (reakcja) GvH rozwija się w następstwie rozpoznania przez przeszczepione komórki układu odpornościowego dawcy (głównie limfocyty T) antygenów transplantacyjnych (silnej i słabej niezgodności) biorcy. Po rozpoznaniu rozwija się odpowiedź cytotoksyczna ze wszystkimi jej następstwami zapalnymi. Głównie zmiany rozwijają się w skórze (na granicy naskórka – skóra właściwa i wokół naczyń skóry), śluzówce jelita i innych błon śluzowych, w płucach i wątrobie. Typową i silnie wyrażoną chorobę GvH obserwuje się po przeszczepieniu szpiku (148–153), a także jelita. Spotyka się także pojedyncze przypadki po przetoczeniach krwi i przeszczepie wątroby (154). Głównym inicjatorem i mediatorem zmian są limfocyty T dawcy.

Przeszczep kończyny zawierającej szpik kostny stwarza możliwość rozwinięcia się choroby GvH. Jednak wbrew oczekiwaniom, badania doświadczalne nie wykazały wyraźnych objawów reakcji GvH u zwierząt biorców kończyny w układach silnej niezgodności antygenów transplantacyjnych (34,155–158). Rozwój GvH wydaje się zależeć od ilości komórek dawcy przedostających się do biorcy (33,35). Również nie obserwowano wyraźnych zmian typu GvH w przeszczepionej kończynie (156). W kończynach obserwowano jedynie wzrost poziomu TGF β , ale jego rola nie została wyjaśniona (155,159,160). Szpik kostny zarówno dawcy (w przeszczepie) jak i biorcy wykazywał znaczne zwiększenie liczby komó-

rek (161). Rozwój reakcji GvH w pewnym procencie zwierząt (w postaci ograniczonej!) przypisuje się limfocytom T dawcy znajdujących się w węźle podkołanowym przeszczepionej kończyny (34,162,163).

U chorych z przeszczepioną kończyną również nie obserwowano wyraźnych objawów GvH (1,3,164). Po przeszczepieniu ręki u człowieka obserwowano zmiany typu GvH pod postacią podnaskórkowych i okołonaczyniowych nacieków w komórkach gospodarza o fenotypie CD3, CD4 i CD8 oraz akantozy i wodniczkowych zmian w keratynocytach w kilka miesięcy po przeszczepie (165). W naczyniach stwierdzono obecność komórek CD1a (komórki Langerhans'a) pochodzące od gospodarza. Obserwacje ograniczonej reakcji GvH mają ogromne znaczenie praktyczne, ponieważ eliminują z listy powikłań po przeszczepie jedną z niebezpiecznych dla przeszczepu reakcji.

Cel badań

Celem moich badań była ocena procesu migracji przeszczepionych komórek hemopoetycznych z kości przeszczepionej kończyny dawcy do jam szpikowych i narządów limfatycznych biorcy w układzie syngenicznym i allogenicznym. Dodatkowo śledziłem proces powstawania allogenicznego mikrochimeryzmu i jego ewentualnego wpływu na wydłużenie czasu przeżycia przeszczepionej kończyny. Badałem także zjawisko reakcji przeszczep-przeciw-gospodarzowi (GvH), które zwykle występuje po przeszczepieniu allogenicznego szpiku. Wszystkie wymienione procesy powinny być poznane przed rozpoczęciem klinicznego przeszczepiania kończyn.

Opis modelu doświadczalnego

Badania były przeprowadzone na wsobnych szczepach szczurów BN i LEW, służących jako dawcy i biorcy kończyny. Przeszczepiona kończyna była źródłem komórek szpiku. Szpik zawarty w kości to tkanka, w której komórki hemopoetyczne pozostają w ścisłej zależności czynnościowej z komórkami podporowymi zrębu. Oznacza to, że komórki szpiku obecne w przeszczepie kostnym mogą w sposób fizjologiczny dojrzewać i być uwalniane do układu krążenia biorcy wraz z cytokinami i chemokinami produkowanymi przez komórki zrębu. W przypadku przeszczepienia samego szpiku podawana zawiesina pozbawiona jest komórek zrębu.

Podstawowe niewiadome po przeszczepieniu biorcy szpiku w kończynie to: a) ilość komórek szpikowych uwalnianych z przeszczepionej kości; b) miejsca, w których w ustroju biorcy osiedlają się uwolnione komórki szpiku; c) szybkość procesu namnażania się komórek szpikowych dawcy w jamach szpikowych i naczyniach limfatycznych biorcy; d) zdolność komórek hemopoetycznych dawcy do produkcji dojrzałych komórek krwi w ustroju biorcy; e) szybkość odrzucania komórek szpiku dawcy przez allogenicznego biorcę; f) przeżywalność komórek szpiku dawcy osiedlających się w tkankach biorcy i wytworzenie stanu tzw. mikrochimeryzmu połączonego z przedłużeniem przeżycia przeszczepu., wreszcie g) możliwość wywoływania reakcji typu przeszczep-przeciw-gospodarzowi (GvH) przez komórki szpiku dawcy zawarte w przeszczepie kostnym. Rozwoju takiego procesu należałoby się spodziewać, ponieważ występuje on po przeszczepie komórek szpiku w zawieszynie zawierającym limfocyty T.

Losy uwolnionych komórek szpiku dawcy były obserwowane u biorców przeszczepów allogenicznych i syngenicznych, u biorców poddawanych i niepoddawanych napromienianiu oraz biorców nieleczonych i leczonych immunosupresyjnie.

Grupy badanych zagadnień

1. Zasiedlanie szpiku kostnego i narządów limfatycznych biorców przeszczepów syngenicznych kończyn nie poddawanych napromienianiu.
2. Zasiedlanie szpiku kostnego i narządów limfatycznych biorców przeszczepów syngenicznych kończyn poddawanych napromienianiu.
3. Zasiedlanie szpiku i tkanek limfoidalnych po przeszczepieniu allogenicznych kończyn u naświetlonych i nie naświetlanych biorców.
4. Kinetyka odrzucania allogenicznego przeszczepu tkanek kończyn i szpiku kostnego zawartego w przeszczepie kostnym u biorców leczonych i nieleczonych immunosupresyjnie.
5. Występowanie zjawiska mikrochimeryzmu komórkowego u leczonych immunosupresyjnie biorców po przeszczepieniu i przedłużenie czasu przeżycia kończyny. Ewentualna rola szpikowych komórek dendrytycznych dawcy.
6. Dystrybucja DNA dawcy u leczonych i nieleczonych immunosupresyjnie biorców allogenicznego przeszczepu kończyny (mikrochimeryzm nie-komórkowy).
7. Reakcja typu przeszczep-przeciw-gospodarzowi u leczonych i nieleczonych immunosupresyjnie biorców allogenicznego przeszczepu kończyny.

Tabela 1. Grupy doświadczalne (n=5–7 w grupie)

Grupa	Przeszczep kończyny*	Przeszczepy dodatkowe*		Immunosupresja
		skóra	serca	
1	+	–	–	–
2	+	–	–	** źkończyny
3	+	–	–	CsA 30d
4	+	+	–	CsA 30d
5	+	–	+	CsA 30d
6	+	+	–	–
7	+	–	–	źbiorcy
8	+	–	+	FK506 30d
9	+ ***	–	–	–

* BN → LEW

** źnaświetlanie 8 Gy

*** LEW → LEW

Material i metody

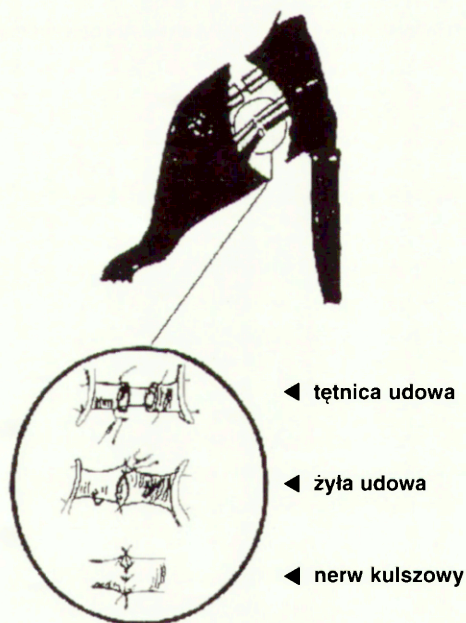
Zwierzęta

Do badania wykorzystano trzymiesięczne szczury szczepów LEW (RT1^l) i BN (RT1ⁿ) urodzone i hodowane w zwierzętarni IMDiK PAN w Warszawie. Szczury LEW służyły jako biorcy i dawcy przeszczepów syngenicznych i allogenicznych, zaś szczury BN były jedynie dawcami. Badania uzyskały zgodę Komisji Etycznej.

Metody

Technika przeszczepiania kończyny ze szpikiem (hind-limb transplantation, HLTx)

Dystalna część kończyny dawcy była amputowana w środkowej części i zespalana z proksymalnym kikutem uda biorcy (ryc. 2). Dokonywano zespolenia koniec-do-końca tętnicy i żyły udowej z naczyniami biorcy, używając szwów monofilamentowych 10-0. Kikuty nerwu kulzowego były zszywane. Kikuty kości udowej były zespalane za pomocą wewnątrzkościowych metalowych stentów. Dokonywano zszycia mięśni i skóry.



Ryc. 2. Schemat operacji przeszczepienia tylnej kończyny szczura

Technika przeszczepiania skóry i serca

Fragmenty skóry 10x10mm przeszczepiano na grzbiet dawcy umocowując 4 szwami. Zakładano okrężny opatrunek nie pozwalający na oderwanie przeszczepu przez szczura. Serce przeszczepiano typowo do naczyń jamy brzusznej łącząc szwami 7-0 aortę przeszczepu z aortą biorcy i tętnicę płucną przeszczepu z żyłą główną.

Napromienianie całego ciała dawką letalną (total body irradiation, TBI)

Biorcy byli eksponowani na 8.0Gy promieniowanie Gamma z lampy kobaltowej, 60 Co (Theatron, Atomic Energy of Canada) w dawce 150cGy/min. Dawka ta powodowała śmierć 100% napromienianych zwierząt, jeśli nie otrzymały one przeszczepu szpiku.

Protokół podawania leków immunosupresyjnych

Cyklosporyna A (CsA) była podawana w dawkach 17 mg/kg w. c./dzień, domięśniowo. FK506 (tacrolimus) podawano w dawce 0.5 mg/kg w. c./dzień, domięśniowo.

Izolowanie komórek

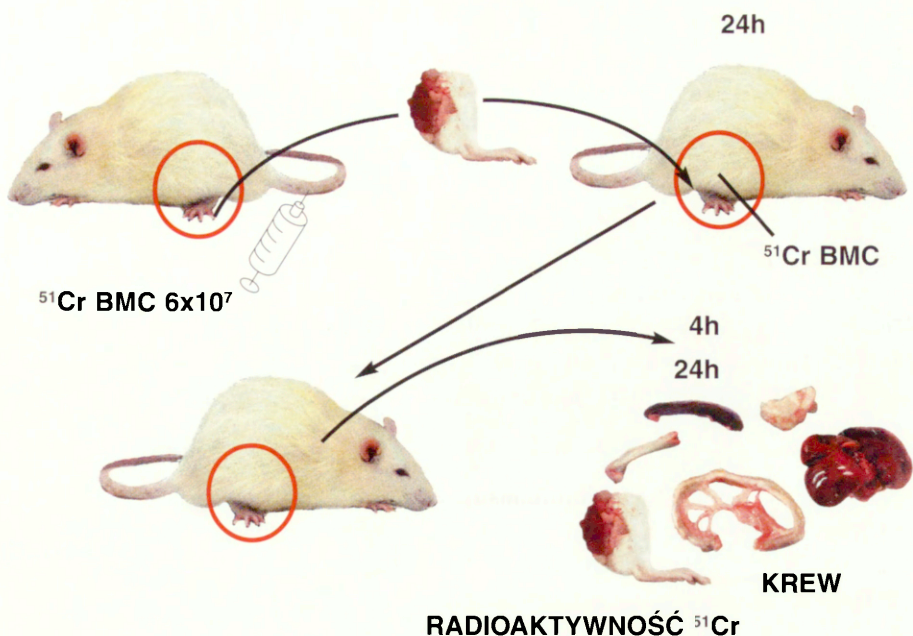
Komórki szpiku otrzymywano poprzez płukanie jamy szpikowej kości piszczelowej i udowej przy użyciu igły 18 gauge w medium RPMI z 5% surowicą cielęcą. Nie stosowano izolacji na gradiencie, a jedynie lizowano erytrocyty. Leukocyty krwi obwodowej izolowano z pełnej krwi w gradiencie Lymphoprepu (Nyegaard, Oslo). Splenocyty izolowano poprzez rozczesanie fragmentów śledziony i oddzielenie komórek mononuklearnych na gradiencie Lymphoprepu (Nyegaard, Oslo).

Przeszczepianie izolowanych komórek szpiku (bone marrow cell i. v., BMC i. v.)

Izolowaną populację komórek szpiku, pozbawioną erytrocytów metodą wodnej lizy, podawano biorcy dożylnie w ilości 6×10^7 . Ilość ta odpowiadała ilości komórek połowy kości udowej ($22.0 \pm 3.2 \times 10^6$), całej piszczeli ($23.9 \pm 2.2 \times 10^6$) i kości stopy ($15.7 \pm 3.0 \times 10^6$).

Dystrybucja w organizmie komórek szpiku znakowanych ^{51}Cr .

W celu oceny dystrybucji komórek szpiku uwolnionych z przeszczepu kończyny i zasiedlających biorcę, komórki szpiku osobnika szczepu BN były izolowane z wypłukanego szpiku kostnego, znakowane ^{51}Cr i podawane dożylnie syngenicznemu osobnikowi BN (ryc. 3). Dwadzieścia cztery godziny później dystalna część kończyny zawierająca znakowane komórki szpiku była amputowana i przeszczepiana ortotopowo osobnikowi szczepu LEW. Cztery i 24 godziny po zabiegu oce-

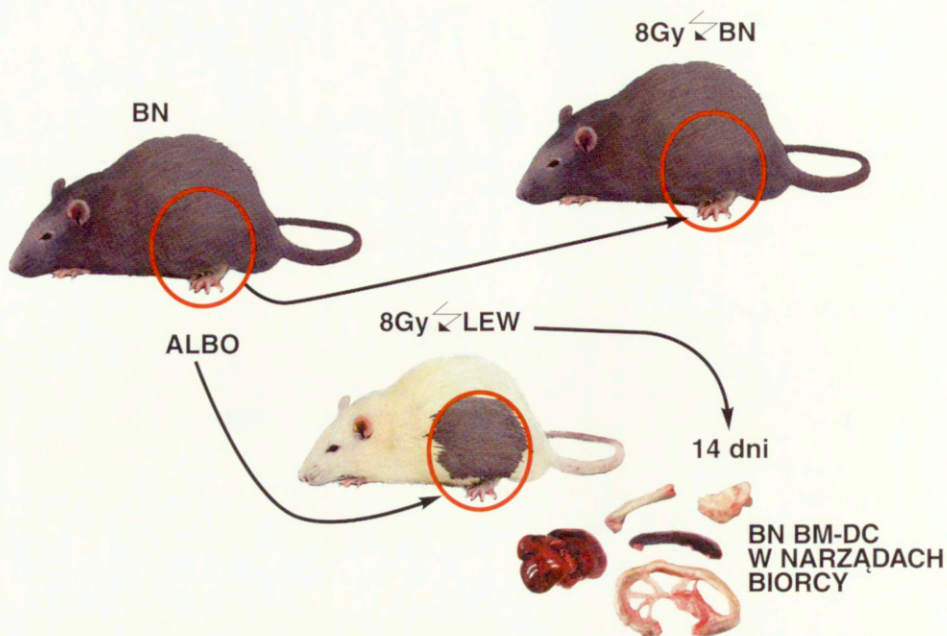


Ryc. 3. Schemat badania rozmieszczenia znakowanych ^{51}Cr komórek szpiku uwalnianych z HLTx w 4 i 24 godziny i zasiedlających tkanki biorcy. LEW otrzymywał dożylnie znakowane BMC, po 24 godz. jego kończyna była przeszczepiana syngenicznemu biorcy. Po następnych 24 godz. pobierano od biorcy HLTx narządy do badań rozmieszczenia radioaktywności pochodzącej z HLTx

niano w jamach szpikowych i narządach limfatycznych u biorców dystrybucję radioaktywności komórek uwolnionych z przeszczepionej kończyny. Dystrybucję przeszczepianych dożylnie izolowanych komórek szpiku badano po ich pobraniu z kości piszczelowej i udowej, wyznakowaniu ^{51}Cr i podaniu dożylnym. Dalsze kroki procedury były identyczne jak opisane dla przeszczepu kończyny.

Zasiedlanie narządów limfoidalnych i nie limfoidalnych szpikowymi komórkami typu denrytycznego (DC)

Kończynę BN przeszczepiano wg opisanego protokołu naświetlonemu biorcy LEW. Po 14 dniach pobierano narządy do badań immunohistochemicznych (ryc. 4). Identyfikowano w narządach biorcy komórki OX27+ (przeciwciała specyficznie znakujące BN ale nie LEW), OX62+ (wędrujące DC), OX6+ (MHC klasa II). W narządach przeznaczonych do przeszczepienia, jak np. serce, identyfikowano DC przy użyciu wymienionych przeciwciał oraz biorąc pod uwagę topograficzną lokalizację DC w tkance normalnego serca.



Ryc. 4. Schemat zastosowany do zasiedlania biorcy komórkami (dendrytycznymi) szpiku dawcy. Kończyna BN przeszczepiona naświetlonemu LEW, po 14 dniach badanie obecności komórek dendrytycznych BN w narządach biorcy HLTx. Kontrola BN → BN

Ocena fenotypów komórek zasiedlonego szpiku biorcy metodą cytometrii przepływowej

Analiza za pomocą cytometrii przepływowej była wykonywana celem wykrycia komórek o fenotypie dawcy w krwi i narządach limfatycznych biorcy. Przeprowadzano ją na jednokolorowym (zielone świecenie przy długości fali 535 nm) aparacie FACStar (Beckton Dickinson, San Jose, CA) przy użyciu przeciwciał analogicznych jak w barwieniach rozmazów komórkowych. Stosowano przeciwciała przeciw antygenom OX7 (CD90) (komórki pnia, niedojrzałe leukocyty), W3/13 (leukocyty, limfocyty), W3/25 (limfocyty pomocnicze), OX8 (limfocyty cytotoksyczne), OX6 (klasa II), OX39 (receptor dla IL-2), OX17 (antygen Ia) oraz OX19 (CD5, limfocyty T, część limfocytów B). Wszystkie przeciwciała z firmy Serotec, UK.

Ocena cytomorfologiczna i ocena histologiczna wycinków tkanek

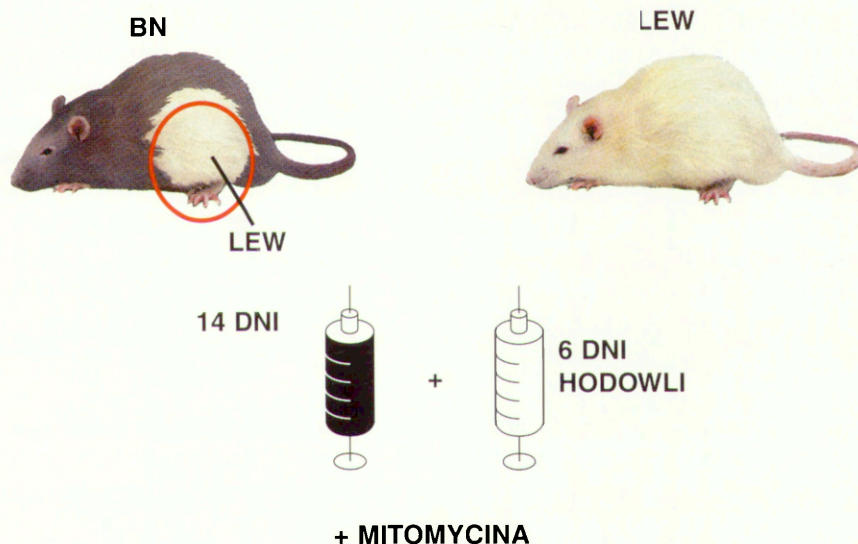
Morfologiczna diagnostyka różnicowa była wykonywana dla oceny procesu odrzucania i mikrochimeryzmu komórkowego. Przeprowadzano ją na odwirowanych komórkach oraz skrawkach mrożonych, które wybarwiano barwnikiem Giemsa, hematoksyliną-eozyną oraz monoklonalnymi przeciwciałami przeciw

CD90 (OX7) leukocyty, komórki pnia, CD43 (W3/13) leukocyty, limfocyty, komórki NK, CD4 (W3/25) limfocyty pomocnicze, CD8 (OX8) limfocyty cytotoksyczne, komórki klasy II (OX6), CD14 (ED1) monocyty, CD54 (ICAM I), HIS48 (granulocyty) i łańcuchom kappa i lambda limfocytów B (OX12). Specyficzne przeciwciało OX27 wybarwiający antygeny klasy I szczepów BN, ale nie LEW, było stosowane w celu wykrycia przeszczepionych komórek dawcy BN zasiedlających tkanki biorcy LEW. Komórki dendrytyczne (DC) identyfikowano za pomocą znakowania przeciwciałem przeciw antygenom OX62 (wędrujące komórki dendrytyczne) i OX6. Wszystkie przeciwciała z firmy Serotec, UK.

Preparaty utrwalano w acetonie, a następnie blokowano 50% surowicą kozią, inkubowano z przeciwciałem przez 30 min., a w dalszym etapie stosowano kit LSAB-AP (Dako, Glostrup), po czym następowało barwienie hematoksyliną-eozyną.

Mieszana hodowla komórek jednojądrzastych krwi dawcy i biorcy po przeszczepie (MLR)

Wyzolowane na gradiencie Lymphoprep'u limfocyty dawcy i biorcy (ryc. 5) były płukane i zawieszane w RPMI z dodatkiem FCS (Gibco), 2 mM glutaminy, 100 μ /ml penicyliny, 100 μ g/ml streptomycyny, 0,05 mM 2-merkaptioetanolu i 1 mM NG-mono-methyl-L-argininy (NMA). Komórki odpowiadające (4×10^5) były po-



Ryc. 5. Schemat pokazujący źródła splenocytów do testu mieszanej hodowli (MLC). Komórki od dawcy BN, który otrzymał przed 14 dniami HLTx od LEW w 6-dniowej hodowli z normalnym osobnikiem szczepu LEW (wszystkie zastosowane kombinacje pokazane na rycinie 12a,b,c).

budzane stymulatorami inkubowanymi z mitomycyną (4×10^5) w całkowitej objętości medium 200 μ l. Hodowla była inkubowana w 37°C w obecności 5% CO₂. Piątego dnia dodawano do hodowli 1 μ Ci³ H-thymidyny (New England Nuclear, Boston, MA) i kończono ją szóstego dnia przy użyciu automatycznego harwestera, następnie liczono w scyntylicyjnym liczniku beta (Beckman, Palo Alto, CA).

Analiza materiału genetycznego dawców BN w tkankach biorców LEW metodą PCR

Genomowe DNA było pobierane z komórek krwi obwodowej, limfocytów węzłów chłonnych krezkowych, komórek szpiku, skóry, wątroby, komórek śledziony i serca (QIamp DNA, Qiagen, US). Ilościowe określenie DNA wykonywano metodą spektrofotometryczną w kuwetach kapilarnych Gene Quant (Amersham Pharmacia, Biotech). Produkty DNA były powielane za pomocą specyficznych dla SRY primerów oligonukleotydowych. Do reakcji PCR stosowano 5 μ g DNA, 25 μ mol startera dla regionu Y-Sry (5'-GAGAGAGGCACAAGTTGGC-3', 5'-AATACCAGTGGATGTGATGCGG-3') i (2 μ l) HotStarTag Marter Mix Kit (Qiagen). Amplifikacja była wykonywana w termocyklerze (DNA Eugina, MJResearch). Analizę DNA przeprowadzano na podstawie elektroforogramów w 12.5% żelach polyakrylamidowych (Phast System, Amersham).

Kryteria odrzucania przeszczepu kończyny

Etapy: Rumień, obrzęk, strup, martwica. Pełne odrzucenie istniało wówczas gdy można było oddzielić mechanicznie strup z włosami (133). Gradacja odrzucania dotyczy poszczególnych tkanek przeszczepu, kinetyka ich odrzucania jest bowiem różna (30). Najsilniej odrzucana jest skóra, następnie mięśnie, kość, pęczek naczyniowy. Odrzucanie szpiku jest widoczne już od 3 dnia. Obraz jest jednak zaciemniony wpływem środków immunosupresyjnych. Dla odróżnienia które elementy komórkowe są pochodzenia dawcy, a które biorcy, należy stosować odpowiednie znaczniki.

Makroskopowe kryteria odrzucania:

Stadium 0: kończyna normalna

- I obrzęk krwawienia skóry po nakłuciu
- II obrzęk i zasinienia, ciemno-czerwona krew po nakłuciu skóry
- III rozplywne zmiany naskórka, brak krwawienia z miejsca nakłucia
- IV martwica, oddzielenie skóry od podłoża, obfity wyciek na powierzchni

Histologiczne kryteria odrzucania:

Skóra –

stadium I: normalna

II: nacieki podnaskórkowe i okołonaczyniowe, wakuolizacja keratynocytów

III: akantoza keratynocytów, odklejanie naskórka, gęste nacieki w całej dermis

IV: martwica, zakrzep naczyń

Mięśnie –

stadium 0: normalna

I: nagromadzenia komórek jednojądrowych w przestrzeniach okołonaczyniowych

II: zatarcie prążkowanej struktury miocytów, nacieki między włóknami mięśniowymi

III: zanik struktury włókien mięśniowych, większe nacieki

IV: martwica

Pęczek naczyniowo-nerwowy –

stadium 0: normalna

I: marginizacja komórek jednojądrowych w tętnicach i żyłach, pojedyncze duże komórki między włóknami nerwowymi

II: nacieki okołonaczyniowe, licznie duże komórki między włóknami nerwowymi, rozszerzone naczynia limfatyczne

III: zakrzep naczyń, gęste nacieki okołonaczyniowe i w nerwie, zamknięte bezkomórkową masą naczynia limfatyczne

IV: martwica struktur naczyniowych, fragmentacja włókien nerwowych

Szpicz kostny –

stadium 0: normalna

I: zwiększona gęstość komórek, łatwe do odróżnienia różne typy komórek

II: częściowa deplecja

III: nieliczne komórki szpikowe, przewaga małych komórek jednojądrowych, przyrost liczby fibroblastów

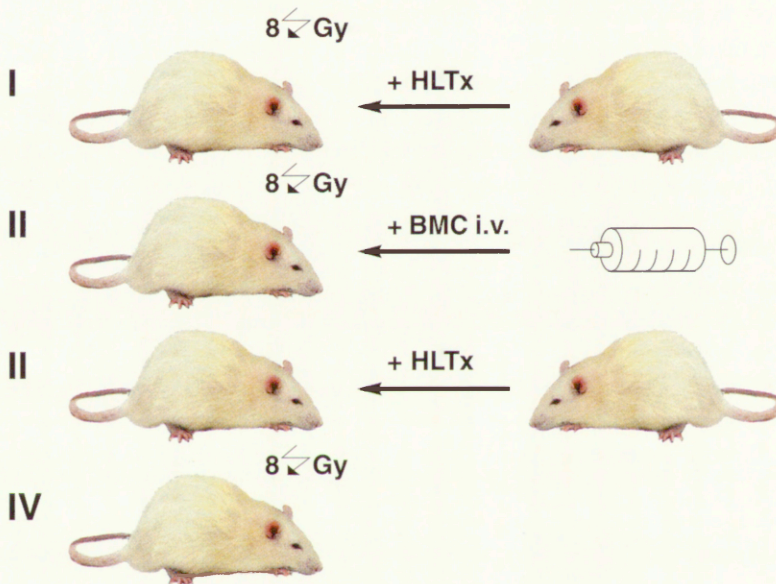
IV: całkowite zatarcie struktury komórkowej szpiku, rozrost fibroblastów

Metody statystyczne

Porównywania wyników grup dokonywano posługując się testem Mann'a-Withney'a. Obliczenia wykonywano za pomocą pakietu statystycznego Statistica or Windows v. 5.1. firmy Statsoft, przyjmując za poziom istotności $p < 0.05$. Dodatkowe informacje dotyczące stosowanej metody statystycznej podano przy przedstawianiu danych w poszczególnych grupach doświadczeń.

Wyniki

Zasiedlanie szpiku kostnego i narządów limfatycznych biorców przeszczepów syngenicznych kończyn nie poddawanych napromienianiu



Ryc. 6. Schemat grup doświadczalnych dla badania repopulacji naświetlonego i nie naświetlonego biorcy syngenicznego HLTx

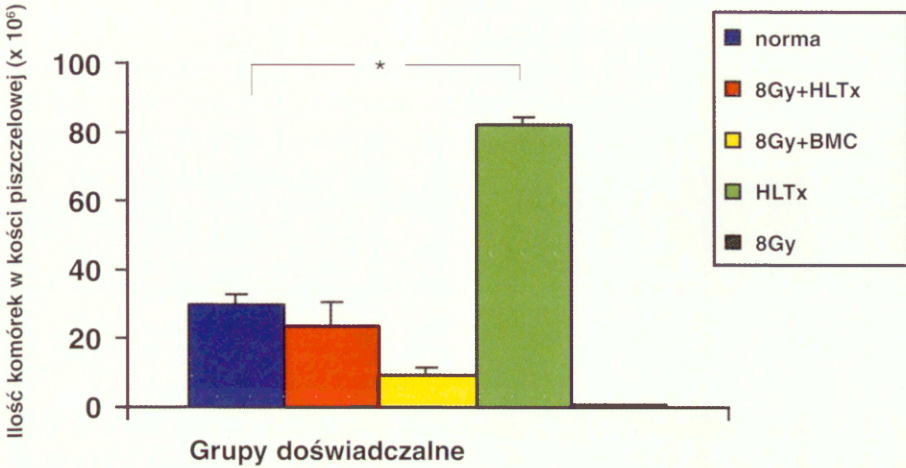
Kończyna była przeszczepiana nie napromienianym syngenicznym biorcom.

W następujących grupach:

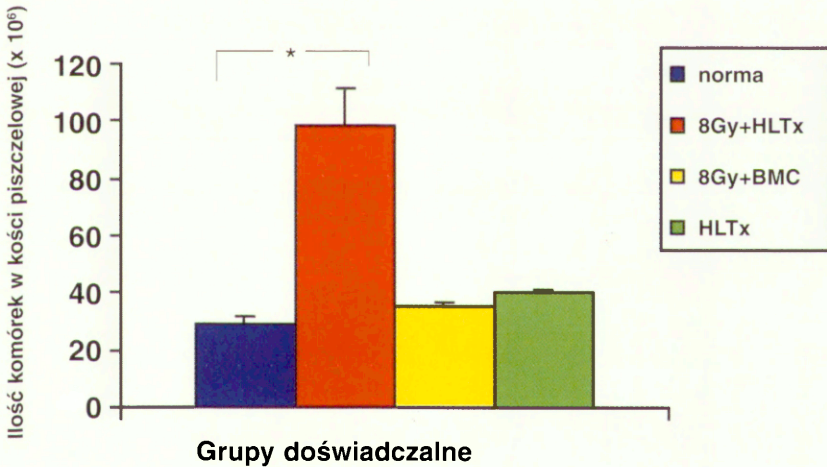
1. HLTx

oraz kontrole:

2. rzekomy przeszczep kończyny bez przerwania ciągłości naczyń,
 3. 4 cm rana skórna grzbietu,
 4. przeszczep wolnego fragmentu skóry odpowiadający wielkością powierzchni skóry kończyny do jamy otrzewnej.
- Okres obserwacji wynosił 10 i 30 dni.



Ryc. 7. Ilość komórek szpiku w kości piszczelowej biorcy w 10 dni po HLTx w grupach kontrolnych. Wartości średnie \pm SD, n=5. Statystycznie wyższa liczba komórek w grupie po HLTx niż w grupach pozostałych (*p<0,05, test Mann'a-Withney'a) (55)



Ryc. 8. Ilość komórek szpiku w kości piszczelowej biorcy w 30 dni po HLTx i w grupach kontrolnych. Wartości średnie \pm SD, n=5. Liczba komórek w grupie po HLTx powróciła do wartości w grupie normalnej (*p<0,05, test Mann'a-Withney'a) (55)

Po 10 dniach obserwacji liczba komórek szpiku kości piszczelowej biorcy była statystycznie większa w grupach HLTx i kontrolach 2, 3 i 4 i w porównaniu ze zwierzętami bez przeszczepu i osiągnęła w grupie HLTx poziom prawie trzykrotnie wyższy niż w normie ($p < 0.05$) (ryc. 7). W grupie HLTx przeciętna liczba komórek/kość piszczelowa biorcy wynosiła powyżej 80×10^6 podczas gdy w grupach 2, 3 i 4 nie przekraczała 40×10^6 ($p < 0,05$).

Odsetek komórek szeregu erytroidalnego szpiku osiągał po 10 dniach prawidłowe wartości. W porównaniu do zwierząt kontrolnych obserwowano większy odsetek neutrofilii segmentowanych i mniejszy odsetek form młodszych i metamielocytów ($p < 0.05$) (tabela 2). Obniżony był poziom limfocytów ($p < 0.05$) (tabela 2) w tym limfocytów pomocniczych (tabela 4). Po 30 dniach dochodziło do

Tabela 2. Subpopulacje BMC w kości piszczelowej biorcy w 10 dni po przeszczepieniu kończyny (55)

	Norma	∓HLTx	∓BMC i.v.	HLTx	∓No.Tx
Linia Erytroidalna					
Pronormoblasty	1.4±0.6	1.9±0.8	1.8±0.6	1.1±0.3	1.6±1.6
Wczesne normoblasty	23.3±3.5	32.4±9.9	33.0±91.2	24.5±5.2	22.4±7.6
Pośrednie normoblasty	9.2±2.5	12.0±3.7	16.5±8.1	13.1±4.5	7.2±1.6
Późne normoblasty	0.8±0.5	0.6±0.6	0	0.6±0.8	0.8±0.3
Figury mitotyczne	0.8±0.6	1.2±0.4	0.8±0.3	1.1±0.5	0.4±0.5
Linia Myeloidalna					
Myeloblasty	2.2±0.9	4.2±2.9	3.4±1.7	4.2±1.1	2.5±0.9
Promyelocyty	6.7±0.8	6.7±2.4	7.6±3.4	5.0±2.1	16.1±3.9
Myelocyty	8.0±3.6	7.4±1.0	7.7±2.9	7.0±4.7	15.5±4.0
Metamyelocyty	10.8±1.3	6.5±2.0	7.2±1.9	6.2±3.4 *	6.5±1.4
Młode neutrofile	12.2±1.5	8.1±5.3 **	6.2±1.7	7.5±2.5 *	1.6±1.1
Segmentowane neutrofile	9.3±3.9	6.1±2.8	6.7±3.0	12.5±2.7 *	3.8±3.4
Eosinofile	1.2±0.6	1.9±1.6	0.6±0.6	3.3±1.7	0.6±0.3
Basofile	0	0	0	0	0
Monocyty	1.4±1.5	0.7±1.2	0.9±0.8	1.9±0.9	0.1±0.1
Komórki tuczne	1.5±0.7	0.4±0	0.3±0.1	0.8±0.4	1.2±1.1
Komórki siateczki	0.2±0.2	0.4±0.4	0	0.3±0.1	5.3±2.8
Figury mitotyczne	0.3±0.1	0.5±0.1	0.3±0.1	0.4±0	0.6±0.6
Linia Limfoidalna					
Limfocyty	9.2±4.3	6.6±3.3 **	3.5±1.4	1.9±0.9 *	3.8±1.8
Komórki plazmatyczne	2.1±0.1	0.8±0	0.8±0.5	1.4±0.6	8.6±9.2
Megakaryocyty	0.2±0.3	0	0	0	0
Całkowita liczba komórek/kość piszczelowa	29.3±2.2x10 ⁶	23.3±7.4x10 ⁶ *	9.5±2.3x10 ⁶ *	82.4±2.1x10 ⁶ *	0.5±0.3x10 ⁶

* HLTx, ∓BMC i.v. vs norma $p < 0.05$ (Mann-Withney)

** ∓HLTx vs norma $p < 0.05$

Tabela 3. Subpopulacje BMC w kości piszczelowej biorcy w 30 dni po przeszczepieniu kośćczyny (w %) (55)

	Norma	∓HLTx	∓BMC i.v.	HLTx
Linia Erytroidalna				
Pronormoblasty	1.4±0.6	0.9±0.7	1.0±0.1	1.7±0.8
Wczesne normoblasty	23.3±3.5	26.5±8.1	25.4±2.1	22.9±5.3
Pośrednie normoblasty	9.2±2.5	15.9±4.5	11.0±2.7	11.6±2.6
Późne normoblasty	0.8±0.5	0.1±0.1	0.3±0.3	0.6±0.9
Figury mitotyczne	0.8±0.6	0.4±0.6	0.9±0.6	1.6±0.3
Linia Myeloidalna				
Myeloblasty	2.2±0.9	2.0±0	4.8±0.3	4.1±1.5
Promyelocyty	6.7±0.8	5.9±2.4	9.2±3.8	6.9±2.1
Myelocyty	8.0±3.6	7.5±3.1	7.6±2.6	7.8±1.0
Metamyelocyty	10.8±1.3	7.1±2.4	5.2±0.5	5.3±0.4
Młode neutrofile	12.2±1.5	7.7±0.5	7.3±1.4	6.8±1.1
Segmentowane neutrofile	9.3±3.9	13.9±3.3	11.6±2.1	15.7±3.5
Eosinofile	1.2±0.6	1.0±0.3	1.1±0.8	3.0±1.0
Basofile	0	0	0	0
Monocyty	1.4±1.5	0.1±0.1	4.5±3.2	2.9±0.7
Komórki tuczne	1.5±0.7	0.6±0.3	0.3±0.3	0.1±0.1*
Komórki siateczki	0.2±0.2	0.5±0.5	0	0*
Figury mitotyczne	0.3±0.1	0.5±0.1	0.3±0.1	0.4±0
Linia Limfoidalna				
Limfocyty	9.2±4.3	8.1±3.7	9.6±4.0	6.4±2.9
Komórki plazmatyczne	2.1±0.1	0.6±0	1.1±0.3	1.6±0.3
Megakaryocyty	0.2±0.3	0	0	0
Całkowita liczba komórek/kość piszczelowa	29.3±2.2x10 ⁶	98.2±13.2x10 ⁶ **	35.2±1.8x10 ⁶	40.2±1.3x10 ⁶

* HLTx vs norma $p < 0.05$ (Mann-Withney)

** ∓HLTx vs norma $p < 0.05$

Tabela 4. Fenotypy BMC w kości piszczelowej biorcy w 10 dni po przeszczepieniu kośćczyny syngenicznego dawcy (w %)

	Norma	∓HLTx	∓BMC i.v.	HLTx
OX7	26.0±3.6	19.4±1.9	22.1±1.3	20.6±2.7
W3/13	47.9±3.9	44.7±0.8	36.8±1.5 *	48.3±5.4
W3/25	5.1±1.3	5.2±3.2	4.3±0.9	2.8±0.6 **
OX 8	5.8±1.7	4.2±1.8	6.5±0.5	3.8±1.5
OX 6	6.9±1.1	5.5±0.7	4.1±1.6	5.3±1.4
OX 39	0.6±0.9	0.1±0.2	0	0
OX 17	3.1±0.8	3.2±2.1	2.6±1.3	1.2±1.2
OX 19	1.5±0.7	1.1±0.5	0.5±0.7	0.9±0.7

* ∓HLTx vs ∓BMC i.v. $p < 0.05$ (Mann-Withney)

** HLTx vs pozostałe $p < 0.05$

Tabela 5. Fenotypy BMC w kości piszczelowej biocy w 30 dni po przeszczepieniu kończyny syngenicznego dawcy (w %)

	Norma	ϕHLTx	ϕBMC i.v.	HLTx
OX7	26.0±3.6	35.9±5.1*	30.2±4.7	16.6±1.6***
W3/13	47.9±3.9	38.1±1.3**	33.5±2.0**	47.6±0.4
W3/25	5.1±1.3	5.1±2.0	3.5±1.5	3.6±1.2
OX 8	5.8±1.7	2.6±1.0**	0.6±0.4 **	4.4±0.2
OX 6	6.9±1.1	6.2±0.5	5.5±2.0	3.9±0.2
OX 39	0.6±0.9	0**	0**	1.2±1.2
OX 17	3.1±0.8	1.3±0.2**	1.2±0.2**	2.6±0.4
OX 19	1.5±0.7	0.3±0.2**	0**	1.5±0.7

* ϕHLTx vs norma $p < 0.05$ (Mann-Whitney)

** ϕHLTx, ϕBMC i.v. vs norma, HLTx $p < 0.05$

*** ϕHLTx vs pozostałe grupy $p < 0.05$

zmniejszenia puli komórek szpiku, jednak obserwowane wartości były i tak wyższe niż u zwierząt bez przeszczepu ($p < 0.05$) (ryc. 8)(tabela 3). W tym punkcie czasowym odsetek komórek linii mieloidalnej i limfocytów powracał do wartości prawidłowych. Stosunkowo niski był poziom komórek OX7 (tabela 5). Obniżony był poziom komórek tucznych i plazmatycznych. Waga i pula komórkowa śledziony i węzłów chłonnych krezkowych nie różniła się od wartości kontrolnych. Nie obserwowano zmian w populacjach komórek krwi obwodowej.

Zasiedlanie szpiku kostnego i narządów limfatycznych biocyów przeszczepów syngenicznych kończyn poddawanych napromienianiu

Zasiedlanie szpiku kostnego i narządów limfatycznych biocy po przeszczepieniu kończyny wraz ze szpikiem badano u syngenicznych napromienianych dawką 8Gy (TBI) szczurów szczepu LEW w następujących grupach:

1. ϕHLTx,
 2. ϕBMC i.v.,
 3. u zwierząt poddanych tylko TBI.
- Okres obserwacji wynosił 10 i 30 dni.

Całkowita odnowa jam szpikowych u biocyów ϕHLTx była obserwowana już 10 dnia, podczas gdy w grupie otrzymujących ϕBMC i. v. odnowa komórek szpiku 10 dnia była jeszcze niekompletna ($p < 0.05$) (tabela 2). Ilość komórek w gru-

pie φ HLTx nie różniła się od ilości u zwierząt normalnych. Była ona jednak dwukrotnie większa niż w grupie zwierząt otrzymujących φ BMC i. v. ($p < 0.05$) (tabela 2). Średni odsetek neutrofilów oraz limfocytów był niższy w porównaniu do odpowiednich wartości w grupie kontrolnej ($p < 0.05$). Ilość komórek szpiku w kości piszczelowej była w grupie φ HLTx zbliżona do wartości prawidłowych (ryc. 7) (tabela 2).

Po 30 dniach ilość komórek szpiku w kości piszczelowej biorcy wzrosła w grupie φ HLTx powyżej wartości z dnia 10 ($p < 0.05$) (ryc. 8) (tabela 3) i była większa od wartości dla grup φ BMC i.v. i zwierząt bez przeszczepu ($p < 0.05$). Nie obserwowano różnic w składzie komórkowym szpiku pomiędzy grupami φ HLTx i φ BMC i.v. i zwierzętami bez przeszczepu (tabela 3). Natomiast wzrostowi uległ procent komórek OX7, a obniżeniu W3/13, OX8, OX39, OX17 i OX19 ($p < 0.05$) (tabela 5).

Zasiedlanie węzłów chłonnych krezkowych (MLN)

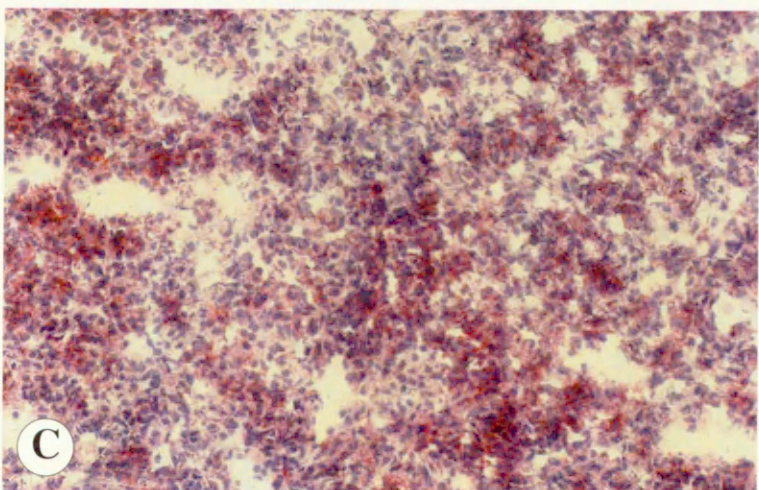
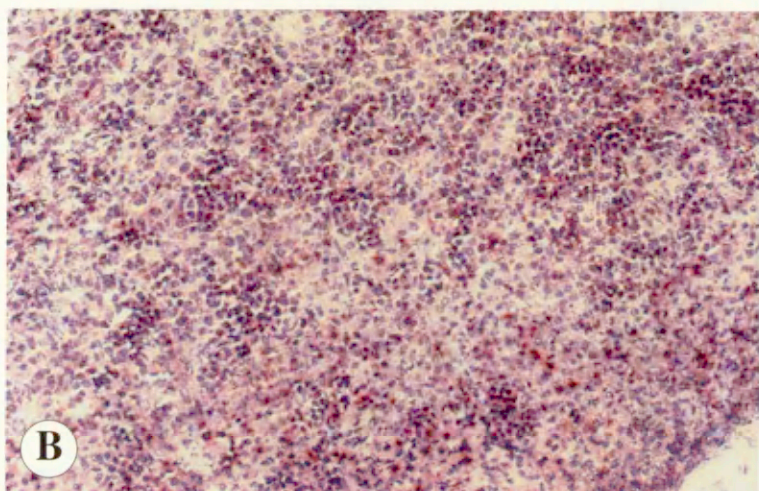
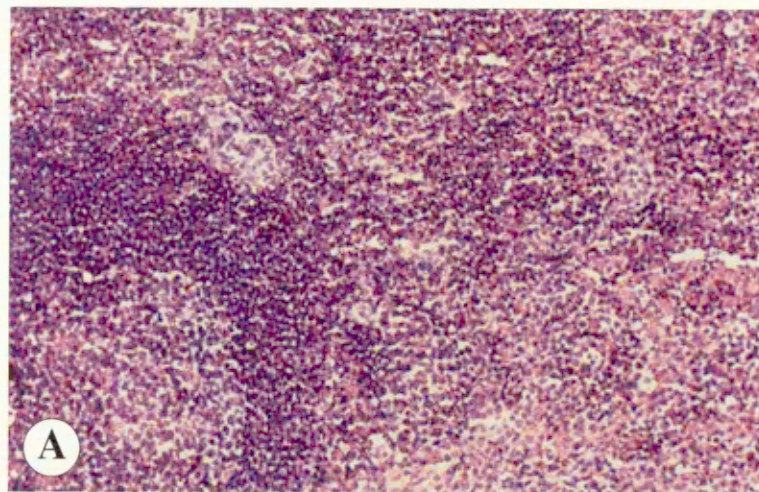
Liczba komórek MLN w grupie φ HLTx była 10 dnia po przeszczepieniu znacząco niższa niż u szczurów z grupy kontrolnej ($p < 0.05$), lecz wyższa niż w grupie φ BMC i.v. ($p < 0.05$). Ocena fenotypu populacji komórek MLN za pomocą przeciwciał anty CD90, CD43, CD4, CD8 i SIg nie wykazała różnic pomiędzy grupami zwierząt kontrolnych i φ HLTx. Liczba komórek CD43 i CD4 była nieznacznie mniejsza w grupie φ BMC i.v. ($p < 0.05$) (36,55).

Ocena histologiczna komórek w zasiedlanych narządach limfatycznych u napromieniowanych biorców

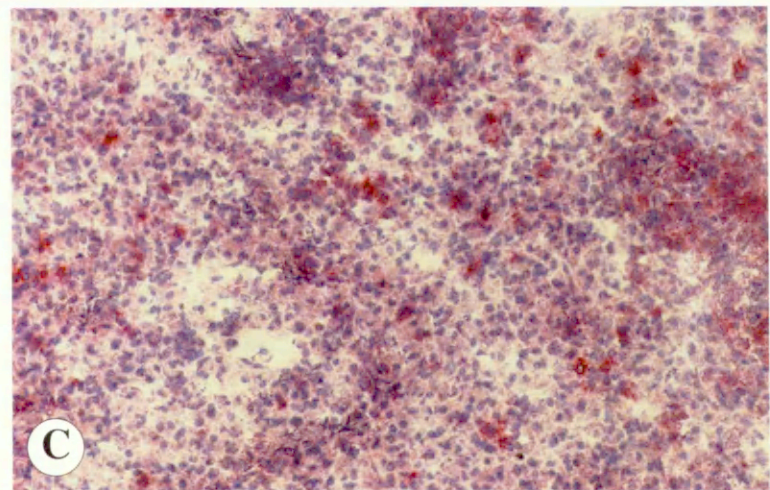
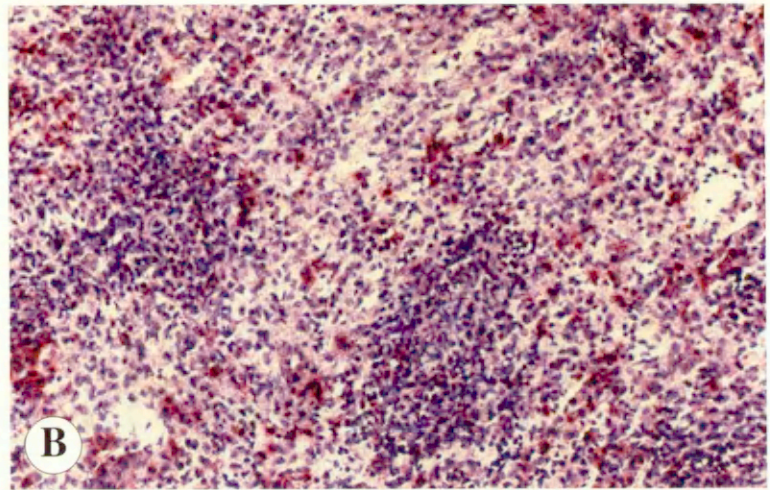
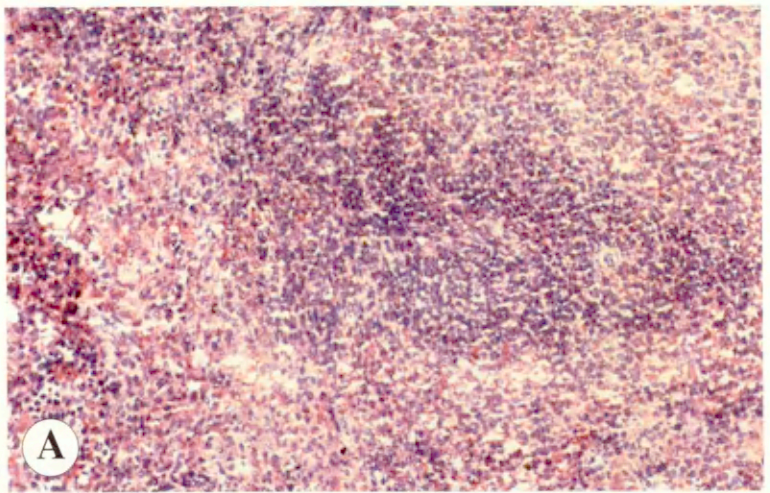
Ocena histologiczna grasicy, śledziony i węzłów chłonnych krezkowych u biorców φ HLTx wykazała, że w 10 dniu po przeszczepieniu nastąpiło całkowite przywrócenie architektury komórkowej w tych narządach (Fig. 9A, B, C, 10A, B, C), podczas gdy w grupie po φ BMC i.v. w narządach tych nadal obserwowano niedobór limfocytów oraz ogniskową martwicę i wylewy. W początkowej fazie odnowa komórek T następowała głównie w strefie przykorowej węzłów chłonnych krezkowych i w strefie okołonaczyniowej miazgi czerwonej śledziony. Odnowa komórek B w ośrodkach rozmnażania węzłów chłonnych krezkowych i w miazdze białej śledziony była mniej wyraźna. W 30 dniu po przeszczepieniu w obrazie histologicznym obserwowano pełną odnowę.

Dystrybucja komórek szpiku kostnego uwalnianych z φ HLTx

Aby prześledzić topograficzną dystrybucję komórek szpiku uwolnionych po φ HLTx komórki szpiku kostnego zawarte w kości zostały wyznakowane ^{51}Cr i przeszczepione z kończyną syngenicznemu biorcy (166). Dokonywano także φ BMC i.v. znakowanych ^{51}Cr . W obu grupach obserwowano dużą kumulację radioaktywnych komórek w szpiku kostnym biorcy. Wysoki poziom radioaktywności wykazywały także jelita, śledziona, węzły chłonne krezkowe i wątroba. Sposób



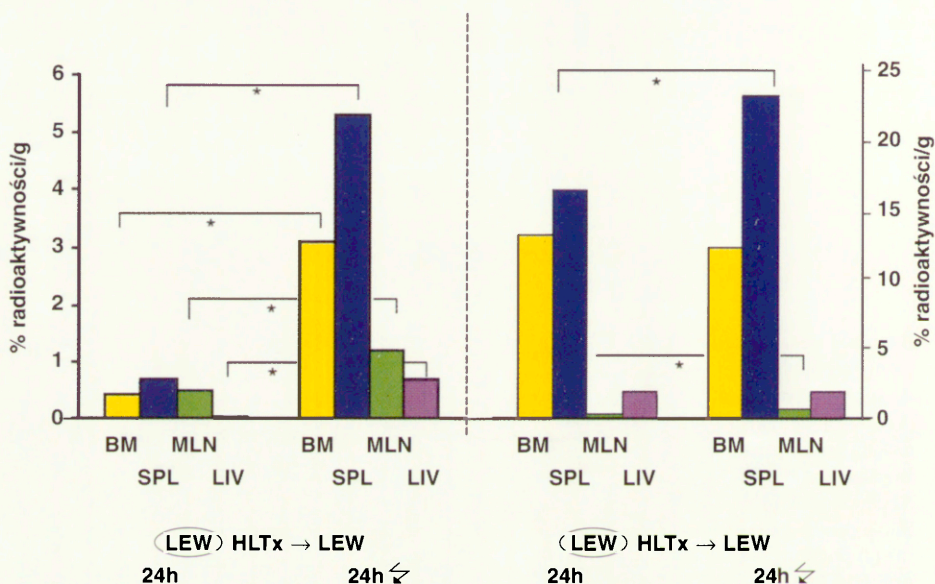
Ryc. 9. Obraz histologiczny repopulowanych węzłów chłonnych krezkowych w 10 dniu po przeszczepieniu syngenicznej kończyny naświetlanemu biorcy. **A.** Obraz po HLTx, **B.** Dla porównania obraz po podaniu dożylnym BMC (BMC i.v.), **C.** Obraz po naświetlaniu biorcy bez HLTX lub BMC i.v. Poza normalną strukturą węzła w A w porównaniu z B i C widoczne są limfocyty W3/13+. Świadczy to o aktywnym procesie repopulacji. Barwienie monoklonalnym przeciwciałem przeciw W3/13 oraz hematoksyliną, x200.



Ryc. 10. Obraz histologiczny repopulowanej śledziny w 10 dniu po przeszczepieniu syngenicznej kończyny naświetlanemu biorcy. A. Obraz po HLTx, B. dla porównania obraz po podaniu dożylnym BMC (BMC i.v.), C. Obraz po naświetlaniu biorcy bez HLTx lub BMC i.v. Poza normalną strukturą śledziny w A w porównaniu z B i C widoczne są limfocyty W3/13+, co świadczy o aktywnym procesie repopulacji podobnie jak w węzłach chłonnych. Barwienie monoklonalnym przeciwciałem przeciw W3/13 oraz hematoksyliną, x200.

Tabela 6. Dwudziestoczerogodzinna dystrybucja BMC po BMC i.v. oraz HLTx u biorcy naświetlanego 8Gy. Średnia z liczby BMC w tysiącach/gram \pm SD, n=5 (obliczenie liczby komórek oparte na radioaktywności jednej komórki, 5×10^7 podanych BMC w obu grupach)

Tkanka	BMC i.v.	HLTx
Jelito	140 \pm 65	2.4 \pm 20
Sledziona	14100 \pm 4440	42.4 \pm 29.2
Wątroba	1090 \pm 205	11.8 \pm 4.0
MLN	720 \pm 920	26.7 \pm 25.9
Szpilek kostny	6420 \pm 1550	32.4 \pm 13.1

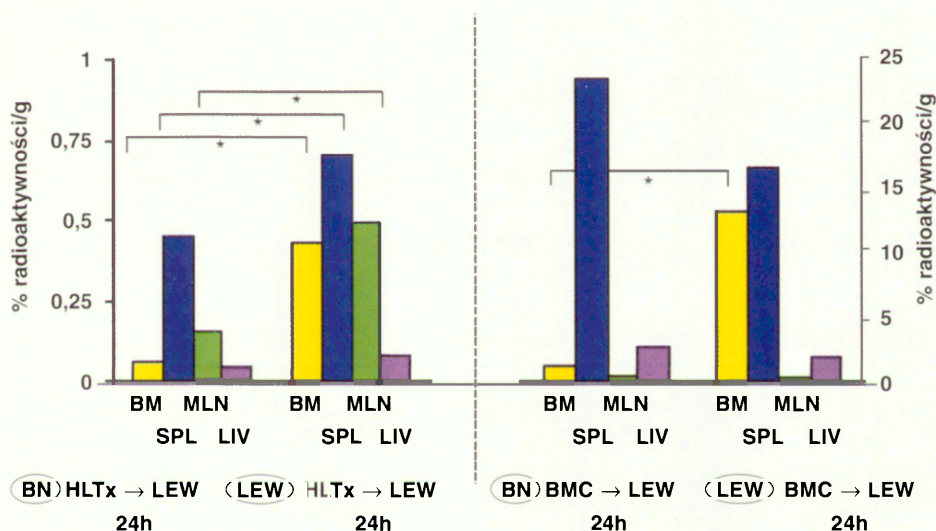


Ryc. 11a. Rozmieszczenie radioaktywności komórek szpiku znakowanych ^{51}Cr , które wyemigrowały z przeszczepionej kończyny (HLTx) w układzie syngenicznym LEW \rightarrow LEW i zatrzymały się u biorcy w szpiku kości piszczelowej (BM), śledzionie (SPL), węzle kręzkowym (MLN) i wątrobie (LIV) po 24 godzinach od przeszczepienia. Porównanie poziomu radioaktywności między nie naświetlanym i naświetlanym biorcą (strzałka). Dla porównania rozmieszczenie po dożylnym podaniu BMC (prawa strona ryciny). Wartości przedstawione jako mediana, n=5. Znamienność statystyczna $*p < 0.05$ (test Mann'a-Withney'a). Niewielki ale znaczący poziom radioaktywności (ilości komórek) po HLTx u nie naświetlanych biorców. Jest on wyraźnie wyższy w grupie naświetlanej. Ten wyższy poziom mógł być następstwem częściowej eliminacji poprzez naświetlanie komórek biorących udział w procesie „niespecyficznego usuwania przeszczepionych komórek szpiku” głównie komórek NK. Dane pokazują jak znaczny procent komórek z przeszczepionego w kończynie szpiku migruje do tkanek biorcy. BMC i.v. dawało znacznie wyższe wartości (inna skala) niż obserwowane po HLTx. Gromadzenie radioaktywności w śledzionie naświetlonych biorców było również wyższe niż u nie naświetlonych

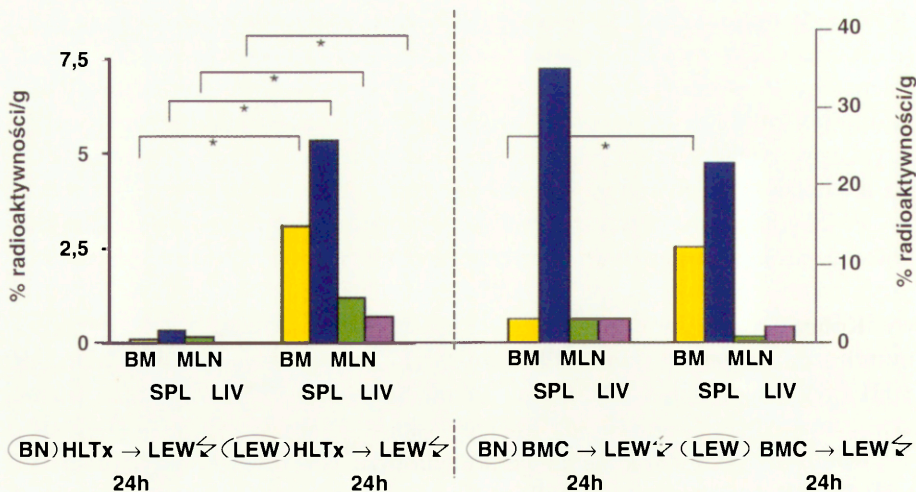
dystrybucji różnił się od dystrybucji limfocytów przewodu pierśowego (TDL) (dane niepublikowane), w którym większość komórek wędrowało do wątroby i śledziony. Prawidłowy szpik kostny zawiera tylko około 10% limfocytów. Wysoki odsetek komórek szpiku gromadzących się w narządach limfatycznych wskazywał, iż w narządach tych osiedlają się nie tylko komórki z szeregu limfoidalnego, ale także z innych szeregów komórek szpiku.

Po 24 godzinach od przeszczepienia syngenicznej kończyny zawierającej znakowane ^{51}Cr komórki szpiku $16.7 \pm 4.0\%$ radioaktywności tych komórek uwalniało się z jam szpikowych i znajdowano ją w szpiku, śledzionie i węzłach krezkowych. Reszta pozostawała w przeszczepie. Trzydzieści do trzystu razy mniej komórek szpiku osiedliło się w szpiku kostnym i narządach limfatycznych biorcy po \leftrightarrow HLTx w porównaniu z \leftrightarrow BMC i.v. (tabela 6).

Mimo to odnowa komórek w śledzionie i węzłach chłonnych krezkowych po \leftrightarrow HLTx była zakończona po upływie 10 dni, podczas gdy w tym czasie szczury otrzymujące komórki szpikowe drogą dożylną miały nie w pełni odtworzone narządy limfatyczne. Nie było różnicy pomiędzy odsetkiem komórek gromadzących



Ryc. 11b. Rozmieszczenie radioaktywności komórek szpiku znakowanych ^{51}Cr , które wyemigrowały z przeszczepionej kończyny (HLTx) w układzie allogenicznym BN → LEW i zatrzymały się u biorcy w szpiku kości piszczelowej (BM), śledzionie (SPL), węzle krezkowym (MLN) i wątrobie (LIV) po 24 godzinach od przeszczepienia. Porównanie poziomu radioaktywności między grupą allogeniczną i syngeniczną (lewa strona ryciny). Dla porównania rozmieszczenie po dożylnym podaniu BMC (prawa strona ryciny). Wartości przedstawione jako mediana, n=5. Znamienność statystyczna *p<0.05 (test Mann'a-Witney'a). Niska radioaktywność w grupie allogenicznej w BM, SPL i MLN. Wynika ona zapewne z tzw. „allogeneic lymphocyte elimination” obserwowanego wyraźniej u gryzoni niż człowieka. BMC i.v. dawało znacznie wyższe wartości (inna skala) niż obserwowane po HLTx. Dotyczyło to w szczególności BM



Ryc. 11c. Rozmieszczenie radioaktywności komórek szpiku znakowanych ^{51}Cr , które wyemigrowały z przeszczepionej kończyny (HLTx) w układzie allogenicznym BN \rightarrow LEW i zatrzymały się u naświetlonego biorcy w szpiku kości piszczelowej (BM), śledzionie (SPL), węzle krezkowym (MLN) i wątrobie (LIV) po 24 godzinach od przeszczepienia. Porównanie poziomu radioaktywności między grupą allogeniczną i syngeniczną (lewa strona ryciny). Dla porównania rozmieszczenie po dożylnym podaniu BMC (prawa strona ryciny). Wartości przedstawione jako mediana, $n=5$. Znamienność statystyczna $p < 0.05$ (test Mann'a-Withney'a). Poziom radioaktywności u naświetlanego allogenicznego biorcy był niski ale wyraźny, znamiennie niższy niż u biorcy syngenicznego. Dotyczyło to wszystkich badanych tkanek. BMC i.v. dawało znacznie wyższe wartości (inna skala) niż obserwowane po HLTx. Dotyczyło to w szczególności śledziony

się w szpiku po upływie 4 i 24 godzin od zabiegu przeszczepienia komórek. Było to prawdopodobnie związane z brakiem właściwości migracyjnych komórek hemopoetycznych. Procent radioaktywności (komórek) szpiku uwolnionych z przeszczepu i zatrzymujących się w narządach limfatycznych był większy u syngenicznych naświetlanych niż nie-naświetlanych biorców (ryc. 11a). Po wykonaniu przeszczepu allogenicznego BN do LEW procent radioaktywności (komórek) szpiku dawcy w narządach biorcy był niższy niż w po przeszczepie w układzie syngenicznym (ryc. 11b). Przeszczep allogeniczny BN do naświetlonego biorcy LEW również charakteryzował się niską radioaktywnością w narządach biorcy w porównaniu z obserwowaną w układzie syngenicznym (ryc. 11c)

Wzór dystrybucji radioaktywności po HLTx różnił się zasadniczo od BMCi.v. W tym ostatnim podane dożylnie komórki rozmieszczały się także poza narządami limfatycznymi jak płuca i skóra. Potrzebna była także znacznie większa niż po HLTx ilość BMC do rekonstrukcji szpiku biorcy (48,50).

Obrazy odrzucania allogenicznego przeszczepu kończyny wraz ze szpikiem kostnym u biorców leczonych i nieleczonych immunosupresyjnie

Czas przeżycia przeszczepów

Wydłużenie przeżycia przeszczepu kończyny wraz ze szpikiem kostnym u biorców leczonych i nieleczonych immunosupresyjnie.

Kończyna BN przeszczepiona nie poddawana immunosupresji uprzednio naświetlanemu osobnikowi LEW przeżywała 17.3 ± 5.0 dni (kontrola 8.4 ± 6.0) ($p < 0.05$) (tabela 7). W 14–15 dniu pojawiał się obrzęk skóry przeszczepionej kończyny, w dniu 17 przybierała ona niebieskawe zabarwienie. Wolne płaty skórne przeszczepione w modelu allogenicznym przeżywały 7 ± 1 dni, zaś przeszczepy serca 7 ± 1 dni. Naświetlana allogeniczna przeszczepiana kończyna przeżywała 10.2 ± 1.6 dni (tabela 7). U allogenicznych biorców otrzymujących CsA lub FK 506 przeszczep kończyny przeżywał 30 dni bez objawów odrzucania, szczególnie dotyczyło to biorców leczonych FK506, u których nie obserwowano zmian w skórze.

W celu sprawdzenia czy HLTx będzie miał tolerancyjny wpływ na przeżycie alloprzeszczepu, a więc wydłużał czas przeżycia przeszczepu allogenicznej skóry

Tabela 7. Czasy przeżycia przeszczepów kończyny i przeszczepów dodatkowych przy różnych protokołach immunosupresji (średnie \pm SD, 5 zwierząt w grupie)

Grupa	Przeszczep kończyny*	Przeszczepy dodatkowe*		Immunosupresja	Czas przeżycia (dni)	
		skóry	serca		kończyny	skóry/serca
1	+	-	-	-	8.4 ± 0.6	-
2	+	-	-	** ↙kończyny	10.2 ± 1.6	-
3	+	-	-	CsA 30	³⁰ 9.2 ± 1.5^{IV}	-
4	+	+	-	CsA 30	³⁰ 9.2 ± 1.5^{IV}	17 ± 14^{IV}
5	+	-	+	CsA 30	³⁰ 9.2 ± 1.5^{IV}	32 ± 10^{IV}
6	+	+	-	-	9.0 ± 1.0	9.0 ± 1
7	+	--	-	↙biorcy	17.3 ± 5.0	-
8	+	-	+	FK506 30	30	30
9	+***	-	-	-	>300	-

* BN → LEW

** ↙naświetlanie 8 Gy

*** LEW → LEW

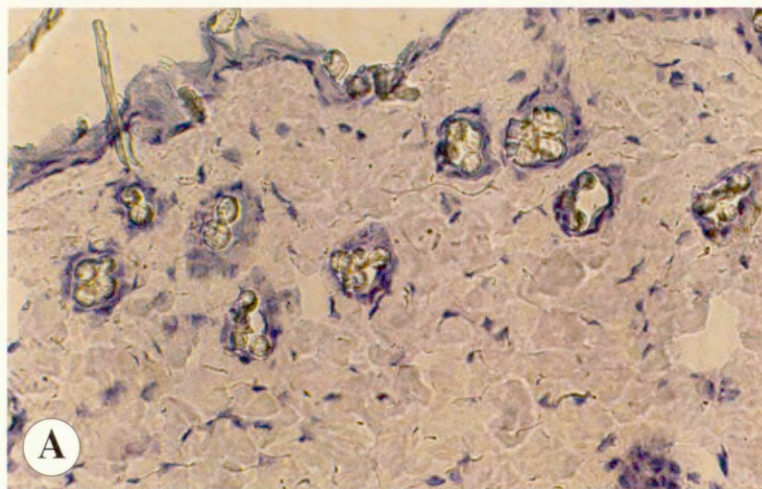
^{IV} po odstawieniu CsA

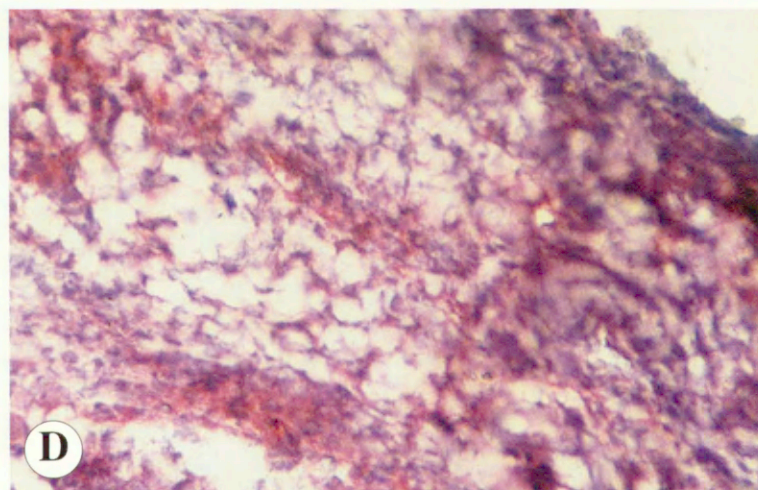
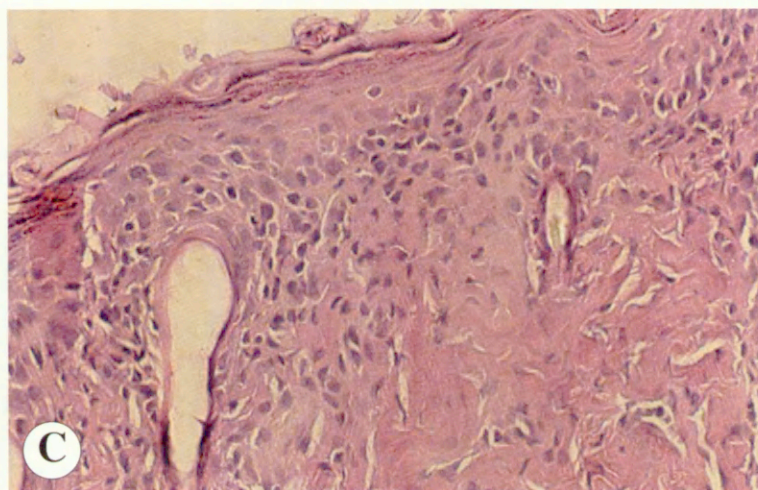
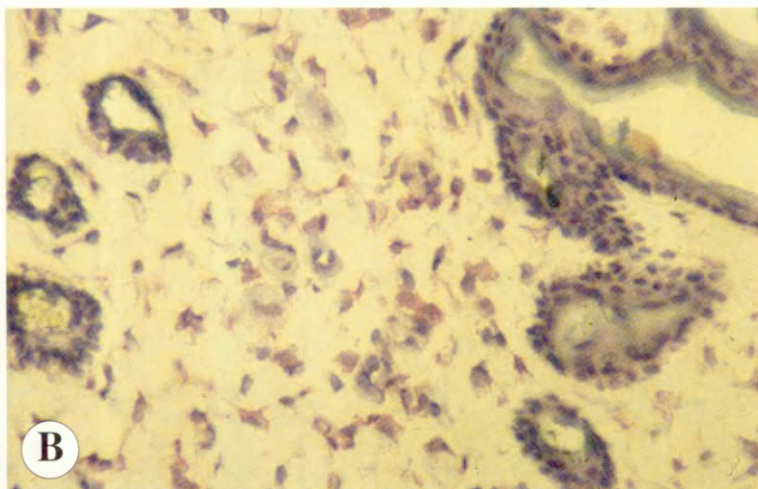
i serca, kończyna osobnika BN była, równocześnie z wolnym płatem skórny lub sercem BN, przeszczepiana szczeruowi LEW. CsA była podawana przez 30 dni. Nie obserwowano nacieków w przeszczepie wolnego płata skórny. Przeszczepy skórny obkurczyły się i częściowo zwłókniały jednak włosy obecne w przeszczepach pozostały nie zmienione. Po zaprzestaniu podawania CsA przeszczep skóry przeżywał 17 ± 14 dni, zaś serca 32 ± 10 dni (tabela 7), podczas gdy przeszczepiona kończyna była odrzucana w przeciętnie 9 dni po odstawieniu CsA. Biorąc pod uwagę, iż izolowany przeszczep skóry przeżywał po odstawieniu CsA również jedynie 7 dni, dłuższe przeżycia skóry i serca w modelu HLTX +CsA mogą świadczyć o pewnym tolerogennym wpływie komórek szpiku (dendrytycznych?) na alloprzeszczep. FK506 miała podobny wpływ jak CsA, obserwowano jednak mniej nacieków w badanym przeszczepie.

Ocena histologiczna tkanek przeszczepu allogenicznej kończyny u biorcy nielezonego

Ocena histologiczna przeszczepu allogenicznej kończyny u biorcy nielezonego i lezonego CsA i FK506 (14 dni)

Dokonano oceny histologicznej tkanek oraz szpiku kostnego obecnego w przeszczepionej allogenicznej kończynie (BN → LEW). Skóra ulegała odrzuceniu w 5–7 dniu. Podobne, aczkolwiek mniej nasilone w sensie gęstości nacieków, zmiany obserwowano w mięśniach i wokół pęczka naczyniowo-nerwowego udoowego. Oceniając szpik w kości piszczelowej u biorców nieleczonych był on pierwszego dnia po przeszczepieniu bogatokomórkowy z dużą liczbą megakariocytów.



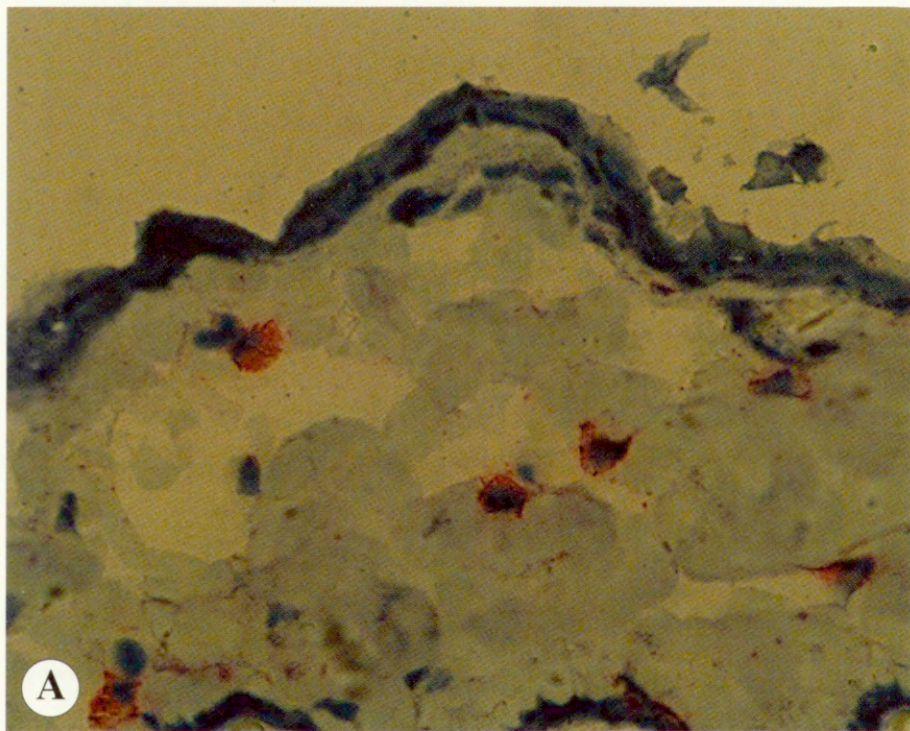


Ryc. 12. Obraz histologiczny skóry przeszczepionej kończyny BN → LEW u biorcy otrzymującego CsA. A. Skóra normalna, B. W 3 dniu po przeszczepieniu widoczne są drobne nacieki komórek jednojądrzastych, C. W 30 dniu po przeszczepieniu obserwuje się przerost naskórka oraz zmiany włókniste w skórze właściwej, D. Skóra kończyny biorcy bez leczenia, pełne odrzucanie w 7 dniu, zatarcie struktury naskórka i skóry

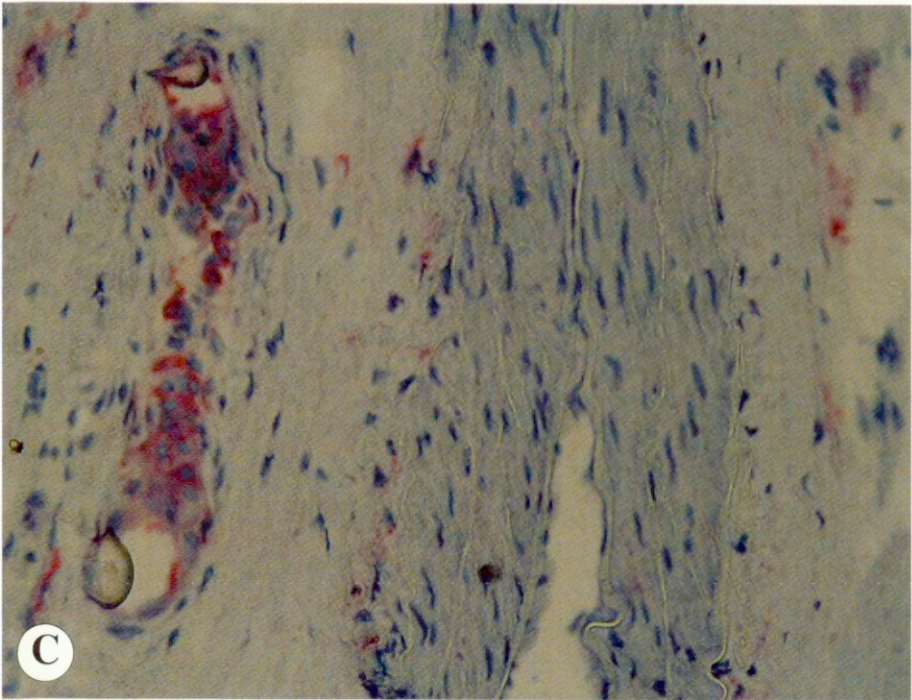
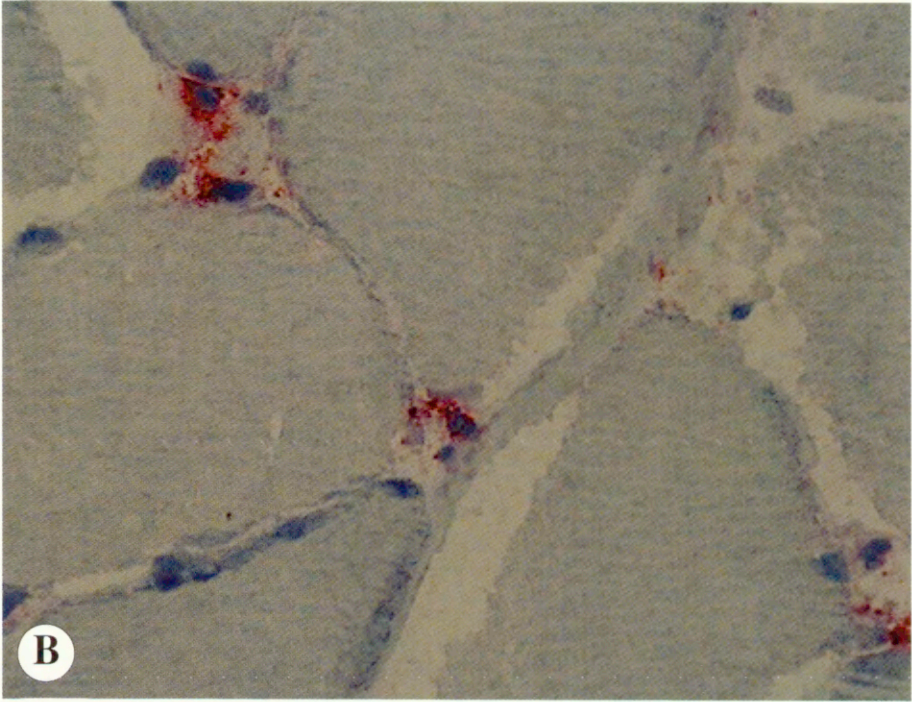
W piątym dniu obserwowano zmniejszenie liczby komórek szpiku kostnego oraz powstawanie skupisk komórek podobnych do limfocytów. Obecne były także bardzo nieliczne erytroblasty i mieloblasty, a także nadal nieliczne megakariocyty. W 14 dniu obserwowano tworzenie się pojedynczych ognisk komórek erytroidalnych i mieloidalnych. Poza tym obecne były skąpe nacieki z mononuklearów poprzedzielane komórkami tłuszczowymi i fibroblastami. Typowe obrazy odrzucania skóry kończyny oraz ich ograniczania podawaniem CsA przedstawiono na ryc. 12.

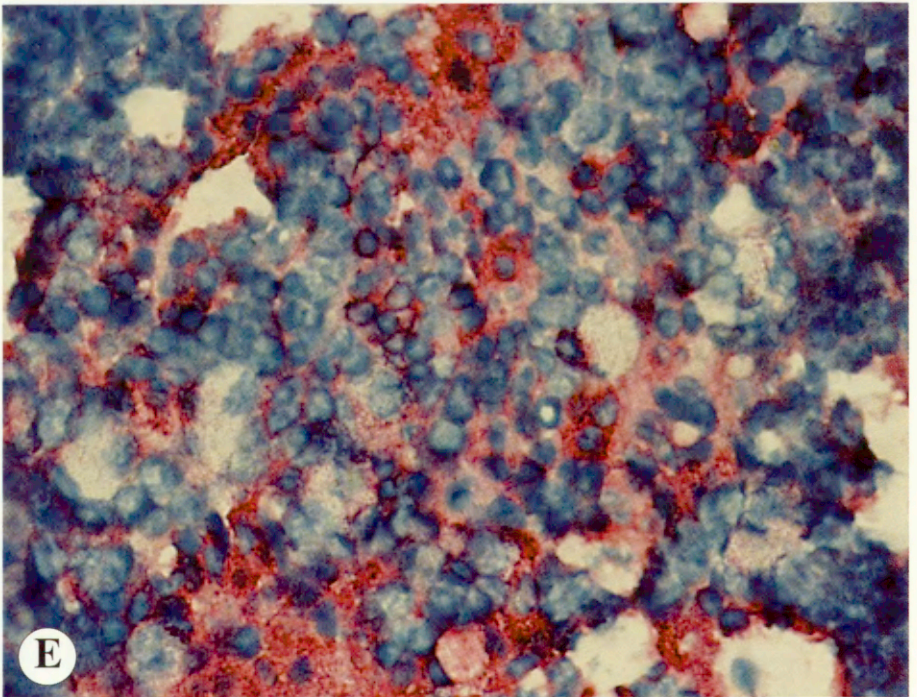
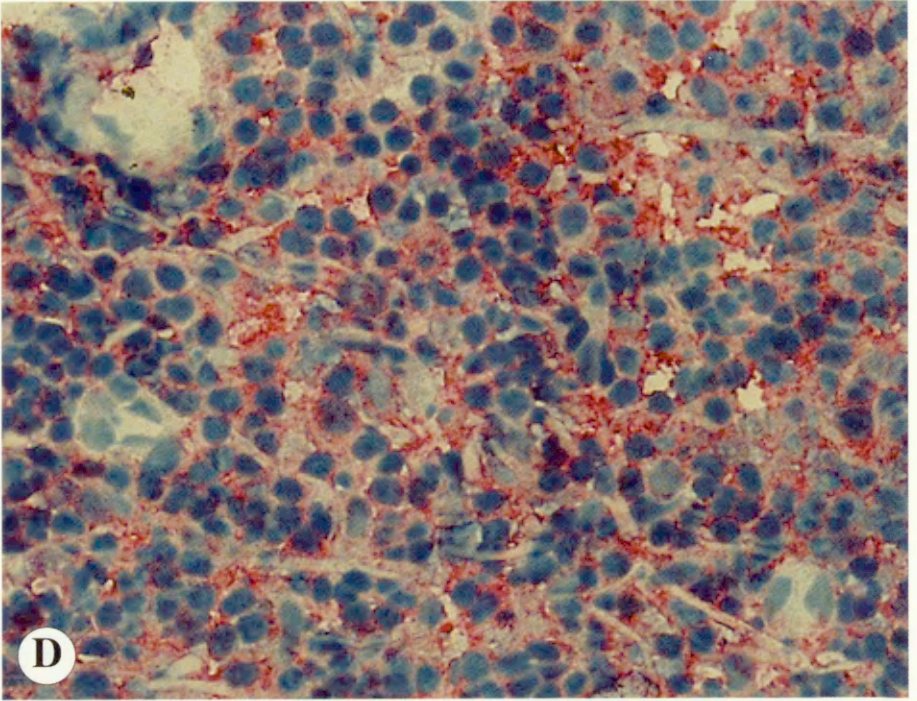
Ocena histologiczna przeszczepu allogenicznej kończyny u biorcy leczonego CsA i FK506 (30 dni)

Biorcom podawano CsA lub FK506 przez 30 dni w dawkach jak opisano w rozdziale Metody. W 30 dniu skóra, mięśnie i pęczki naczyniowe wykazywały niewielkie rozproszone nacieki komórkowe. Nie obserwowano zmian w naskórku. W kończynach biorców leczonych FK506 nacieki były mniejsze niż przy leczeniu



Ryc. 13. Obraz histologiczny skóry (A), mięśni (B), pęczka naczyniowego udowego (C), węzła podkolanowego (D) oraz szpiku (E) przeszczepionej kończyny BN → LEW po 30 dniach podawania FK506. Prawidłowe struktury przeszczepu bez wyraźnych cech odrzucania. Znakowanie na obecność antygenów RTA klasy II (OX6), hematoksylina, x 600

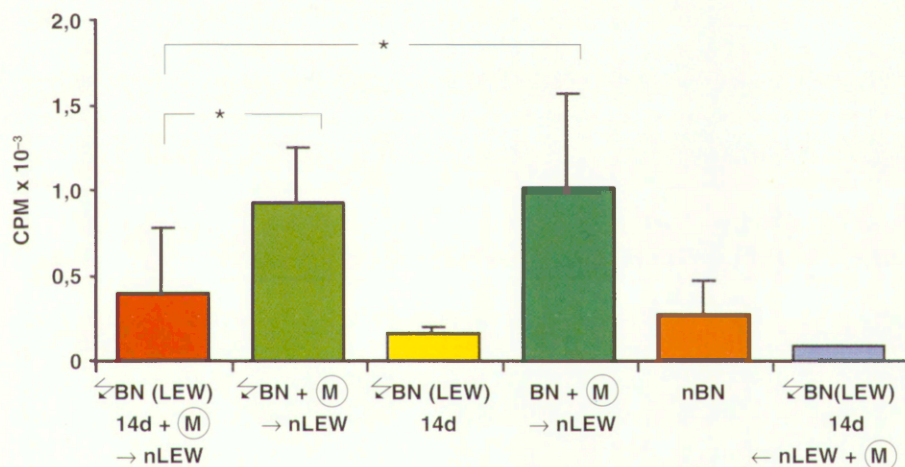




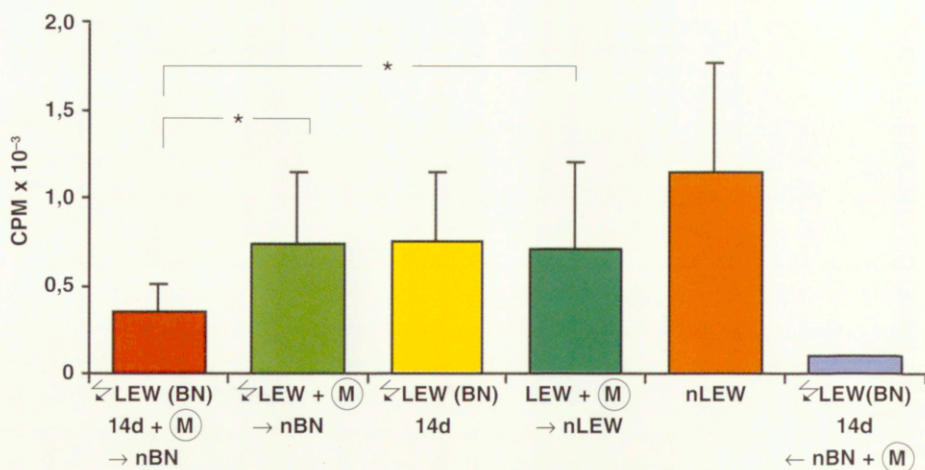
CsA (ryc. 13). W tym czasie jamy szpikowe przeszczepionej kończyny były pełne komórek jednojądrowych bez wyraźnej struktury obserwowanej w normalnym szpiku, prawdopodobnie pochodzących od biorecy. Obecne były także nieliczne niedojrzałe komórki erytroidalne i mieloidalne. Można by podejrzewać, że komórki szpiku kostnego dawcy zostały w większości zastąpione przez szpik biorecy. Nie przeprowadzono analizy różnicowej genotypów komórek dawcy i biorecy.

Odpowiedź biorecy allogenicznego przeszczepu kończyny na antygeny dawcy w mieszanej hodowli limfocytów (MLR)

Wykonane testy mieszanej hodowli komórek mononuklearnych krwi (PBM) biorecy i dawcy allogenprzeszczepu kończyny w różnych zestawieniach zostały przedstawione na ryc. 14a, b). PBM szczepu biorecy (nLEW) odpowiadały w obniżony sposób na antygeny PBM dawcy (↔BN (LEW) 14d + Mitomycyna), który otrzymał przed 2 tygodniami przeszczep kończyny w porównaniu z PBM uprzednio naświetlonego (↔BN + mitomycyna) lub nienaświetlonego (BN + mitomycyna) dawcy bez przeszczepu. PBM dawcy (↔BN (LEW) 14d), który otrzymał allogeniczny przeszczep kończyny nie odpowiadały na pobudzenie PBM biorecy



Ryc. 14a. Mieszana hodowla splenocytów biorecy (odpowiadający) przeszczepu kończyny i dawcy (pobudzający) w kombinacji BN(z kończyną LEW) i normalny LEW. Niski poziom odpowiedzi komórek biorecy pobudzanych komórkami dawcy z 14-dniowym przeszczepem kończyny genotypu biorecy (pierwsza kolumna) w porównaniu z pobudzeniem komórkami osobnika bez przeszczepu kończyny (druga kolumna). Brak odpowiedzi splenocytów dawcy na pobudzenie komórkami biorecy (szósta kolumna). Osobnik, który otrzymał przeszczep kończyny jest słabym respondentem, co zmniejsza szanse wystąpienia GvH. Niewymienione kolumny to kontrole. ↔-naświetlany, M-mitomycyna, n-normalny, strzałki wskazują kierunek pobudzania (n=5, wartości średnie ± SD, test Mann'a-Witney'a, *p<0,05)



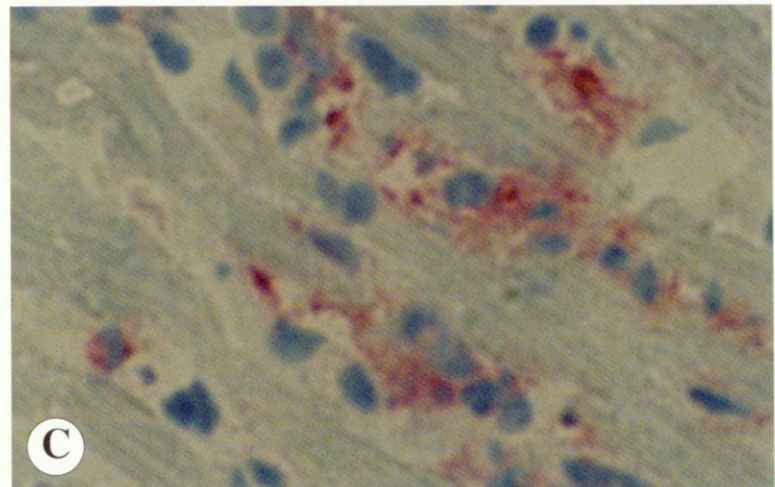
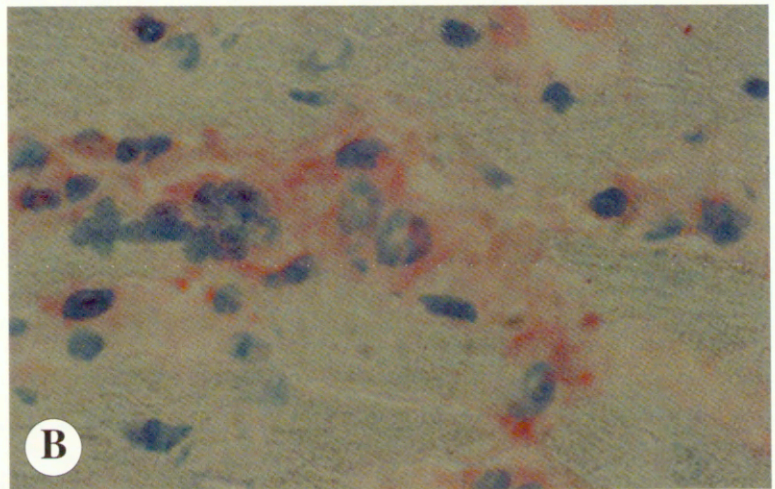
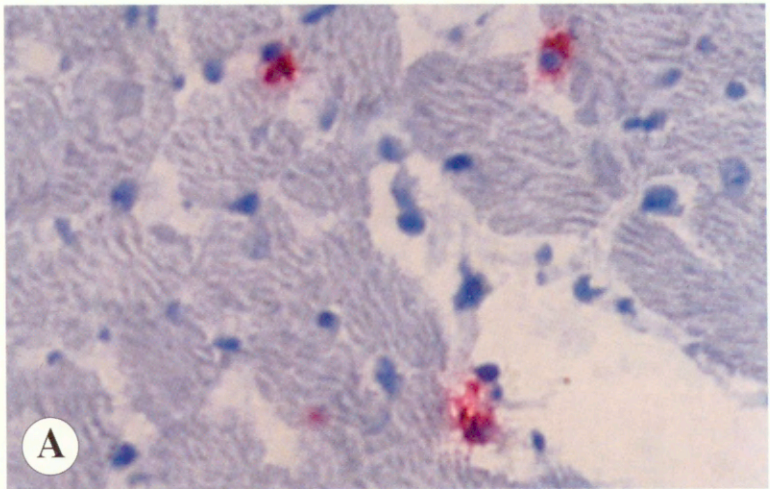
Ryc. 14b. Mieszana hodowla splenocytów jak na rycinie, ale w kombinacji odwrotnej LEW (z kończyną BN) i BN

(nLEW+mitomycyna). Widoczne więc było obniżenie zarówno pobudzających jak i odpowiadających właściwości PBM biorcy przeszczepu kończyn na antygeny dawcy.

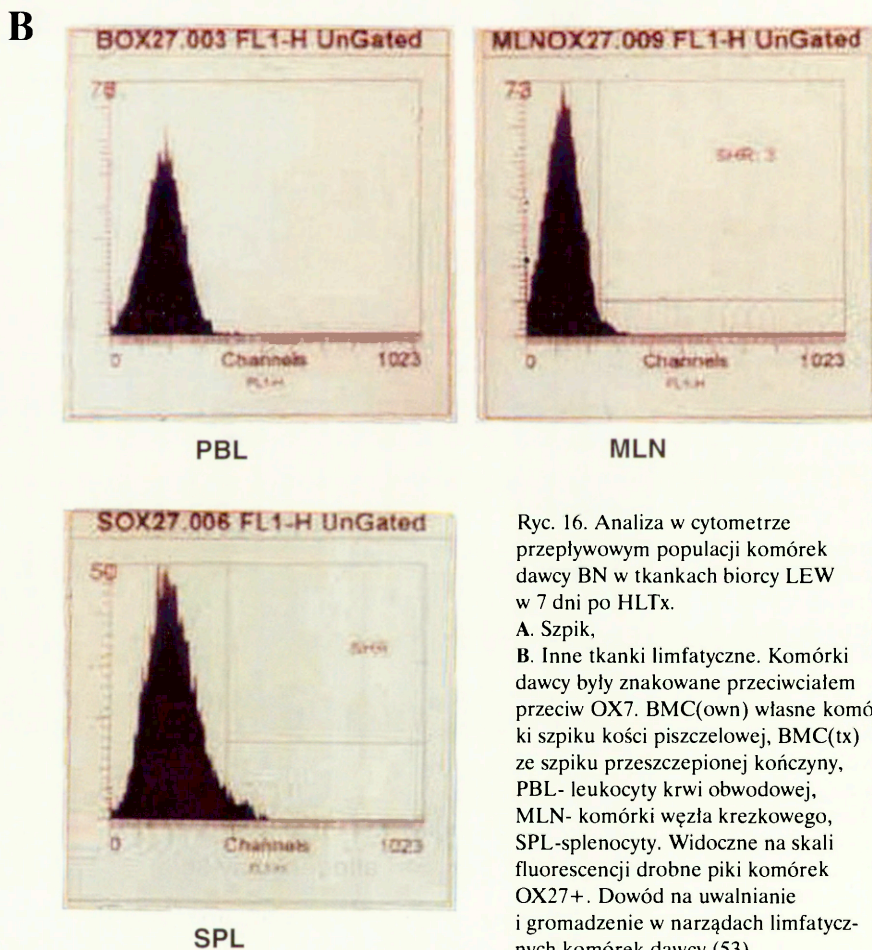
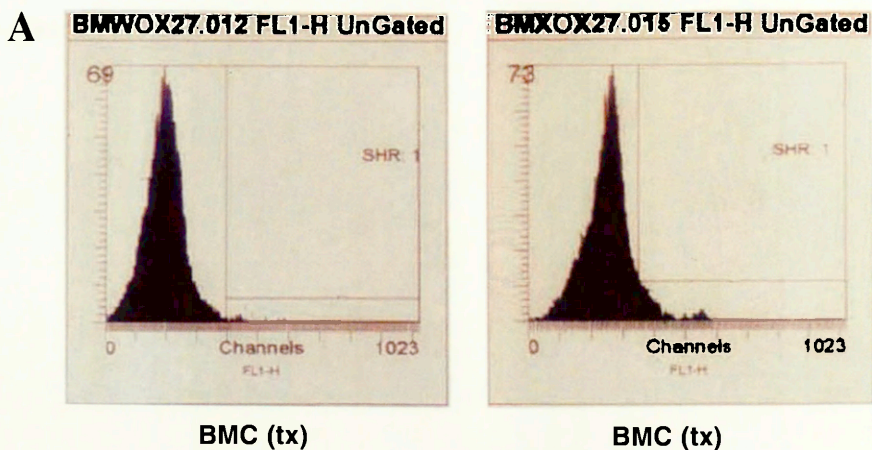
Osiedlanie się komórek dawcy w tkankach allogenicznego biorcy po HLTx (mikrochimeryzm komórkowy)

Migracja komórek po HLTx była analizowana na modelu allogenicznego przeszczepu kończyn od szczepu BN do szczepu LEW. Naświetlonemu 8Gy biorcy LEW przeszczepiano kończyną BN i 14 dni później badano w narządach limfatycznych obecność komórek zasiedlających nisze typowe dla komórek dendrytycznych DC a znakujących się jedynie przeciwciałem dla antygenów klasy I BN. Wykazano, iż komórki te zajęły miejsca typowe dla DC w sercu (ryc. 15) i widoczne były także w śledzionie i węzłach krezkowych LEW.

W badaniach w cytometrze przepływowym stwierdzano w 7 dni po przeszczepieniu w krwi biorcy $12.3 \pm 3.2\%$, w szpiku $0.7 \pm 0.4\%$, w śledzionie $3.2 \pm 1.7\%$ i w węzłach krezkowych $1.2 \pm 0.6\%$ komórek dawcy o fenotypie dawcy CD27. Po 30 dniach podawania CsA procent ten wynosił odpowiednio 5.7 ± 4.1 , 0.3 ± 0.4 , 1.7 ± 0.3 i 0.65 ± 0.07 (ryc. 16) (53).



Ryc. 15. Obraz histologiczny normalnego serca u naświetlonego allogenicznego biorcy LEW w 14 dni po HLTx pochodzącym od BN i zasiedlonego komórkami BN. **A.** obraz normalny (kontrolny), własne komórki dendrytyczne barwione przeciwciałem dla RTA klasy II na czerwono (OX6), **B.** komórki dawcy BN zasiedliły serce LEW, czerwono zabarwione komórki barwione przeciwciałem dla OX27 specyficznego dla antygenów BN, **C.** komórki dawcy i biorcy zasiedlające serce LEW znakowane przeciwciałem dla RTA klasy II (OX6) i hematoksyliną, x 600



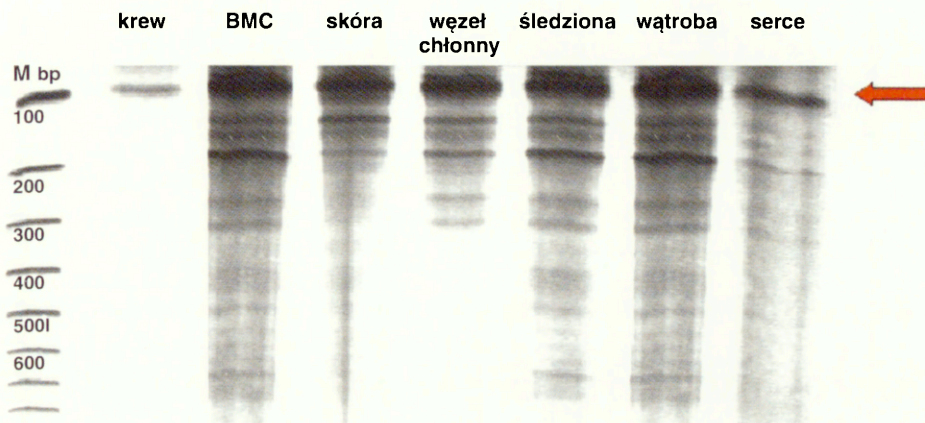
Ryc. 16. Analiza w cytometrze przepływowym populacji komórek dawcy BN w tkankach biorcy LEW w 7 dni po HLTx.

A. Szpik,

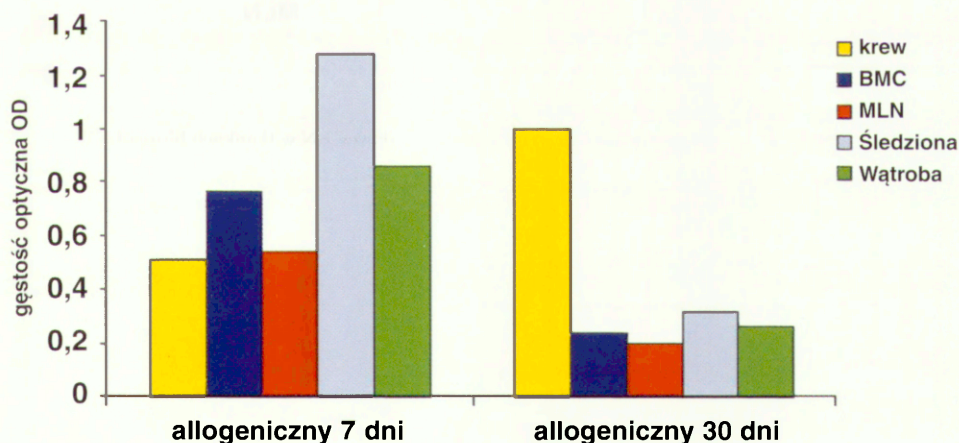
B. Inne tkanki limfatyczne. Komórki dawcy były znakowane przeciwciałem przeciw OX7. BMC(own) własne komórki szpiku kości piszczelowej, BMC(tx) ze szpiku przeszczepionej kończyny, PBL- leukocyty krwi obwodowej, MLN- komórki węzła kręzkowego, SPL-splenocyty. Widoczne na skali fluorescencji drobne piki komórek OX27+. Dowód na uwalnianie i gromadzenie w narządach limfatycznych komórek dawcy (53)

Dystrybucja DNA dawcy (niekomórkowy mikrochimeryzm) u nieleczonych i leczonych immunosupresyjnie allogenicznych biorców

HLTx wykonywano od samców BN do samic LEW, w grupach zwierząt otrzymujących i nie otrzymujących CsA lub FK506. Okres obserwacji wyniósł 7 i 30 dni. Komórki krwi, BMC, limfocyty MLN, śledziona i wątroba biorcy były badane na



Ryc. 17. Elektroforegram pokazujący obecność prążka odpowiadającego Sry-DNA w różnych tkankach biorcy w 7 dni po allogenicznym HLTx bez immunosupresji (strzałka)



Ryc. 18. Wartości gęstości optycznej Sry-DNA dawcy izolowanego z tkanek biorcy HLTx leczonego CsA w 7 i 30 dni po przeszczepieniu w układzie allogenicznym. Średnie wartości OD, n=3

obecność specyficznego dla dawcy nukleotydu SRY w dniu odrzucania przeszczepu (ryc. 17). W 7 dniu stwierdzano obecność Sry-DNA BN w krwi biorcy w wartościach OD 0.51, w szpiku 0.77, w śledzionie w 1.28, w węzłach krezkowych w 0.54 i w wątrobie w 0.86. Po 30 dniach podawania CsA odpowiednie wartości wynosiły 1.0, 0.24, 0.32 i 0.26 (ryc. 18). Dane te świadczą, iż komórki szpiku z przeszczepionej kończyny jak i materiał ze zniszczonych tkanek przeszczepu gromadzą się w tkankach biorcy, w tym zawarte w nich DNA. Podobne wartości obserwowano po podawaniu FK506 (167).

Choroba przeszczep-przeciwno-gospodarzowi (GvH) u nieleczonych i leczonych immunosupresyjnie biorców przeszczepu kończyny i szpiku kostnego

W 17 dniu po HLTx, a więc w dniu odrzucania kończyny u nielezonego immunosupresyjnie biorcy, w badaniu histologicznym śluzówki jelit biorcy obserwowano gromadzenie się komórek z antygenami klasy II na powierzchni. Nie było wyraźnych nacieków komórkowych na granicy naskórka i skóry właściwej ani w śródmiąszu płuc.

Po 30 dniach podawania CsA badanie makroskopowe skóry biorcy nie wykazało zmian. W badaniu mikroskopowym naskórek był pogrubiały i posiadał grubą warstwę rogowaczącą. W skórze właściwej obecne były komórki CD8, posiadające antygeny klasy II i ED1 (makrofagi), lecz architektonika skóry nie była wyraźnie zmieniona. W lamina propria błony śluzowej jelita obserwowano gromadzenie się większej liczby komórek posiadających antygeny klasy II. Nie było nacieków komórkowych w płucach. W zatokach wątroby obecna była zwiększona liczba komórek prezentujących antygen klasy II. Zacznie mniejsze nacieki obserwowano po stosowaniu FK506. Tak więc, nie obserwowano wyraźnych objawów GvH.

Omówienie

W prowadzonych badaniach uzyskano następujące obserwacje: 1) komórki szpiku uwolnione z przeszczepu unaczynionej kończyny osiedlają się w szpiku kostnym i narządach limfatycznych biorcy, 2) liczba uwalnianych komórek jest niska, lecz wystarczająca do odtworzenia w ciągu 10 dni populacji komórek szpiku i narządów limfatycznych u biorcy poddanemu napromienianiu (cytoablacji), 3) przeszczepienie kończyny syngenicznemu nie napromienianemu biorcy prowadzi do wystąpienia efektu „natłoku” w szpiku kostnym i do hamowania dojrzewania granulocytów i limfocytów, 4) przeszczepienie kończyny syngenicznemu napromienianemu biorcy prowadzi, w ciągu 10 dni, do całkowitej odnowy komórek szpiku i narządów limfatycznych; następuje odtworzenie prawidłowego składu komórkowego szpiku i narządów limfatycznych, 5) przeszczepienie kończyny allogenicznemu, naświetlonemu, leczonemu immunosupresyjnie biorcy prowadzi do odnowy szpiku kostnego i narządów limfatycznych oraz do wystąpienia stanu mikrochimerizmu, 6) narządy biorcy są repopulowane m.in. komórkami typu dendrytycznego pochodzącymi od dawcy, 7) czas przeżycia skóry przeszczepionej kończyny u allogenicznych biorców jest 2–3-krotnie dłuższy w porównaniu z przeszczepem wolnych płatów skórnych, 8) przeszczepienie allogenicznej kończyny sprzyja wydłużeniu czasu przeżycia przeszczepu wolnych płatów skórnych i serca od tego samego dawcy, 9) obniżona odpowiedź splenocytów biorcy allogenicznego przeszczepu kończyny na antygeny dawcy oraz niskie zdolności pobudzenia przez splenocyty biorcy limfocytów dawcy, 10) występowanie zjawiska mikrochimerizmu komórkowego nie wydaje się bezpośrednio korelować z czasem przeżycia kończyny, 11) podczas odrzucania DNA dawcy może być wykrywane w nie limfoidalnych i limfoidalnych tkankach biorcy, 12) w grupie biorców nieleczonych i leczonych immunosupresyjnie nie obserwowano występowania choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi

Zgodnie z oczekiwaniami komórki przeszczepionego w kończynie szpiku były z niego uwalniane i zasiedlały narządy limfoidalne i nie limfoidalne biorcy. Udowodniliśmy to już uprzednio (36,43,45,46,48), podobnie jak i inni autorzy (26,35,38,39,40–42,56,101–105). Z klinicznego punktu widzenia dla projektu

przeszczepiania kończyn niezbędna jest odpowiedź na pytanie, jakie ilości komórek szpiku są uwalniane do biorcy i jak długo proces ten ma miejsce. Uwalnianie znacznych ilości komórek mogłoby wiązać się z silną miejscową reakcją gospodarza w tkankach poza szpikiem, gdzie komórki szpiku zostały zatrzymane (GvH). Wiadomo, iż podskórne podanie zawiesiny komórek szpiku wiąże się z wielodniowym odczynem typu zapalnego (obserwacje własne). Poza tym im większa liczba komórek tym większe istniałyby możliwości rozwoju odpowiedzi typu GvH, zwłaszcza przy zasiedlaniu tkanek nie limfatycznych takich jak skóra czy jelito. Rozwój GvH wydaje się zależeć od ilości komórek dawcy przedostających się do biorcy (33,35). Innym niekorzystnym zjawiskiem wynikającym z uwalniania znacznych ilości namnażających się w przeszczepionej kości komórek szpiku byłaby oczywiście bardziej nasilona odpowiedź biorcy na antygeny transplantacyjne dawcy.

W pierwszej grupie doświadczeń przeszczepiano kończynę ze układu syngenicznego bez uprzedniej cytoabłacji metodą napromieniania. Zaobserwowano już po 10 dniach nadmierne nagromadzenie komórek szpiku w kości piszczelowej biorcy. Obserwacja jest ważna dla kliniki aczkolwiek jej biologiczny efekt pozostaje trudny do przewidzenia. Np. zbyt duże nagromadzenie megakaryocytów i uwalnianie płytek krwi mogłoby zaburzać proces krzepnięcia. Również wysoka koncentracja w szpiku postaci myeloidalnych mogłaby hamować proces dojrzewania tej linii. Po 30 dniach nastąpił jednak powrót do prawidłowych wartości, zapewne na skutek fizjologicznej regulacji. Większa niż oczekiwano objętość komórek szpiku kostnego u biorców po przeszczepieniu kończyny wraz ze szpikiem wskazuje, że muszą istnieć dodatkowe, oprócz przeszczepionych komórek szpiku i komórek podporowych zrębu, czynniki sprzyjające proliferacji szpiku kostnego. Mogą to być cytokiny czy czynniki wzrostu produkowane przez komórki obecne w gojącej się ranie przeszczepionej kończyny lub komórki przejściowo niedokrwionej skóry przeszczepu. Wyniki uzyskane po operacjach rzekomych i po wewnątrztrzewnowym przeszczepieniu skóry potwierdzają ten pogląd (obserwacje własne). Na podstawie powyższych badań można wnioskować, że u syngenicznych biorców po przeszczepieniu kończyny wraz ze szpikiem dochodzi do „efektu natłoku” w jamach szpikowych z oznakami przejściowego hamowania dojrzewania neutrofilii i limfocytów, ale zjawisko to jest przejściowe.

Model przeszczepu kończyny bez cytoabłacji szpiku nie pozwalał na obserwację szybkości odnowy populacji komórek jam szpikowych i narządów limfatycznych biorcy po przeszczepieniu kończyny. Skłoniło to do przeprowadzenia badań nad przebiegiem odnowy populacji komórkowych biorców z komórek szpiku pochodzących z przeszczepionej kończyny u napromienianych syngenicznych zwierząt. Przeszczepienie kończyny (HLTx) jest przeszczepieniem komórek szpiku kostnego wraz z komórkami podporowymi zrębu w ich naturalnym stosunku przestrzennym. Pozwala to na natychmiastowe podjęcie czynności krwiotwórczej w przeszczepie. Co więcej, komórki uwolnione z przeszczepu zachowu-

ja pełną zdolność migracji z jam kostnych i osiedlania się, w szpiku kostnym i narządach limfatycznych biorcy (36, 47). Produkcja cytokin przez komórki podporowe zrębu przeszczepu pozostaje prawdopodobnie nie zaburzona. Cytokiny te pobudzają proliferację i dojrzewanie komórek szpiku przeszczepu w przypadkach zwiększonego zapotrzebowania na komórki krwi u biorcy. Uwolnione do krążenia cytokiny mogą mieć również wpływ regulacyjny na narządy limfatyczne biorcy, ułatwiając ich uzupełnienie prekursorami pochodzącymi z przeszczepionego szpiku kostnego.

U naświetlanych biorców odnowa własnego szpiku była prawie pełna po 10 dniach, zaś po 30 dniach ilość komórek w kości piszczelowej była co najmniej 3-krotnie wyższa niż u zwierząt bez przeszczepu. Zjawisko to można tłumaczyć działaniem wymienionych uprzednio niespecyficznych czynników związanych z procesem gojenia rany. Szybka odnowa populacji jam szpikowych u zwierząt po HLTx znacznie różniła się od wyników uzyskanych w grupie szczurów otrzymujących BMC i.v. Mechanizm wolnego tempa hemopoezy po zabiegach BMC i.v. nie jest jasny. Wydaje się, że czynnikiem sprawczym jest niedobór w przeszczepianej zawieszynie syngenicznych komórek podporowych zrębu.

Oczywiście w warunkach klinicznych nie bierze się pod uwagę napromieniania biorcy alloprzeszczepu kończyny. W moich badaniach zastosowałem jednak ten model, aby dokładniej poznać jak wygląda proces uwalniania komórek z przeszczepu i jakie mogą być tego efekty biologiczne u biorcy. Ta grupa doświadczeń wskazała, iż uwalnianie komórek z HLTx jest stale utrzymującym się, fizjologicznie regulowanym procesem, o którego kinetyce musi wiedzieć transplantolog. Komórki fenotypu dawcy były wykrywane u biorcy po 30 dniach i później. Przeszczep kończyny jest więc źródłem stałego mikrochimeryzmu komórkowego, a jego długotrwałe efekty powinny być dokładnie zbadane.

Komórki przeszczepionego szpiku zasiedlały nie tylko jamy szpikowe, ale także narządy limfoidalne. Obserwacja ta jest ważna dla przeszczepiającego kończynę. Wskazuje ona, iż proces odrzucania może się rozwijać nie tylko w przeszczepie, ale także tam, gdzie zatrzymały się uwolnione komórki przeszczepu. Dziesiątego dnia po HLTx zarówno fenotypowa jak i czynnościowa odnowa komórek w węzłach chłonnych była zakończona. Natomiast odnowa po BMC i.v. w tym punkcie czasowym jeszcze nie była kompletna. Pełna odnowa narządów limfatycznych 10 dnia po HLTx wskazuje, że dojrzewanie prekursorów limfocytów w szpiku i ich wędrówka na obwód jest w tym czasie doprowadzona do normalnego poziomu. Wyrażna różnica w szybkości przywrócenia prawidłowej architektury węzłów chłonnych, śledziony i grasicy pomiędzy grupami po HLTx i BMC i.v. jest kolejnym dowodem, że szpik kostny przeszczepiony jako tkanka, a nie zawieszina komórek odzyskuje swoją funkcję natychmiast po transplantacji (45, 47, 55).

W badaniach dystrybucji znakowanych komórek szpiku znajdujących się w przeszczepie kończyny wykazano, iż liczba uwalnianych do biorcy komórek jest

bardzo mała. Pomimo tego efektywność zasiedlania i odnowy szpiku była szybka i pełna (48). Dodatkowo, nie było różnicy w objętości komórek szpiku osiedlających się w tkankach po 4 i 24h co sugerowało, że komórki hemopoetyczne musiały wykazywać powinowactwo do komórek śródbłonna zatok szpiku kostnego i po osiedleniu się tam nie opuszczały jam szpikowych.

Inne cenne informacje pochodziły z porównania tempa odnowy i liczby osiedlających się komórek szpiku, po HLTx i BMC i.v. (48,166). Liczba komórek szpiku potrzebna do odtworzenia prawidłowego szpiku i architektury komórkowej narządów limfatycznych była kilkakrotnie niższa po HLTx w porównaniu do BMC i.v. W pierwszym modelu aktywnie działały komórki, które są normalnie uwalniane ze szpiku pod wpływem regulacji hemopoetycznej i wędrowały do szpiku kostnego i narządów limfatycznych biorcy, podczas gdy w drugim modelu większość przeszczepionych dożylnie komórek zatrzymywana była w tkankach nie limfoidalnych, jedynie mniejszość z nich zaś docierała do jam szpikowych i podejmowała współpracę z komórkami podporowymi, co jak wiadomo wymaga czasu.

Starając się określić, które populacje prekursorów szpikowych zasiedlają tkanki biorcy, szczególnie interesujące było śledzenie migracji komórek dendrytycznych (DC). Komórki te cechują się właściwościami immunogennymi, ale i tolerogennymi (66–73). Mogą one więc być odpowiedzialne za przedłużenie przeżycia przeszczepu allogenicznego. W chwili obecnej nie ma w pełni specyficznych znaczników dla niedojrzałych i dojrzałych form DC szczura. Nie mniej jednak zastosowane w pracy przeciwciała dla OX62 oraz ocena topograficznego rozmieszczenia OX62+OX6+OX27+ w sercu repopulowanego osobnika udowodniły, iż szpiko-pochodne DC dawcy zasiedlają biorcę. Jaką rolę odgrywały one w nieznanym ale wyraźnym przedłużeniu czasu przeżycia kończyny i dodatkowych przeszczepów, jak również czy zawierały ciała apoptotyczne fenotypu biorcy (106–109), nie było badane w obecnej pracy.

Allogeniczna kończyna przeszczepiona naświetlanemu biorcy przeżywała statystycznie dłużej (średnio 17 dni) niż u naświetlonego i repopulowanego syngenicznym szpikiem w zawiesinie (średnio 7 dni). Było to zapewne efektem zmiennej regulacji reakcji na antygeny dawcy (vide poniżej: obniżona odpowiedź in vitro). Dłuższe przeżycie można by teoretycznie również tłumaczyć nadmiarem antygeny dawcy (duża masa kończyny), tzw. „antigenic overload paralysis”. Taka możliwość nie była badana w niniejszej pracy. Dłuższe przeżycia przeszczepów skóry i serca od tego samego dawcy co przeszczep kończyny, po odstawieniu CsA czy FK506, dodatkowo wskazują, iż reaktywność biorcy na antygeny dawcy była obniżona. Zakres tego ograniczenia był bardzo mały, ale mógłby stanowić uzasadnienie do zmniejszenia dawek immunosupresji farmakologicznej.

Przedłużone przeżycie skóry w allogenicznej przeszczepionej kończynie oraz przeszczepów dodatkowych wskazują, iż czynniki komórkowe i humoralne zawarte w przeszczepie kończyny mogą być odpowiedzialne za ten pozytywny efekt.

Można by oczekiwać obniżenia stymulacyjnych właściwości komórek mononuklearnych biorcy kończyny w stosunku do dawcy, co zostało potwierdzone w badaniach *in vitro* mieszanej hodowli limfocytów dawcy i biorcy, jako jednego z mechanizmów. Również komórki biorcy odpowiadały na pobudzenie komórkami dawcy w sposób wyraźnie obniżony. Obie te obserwacje były przeprowadzone w doświadczeniach bez immunosupresji, dają więc pogląd na rzeczywisty proces częściowej tolerancji rozwijającej się po HLTx. Doniesienia w literaturze dotyczące obniżonej reaktywności na antygeny dawcy są skąpe (133, 135a, 143). Ostatnie wielośrodkowe badania przyniosły wyniki zgodne z naszymi (64). W warunkach klinicznych stosowana jest po przeszczepieniu kończyny immunosupresja farmakologiczna. Być może jej dawkowanie mogłoby być obniżone przy udowodnionej u biorcy obniżonej reaktywności na antygeny dawcy. Pośrednio na taką możliwość wskazywałyby obserwacje z kliniki. Po przeszczepieniu ręki nie obserwowano bowiem, wbrew oczekiwaniom, burzliwego odrzucenia skóry, co ma miejsce po izolowanym przeszczepie tej tkanki (1,2,3,20).

Ocena histologiczna procesu odrzucania skóry jest prosta, natomiast szpiku kostnego dawcy w kości jest trudna. Związane jest to z naciekaniem przeszczepionego szpiku przez komórki jednojądrowe biorcy. Fenotyp tych komórek jest podobny do komórek dawcy. Nie stosowano w tej pracy, w grupach poświęconych odrzucaniu, metody znakowania komórek przeciwciałami specyficznymi dla MHC szczepu dawcy. Natomiast wykonywano tego rodzaju badanie dla oceny wielkości mikrochimeryzmu komórkowego oraz dla udowodnienia zasiedlenia narządów biorcy przez komórki dendrytyczne dawcy. Wydaje się, że część komórek dawcy przeżywała w przeszczepionym w kończynie szpiku u nieleczonego biorcy okres 14 dni i dłużej. Były to komórki, które nie mogły pochodzić od biorcy, a więc takie jak megakariocyty i wczesne postacie mieloblastów i erytroblastów. Można więc wnioskować, że jama szpikowa była wypełniona częściowo komórkami hemopoetycznymi dawcy, częściowo zaś komórkami nacieku biorcy. Pytanie które komórki hemopoetyczne pochodziły od dawcy czy od biorcy pozostało bez odpowiedzi. Wydaje się, że pod działaniem CsA czy FK506 komórki dawcy mogą przeżyć i być aktywne w procesie hemopoezy. Rozumienie tego procesu jest niezwykle ważne dla transplantologa, ponieważ dotyczy zachowania funkcji przeszczepionego szpiku, t.j. namnażania, dojrzewania i uwalniania komórek do biorcy, być może tak długo jak długo przeszczep nie uległ odrzuceniu.

Przeszczepiona tkanka szpikowa uwalnia do biorcy dojrzałe komórki oraz prekursorzy innych linii, w tempie zależnym od fizjologicznej regulacji. Odrzucanie rozprzestrzenionych komórek dawcy ma miejsce w narządach limfoidalnych biorcy. Nie jest wiadome, w którym narządzie t.j. szpiku biorcy, śledzionie, węzłach czy tkance limfoidalnej jelita przebiega ten proces. Ocena kinetyki odrzucania uwolnionych z przeszczepu komórek szpiku nie była wykonywana.

Po przeszczepieniu kończyny allogenicznej ilość komórek dawcy wykrywanych w tkankach biorcy była znacznie mniejsza niż w układzie przeszczepów syn-

genicznych. Efekt ten był zauważalny już po 24 godzinach. Można go tłumaczyć zjawiskiem tzw. „allogeneic lymphocyte elimination” szczególnie wyraźnym w układzie doświadczalnym przeszczepu rodzicielskiego do F1. Częściowo za efekt ten są odpowiedzialne komórki NK biorcy (50). Zagadnienie, które komórki szpiku były przede wszystkim eliminowane nie było przedmiotem badań. Wiadomo, iż komórki NK wykazują cytotoksyczność w stosunku do niektórych niedojrzałych postaci szpikowych. W jakim stopniu mechanizm ten funkcjonuje u człowieka nie jest jasne. Mógłby on ograniczać funkcjonalnie nadmiar uwalnianych komórek szpiku, zapobiegając m.in. rozwojowi reakcji GvH. Są to jedynie spekulacje.

Konsekwencją HLTx jest obecność w tkankach limfatycznych biorcy komórek układu odpornościowego dawcy. W stosowanym modelu komórki dawcy utrzymujące się w tkankach biorcy były wykrywalne zarówno w 30 jak i w 100 dni po przeszczepieniu. Nie ustalono czy obecność komórek dawcy była dowodem na rozwój częściowej tolerancji na antygeny dawcy, czy też przeszczepione, wraz z kończyną, komórki szpiku przeżyły dzięki działaniu CsA lub FK506.

Po przeszczepieniu kończyny obserwowano w krwi i tkankach biorcy nie tylko mikrochimeryzm komórkowy ale i nie-komórkowy (fragmenty DNA dawcy). Używana tu nazwa „nie-komórkowy” jest jedynie czasowym określeniem roboczym. Do niedawna uważano, iż DNA dawcy znajduje się jedynie w komórkach „pasażerowych” z przeszczepów. Udowodniliśmy w innych badaniach, iż DNA dawcy może być także wykrywane w komórkach dendrytycznych biorcy i utrzymywać się w nich przez wiele miesięcy po odrzuceniu przeszczepu (167). Nasze dane wskazują, że DNA dawcy pochodzi głównie ze zniszczonych komórek przeszczepu, a nie z komórek osiedlających się w narządach biorcy. Mikrochimeryzm komórkowy jest bowiem obecny od dnia przeszczepienia, DNA dawcy zaś wykrywano w dużych ilościach głównie po wystąpieniu epizodu odrzucania (167). W obu przypadkach ilości DNA pochodzącego od dawcy były znaczące. W badaniu tym jednoznacznie wykazano, że przeszczepienie kończyny jest związane z rozproszaniem materiału genetycznego dawcy w tkankach biorcy. Jakie znaczenie ma uwolnione z komórek dawcy DNA nie jest jasne. Nie wiadomo, podobnie jak w przypadku mikrochimeryzmu komórkowego, czy obecność tych elementów dawcy może mieć wpływ na przedłużenie przeżycia alloprzeszczepu. W obecnej pracy poziom wykrywanych komórek dawcy w tkankach biorcy stopniowo ulegał zmniejszeniu, poziom wykrywanego DNA pozostawał wysoki, ale nie korelowało to wyraźnie z czasem przeżycia.

Nie obserwowano wyraźnych objawów choroby; przeszczep-przeciwko-gospodarzowi zarówno w grupie szczurów poddawanych immunosupresji jak i w grupie szczurów nie leczonych. Przyczyna, dla której nie występowała ostra lub przewlekła forma GvH nie jest jasna. Można tylko przypuszczać, że po HLTx mniej limfocytów szpikowych i ich prekursorów jest uwalniane ze szpiku kostnego w przedziale czasowym w porównaniu z BMC i.v. Po podaniu dożylnym lim-

focyty szpikowe natychmiast, w dużej liczbie, osiedlają się w skórze, jelitach i płucach. Część komórek hemopoetycznych jest zatrzymywana w tkankach obwodowych. Tam właśnie dochodzi do rozwoju reakcji. Po HLTx uwalnianie zarówno komórek hemopoetycznych jak i limfocytów szpikowych jest powolne i ilościowo ograniczone. Obserwacje w tej pracy potwierdzają doniesienia innych autorów o braku wyraźnej reakcji GvH po przeszczepieniu kończyny, również w klinice (1,3,34,155–158,164).

Obserwacje z pracy posiadające wartość kliniczną to: a) jedynie krótkotrwały efekt „crowding” t.j. nadmiaru komórek szpiku po przeszczepieniu kończyny, b) niewielka ilość komórek szpiku uwalnianych z przeszczepu, co może tłumaczyć brak ostrej reakcji GvH, c) tendencja do przedłużenia przeżycia przeszczepu kończyny wynikająca z biologicznego charakteru przeszczepu (mechanizm niejasny), d) brak ostrego odrzucania skóry przeszczepu kończyny (obserwacja nieoczekiwana).

Z klinicznego punktu widzenia należy także pamiętać, iż: a) komórki szpiku przeszczepionej kończyny uwalniają się z jamy szpikowej i zasiedlają biorcę, b) w związku z tym, reakcja odrzucania ma miejsce nie tylko w przeszczepie ale i narządach, gdzie rozmieściły się allogeniczne komórki szpiku, c) reakcja na złożony przeszczep (kończyna) nie jest tak ostra jak na izolowany przeszczep skóry, d) FK506 jest w modelu szczura lekiem efektywnie ograniczającym odrzucanie przeszczepu kończyny.

Korzystne i niepożądane efekty przeszczepienia tkanki szpikowej powinny być brane pod uwagę w opracowaniach klinicznych programów przeszczepiania kończyn.

Streszczenie

Przeszczepianie ludzkich kończyn stało się rzeczywistością. Do sierpnia 2002 wykonano na świecie, wg oficjalnych danych, 8 allogenicznych pojedynczych oraz 4 podwójne przeszczepy ręki. Ponadto wykonano unaczynione przeszczepy allogenicznych kości i stawów u 8 chorych. Wskazaniem do przeszczepienia ręki są: 1) brak obu rąk (pourazowy, wrodzony (?)). 2) brak jednej ręki i współistniejące zaburzenia wzroku ograniczające podstawowe funkcje życiowe, 3) brak jednej ręki u osobnika z motywacją przywrócenia standardu życia. Wyzwaniem klinicznym pozostaje także rekonstrukcja uszkodzeń dużych kości i tkanek miękkich spowodowanych urazem, resekcją guza nowotworowego lub wadami wrodzonymi.

Ograniczona jest znajomość procesów odrzucania kończyny i zapobiegania jej odrzucania. Także brak jest dokładnych obserwacji dotyczących funkcjonalnego połączenia się przeszczepu z biorcą, takich jak powrotu unerwienia, reakcji naczyniowych, funkcji chwytnych, itp. Do najważniejszych problemów dotyczących przeszczepiania kończyn, przed którymi stoi współczesna transplantologia, należą: proces odrzucania poszczególnych tkanek przeszczepu, reinerwacji przeszczepu w celu przywrócenia funkcji kończyny oraz rozsiew i namnażanie się w organizmie biorcy komórek szpiku przeszczepionych wraz z kością z potencjalnym rozwojem tolerancji na antygeny transplantacyjne dawcy, ale jednocześnie z zagrożeniem rozwoju reakcji gospodarz przeciwko przeszczepowi i przeszczep przeciwko gospodarzowi w miejscu zgromadzenia się tych komórek. Uwalnianie komórek szpiku z przeszczepionej kończyny niesie więc ze sobą potencjalną korzyść w postaci wydłużenia przeżycia przeszczepu, prawdopodobnie w związku z obecnością mikrochimeryzmu komórkowego, a w szczególności komórek dendrytycznych dawcy. Jak dotąd brak jest w literaturze doniesień dotyczących procesu uwalniania i osiedlania się u biorcy komórek szpiku z przeszczepionej kończyny oraz efektów tego procesu.

Celem moich badań była ocena procesu migracji przeszczepionych komórek hemopoetycznych z kości przeszczepionej kończyny dawcy do jam szpikowych i narządów limfatycznych biorcy w układzie syngenicznym i allogenicznym. Do-

datkowo śledziłem proces powstawania allogenicznego mikrochimeryzmu i jego ewentualnego wpływu na wydłużenie czasu przeżycia przeszczepionej kończyny. Badałem także zjawisko reakcji przeszczep-przeciw-gospodarzowi (GvH), które zwykle występuje po przeszczepieniu allogenicznego szpiku. Wszystkie wymienione procesy powinny być poznane przed rozpoczęciem klinicznego przeszczepiania kończyn.

W prowadzonych badaniach uzyskano następujące obserwacje: 1) komórki szpiku uwolnione z przeszczepu unaczynionej kończyny osiedlają się w szpiku kostnym i narządach limfatycznych biorcy, 2) liczba uwalnianych komórek jest niska, lecz wystarczająca do odtworzenia w ciągu 10 dni populacji komórek szpiku i narządów limfatycznych u biorcy poddanemu napromienianiu (cytoablacji), 3) przeszczepienie kończyny syngenicznemu nie napromienianemu biorcy prowadzi do wystąpienia efektu „natłoku” w szpiku kostnym i do hamowania dojrzewania granulocytów i limfocytów, 4) przeszczepienie kończyny syngenicznemu napromienianemu biorcy prowadzi, w ciągu 10 dni, do całkowitej odnowy komórek szpiku i narządów limfatycznych; następuje odtworzenie prawidłowego składu komórkowego szpiku i narządów limfatycznych, 5) przeszczepienie kończyny allogenicznemu, naświetlonemu, leczonemu immunosupresyjnie biorcy prowadzi do odnowy szpiku kostnego i narządów limfatycznych oraz do wystąpienia stanu mikrochimeryzmu, 6) narządy biorcy są repopulowane m.in. komórkami typu dendrytycznego pochodzącymi od dawcy, 7) czas przeżycia skóry przeszczepionej kończyny u allogenicznych biorców jest 2–3-krotnie dłuższy w porównaniu z przeszczepem wolnych płatów skórnych, 8) przeszczepienie allogenicznej kończyny sprzyja wydłużeniu czasu przeżycia przeszczepu wolnych płatów skórnych i serca od tego samego dawcy, 9) obniżona odpowiedź splenocytów biorcy allogenicznego przeszczepu kończyny na antygeny dawcy oraz niskie zdolności pobudzenia przez splenocyty biorcy limfocytów dawcy, 10) występowanie zjawiska mikrochimeryzmu komórkowego nie wydaje się bezpośrednio korelować z czasem przeżycia kończyny, 11) podczas odrzucania DNA dawcy może być wykrywane w nie limfoidalnych i limfoidalnych tkankach biorcy, 12) w grupie biorców nieleczonych i leczonych immunosupresyjnie nie obserwowano występowania choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi.

Obserwacje z pracy posiadające wartość kliniczną to: a) jedynie krótkotrwały efekt „crowding” t.j. nadmiaru komórek szpiku po przeszczepieniu kończyny, b) niewielka ilość uwalnianych komórek szpiku uwalnianych z przeszczepu, co może tłumaczyć brak ostrej reakcji GvH, c) tendencja do przedłużenia przeżycia przeszczepu kończyny wynikająca z biologicznego charakteru przeszczepu (mechanizm niejasny), d) brak ostrego odrzucania skóry przeszczepu kończyny (obserwacja nieoczekiwana).

Z klinicznego punktu widzenia należy także pamiętać, iż: a) komórki szpiku przeszczepionej kończyny uwalniają się z jamy szpikowej i zasiedlają biorcę, b) w związku z tym, reakcja odrzucania ma miejsce nie tylko w przeszczepie ale i na-

rzędach, gdzie rozmieściły się allogeniczne komórki szpiku, c) reakcja na złożony przeszczep (kończyna) nie jest tak ostra jak na izolowany przeszczep skóry, d) FK506 jest w modelu szczura lekiem efektywnie ograniczającym odrzucanie przeszczepu kończyny.

Korzystne i niepożądane efekty przeszczepienia tkanki szpikowej powinny być brane pod uwagę w opracowaniach klinicznych programów przeszczepiania kończyn.

Wnioski

1. Komórki szpiku uwolnione z przeszczepu unaczynionej kończyny zasiedlają szpik kostny i narządy limfatyczne biorcy.
2. Liczba uwalnianych komórek jest niska, lecz wystarczająca do odtworzenia w ciągu 10 dni populacji komórek szpiku i narządów limfatycznych u biorcy poddanemu napromienianiu (cytoablacji), co świadczy o hematopoetycznej aktywności przeszczepu.
3. Przeszczepienie kończyny allogenicznemu, naświetlonemu, leczonemu immunosupresyjnie biorcy prowadzi do wystąpienia mikrochimeryzmu komórkowego i nie-komórkowego (DNA dawcy poza jego komórkami).
4. Narządy biorcy są repopulowane m.in. komórkami typu dendrycznego pochodzącymi od dawcy, mogącymi odgrywać rolę w przedłużeniu przeżycia przeszczepu.
5. Przeszczepienie allogenicznej kończyny sprzyja wydłużeniu czasu przeżycia przeszczepu wolnych płatów skórnych i serca od tego samego dawcy.
6. Nie obserwowano występowania choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi zarówno w grupie biorców nieleczonych, jak i leczonych immunosupresyjnie.
7. Uzyskane obserwacje będą przydatne w rozumieniu procesów klinicznych rozwijających się po złożonych allogenicznych przeszczepach tkankowych (composite tissue grafts), w tym kończyn.

Literatura

Kliniczne przeszczepianie kończyn

Doświadczalne przeszczepianie kończyny

Mechanizm działania przeszczepianego szpiku

- a) komórki dendrytyczne
- b) przeszczepianie szpiku w zawieszynie
- c) przeszczepianie unaczynionego szpiku
- d) migracja komórek szpiku
- e) apoptoza
- f) komórki regulacyjne

Mikrochimeryzm po przeszczepieniu szpiku

Tolerancja na przeszczep allogeniczny po przeszczepieniu szpiku przy stosowanej immunosupresji

Reakcja przeszczep-przeciww-gospodarzowi (graft-versus-host, GvH) po przeszczepieniu kończyny

Kliniczne przeszczepianie kończyn

1. Dubernard J.M., Owen E., Herzberg G., Lanzetta M., Martin X., Kapila H., Dawahra M., Hakim N.S. Human hand allograft: report on first 6 months. *Lancet* 1999, 353, 1315-20

2. Dubernard J.M., Owen E., Lefrançois N., Petruzzo P., Martin X., Dawahra M., Jullien D., Kanitakis J., Frances C., Preville X., Gebuhrer L., Hakim N., Lanzetta M., Kapila H., Herzberg G., Revillard J.P. First human hand transplantation. *Transpl Int* 2000, 13, S521-S524

3. Jones J.W., Gruber S.A., Barker J.H., Breidenbach W.C. Successful hand transplantation. *N Engl J Med* 2000, 343, 468-473

4. Dubernard J.M., Owen E.R., Lanzetta M., Hakim N. What is happening with hand transplants? *Lancet* 2001, 357, 1711-1712

5. Dubernard J.-M. Clinical composite tissue allografts: current status. *Transplantation* 2002, 74, 244

6. Gunther O, Hofmann. Knee joint allograft. *Transplantation* 2002, 74, 245
7. Guoxian P, Zhu L, Gu L. The experience of 3 cases of human hand allografts in China. *Transplantation* 2002, 74, 244
8. Iwasaki N, Gohda T, Itoga H, Minami A, Kaneda K. Effects of major histocompatibility complex matching on graft survival in allogeneic rat limb transplantation. *J Hand Surg* 2001, 26A, 540-545
9. Petruzzo P, Lefrançois N, Herzberg G, Lanzetta M, Owen E, Hakim N, Kanitakis J, Giroux P, Martin X, Dubernard J.M. Two-year follow-up of the first double hand transplantation. *Transplantation* 2002, 74, 62
10. Tai C, Goldenberg M, Schuster K.M, Kann B.R, Hewitt C.W. Composite tissue allotransplantation. *J Invest Surg* 2003, 16, 193-201
11. Cendales L.K, Kleiner D.E, Burns C, Hale D.A, Kirk A.D, Granger D, Breidenbach W. Histopathology of rejection in human composite tissue allotransplantation. *Transplantation* 2002, 74, 62-63
12. Kanitakis J, Jullien D, Petruzzo P, Hakim N, Claudy A, Revillard J.P, Owen E, Dubernard J.M. Clinicopathologic features of graft rejection of the first human hand allograft. *Transplantation* 2003, 76, 688-93
13. Kanitakis J, Petruzzo P, Hakim N, Jullien D, Claudy A, Owen E, Dubernard J.M. Clinicopathological features of chronic graft rejection in the first human hand allograft. *Transplantation* 2002, 74, 63
14. Giroux P, Cheyles A, Duhamel J.R, Petruzzo P, Dubernard J.M, Sirigu A. Motor recovery after bilateral hand transplantation: a two-year follow-up study. *Transplantation* 2002, 74, 63
15. Granger D.K, Cendales L.K, Breidenbach W.C. Functional recovery in composite tissue allograft not prevented by rejection. *Transplantation* 2002, 74, 63-64
16. Owen E.R, Dubernard J.M, Lanzetta M, Kapia H, Martin X, Dawahra M, Hakim N.S. Peripheral nerve regeneration in human hand transplantation. *Transplant Proc* 2001, 33, 1720-1721
17. Kawabata H, Ueno T. Screening recommendation for women taking tamoxifen. *Lancet* 2001, 358, 1018
18. Herzberg G, Parmentier H, Erhard L. Assessment of functional outcome in hand transplantation patients. *Hand Clin* 2003, 19, 505-9
17. Tobin G.R, Granger D.K, Breidenbach W.C. Hand transplantation follow-up. *Lancet* 2001, 358, 1018
19. Wiberg M, Hazari A, Ljungberg C, Pettersson K, Backman C, Nordh E, Kwast-Rabben O, Terenghi G. Sensory recovery after hand reimplantation: a clinical, morphological, and neurophysiological study in humans. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 2003, 37, 163-73
20. Kanitakis J, Jullien D, Claudy A, Revillard J.P, Dubernard J.M. Microchimerism in a human hand allograft. *Lancet* 1999, 354, 1820-1821
21. Lees V.C, McCabe S.J. The rationale for hand transplantation. *Transplantation* 2002, 74, 749-753

22. Carta I. Convertino O. Cornaggia C.M. Psychological investigation protocol of candidates for hand transplantation. *Transplant Proc* 2001, 33, 621-622
23. Lanzetta M. Dubernard J.M., Owen E.R., Nolli R., Martin X., Dawahra M., Kapila H., Hakim N.S. Surgical planning of human hand transplantation. *Transplant Proc* 2001, 33, 683
24. Andrew Lee W.P. Editorial. Composite tissue (hand) allotransplantation: Are we ready? *Plast Reconstr Surg* 2001, 107, 1060-1070
25. Petit F. Minns A.B., Dubernard J.M., Hettiaratchy S., Andrew Lee W.P. Composite tissue allotransplantation and reconstructive surgery. *Ann Surg* 2003, 237, 19-25
26. Llull R., Beko II K.R., Black K.S., Hewitt Ch.W. Composite tissue allotransplantation: perspectives concerning eventual clinical exploitation. *Transpl Rev* 1992, 6, 175-188
27. Noble W.C. (Ed). *The skin microflora and microbial skin disease*. Cambridge University Press, Cambridge 1993
28. Olszewski W.L., Jamal S., Manokaran G., Pani S., Kumaraswami V., Kubicka U., Lukomska B., Dworzynski A., Swoboda E., Meisel-Mikolajczyk E. Bacteriologic studies of skin, tissue fluid, lymph, and lymph nodes in patients with filarial lymphedema. *Am J Trop Med Hyg.* 1997, 57, 7-15

Doświadczalne przeszczepianie kończyny

29. Cakala M., Olszewski W.L. Immune changes in lymph nodes after skin grafting. I. Effects of bacterial antigens. *Ann Transpl* 2003, 8, 10-15
30. Büttmeyer R., Jones N.F., Min Z., Rao U. Rejection of the component tissues of limb allografts in rats immunosuppressed with FK-506 and Cyclosporine. *Plast Reconstr Surg* 1996, 97, 139-148
31. Jones N.F., Hebebrand D., Büttmeyer R., Zhao M., Benhaim P., Rao U. Comparison of long-term immunosuppression for limb transplantation using Cyclosporine, Tacrolimus, and Mycophenolate Mofetil: implications for clinical composite tissue transplantation. *Plast Reconstr Surg* 2001, 107, 777-784
32. Foster R.D., Fan L., Niepp M., Kaufman C., Chen S.G., Ascher N., Ildstad S., Mathes S.J., Anthony J.P. Mixed allogeneic chimeras as a model for tolerance induction in composite tissue allografts: chimeric stability and functional recovery. *Plastic Surg* 605-607
33. Vossen M., Gorantla V., Perez-Abadia G., Brouha P.C.R., Francois C.G., Laurentin-Perez L.A., Pidwell D., Maldonado C., Breidenbach W.C., Kon M., Berker J.H. Vascularized bone marrow transplantation: fact or fiction? *Plastic Surg* 2001, 525-526
34. Llull R., Murase N., Ye Q., Manez R., Demetris A.J., Fournier V., Starzl T.E. Vascularized bone marrow transplantation in rats: evidence for amplification of hemolymphoid chimerism and freedom from graft-versus-host reaction. *Transplant Proc* 1995, 27, 164-165

35. Llull R., Murase N., Demetris A.J., Ye Q., Manez R., Starzl T.E. Multilineage amplification of graft-vs-host disease-resistant chimerism following rat vascularized bone marrow allotransplantation. *Transplant Proc* 1995, 27, 2363-4
36. Olszewski W.L., Lukomska B., Durlik M., Namyslowski A., Cybulska E. Bone marrow cells transplanted in suspension or in vascularized bone graft repopulate not only bone marrow but also lymphoid organs. *Transplant Proc* 1994, 26, 3319-3320
37. Lapsiński, brak danych bibliograficznych
38. Lipson R.A., Kawano H., Halloran P.F., McKee N.H., Pritzker K.P.H., Langer F. Vascularized limb transplantation in the rat. *Transplantation* 1983, 35, 293-299
39. Yaremchuk M.J., Nettelblad H., Randolph M.A., Weiland A.J. Vascularized bone allograft transplantation in a genetically defined rat model. *Plast Reconstr Surg* 1985, 75, 355-362
40. Press B.H., Sibley R.K., Shons A.R.. Limb allotransplantation in the rat: extended survival and return of nerve function with continuous cyclosporin/prednisone immunosuppression. *Ann Plast Surg* 1986, 16, 313-321
41. Kim S.K., Aziz S., Oyer P, Hentz V.R. Use of Cyclosporin A in allotransplantation of rat limbs. *Ann Plast Surg* 1984, 12, 249-255
42. Hewitt Ch.W., Black K.S., Fraser L.A., Howard E.B., Martin D.C., Achauer B.M., Furnas D.W. Composite tissue (limb) allografts in rat. *Transplantation* 1985, 39, 360-364
43. Durlik M., Lukomska B., Modrzycka-Michalik M., Olszewski W.L. Bone marrow reconstitution in irradiated rats receiving syngeneic hind limb graft. *Eur Surg Res* 1991, 23, 30
44. Lukomska B., Durlik M., Modrzycka-Michalik M., Olszewski W.L. Transplantation of vascularized bone marrow. *Transplant Proc* 1991, 23, 887-888
45. Olszewski W.L., Lukomska B., Durlik M., Ziemiński A. Bone marrow in bone versus bone marrow cell suspension transplant. *Transplant Proc* 1992, 24, 3002-3003
46. Durlik M., Olszewski W.L. Przeszczepianie kończyny. *Pol Przegl Chir* 1993, 65, 933-937
47. Janczewska S., Ziolkowska A., Durlik M., Olszewski W.L., Lukomska B. Fast lymphoid reconstitution after vascularized bone marrow transplantation in lethally irradiated rats. *Transplantation*, 1999, 68, 201-209
48. Durlik M., Lukomska B., Namyslowski A., Cybulska E., Janczewska S., Olszewski W.L. The kinetics of seeding of syngeneic cells vascularized bone marrow grafts. *Transplant Proc* 1997, 4, 2008-2009
49. Durlik M., Lukomska B., Modrzycka-Michalik M., Olszewski W.L. Doświadczalny allogeniczny przeszczep kończyny. I. Kinetyka ostrego odrzucenia skóry i szpiku. *Pol Przegl Chir* 1993, 65, 1006-1014

50. Olszewski W.L., Lukomska B., Durlik M., Namyslowski A., Laszuk D., Cybulska E. Nonsecific rapid elimination of transplanted allogeneic bone marrow cells. *Transplant Proc* 1997, 29, 2073-2074

51. Durlik M., Lukomska B., Cybulska E., Olszewski W.L. Cyclosporine changes the rejection pattern of different tissues in vascularized hind limb allograft. *Pol J Immunol* 1995, 20, 362-364

52. Durlik M., Lukomska B., Namyslowski A., Cybulska E., Janczewska S., Olszewski W.L. Long-term survival of limb allografts after weaning of cyclosporine: possible role of microchimerism. *Transplant Proc* 1997, 29, 1226-1227

53. Durlik M., Lukomska B., Religa P., Ziolkowska H., Namyslowski A., Janczewska S., Cybulska E., Sojn J., Gaciong Z., Olszewski W.L. Tolerance induction folling allogenic vascularized bone marrow transplantation – the possible role of microchimerism. *Transpl Int* 1998, 11, 299-302

54. Olszewski W.L., Durlik M., Lukomska B., Religa P., Ziolkowska H., Janczewska S., Cybulska E., Sojn J., Gaciong Z., Interewicz B. Donor DNA can be detected in recipient tissues during rejection of allograft. *Transpl Int* 2000, 13, S461-464

55. Lukomska B., Janczewska S., Durlik M., Olszewski W.L. Kinetics of bone marrow repopulation in lethally irradiated rats after transplantation of vascularized bone marrow in syngeneic hind limb. *Ann Transplant* 2000, 5, 14-20

56. Yeh L.-S., Gregory C.R., Theriault B.R., Hou S.-M., Lecouter R.A. A functional model for whole limb transplantation in the rat. *Plast Reconstr Surg* 2000, 105, 1704-1711

57. Tai C.Y., France M., Strande L.F., Eydelman R., Matthews M., Dalsey R., Hewitt C.W. An extraperitoneal isolated vascularized bone marrow transplant model in the rat. *The XIX International Congress of The Transplantation Society*, 333

58. Suzuki H., Patel N., Matthews M., DelRossi A.J., Doolin E.J., Hewitt Ch.W. Vascularized bone marrow transplantation: a new surgical approach using isolated femoral bone/bone marrow. *J Surg Res* 2000, 89, 176-183

59. Zhang F., Shi de Y., Kryger Z., Moon W., Lineaweaver W.C., Buncke H.J. Development of a mouse limb transplantation model. *Microsurgery* 1999, 19, 209-213

60. Höhnke C., Russavage J.M., Subbotin V., Llull R., Starzl T.E., Sotereanos G.C. Vascularized composite tissue mandibular transplantation in dogs. *Transplant Proc* 1997, 29, 995

61. Mizumoto S., Tamai S., Goshima J., Yajima H., Yoshii T., Fukui A., Masuhara K. Experimental study of vascularized tibiofibula graft in inbred rats: a preliminary report. *J Reconstr Microsurg* 1986, 3, 1

62. Yaremchuk M.J., Sedacca T., Schiller A.L., May J.W. Vascular knee allograft transplantation in a rabbit model. *Plast Reconstr Surg* 1983, 71, 461-471

63. Santiago S.F., de Faria W., Toufeeq Khan T.F., Gandia C.E., Misiakos E.P., Ferrer L., Ruiz P., Coleman L., Fernandez H.F., Miller J., Ricordi C., Tzakis A.G. Heterotopic sternum transplant in rats: a new model of a vascularized bone marrow transplantation. *Microsurgery* 1999, 19, 330-334

64. Mathew J.M., Garcia-Morales R.O., Carreno M., Jin Y., Fuller L., Blomberg B., Cirocco R., Burke G.W., Ciancio G., Ricordi C., Esquenazi V., Tzakis A.G., Miller J. Immune responses and their regulation by donor bone marrow cells in clinical organ transplantation. *Transpl Int* 2003, 11, 307-321

Mechanizm działania przeszczepianego szpiku

a) Komórki dendrytyczne

65. Fairchild P.J., Waldmann H. Dendritic cells and prospects for transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol.* 2000, 12, 528-35

66. Wells A.D., Li X.C., Li Y., Walsh M.C., Zheng X.X., Wu Z., Nunez G., Tang A., Sayegh M., Hancock W.W., Strom T.B., Turka L.A. Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance. *Nat Med.* 1999, 5, 1303-7

67. Li Y., Li X.C., Zheng X.X., Wells A.D., Turka L.A., Strom T.B. Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nat Med.* 1999, 5, 1298-302

68. Hayamizu K., Huie P., Sibley R.K., Strober S. Monocyte-derived dendritic cell precursors facilitate tolerance to heart allografts after total lymphoid irradiation. *Transplantation.* 1998, 66, 1285-91

69. DePaz H.A., Oluwole O.O., Adeyeri A.O., Witkowski P., Jin M.X., Hardy M.A., Oluwole S.F. Immature rat myeloid dendritic cells generated in low-dose granulocyte macrophage-colony stimulating factor prolong donor-specific rat cardiac allograft survival. *Transplantation.* 2003, 75, 521-8

70. Jin Y., Fuller L., Esquenazi V., Ciancio G., Burke G.W., Tzakis A.G., Ricordi C., Miller J. Antigen presentation and immune regulatory capacity of immature and mature dendritic cell enriched population derived from human bone marrow. *Transplantation* 2002, 74, 599

71. Gozzo J., Masli S., De Fazio S. Extension of graft survival with pulsed administration of donor dendritic cells. *Transplant Proc.* 1999, 31, 1196

72. Lee W.C., Chiang Y.J., Lai S.R., Wang H.C., Jeng L.B., Chen M.F., Lu L., Qian S. Donor immature dendritic cells induce hyporesponse of recipients' T-lymphocytes. *Transplantation* 2002, 74, 236

73. Mathew J.M., Carreno M., Fuller L., Ricordi C., Tzakis A., Esquenazi V., Miller J. Modulatory effects of human donor bone marrow cells on allogeneic cellular immune responses. *Transplantation* 1997, 63, 686-92

b) Przeszczepianie szpiku w zawieszynie

74. Khanna A., Steptoe R.J., Antonysamy M.A., Li W., Thomson A.W. Donor bone marrow potentiates the effect of tacrolimus on nonvascularized heart allograft survival: association with microchimerism and growth of donor dendritic cell progenitors from recipient bone marrow. *Transplantation*. 1998, 65, 479-85

75. Spriewald B.M., Billing J.S., Ensminger S.M., Morris P.J., Wood K.J. Linked unresponsiveness: early cytokine gene expression profiles in cardiac allografts following pretreatment of recipients with bone marrow cells expressing donor MHC alloantigen. *Cytokine*. 2002;19(1):6-13

76. Blaha P., Bigenzahn S., Koporc Z., Schmid M., Langer F, Selzer E., Bergmeister H., Wrba F, Kurtz J., Kiss C., Roth E., Muehlbacher F, Sykes M., Wekerle T. The influence of immunosuppressive drugs on tolerance induction through bone marrow transplantation with costimulation blockade. *Blood*. 2003, 101, 2886-93

77. Siemionow M., Ortak T, Izycki D., Oke R., Cunningham B., Prajapati R., Zins J.E. Induction of tolerance in composite-tissue allografts. *Transplantation*. 2002, 74, 1211-7

78. Fontes P., Rao A.S., Demetris A.J., Zeevi A., Trucco M., Carroll P, Rybka W., Rudert W.A., Ricordi C., Dodson F., et al. Bone marrow augmentation of donor-cell chimerism in kidney, liver, heart, and pancreas islet transplantation. *Lancet*. 1994, 344, 151-5

79. Ricordi C., Karatzas T, Nery J., Webb M., Selvaggi G., Fernandez L., Khan F.A., 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: the effect of timing. *Transplantation*. 1997;63(1):7-11.

80. Sykes M., Szot G.L., Swenson K.A., Pearson D.A. Induction of high levels of allogeneic hematopoietic reconstitution and donor-specific tolerance without myelosuppressive conditioning. *Nat Med*. 1997, 3, 783-7

81. Rigney M.E., Gignac M.R., Gritsch H.A., Chatlos L.J., Hoffman R.A., Jordan M.L. Graft hyporeactivity induced by donor-specific bone marrow. *Transplantation*. 1996, 62, 1601-5

82. Ricordi C., Karatzas T, Selvaggi G., Neri J., Fernandez H., Ruiz M.P., Linetsky E., Kong S.S., Webb M., Bottino R., et al. Enhanced allograft acceptance by multiple infusions of donor bone marrow in humans. *Transplant Proc*. 1995, 27, 3381

83. Rothmeier C., Roux E., Spiliopoulos A., Gerbase M., Nicod L.P. Early chimerism of macrophages and lymphocytes in lung transplant recipients is predictive of graft tolerance. *Transplantation*. 2001, 71, 1329-33

84. Masli S., De Fazio S.R., Gozzo J.J. Requirement for early donor cell chimerism during prolonged survival of murine skin allografts. *Transplantation*. 2000, 69, 1667-75

85. Wekerle T., Nikolic B., Pearson D.A., Swenson K.G., Sykes M. Minimal conditioning required in a murine model of T cell depletion, thymic irradiation and high-dose bone marrow transplantation for the induction of mixed chimerism and tolerance. *Transpl Int.* 2002, 15, 248-53

86. Rao A.S., Fontes P., Zeevi A., Rugeles M., Shapiro R., Jordan M., Corry R., Dodson F., Rilo H.L., Rastellini C., et al. Enhancement of donor cell chimerism in whole organ allograft recipients by adjuvant bone marrow transplantation. *Transplant Proc.* 1995;27(6):3387-8

c) Przeszczepianie unaczynionego szpiku

87. Ramsamooj R., Llull R., Patel M.P., Beko K.R. 2nd, Black K.S., Hewitt C.W. Mechanisms of alloimmune tolerance associated with mixed chimerism induced by vascularized bone marrow transplants. *Cell Transplant.* 2002, 11, 683-93

88. Tai C.Y., France M.A., Strande L.F., Eydelman R., Sheng X., Matthews M.S., Dalsey R., Hewitt C.W. An extraperitoneal isolated vascularized bone marrow transplant model in the rat. *Transplantation.* 2003, 75, 1591-3

89. Suzuki H., Patel N., Matthews M., DelRossi A.J., Doolin E.J., Hewitt C.W. Vascularized bone marrow transplantation: A new surgical approach using isolated femoral bone/bone marrow. *J Surg Res.* 2000, 89, 176-83

90. Talmor M., Steinman R.M., Codner M.A., Chen M., Harper A.D., Witmer-Pack M.D., Hoffman L.A. Bone marrow-derived chimerism in non-irradiated, cyclosporin-treated rats receiving microvascularized limb transplants: evidence for donor-derived dendritic cells in recipient lymphoid tissues. *Immunology.* 1995, 86, 448-55

91. Ozer K., Oke R., Gurunluoglu R., Zielinski M., Izycki D., Prajapati R., Siemionow M. Induction of tolerance to hind limb allografts in rats receiving cyclosporine A and antilymphocyte serum: effect of duration of the treatment. *Transplantation.* 2003, 75, 31-6

92. Mathes D.W., Randolph M.A., Bourget J.L., Nielsen G.P, Ferrera V.R., Arn J.S., Sachs D.H., Lee W.P. Recipient bone marrow engraftment in donor tissue after long-term tolerance to a composite tissue allograft. *Transplantation.* 2002, 73, 1880-5

93. Tsuchida Y., Usui M., Uede T. Vascularized bone-marrow allotransplantation in rats prolongs the survival of simultaneously grafted alloskin. *J Reconstr Microsurg.* 2002, 18, 289-94.

94. Foster R.D., Fan L., Neipp M., Kaufman C., McCalmont T., Ascher N., Ildstad S., Anthony J.P, Niepp M. Donor-specific tolerance induction in composite tissue allografts. *Am J Surg.* 1998, 176, 418-21

95. Ajiki T., Takahashi M., Inoue S., Sakuma Y., Oyama S., Kaneko T., Hakamata Y., Murakami T., Kume A., Kariya Y., Hoshino Y., Kobayashi E. Generation of donor hematology cells after rat-limb composite grafting. *Transplantation.* 2003, 75, 631-6

96. Siemionow M., Ortak T., Izycki D., Oke R., Cunningham B., Prajapati R., Zins J.E. Induction of tolerance in composite-tissue allografts. *Transplantation*. 2002, 74, 1211-7

97. Askenasy N. Localized bone marrow transplantation leads to skin allograft acceptance in nonmyeloablated recipients: comparison of intra-bone marrow and isolated limb perfusion. *Stem Cells*. 2002, 20, 86-93

98. Tung T.H., Mackinnon S.E., Mohanakumar T. Long-term limb allograft survival using anti-CD40L antibody in a murine model. *Transplantation*. 2003, 75, 644-50

99. Bingaman A.W., Waitze S.Y., Alexander D.Z., Cho H.R., Lin A., Tucker-Burden C., Cowan S.R., Pearson T.C., Larsen C.P. Transplantation of the bone marrow microenvironment leads to hematopoietic chimerism without cytoreductive conditioning. *Transplantation*. 2000, 69, 2491-6

100. Hewitt C.W., Black K.S., Henson L.E., Achauer B.M., Nguyen J.H. Lymphocyte chimerism in a full allogeneic composite tissue (rat-limb) allograft model prolonged with cyclosporine. *Transplant Proc*. 1988, 20, 272-8

d) Migracja komórek szpiku

101. Talmor M., Steinman R.M., Codner M.A., Chen M., Harper A.D., Witmer-Pack M.D., Hoffman L.A. Bone marrow-derived chimerism in non-irradiated, cyclosporin-treated rats receiving microvascularized limb transplants: evidence for donor-derived dendritic cells in recipient lymphoid tissues. *Immunology*. 1995, 86, 448-55

102. Ajiki T., Takahashi M., Inoue S., Sakuma Y., Oyama S., Kaneko T., Hakamata Y., Murakami T., Kume A., Kariya Y., Hoshino Y., Kobayashi E. Generation of donor hematology cells after rat-limb composite grafting. *Transplantation*. 2003, 75, 631-6

103. Saiki T., Ezaki T., Ogawa M., Matsuno K. Trafficking of host- and donor-derived dendritic cells in rat cardiac transplantation: allosensitization in the spleen and hepatic nodes. *Transplantation*. 2001, 71, 1806-15

104. Codner M.A., Shuster B.A., Steinman R.M., Harper A.D., LaTrenta G.S., Hoffman L.A. Migration of donor leukocytes from limb allografts into host lymphoid tissues. *Ann Plast Surg*. 1990, 25, 353-9

105. Demetris A.J., Murase N., Fujisaki S., Fung J.J., Rao A.S., Starzl T.E. Hematology cell trafficking, microchimerism, and GVH reactions after liver, bone marrow, and heart transplantation. *Transplant Proc*. 1993, 25, 3337-44

e) Apoptoza

106. Fairchild P.J., Waldmann H. Dendritic cells and prospects for transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol*. 2000, 12, 528-35

107. Kleinclaus F., Perruche S., Angonin R., De Carvalho-Bittencourt M., Bittard H., Chalopin J.M., Cahn J.Y., Hervé P., Tiberghien P., Saas P.

Intravenous infusion of apoptotic leukocytes with allogeneic bone marrow transplantation induces tolerance to donor antigens. *Transplantation* 2002, 74, 3

108. Goldstein D.R., Thomas J.M., Kirklin J.K., George J.F. Indefinite allograft survival mediated by donor bone marrow is dependent on the presence of a functional CD95 (Fas) gene in recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2001, 20, 1132-5

109. Lu L., Thomson A.W. Manipulation of dendritic cells for tolerance induction in transplantation and autoimmune disease. *Transplantation*. 2002, 73, S19-22

f) Komórki regulacyjne

110. Guttman R.D., Aust J.B. Acquired tolerance to homografts produced by homologous spleen cell injection in adult mice. *Nature*. 1961, 192, 564

111. Thomson A.W., Takayama T. Dendritic cells and the outcome of organ transplantation: a contemporary view. *Transplant Proc*. 1999, 31, 2738-9

112. Thomson A.W., Lu L. Are dendritic cells the key to liver transplant tolerance? *Immunol Today* 1999, 20, 27-32

113. Cobbold S.P., Graca L., Lin C.Y., Adams E., Waldmann H. Regulatory T cells in the induction and maintenance of peripheral transplantation tolerance. *Transpl Int* 2003, 16, 66-75

Mikrochimerizm po przeszczepieniu szpiku

114. Shirwan H., Wang H.K., Barwari L., Makowka L., Cramer D.V. Pretransplant injection of allograft recipients with donor blood or lymphocytes permits allograft tolerance without the presence of persistent donor microchimerism. *Transplantation*. 1996, 61, 1382-6

115. Norris S., Lawler M., McCann S., Hegarty J., O'Farrelly C. Donor type microchimerism is an infrequent event following liver transplantation and is not associated with graft acceptance. *Hepatology*. 1997, 26, 848-52

116. McDaniel D.O., Naftilan J., Hulvey K., Shaneyfelt S., Lemons J.A., Lagoo-Deenadayalan S., Hudson S., Diethelm A.G., Barber W.H. Peripheral blood chimerism in renal allograft recipients transfused with donor bone marrow. *Transplantation*. 1994, 57, 852-6

117. Alard P., Matriano J.A., Socarras S., Ortega M.A., Streilein J.W. Detection of donor-derived cells by polymerase chain reaction in neonatally tolerant mice. Microchimerism fails to predict tolerance. *Transplantation*. 1995, 60, 1125-30

118. Fontes P., Rao A.S., Demetris A.J., Zeevi A., Trucco M., Carroll P., Rybka W., Rudert W.A., Ricordi C., Dodson F., et al. Bone marrow augmentation of donor-cell chimerism in kidney, liver, heart, and pancreas islet transplantation. *Lancet*. 1994, 344, 151-5

119. Elwood E.T., Larsen C.P., Maurer D.H., Routenberg K.L., Neylan J.F., Welchel J.D., O'Brien D.P., Pearson T.C. Microchimerism and rejection in clinical transplantation. *Lancet*. 1997, 349, 1358-60

120. Hale D.A., Gottschalk R., Umemura A., Maki T., Monaco A.P. Establishment of stable multilineage hematopoietic chimerism and donor-specific tolerance without irradiation. *Transplantation*. 2000, 69, 1242-51

121. Burke G.W., Ciancio G., Garcia-Morales R., Ricordi C., Alejandro R., Roth D., Viciano A., Cirocco R., Fragulidis G., Markou M., Tzakis A., Miller J. Evidence for microchimerism in peripheral blood, bone marrow, and skin following donor bone marrow/kidney-pancreas transplantation at 3 years. *Transplant Proc*. 1998, 30, 1555

122. Rothmeier C., Roux E., Spiliopoulos A., Gerbase M., Nicod L.P. Early chimerism of macrophages and lymphocytes in lung transplant recipients is predictive of graft tolerance. *Transplantation*. 2001, 71, 1329-33

123. Umemura A., Morita H., Li X.C., Tahan S., Monaco A.P., Maki T. Dissociation of hemopoietic chimerism and allograft tolerance after allogeneic bone marrow transplantation. *J Immunol*. 2001, 167, 3043-8

124. Rao A.S., Fontes P., Zeevi A., Rugeles M., Shapiro R., Jordan M., Corry R., Dodson F., Rilo H.L., Rastellini C., et al. Enhancement of donor cell chimerism in whole organ allograft recipients by adjuvant bone marrow transplantation. *Transplant Proc*. 1995, 27, 3387-8

125. Ko S., Deiwick A., Jager M.D., Dinkel A., Rohde F., Fischer R., Tsui T.Y., Rittmann K.L., Wonigeit K., Schlitt H.J. The functional relevance of passenger leukocytes and microchimerism for heart allograft acceptance in the rat. *Nat Med*. 1999, 5, 1292-7

126. Ozer K., Ortak T., Zielinski M., Izycki D., Prajapati R., Siemienow M. The role of chimerism in tolerance induction to composite tissue allografts. *Transplantation* 2002, 74, 99

127. Butler P.E., Lee W.P., Sims C.D., Randolph M.A., Vacanti C.A., Yaremchuk M.J.. Cell transplantation from limb allografts. *Plast Reconstr Surg* 1998, 102, 161-168

Tolerancja na przeszczep allogeniczny po przeszczepieniu szpiku przy stosowanej immunosupresji

128. Butler P.E.M., Andrew Lee W.P., van de Water A.P., Randolph M.A. Neonatal Induction of tolerance to skeletal tissue allografts without immunosuppression. *Plast Reconstr Surg* 2000, 105, 2424-2432

129. Hiotis S.P., Wnuk K.L., Blumenthals W.A., Halaris S.A.A., Good R.A. Successful limb transplantation across a multi-minor barrier facilitated by preceding engraftment of T-cell-purged donor and recipient bone marrow. *Transplant Proc* 1999, 31, 692-693

130. Andrew Lee W.P., Butler P.E.M., Randolph M.A., Yaremchuk M.J. Donor modification leads to prolonged survival of limb allografts. *Plast Reconstr Surg* 2001, 108, 1235-1240

131. Mathes D.W., Bourget J.L., Randolph M.A., Solari M.G., Wu A., Sachs D.H., Andrew Lee W.P. Tolerance to limb allografts in a miniature swine model. *Plastic Surg*, 581-583

132. Fealy M.J., Umansky W.S., Bickel K.D., Nino J.J., Morris R.E., Press B.H.J. Efficacy of rapamycin and FK506 in prolonging rat hind limb allograft survival. *Ann Surg* 1994, 219, 88-93

133. Kuroki H., Ishida O., Daisaku H., Fukuhara K., Hatano E., Murakami T., Ikuta Y., Matsumoto A.K., Akiyama M. Morphological and immunological analysis of rats with long-term-surviving limb allografts induced by a short course of FK506 or Cyclosporine. *Transplant Proc* 1991, 23, 516-520

133a. Arai K., Hotokebuchi T., Miyahara H., Arita C., Mohtai M., Sugioka Y., Kaibara N. Prolonged limb allograft survival with short-term treatment with FK506 in rats. *Transplant Proc* 1989, 21, 3191-3193

134. Benhaim P., Anthony J.P., Ferreira L., Borsanyi J.-P., Mathes S.J. Use of combination of low-dose cyclosporine and RS-61443 in a rat hindlimb model of composite tissue allotransplantation. *Transplantation* 1996, 61, 527-532

135. Hotokebuchi T., Arai K., Arita C., Miyahara H., Sugioka Y., Kaibara N. Limb allografts in skeletally immature rats with cyclosporin: behavior of the growth plate. *Transplant Proc* 1989, 21, 3183-3185

135a. Fealy M.J., Most D., Huie P., Wolf M., Sibley R.K., Morris R.E., Press B.H.J. Association of down-regulation of cytokine activity with rat hind limb allograft survival. *Transplantation* 1995, 59, 1475-1480

136. Hotokebuchi T., Arai K., Takagishi K., Arita C., Sugioka Y., Kaibara N. Limb allografts in rats immunosuppressed with cyclosporine: as a whole-joint allograft. *Plast Reconstr Surg* 1989, 83, 1027-1038

136a. Lee A.W.P., Randolph M.A., Weiland A.J., Yaremchuk M.J. Prolonged survival of vascularized limb tissue allografts by donor irradiation. *J Surg Res* 1995, 59, 578-588

137. van den Helder T.B.M., Benhaim P., Anthony J.P., McCalmont T.H., Mathes S.J. Efficacy of RS-61443 in reversing acute rejection in a rat model of hindlimb allotransplantation. *Transplantation* 1994, 57, 427-433

138. Benhaim P., Anthony J.P., Lewis J.C., Mathes S.J. Improved sciatic nerve regeneration in rat hindlimb allografts immunosuppressed with RS-61443. *Plastic Surg* 1994, 717-719

138a. Jones J.W., Üstüner T., Zdichavsky M., Edelstein J., Ren X., Maldonado C., Ray M., Jevans A.W., Breidenbach W.C., Gruber S.A., Barker J.H. Long-term survival of an extremity composite tissue allograft with FK506 – mycophenolate mofetil therapy. *Surgery* 1999, 126, 384-388

139. Quatra F., Romeo O.M., Lowenberg D., Brooks D., Stagno D'Alcontres F., Colonna M.R., Buncke H.J. Short-term administration of deoxyspergualin and an anti-T cell receptor alpha/beta antibody prolongs survival of rat limb allografts. *Transplantation* 2002, 74, 300

140. Ozer K., Oke R., Gurunluoglu R., Izycki D., Siemienow M. Induction of tolerance to hind limb allografts in rats under Cyclosporine A and anti-lymphocyte serum treatment. *Transplantation* 2002, 74, 314

141. Mathes D.W., Randolph M.A., Solari M.G., Nazzal J.A., Nielsen G.P., Arn J.S., Sachs D.H., Andrew Lee W.P. Split tolerance to a composite tissue allograft in a swine model. *Transplantation* 2003, 75, 25-31

142. Jaskłowska-Englisz M., Olszewski W.L., Maksymowicz M., Ziółkowska A. Protection of heart and rejection of lymphocyte allografts from the same donor in recipients of donor-specific transfusions. *Ann Transpl* 1998, 3, 28-33

143. Kuroki H., Bean M.A., Ikuta Y., Akiyama M., Burgess E.M. Effect of FK506 and donor-specific blood transfusion on the rat composite tissue limb allograft and the mechanism of long-term graft survival. *Transplant Proc* 1993, 25, 658-661

144. Mathes D.W., Randolph M.A., Solari M.G., Nazzal J.A., Svennevik E., Gazelle G.S., Sachs D.H., Andrew Lee W.P. Intravascular in utero injection of adult bone marrow leads to acceptance of fully mismatched composite tissue allografts. *Plastic Surg* 2001, 529-531

145. Sato Y., Ajiki T., Inoue S., Hakamata Y., Murakami T., Kaneko T., Takahashi M., Kobayashi E. A novel gene therapy to the graft organ by a rapid injection of naked DNA I: long-lasting gene expression in a rat model of limb transplantation. *Transplantation* 2003, 76, 1294-1298

146. Morris G.E., Browse N.L., Butler L. Prior administration of donor-strain epidermal cells or macrophages to enhance survival of rat hind-limb allografts. *Transplantation* 1987, 44, 572-575

147. Andrew Lee W.P., Rubin P., Bourget J.L., Cober S.R., Randolph M.A., Nielsen P., Ierino F.L., Sachs D.H. Tolerance to limb tissue allografts between swine matched for major histocompatibility complex antigens. *Plast Reconstr Surg* 2001, 107, 1482-1491

Reakcja przeszczep-przeciw-gospodarzowi (graft-versus-host, GvH) po przeszczepieniu kończyny

148. Leszczynski D., Renkonen R., Häyry P. Bone marrow transplantation in the rat. III. Structure of the liver inflammatory lesion in acute graft-versus-host disease. *Am J Pathol* 1985, 120, 316-322

149. Renkonen R. Bone marrow transplantation in the rat. V. Lymphoid cell subclasses in the target organs during acute graft-versus-host disease. *Transplantation* 1986, 41, 704-708

150. Renkonen R., Häyry P. Bone marrow transplantation in the rat. II. Quantitation of cellular infiltrates in parenchymal target organs in acute graft-versus-host disease. *Scand J Immunol* 1986, 23, 351-356
151. Renkonen R., Häyry P. Bone marrow transplantation in the rat. I. Histologic correlations and quantitation of cellular infiltrates in acute graft-versus-host disease. *Am J Pathol* 1984, 117, 462-470
152. Renkonen R., Häyry P. Bone marrow transplantation in the rat. Lytic functions of inflammatory leukocytes during acute graft-versus-host disease. *APMIS* 1989, 97, 147-152
153. Renkonen R., Wangel A., Häyry P. Bone marrow transplantation in the rat. B lymphocyte activation in acute graft-versus-host disease. *Transplantation* 1986, 41, 290-295
154. Triulzi D.J., Nalesnik M.A. Microchimerism, GVHD, and tolerance in solid organ transplantation. *Transfusion* 2001, 41, 419-426
155. Ramsamooj R., Llull R., Tatem L.D., Black K.S., Lotano V., Dalsey R.M., Born C.T., DeLong W.G., Hewitt C.W. Graft-versus-host disease in limb transplantation: digital image analysis of bone marrow and TGF-beta expression in situ using a novel 3-D microscope. *Transplant Proc* 1996, 28, 2029-2031
156. Llull R., Murase N., Ye Q., Demetris A.J., Starzl T.E. Chimerism, graft-vs-host disease, rejection, and their association with reciprocal donor-host immune reactions after cell, organ, and composite tissue transplantation. *Transplant Proc.* 1997, 29, 1203-4
157. Gorantla V., Perez-Abadia G., Prabhune K., Orhun H., Majzoub R., Kakoulidis T., Maldonado C., Anderson G., Ogden L., Breidenbach W., Ildsad S., Berker J.H. Composite tissue allografts: tolerance induction without graft-versus-host disease. *Plastic Surg* 2001, 578-580
158. Ramsamooj R., Llull R., Black K.S., Hewitt C.W. Composite tissue allografts in rats: IV. Graft-versus-host disease in recipients of vascularized bone marrow transplants. *Plast Reconstr Surg.* 1999, 104, 1365-71
159. Walgenbach K.-J., Llull R., Murase N., Starzl T.E., Hirner A. Immunocytes of composite tissue allografts express elevated levels of TGF beta mRNA and protein during chronic rejection. *Transplant Proc.* 1997, 29, 1542
160. Ramsamooj R., Llull R., Tatem L.D., Black K.S., Lotano V., Dalsey R.M., Born C.T., DeLong W.G., Hewitt C.W. Graft-versus-host disease in limb transplantation: digital image analysis of bone marrow and TGF-beta expression in situ using a novel 3-D microscope. *Transplant Proc* 1996, 28, 2029-2031
161. Hewitt C.W., Englesbe M.J., Tatem L.D., Strande L.F., Doolin E.J., Dalsey R.M., DeLong W.G. Graft-versus-host disease in extremity transplantation: digital image analysis of bone marrow in situ. *Ann Plast Surg* 1995, 35, 108-112
162. Brouha P.C.R., Perez-Abadia G., Francois C.G., Gorantla V., Vossen M., Laurentin-Perez L.A., Maldonado C., Anderson G., Kon M., Berker J.H.

Prevention of graft-versus-host disease in chimeric hosts by lymph node removal prior to limb allotransplantation. *Plastic Surg* 2001, 527-528

163. Brouha P.C.R., Perez-Abadia G., Francois C.G., Gorantla V, Vossen M., Laurentin-Perez L.A., Maldonado C., Anderson G., Kon M., Berker J.H. Prevention of graft-versus-host disease in chimeric hosts by lymph node removal prior to limb allotransplantation. *Plastic Surg* 2001, 527-529

164. Granger D.K., Briedenbach W.C., Pidwell D.J., Jones J.W., Baxter-Lowe L.A., Kaufman C.L. Lack of donor hyporesponsiveness and donor chimerism after clinical transplantation of the hand. *Transplantation* 2002, 74, 1624-1630

165. Kanitakis J., Jullien D., Petruzzo P, Francès C., Claudy A., Revillard J.P., Dubernard J.-M. Immunohistologic studies of the skin of human hand allografts: our experience with two patients. *Transplant Proc* 2001, 33, 1722

166. Olszewski W.L., Interewicz B., Maksymowicz M., Durlik M. Biological aspects of limb transplantation I. Migration of transplanted bone marrow cells into recipient. *Plast Reconstr Surg* 2003, 112, 1628-35

167. Interewicz B., Olszewski W.L., Maksymowicz M., Stanislawska J., Szyper E. DNA from rejecting donor organs can be detected in recipient lymphoid and non-lymphoid tissues. *Ann Transpl* 2002, 7, 32-35