

## II. СИСТЕМА АУТОТОЛЕРАНТНОСТИ И ЕЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННЫХ ОРГАНОВ

*Артамонов С.Д., Онищенко Н.А., Башкина Л.В., Сускова В.С., Крашенинников М.Е., Никольская А.О., Великий Д.А.*

ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва

Результаты анализа современного состояния проблемы формирования трансплантационной толерантности показывают, что индукция толерантности связана с использованием регуляторных возможностей клеток костного мозга донора. Гемопоэтические стволовые клетки костного мозга могут быть использованы для создания центральной толерантности. Для создания активной периферической толерантности могут быть использованы малодифференцированные дендритные клетки мононуклеарной фракции костного мозга, которые при сокультивировании способны участвовать в получении Т-регуляторных клеток памяти реципиента и в предотвращении острого и хронического отторжения трансплантата.

*Ключевые слова: центральная толерантность, периферическая толерантность, костный мозг, Т-регуляторные клетки, трансплантационная толерантность.*

## II. THE SYSTEM OF AUTOTOLERANCE AND ITS FUNCTIONING IN ALLOGENIC ORGAN TRANSPLANTATION

*Artamonov S.D., Onishchenko N.A., Bashkina L.V., Suskova V.S., Krasheninnikov M.E., Nikol'skaya A.O., Velikiy D.A.*

Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow

It was ascertained, that induction of transplantation tolerance are bound with the using of regulatory possibilities of donor's bone marrow cells. Hemopoietical bone marrow stem cells may be used to induct the central tolerance into organism of recipient. For inducing of the active peripheral tolerance may be used small-differentiated dendrite cells of bone marrow, which are able to take part in receiving of T-regulatory memory cells, which are preventing both acute and chronic allograft rejection.

*Key words: central tolerance, peripheral tolerance, bone marrow, T-regulatory cells, transplantation tolerance.*

Большинство регуляторных реакций в адаптивной системе иммунитета протекает в органах иммуногенеза, которые подразделяются на центральные и периферические. К центральным органам иммуногенеза, в которых идет образование Т- и В-клеток из малодифференцированных предшественников, относят костный мозг и тимус; к периферическим

относят органы, в которых идет окончательное созревание Т- и В-лимфоцитов: селезенку, лимфоузлы, миндалины, лимфоидные скопления в подслизистых оболочках и т. п. Выработка толерантности предполагает четко координированное взаимодействие центральных и периферических органов иммуногенеза, с помощью которых в организме создаются

*Статья поступила в редакцию 07.05.10 г.*

*Контакты: Артамонов Сергей Дмитриевич, к. м. н., ст. науч. сотр. лаборатории биотехнологии стволовых клеток.*

*Тел. 8-926-364-36-89*

условия для формирования соответственно центральной и периферической толерантности [5, 19].

## 1. ЦЕНТРАЛЬНАЯ ТОЛЕРАНТНОСТЬ

Необходимость центральной толерантности обусловлена тем, что из-за рекомбинации генов, отвечающих за синтез иммуноглобулинов В-лимфоцитов и Т-клеточных рецепторов, малодифференцированные формы этих клеток постоянно воспроизводят всевозможные иммунные специфичности, которые необходимо постоянно подвергать селекции для формирования толерантности и сохранения иммунного гомеостаза. Принято считать, что эту функцию в организме выполняет преимущественно тимус, который через селекцию Т-клеток предотвращает также и несанкционированную активацию аутоиммунных В-лимфоцитов; однако предварительный отбор малодифференцированных В-лимфоцитов происходит и в костном мозге [1].

Для выработки ауто толерантности в тимусе существуют два механизма селекции Т-лимфоцитов, в основе которых лежит разная степень сродства (аффинности) их рецепторов к молекулам HLA I и II класса.

1. Положительная селекция предусматривает отбор тех лимфоцитов, которые имеют Т-клеточный рецептор, с достаточной степенью сродства к комплексу молекулы HLA и аутоантигенного пептида на клетках специализированного эпителия коркового слоя тимуса. Распознавание Т-лимфоцитом только молекулы HLA служит сигналом к началу дифференцировки тимоцитов и миграции созревших клеток в мозговой слой тимуса; те лимфоциты, Т-клеточный рецептор которых обладает крайне низкой степенью аффинности и не связывается с молекулой HLA в этом комплексе, погибают апоптозом.
2. Отрицательная селекция подвергает отбору те лимфоциты, Т-клеточный рецептор которых обладает высокой степенью аффинности к комплексу молекулы HLA и аутоантигенного пептида и способен распознать собственные аутоантигены. Такие лимфоциты поступают в мозговой слой, контактируют с дендритными клетками, проходят отрицательную селекцию и элиминируются из организма путем апоптоза [4, 5].

Следует, однако, иметь в виду, что, несмотря на двухэтапную жесткую селекцию Т-клеток на специфичность, часть Т-лимфоцитов при выходе из тимуса и поступлении в периферические иммунные органы (наивные Т-лимфоциты) остаются способными распознавать свои аутоантигены. Эти лимфоциты попадают под контроль системы, отвечающей за периферическую толерантность [31, 32].

## 2. ПЕРИФЕРИЧЕСКАЯ ТОЛЕРАНТНОСТЬ

Из вышеизложенного следует, что взаимодействие Т-рецептора лимфоцита с комплексом HLA плюс презентируемый антигенный пептид может приводить к двум совершенно различным результатам (в одном случае лимфоцит погибает, в другом продолжает дифференцироваться), которые определяются качеством взаимодействия и зависят от условий протекания реакции. В современной литературе такой эффект принято называть эффектом ниши [24], которую рассматривают и как конкретное место протекания реакции, и как сумму действия всех факторов микроокружения клетки. Для малодифференцированных гемопоэтических прогениторных клеток разного уровня ниши создают клетки, происходящие из стромальных прогениторных элементов, а развитие и дифференцировка их в нишах предполагает прямой контакт с клетками ниши. Для более зрелых лимфоидных форм соседями в нишах, контролирующими их развитие, могут быть в зависимости от конкретной ситуации любые другие клетки иммунной системы. Влияние происходит как путем прямого контакта между клетками, так и путем выработки окружающими клетками соответствующих ситуации цитокинов [22, 25], и все это происходит под соответствующим общим нейрогуморальным контролем [2]. Современные представления о нишах позволили дополнить представления о центральной толерантности и установить связь ее с периферической толерантностью. Открытие регуляторных Т-лимфоцитов, большая часть которых образуется в тимусе, показало, что до 10% Т-лимфоцитов с высокой аффинностью к аутоантигенам не подвергаются отрицательной селекции, а образуют пул клеток, который способен подавлять в периферических органах аутореактивные лимфоциты с аналогичным Т-рецептором. Это позволило определить тимус как мозаику ниш, в каждой из которых созревание Т-лимфоцитов происходит по своим правилам [22, 28]. Ниши для наивного Т-лимфоцита расположены в периферических иммунных органах. Если наивный лимфоцит, попадая в ткань, распознает комплекс HLA и антигенного пептида на паренхиматозных клетках, то он чаще всего погибает апоптозом [5]. Достигнув периферического иммунного органа, наивный лимфоцит для своего дальнейшего созревания должен встретить соответствующую антигенпрезентирующую клетку (АПК), представляющую ему антиген. Если этого не происходит в течение определенного срока (от нескольких часов до нескольких дней), то наивный лимфоцит погибает из-за окончания срока жизни [1], и на его место приходят новые, молодые лимфоциты. Если лимфоцит находит свою АПК и осуществляется первый этап – взаимодей-

ствие T-клеточного рецептора (ТКР) и комплекса HLA+пептид, то лимфоцит становится подготовленным к пролиферации (активируется несколько тысяч генов и примерно столько же блокируется) [11]. Но дальше для образования эффективного иммунного контакта должен произойти второй этап – синтез костимулирующих молекул на лимфоците и АПК. Если этот процесс заблокировать, то лимфоцит гибнет апоптозом. Именно так действуют наиболее часто применяемые иммуносупрессоры: блокаторы кальцийнейрина, антибиотики – циклоспорин А и FK506 (такролимус) [18]. Если успешно прошел и второй этап взаимодействия, то наступает третий этап, на котором дальнейшую судьбу клеток (будет ли наивный лимфоцит пролиферировать и дифференцироваться, а если дифференцироваться, то в какой тип функциональных клеток) определяет состав цитокинового окружения, а также состояние активности антигенпрезентирующей (дендритной) клетки. Если лимфоцит начнет продуцировать интерлейкин 2 (IL-2), а АПК будет активирована провоспалительными цитокинами (гамма-интерфероном, фактором некроза опухоли альфа и интерлейкином 1) и начнет продуцировать IL-12, то наивный лимфоцит, несущий маркер CD4, будет дифференцироваться в T-хелпер 1-го типа (Th1), активирующий T-эффекторы, с маркером CD8 (на этом этапе процесс можно заблокировать другим популярным иммуносупрессором – антибиотиком рапамицином (сиролимус) [49]. Если окружение (АПК) начнет продуцировать IL-4 и IL-10, то наивные лимфоциты будут дифференцироваться в Th2, ответственные за развитие гуморального ответа. Все эти три этапа, создающие необходимые условия для созревания T-лимфоцита в периферических органах иммуногенеза, в литературе называют пассивной периферической толерантностью. Однако в спокойной обстановке, при низком уровне провоспалительных цитокинов, неактивированных АПК, а также высоких концентрациях IL-10 и трансформирующего ростового фактора бета (TGF-β) лимфоцит дифференцируется в регуляторные T-клетки-супрессоры (Трег), несущие маркеры CD4CD25FoxP3, которые создают активную клеточную периферическую толерантность по данному аутоантигену [12, 28].

Вышеизложенное свидетельствует о том, что на настоящий момент при пересадке органов клинические протоколы по индукции толерантности цитостатиками, блокаторами костимуляции, иммунодепрессантами и стероидами используют фактически единственный механизм пассивной периферической толерантности, который неспецифически блокирует развитие любых наивных T-лимфоцитов.

### 3. СТРАТЕГИИ ИНДУКЦИИ АНТИГЕНСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ ПРИ ПЕРЕСАДКЕ АЛЛОГЕННЫХ ОРГАНОВ

Исторически сложилось две стратегии индукции толерантности при трансплантации органов – путем использования либо только центральной толерантности, либо только активной периферической толерантности. Индукция центральной толерантности предполагает постоянное присутствие АПК-донора в тимусе реципиента, которое воссоздается заселением костного мозга реципиента стволовыми гемопоэтическими клетками донора при пересадке органа совместно с пересадкой костного мозга или выделенных из него гемопоэтических стволовых клеток. Пересадка донорских гемопоэтических клеток предполагает, наличие свободных ниш в костном мозге реципиента, иначе они не приживутся и через некоторое время погибнут [10, 14, 24, 29]. Ниши принято освобождать методами миелоаблативной терапии путем облучения и тяжелой химиотерапии. Такая стратегия в клинике реализована при пересадке аллогенного костного мозга больным с онкологическими заболеваниями крови. Развивающийся в результате лечения полный химеризм (клетки крови несут 100% генотипа донора) позволяет обходиться без иммуносупрессии, однако примерно у 10% больных развивается реакция «трансплантат против хозяина» [3, 46]. Между тем этот способ оказался не применим при трансплантации солидных органов из-за высокой смертности реципиентов при использовании сублетального облучения и химиотерапии. Снижение тяжести миелоаблативной терапии путем снижения доз сублетальных воздействий в некоторых случаях, при пересадке стволовых гемопоэтических клеток, приводит к развитию состояния неполного (смешанного) химеризма [44]. На мышах, в частности, было показано [6], что смешанный химеризм сохраняет трансплантационную толерантность при уровне более 5–10%. В клинике описаны случаи развития смешанного химеризма при пересадке почек, подобранных по HLA-антигенам, с максимальным – 7-летним – сроком выживания без иммуносупрессии [17, 36, 43]. Описано, что при не подобранной по HLA пересадке почки смешанный химеризм также возникает, однако он неустойчив [21]. И хотя у больных химеризм исчезал, эти больные больше не нуждались в иммуносупрессии. На 2008 год таких больных было 4 с максимальным сроком жизни без иммуносупрессии 5 лет. Примечательно, что у всех этих реципиентов был очень высокий уровень Трег в почечных биоптатах [33]. Это заставляет предполагать, что длительные сроки выживания больных могла создавать также активная периферическая толерантность к антигенам донора. Очень многое в развитии толерантности после пересадки зависит

от интенсивности иммуносупрессии до пересадки. В настоящее время показано, что ингибиторы кальцийнейрина – циклоспорин и такролимус – снижают вероятность развития спонтанной толерантности, в отличие от ингибитора продукции IL-2 – рапамицина [37, 49]. Это позволило одному из ведущих трансплантологов в мире, руководителю Питсбургского центра Tomas Starzl, совместно с Ralf Zinkernagel сформулировать и предложить новую стратегию выработки толерантности. Новизна и привлекательность ее для трансплантологов заключается в том, что авторы связывают спонтанное возникновение трансплантационной толерантности при аллогенной пересадке органа с сопутствующим микрохимеризмом [39]. Микрохимеризм предполагает количество лимфоидных клеток, несущих генотип донора, на уровне менее 1% [40], что соизмеримо с погрешностью метода определения его с помощью моноклональных антител и требует применения специальных методов, в частности ПЦР. На значительном количестве пациентов с пересаженным органом было установлено почти 100% наличие у них микрохимеризма. Микрохимеризм возникает естественным образом при пересадке целого органа путем взаимного проникновения лейкоцитов за счет рециркуляции, что приводит в условиях иммуносупрессии к взаимной элиминации наиболее агрессивных клонов, которые активируются по прямому метаболическому пути; судьба остальных лимфоидных клеток определяется сроком их жизни. В работе [40] полагают, что часть АПК может длительно сохраняться в иммуноприлегирированных нишах, в частности в печени, и это объясняет высокую толерогенность при ее пересадке. Теория Starzl and Zinkernagel [39] воспринимается неоднозначно, так как многие считают микрохимеризм малозначимым явлением [44], однако выдвинутая теория микрохимеризма привлекла внимание к естественным механизмам возникновения аллогенной толерантности. В обзоре, вышедшем в 2004 году, Starzl пишет, что из 46 больных, которым в 1963 году была пересажена почка, когда были неизвестны еще многие варианты молекул HLA, из иммуносупрессии был только азотиоприн, а стероиды были препаратом резерва на случай острого отторжения, длительно выжило без постоянной иммуносупрессии 9 больных и все они живы до сих пор [40] (т. е. на момент написания статьи более 40 лет). На иммуносупрессии, основа которой циклоспорин и/или такролимус, в настоящее время до 10 лет доживает лишь 50% больных [35]. На основании выдвинутой теории Starzl разработал протокол постепенного снижения иммуносупрессии, с возможностью ее полной отмены. В этой работе автор сообщает о 600 больных с пересадками почек, печени, кишечника и легких, у которых постепенно после пере-

садки, выполненной по возможности без стероидов, снижали дозу такролимуса и увеличивали интервал между его введениями. У 75% больных протокол себя оправдал, а в нескольких случаях пересадки печени от иммуносупрессии отказались вообще. Starzl пишет, что «качество жизни этих пациентов было лучше, чем мы когда-либо были в состоянии систематически достигнуть прежде» [40]. Роль стволовых клеток, привнесенных с пересаженной печенью, в индукции центральной толерантности можно проиллюстрировать клиническим случаем [8]. Девочке 9 лет в конечной стадии острой печеночной недостаточности, после вирусного гепатита, была пересажена полностью не совпадающая по HLA печень 12-летнего подростка. Для коррективы развившихся через некоторое время осложнений была произведена полостная операция, потребовавшая повторного определения группы крови, которая не совпала с ранее бывшей у нее, но оказалась идентичной группе крови донора. При исследовании был обнаружен смешанный химеризм, причем клетки донора во всех клеточных линиях составляли более 90%. В дальнейшем ситуация осложнилась гемолизом, по-видимому, вызванным частичным срывом толерантности по В-клеткам. Ситуация потребовала отмены иммуносупрессии, что привело к образованию устойчивой полной химеры. Девочка на момент написания статьи живет уже 5 лет без иммуносупрессии. Все показатели печени и иммунной системы восстановились до нормы. Об эпизодах реакции «трансплантат против хозяина» в статье не упоминается. Достигнута устойчивая активная толерантность у реципиента, не совпадающего по HLA трансплантата. Следует иметь в виду, что общая масса лейкоцитов в организме сравнима с массой печени, 1–1,5 кг (порядка  $10^{12}$  клеток) [1], и эта масса была воспроизведена из ничтожного количества гемопоэтических стволовых клеток, привнесенных с печенью, как только спонтанно создались благоприятные для этого условия.

Замену инвалидизирующих протоколов иммуносупрессии и отказ от миелоаблативной терапии для выработки трансплантационной толерантности к аллогенным органам может обеспечить также использование клеточных технологий. Об этом свидетельствует, в частности, цитированная выше работа [21], в которой немиелоаблативными методами авторы стремились получить смешанный химеризм, а получили стабильно воспроизводимую активную периферическую толерантность [33], которая без заметного участия центральной толерантности (роль микрохимеризма не очевидна, но и не может быть исключена [26, 27]), оказалась способной длительно поддерживать трансплантационную толерантность. Для подтверждения значимости со-

здания активной периферической толерантности как наиболее перспективной стратегии для обеспечения длительного выживания реципиентов без иммуносупрессии приведем еще целый ряд дополнительных фактов. Они связаны с использованием в трансплантологии особого пула Т-лимфоцитов, несущих маркеры CD4CD25FoxP3, которые получили название Трег-клетки с супрессорными свойствами [50]. Было показано, что истощение популяции Т-лимфоцитов по одной из субпопуляций, несущей маркер  $\alpha$ -цепи рецептора интерлейкина 2 (CD25) и составляющей примерно 10% от всей популяции Т-лимфоцитов, вызывает развитие аутоиммунных заболеваний [13, 31]. Введение этих клеток в составе общей популяции лимфоцитов предотвращало их развитие [32]. Дальнейший анализ регуляторной функции CD4CD25-клеток в модельных системах показал, что такие лимфоциты, однажды активированные дендритными клетками, уже не нуждаются в антигене и подавляют эффекторные реакции *in vitro* и *in vivo*, т. е. являются «профессиональными супрессорами» [30]. Ранее считалось, что маркер CD25 появляется у этих клеток в процессе созревания в тимусе и именно это определяет их профессиональные супрессорные свойства. Однако в настоящее время показана возможность образования этих клеток и вне тимуса, а также возможность размножения их *in vitro* [38]. Порядка 5–10% человеческих Т-лимфоцитов имеют маркер CD25, но не все они являются профессиональными супрессорами, так как маркер CD25 может экспрессироваться и на других активных клетках. К 2003 году был установлен новый маркер, непосредственно связанный с супрессорной функцией CD4CD25-клеток, а именно FoxP3 (forkhead box p3) [32]. Клетки с маркерами CD4CD25FoxP3, получившие наименование Трег действуют на многих уровнях иммунного ответа, но важно, что они ингибируют аутореактивные клетки, избежавшие центральной толерантности. Трег-клетки делятся на две группы: естественные клетки, получившие свои супрессорные функции в тимусе, и индуцированные, получившие свои функции на периферии [50]. У этих клеток одинаковые свойства и различаются они только по происхождению. Количество индуцированных Трег-клеток увеличивается с возрастом, по мере угасания функции тимуса, и образуются они при специфической стимуляции по мере надобности. В норме, однако, общее количество супрессорных клеток Трег с возрастом не изменяется [16]. Активация гена FoxP3 является существенным для функции Трег – его активация приводит к блоку синтеза провоспалительных цитокинов, в частности интерферона гамма. При его дефекте у мышей развиваются фатальные аутоиммунные и воспалительные заболевания [38]. Возможность получать Трег *in vitro* может привести

к развитию совершенно новых стратегий в терапии аутоиммунных заболеваний, а это значит – к созданию реальных клинических протоколов получения активной периферической толерантности. Многочисленные исследования показали способность Трег к продлению выживания аллотрансплантата, что было связано с предотвращением пролиферации эффекторных клеток [20, 45], как путем прямого взаимодействия и элиминации антигенспецифичных клонов, так и путем создания условий для регуляции профиля цитокинов, при котором супрессировались и антиген-неспецифичные клоны (так называемая «инфекционная толерантность»).

Показано, что аллогенные Трег способны пролиферировать сами при встрече со специфическим антигеном *in vivo* (количество делений было связано с количеством презентированного антигена), а также ингибировать пролиферацию существующих антигенспецифичных клеток памяти [23]. В работе [7] аллогенные Трег вводили дефектным по Трег мышам, не совпадающим по генам главного комплекса гистосовместимости. Клетки пожизненно прививались, компенсировали дефекты иммунитета реципиентной мыши, и что самое интересное, приживались кожные трансплантаты, имеющие те же гены главного комплекса гистосовместимости, что и донорские аллогенные Трег-клетки. На модели аутоиммунного диабета было показано, что 5000 Трег-клеток, специфичных по одному из продиабетогенных аутоантигенов, более эффективно предотвращали диабет, чем 100 000 поликлональных Трег-клеток [42]; эффект был выше при использовании Трег-клеток, специфичных и по другим продиабетическим аутоантигенам. Обзор свойств регуляторных клеток был бы неполным без рассмотрения вопроса о связи их действия с длительным присутствием лимфоидных клеток донора в организме реципиента. К сожалению, работ, дающих твердую уверенность в наличии такой связи, мы не нашли. Наиболее близко к этому вопросу подошли в работе [15]. В ней разобраны вопросы, связанные с микрохимеризмом, возникающим при пересадке печени, и циркуляцией Трег. Авторы исследовали наличие Трег в перфузате печени и последующую циркуляцию этих клеток после пересадки у 22 больных. Известно, что микрохимеризм и связанная с ним толерантность при пересадке печени более часты, чем при пересадке других органов. Более высокие уровни химеризма сочетаются с меньшим количеством острых кризов отторжения и лучшим начальным приживлением органа. Эти авторы показали, что по крайней мере в течение 6 месяцев происходит циркуляция значительного количества Трег донора (до 5% от общего содержания их в организме) и эти клетки способны подавлять прямой метаболический путь реакции отторжения. Други-

ми словами, Трег-клетки способны влиять на АПК донора, модулируя степень их активности, и тем самым вызывать трансформацию Т-клеток реципиента с наивным фенотипом в сторону образования индуцированных Трег-клеток, уже специфичных по донорским антигенам. К сожалению, в этой работе приведенные сведения никак не связаны с клинической картиной, в ней не приведено сведений о развитии толерантности либо посттрансплантационной супрессии у реципиентов, остается неясным, был ли какой-то клинический эффект.

Когда Трег-клетки активированы антигеном, они продуцируют цитокины TGF- $\beta$  и IL-10 с супрессивными свойствами, и очевидно, этим можно объяснить тот факт, что Трег-клетки угнетают пролиферацию и продукцию цитокинов обычными CD4<sup>+</sup> Т-клетками (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Т-клетками), а также CD8<sup>+</sup> Т-клетками [41]. Большинство Трег запрограммированы в тимусе и составляют пул естественных или натуральных Трег (нТрег) [50]. Оказалось, что общий пул Трег может быть увеличен за счет индуцированного или адаптивного пула Трег (иТрег), который образуется *de novo* из пула наивных CD4<sup>+</sup> предшественников в периферической лимфоидной ткани при взаимодействии Т-клеточного рецептора этих клеток с экзогенным антигеном в присутствии TGF- $\beta$  и IL-2 [48], превращающих фенотип CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> – наивных Т-клеток в фенотип натуральных супрессоров – CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Трег за счет экспрессии в них транскрипционного фактора гена Foxp3. Полагают, что пул Трег-клеток и надежность выработки иммунной толерантности в организме могут быть повышены за счет активации (независимой экспрессии) гена Foxp3 не только наивных, но и антигенспецифических CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти путем использования стратегии избирательной (антигенспецифической) Трег иммунной модуляции, которая позволит избавиться от проблем, связанных с медикаментозной иммуносупрессивной терапией для создания иммунной толерантности в организме [9, 30].

Все увеличивающийся поток работ по изучению свойств и применению регуляторных клеток свидетельствует как о перспективности данного направления, так и о нерешенности проблем создания реальных клинических протоколов применения Трег-клеток для создания надежной и стабильной толерантности. Однако, как сказал один из ведущих участников разработки клинических стратегий получения трансплантационной толерантности Alan Salama, «есть много рек, которые нужно форсировать, чтобы достигнуть намеченной цели (клинической трансплантационной толерантности), и мы должны постоянно строить новые мосты, которые в конечном счете позволят нам сделать это» [34].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для создания трансплантационной толерантности в организме реципиента необходимо решить две основные задачи: научиться оценивать состояние иммунной толерантности к аллоантигенам на всех этапах пересадки органа и научиться использовать возможности стволовых гемопоэтических клеток костного мозга донора – как основного источника толеризирующих клеток для выработки толерантности. Показано, что для создания центральной толерантности целесообразно использовать стволовые гемопоэтические клетки; для создания активной периферической толерантности – малодифференцированные предшественники дендритных клеток из костного мозга донора, которые пригодны для получения регуляторных Т-лимфоцитов памяти реципиента и создания толерантности по аллоантигенам, в вариантах их подготовки как *in vitro* так и *in vivo*. Разработка вариантов «клеточной толеризирующей вакцинации» со всеми ее нерешенными проблемами должна стать предметом отдельного обзора.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Быков В.Л. Цитология и общая гистология. СПб.: Солис, 2001.
2. Зайчик А.И., Чурилов Л.П. Патолофизиология. Т. 1: Общая патолофизиология. СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2002.
3. Зотиков Е.А., Бабаева А.Г., Порешина Л.П. Клеточный химеризм и химеризм клетки при трансплантации костного мозга. М.: Хризостом, 2003. 112 с.
4. Рабсон А., Роит А., Делз П. Основы медицинской иммунологии. М.: Мир, 2006.
5. Роит А., Бростофф Д., Меил Д. Иммунология. М.: Мир, 2000.
6. Adams A.B., Durham M.M., Kean L., Shirasugi N. et al. Costimulation Blockade, Busulfan, and Bone Marrow Promote Titratable Macrochimerism, Induce Transplantation Tolerance, and Correct Genetic Hemoglobinopathies with Minimal Myelosuppression // Journal of Immunology. 2001. Vol. 167. P. 1103–1111.
7. Adegbe D., Bayer A.L., Levy R.B. and Malek Cutting Edge. Allogeneic CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T Regulatory Cells Suppress Autoimmunity while Establishing Transplantation Tolerance // Journal of Immunology. 2006. Vol. 176. P. 7149–7153.
8. Alexander S.J., Smith N., Hu M. et al. Chimerism and tolerance in a recipient of a deceased – donor liver transplant // NEJM. 2008. Vol. 358 (4). P. 369–374.
9. Allan S.E., Alstad A.N., Merindol N. et al. Generation of potent and stable human CD4 – T regulatory cells by activation – independent expression of Foxp3 // Mol. Ther. 2008. Vol. 16. P. 194–202.
10. Bhattacharya D., Rossi D.J., Bryder D., Weissman I.L. Purified hematopoietic stem cell engraftment of rare niches corrects severe lymphoid deficiencies without

- host conditioning // *J. Exp. Med.* 2005. Vol. 203 (1). P. 73–85.
11. *Botstein D., Crabtree G.R., Brown P.O.* Genomic expression programs and the integration of the CD28 co-stimulatory signal in T cell activation // *PNAS*. 2002. Vol. 99 (18). P. 11796–11801.
  12. *Burchill M.A., Yang J., Vang K.B. et al.* Linked T-cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T-cell repertoire // *Immunity*. 2008. Vol. 28. P. 112–121.
  13. *Cady A.A., Reddy S.T., Chatila T. et al.* CD25 deficiency causes an immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like syndrome and defective IL-10 expression // *J. Allerg. Clin. Immunol.* 2007. Vol. 119. P. 482–487.
  14. *Czechowicz A., Kraft D., Weissman I.L., Bhattacharya D.* Efficient Transplantation via Antibody-Based Clearance of Hematopoietic Stem Cell Niches // *Science*. 2007. Vol. 318 (5854). P. 1296–1299.
  15. *Demirkiran A., Bosma B.M., Kok A. et al.* Allosuppressive Donor CD4+CD25+ Regulatory T-Cells Detach from the Graft and Circulate in Recipients after Liver Transplantation // *Journal of Immunology*. 2007. Vol. 178. P. 6066–6072.
  16. *Fontenot J.D., Dooley J.L., Farr A.G., Rudensky A.Y.* Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny // *J. Exp. Med.* 2005. Vol. 202. P. 901–906.
  17. *Fudaba Y., Spitzer T.R., Shaffer J. et al.* Myeloma Responses and Tolerance Following Combined Kidney and Nonmyeloablative Marrow Transplantation: in vivo and in vitro Analyses // *American Journal of Transplantation*. 2006. Vol. 9 (6). P. 2121–2133.
  18. *Haddad E.M., McAlister V.C., Renouf E. et al.* Cyclosporin versus tacrolimus for liver transplanted patients // *The Cochrane Library*. 2008. Issue 4.
  19. *Jiang H., Chess L.* Regulation of Immune Responses by T Cells // *NEJM*. 2006. Vol. 11 (354). P. 1166–1176.
  20. *Joffre O., Santolaria T., Calise D. et al.* Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3 regulatory T-lymphocytes // *Nat. Med.* 2008. Vol. 14. P. 888–892.
  21. *Kawai T., Cosimi B., Spitzer T.R. et al.* HLA-Mismatched Renal Transplantation without Maintenance Immunosuppression // *NEJM*. 2008. Vol. 4 (358). P. 353–361.
  22. *Kyewski B., Klein L.* A central thymic role for central tolerance // *Annu. Rev. Immunol.* 2006. Vol. 24. P. 571–606.
  23. *Lee M.K., Moore D.J., Jarrett B.P. et al.* Promotion of Allograft Survival by CD4+CD25+ Regulatory T-Cells: Evidence for In Vivo Inhibition of Effector Cell Proliferation // *Journal of Immunology*. 2004. Vol. 172. P. 6539–6544.
  24. *Martinez-Agosto J.A., Mikkola H.K.A., Hartenstein V., Banerjee U.* The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view *Genes & Dev.* 2007. Vol. 21. P. 3044–3060.
  25. *Mathis D., Benoist C.* Back to central tolerance // *Immunity*. 2004. Vol. 20. P. 509–516.
  26. *Noris M., Casiraghi F., Todeschini M. et al.* Regulatory T-cells and T-cell depletion: role of immunosuppressive drugs // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007. Vol. 18. P. 1007–1018.
  27. *Noris M., Cugini D., Casiraghi F. et al.* Thymic Microchimerism Correlates with the Outcome of Tolerance-Inducing Protocols for Solid Organ Transplantation // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2001. Vol. 12. P. 2815–2826.
  28. *Pennington D.J., Silva-Santos B., Silberzahn T. et al.* Early events in the thymus affect the balance of effector and regulatory T-cells // *Nature*. 2006. Vol. 444. P. 1073–1077.
  29. *Pham S.M., Rao A.S., Zeevi A., Kormos R.L. et al.* A clinical trial combining donor bone marrow infusion and heart transplantation: intermediate-term results // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2000. Vol. 119. P. 673–681.
  30. *Roncarolo M.G., Battaglia M.* Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans // *Nat. Rev. Immunol.* 2007. Vol. 7. P. 585–598.
  31. *Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M. et al.* Immunologic self-tolerance maintained by activated T-cells expressing IL-2 receptor-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases // *J. Immunol.* 1995. Vol. 160. P. 1151–1164.
  32. *Sakaguchi S.* Naturally arising CD4(+) regulatory T-cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses // *Annu. Rev. Immunol.* 2004. Vol. 22. P. 531–562.
  33. *Salama A.D., Najafian N., Clarkson M.R., Harmon W.E., Sayegh M.H.* Regulatory CD25+ T Cells in Human Kidney Transplant Recipients // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003. Vol. 14. P. 1643–1651.
  34. *Salama A.D., Womer K.L., Sayegh M.H.* Clinical Transplantation Tolerance: Many Rivers to Cross // *Journal of Immunology*. 2007. Vol. 178. P. 5419–5423.
  35. *Sayegh M.H., Carpenter C.B.* Transplantation 50 Years Later – Progress, Challenges, and Promises // *NEJM*. 2004. Vol. 26 (351). P. 2761–2766.
  36. *Scandling J.D., Busque S., Dejbakhsh-Jones S. et al.* Tolerance and Chimerism after Renal and Hematopoietic-Cell Transplantation // *NEJM*. 2008. Vol. 4 (358). P. 362–368.
  37. *Segundo D., Ruiz J.C., Izquierdo M. et al.* Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T-cells in renal transplant recipients // *Transplantation*. 2006. Vol. 82. P. 550–557.
  38. *Shevach E.M.* Certified professionals: CD4+CD25+ suppressor T cells // *J. Exp. Med.* 2001. Vol. 193. P. 41–46.
  39. *Starzl T.E., Zinkernagel R.M.* Antigen Localization and Migration in Immunity and Tolerance // *NEJM*. 1998. Vol. 26 (339). P. 1905–1913.
  40. *Starzl T.E.* Chimerism and tolerance in transplantation // *PNAS*. 2004. Vol. 101 (2). P. 14607–14614.
  41. *Stassen M., Jonuleit H., Muller C. et al.* Differential regulatory capacity of CD25+ T regulatory cells and preactivated CD25+ T regulatory cells on development, functional activation and proliferation of Th2 cells // *J. Immunol.* 2004. Vol. 173. P. 267–274.
  42. *Tarbell K.V., Yamazaki S., Olson K., Toy P., Steinman R.M.* CD25+ CD4+ T-Cells, Expanded with Dendritic Cells Presenting a Single Autoantigenic Peptide,

- Suppress Autoimmune Diabetes // JEM. Vol. 199. № 11. P. 1467–1477.
43. *Trivedia H.L., Vanikarb A.V., Modid P.R. et al.* Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation, Mixed Chimerism, and Tolerance in Living Related Donor Renal Allograft Recipients // Transplantation Proceedings. 2005. Vol. 37 (2). P. 737–742.
44. *Wekerle T., Sykes M.* Mixed chimerism as an approach for the induction of transplantation tolerance // Transplantation. 1999. Vol. 68 (4). P. 459–467.
45. *Wood K.J., Sakaguchi S.* Regulatory T-cells in transplantation tolerance // Nat. Rev. Immunol. 2003. Vol. 3. P. 199–210.
46. *Zenz T., Ritgen M., Dreger P. et al.* Autologous graft-versus-host disease – like syndrome after an alemtuzumab-containing conditioning regimen and autologous stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia // Blood. 2006. Vol. 108 (6). P. 2127–2130.
47. *Zhang J., Li L.* Stem Cell Niche: Microenvironment and Beyond // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283 (15). P. 9499–9503.
48. *Zheng S.G., Wang J., Wang P. et al.* IL-2 is essential for TGF- $\beta$  to convert naïve CD4+CD25-cells to CD25+Foxp3 regulatory T-cells and for expansion of these cells // J. Immunol. 2007. Vol. 178. P. 2018–2027.
49. *Zheng Y., Collins S.L., Lutz M.A. et al.* A Role for Mammalian Target of Rapamycin in Regulating T-Cell Activation versus Anergy // The Journal of Immunology. 2007. Vol. 178. P. 2163–2170.
50. *Zheng Y., Rudensky A.Y.* Foxp3 in control of the regulatory T-cell lineage // Nat. Immunol. 2007. Vol. 8. P. 457–462.