

ZDZISŁAW SMORAĞ¹, RYSZARD SŁOMSKI²

Ksenotransplantacja – możliwości i ograniczenia

Pogłębiający się z każdym rokiem niedobór narządów zmusza do poszukiwania nowych i bardziej skutecznych metod ich pozyskiwania. Do najważniejszych z nich można zaliczyć inżynierię tkankową, wykorzystanie komórek macierzystych, terapię biohybrydową, tworzenie sztucznych narządów czy bioreaktorów, które będą pełnić ich funkcje. Szczególne nadzieje pokłada się w przeszczepianiu zmodyfikowanych metodami inżynierii genetycznej narządów pozyskiwanych od zwierząt, czyli ksenotransplantacjach.

Ksenotransplantacja to przeszczepianie komórek, tkanek i narządów między różnymi gatunkami. Niestety taki przeszczep jest immunologicznie wysoce niezgodny, co wynika z różnic genetycznych między dawcą a biorcą. W przypadku gatunków blisko spokrewnionych proces odrzucenia przeszczepu jest względnie długi i wynosi od kilku godzin do paru dni. W przypadku gatunków odległych filogenetycznie następuje bardzo szybko, w ciągu kilkunastu minut. Definicja ksenotransplantacji u ludzi jest obszerniejsza. Według *U.S. Public Health Service* jest to każda procedura, która obejmuje transplantację, implantację czy infuzję człowiekowi żywych komórek, tkanek lub organów pochodzących od zwierząt, a także płynów ustrojowych, komórek, tkanek czy narządów człowieka, które weszły w kontakt *ex vivo* ze zwierzęcymi komórkami, tkankami lub narządami.

Wybór dawcy zwierzęcego nie jest kwestią prostą. Narządy takiego zwierzęcia muszą w dużym stopniu być podobne do narządów człowieka. Podobieństwo to musi się wyrażać zarówno w anatomii organu, jak też w jego fizjologii. Pod uwagę bierze się małpy naczelne – pawiany (*Papio sp.*) i szympany (*Pan troglodydes*), a także świnię domową (*Sus scrofa*). Naczelne są najbliższymi spokrewnionymi filogenetycznie z człowiekiem zwierzętami (NHPS, ang. *Nonhuman Primates*). Szympany i pawiany były początkowo brane pod uwagę jako potencjalni dawcy ze względu na duże podobieństwo

¹ Prof. dr hab. Zdzisław Smorağ, Instytut Zootechniki, Balice

² Prof. dr hab. Ryszard Słomski, Instytut Genetyki Człowieka, Polska Akademia Nauk, Poznań; Katedra Biochemii i Biotechnologii, Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań

anatomiczne i fizjologiczne ich narządów do organów człowieka. Problemem wydają się być małe rozmiary narządów pawiana czy szympansa, a tym samym niemożność wykorzystania, np. serca u ludzi dorosłych, a jedynie u dzieci oczekujących na właściwy alloprzeszczep. Podejmowano nawet próby kliniczne z wykorzystaniem organów pochodzących od naczelnych [1-3]. Pomimo dość owocnych wyników w badaniach klinicznych, naczelne straciły zainteresowanie jako potencjalni dawcy narządów dla ludzi z kilku powodów. Małpy są trudne w hodowli, mają niską płodność, wydają na świat zazwyczaj tylko jednego potomka i to po dość długim okresie ciąży, późno osiągają dojrzałość płciową. Wszystko to sprawia, że zastosowanie kliniczne pochodzących od nich narządów potencjalnie byłoby rozwiązaniem bardzo drogim. Filogenetyczna bliskość jest jednocześnie najsilniejszym atutem i największą barierą. Tak duże podobieństwo genetyczne sprawia, że znaczna część patogenów wirusowych pawianów i szympanсів jest w stanie z powodzeniem zarażać ludzi. Do retrovirusów mogących powodować objawy chorobowe u ludzi zalicza się w szczególności: BaEV (ang. *baboon endogenous retrovirus*), SIV (ang. *simian immunodeficiency virus*), STLV (ang. *simian T-lymphotropic virus*), SRV (ang. *exogenous simian retrovirus*), SFV (ang. *simian foamy virus*) oraz wirus SV40 (ang. *simian virus*).

Zbyt wiele problemów związanych z wykorzystaniem w ksenotransplantacji gatunków bliskich wymagało znalezienia potencjalnego dawcy wśród gatunków filogenetycznie odległych. Optymalnym okazała się być świnia. Świnie są łatwe i tanie w hodowli, rozmnażają się szybko, mają liczne potomstwo. Zróżnicowanie wielkości wśród ras pozwala na dobranie organów o odpowiedniej wielkości dla różnych biorców. Zwierzęta te łatwo poddają się zabiegom inżynierii genetycznej. Mają zbliżone parametry anatomiczne i fizjologiczne. Zbliżona jest osmolarność moczu, wielkość filtracji kłębuszkowej i przepływ krwi przez nerki. Podobny jest też rzut minutowy serca i ciśnienie tętnicze. Niektóre hormony (insulina) oraz czynniki tkankowe (czynnik VIII krzepnięcia) działają na organizm człowieka, co potwierdza ich zastosowanie w badaniach klinicznych. Perfuzja krwi przez wątrobę świni umożliwia detoksykację chorych w śpiączce wątrobowej. Znaczny dystans filogenetyczny jest jednak powodem ogromnych problemów immunologicznych po przeszczepie, ale potencjalnie zmniejsza ryzyko zakażeń wirusowych. U człowieka obecne są ksenoreaktywne przeciwciała skierowane przeciwko antygenowi Gal świni obecnemu na glikolipidach i glikoproteinach.

Konstrukcje genowe dla ksenotransplantacji

Obecność antygeny Gal na powierzchni komórek jest główną barierą uniemożliwiającą uzyskanie narządów nadających się do transplantacji międzygatunkowych [4]. Przeszczep narządu genetycznie zmienionej świni pozbawionej enzymu α 1,3-galaktozylotransferazy, a zatem pozbawionego antygeny Gal, byłby tolerowany przy jedno-

czesnym podawaniu leków działających na inne mniej nasilone reakcje immunologiczne. Gen kodujący $\alpha 1,3$ -galaktozylotransferazę udało się inaktywować metodą rekombinacji homologicznej w komórkach fibroblastów płodowych świni niezależnie od siebie dwóm grupom badawczym [5, 6]. W 2003 roku grupie naukowców związanych z firmą PPL Therapeutics udało się uzyskać homozygotyczne pod względem inaktywowanego genu zwierzęta transgeniczne [7, 8].

Układ dopełniacza i jego regulacja

Czynnikiem decydującym o szybkim odrzuceniu przeszczepu jest włączenie u biorcy tzw. enzymatycznej kaskady dopełniacza. Występują trzy szlaki aktywacji systemu dopełniacza: klasyczny, alternatywny oraz lektynowy. Aktywacja klasycznego szlaku rozpoczyna się związaniem obcego antygeny przez specyficzne przeciwciała (IgM, IgG1, 2 lub 3), w wyniku którego powstaje kompleks immunologiczny. Następnie białko C1, zbudowane z podjednostek C1q, C1r oraz C1s wiąże się z odpowiednimi domenami przeciwciał kompleksu immunologicznego.

W klasycznym szlaku aktywacja białka C1 inicjowana jest przez kompleks antygen-przeciwciała. Jednakże białko C1 może być aktywowane bez udziału przeciwciał. Lektyna wiążąca mannozę MBL (ang. *mannan-binding lectin*) jest członkiem rodziny kolektyn, występującym w surowicy i wiążącym się z końcowymi grupami mannozy, znajdującymi się na powierzchni komórek bakterii. MBL współdziała i aktywuje zarówno kompleks C1r21s2, jak i proenzym MASP (ang. MBL, *associated serine protease*) odznaczający się wysoką homologią z C1r i C1s. Aktywowany MASP trawi składnik C4 i C2, aktywując w ten sposób kaskadę enzymatyczną dopełniacza.

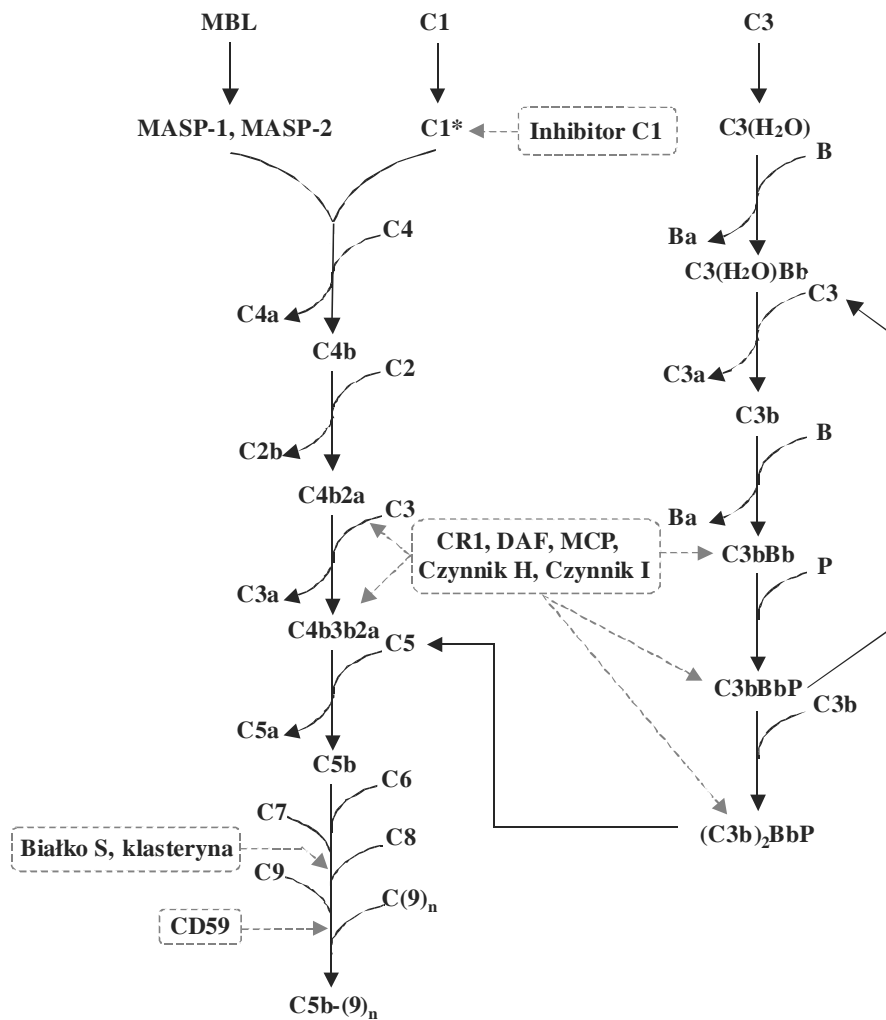
Alternatywny szlak układu dopełniacza jest aktywowany bez udziału przeciwciał. Umożliwia szybką odpowiedź na atak mikroorganizmów, zanim pojawi się bardziej precyzyjna i skuteczna odpowiedź immunologiczna z udziałem specyficznych przeciwciał. Aktywacja alternatywnego szlaku jest indukowana niskim poziomem hydrolizy składnika C3 w surowicy.

Końcowym etapem kaskady enzymatycznej dopełniacza prowadzącej do lizy komórki jest utworzenie kompleksu atakującego błonę.

Aby zapobiec nadostrej reakcji immunologicznej, możliwe jest wprowadzenie do genomu świń genów człowieka regulujących kaskadę enzymatyczną dopełniacza [9]. Układ dopełniacza może ulegać spontanicznej autoaktywacji i atakować komórki własnego organizmu. Na szczególną uwagę, ze względu na możliwość zastosowania na potrzeby ksenotransplantacji, zasługują czynnik DAF, czynnik MCP oraz czynnik CD59.

Czynnik CD59 (MIRL, ang. *membrane inhibitor of reactive lysis*) zapobiega formowaniu kompleksu atakującego błonę komórkową. Przyjmuje się, że czynnik CD59 wiąże się ze składnikami C8 i C9, blokując polimeryzację czynnika C9 i wejście kompleksu do

blony [10]. W ten sposób czynnik CD59 chroni komórki przed zniszczeniem. Trwała ekspresja czynnika CD59 człowieka chroni *in vitro* komórki ksenoprzeszczepu przed zniszczeniem przez układ dopełniacza, a skuteczność ochrony zależy od poziomu ekspresji transgenu na powierzchni komórek (11). Uzyskane wyniki sugerowały, że przeszczep organów transgenicznych świń z wysokim poziomem ekspresji czynnika CD59 może być odporny na atak układu dopełniacza człowieka. Do modyfikacji genomu świni wykorzystano konstrukcje genowe, które umożliwiły uzyskanie wysokiego poziomu ekspresji w różnych typach komórek i tkanek, włącznie z komórkami śródbłonna naczyniowego [12-14].



Ryc. 1. Układ dopełniacza i jego regulacja

Czynnik DAF (CD55) (ang. *decay accelerating factor*) – czynnik przyspieszający rozkład – reguluje podatność komórek na atak dopełniacza [10]. Przez wiązanie składnika C4b i C3b blokuje tworzenie się funkcjonalnego kompleksu konwertazy C3 i C5 oraz powoduje dysocjację już uformowanego enzymu. Uwalnia składnik C2 i C2a oraz B i Bb odpowiednio z konwertazy drogi klasycznej i alternatywnej. Czynnik DAF, ulegający ekspresji we wszystkich tkankach i organach transgenicznych świń, nie miał negatywnego wpływu na zdrowie, rozwój i reprodukcję transgenicznych zwierząt [15]. Serca tych transgenicznych świń poddane perfuzji *ex vivo* były odporne na atak układu dopełniacza człowieka. Czynnik DAF chronił serce transgenicznej świni przeszczepione pawianom przed zniszczeniem w wyniku nadostrego odrzucenia [16]. Nerki transgenicznych zwierząt przeszczepione makakom, które zostały poddane splenektomii i które otrzymywały leki immunosupresyjne oraz rekombinowaną erytropoetynę, funkcjonowały w najlepszym przypadku przez 78 dni [17].

Czynnik MCP (CD46) (ang. *membrane cofactor protein*) – błonowy kofaktor białkowy – blokuje formowanie się kompleksu konwertazy C3 zarówno w klasycznym, jak i alternatywnym szlaku aktywacji układu dopełniacza, chroniąc komórki, na powierzchni których ulega ekspresji [10]. Uzyskanie transgenicznych świń wykazujących ekspresję czynnika CD46 jest ważnym osiągnięciem w działaniach zmierzających do całkowitego wyeliminowania nadostrej reakcji odrzucenia [18]. Ekspresja czynnika CD46 u człowieka jest komórkowo i tkankowo specyficzna. Podobną komórkowo i tkankowo specyficzną ekspresję transgenu udało się zachować u transgenicznych zwierząt. Serce transgenicznej świni przeszczepione pawianowi, przy jednoczesnym stosowaniu leków immunosupresyjnych, w najlepszym przypadku zostało odrzucone dopiero po 23 dniach, podczas gdy serca pochodzące od nietransgenicznych świń były odrzucane w ciągu 60-90 minut. Ekspresja czynnika CD46 chroniła organ przed zniszczeniem przez układ dopełniacza pawiana.

Modyfikacja białek powierzchniowych komórki dawcy

Enzym α 1,2-fukozylotransferaza (transferaza H) wykorzystuje ten sam akceptor N-acetylolaktozoaminę (N-lac), co α 1,3-galaktozylotransferaza [19]. Enzym katalizuje reakcję przyłączenia reszty fukozy, co prowadzi do utworzenia tzw. struktury H. Wprowadzenie do organizmu dawcy dodatkowych kopii enzymu α 1,2-fukozylotransferazy umożliwiłoby modyfikację białek powierzchniowych komórek dawcy, co ograniczyłoby immunogenność [20-22]. Możliwe jest również wykorzystanie innych glikozylotransferaz, takich jak α 2,6-sjalilotransferaza czy α 2,3-sjalilotransferaza [23].

Wprowadzenie genu kodującego enzym α -galaktozydazę do genomu świni umożliwiłoby uzyskanie narządów do przeszczepów z obniżoną ilością epitopu Gal na powierzchni komórek. Ponieważ α -galaktozydaza nie eliminuje całkowicie reszt α -D-galaktozy

z antygeny Gal, sugeruje się wykorzystanie jednocześnie enzymu α -galaktozydazy oraz enzymu α 1,2-fukozylotransferazy [24].

System krzepnięcia i jego regulacja

Modyfikacje białek występujących na powierzchni komórek, prowadzące do całkowitego usunięcia lub znacznego zredukowania ilości antygeny Gal zapobiegają aktywacji układu dopełniacza. W tej sytuacji główną przyczyną odrzucenia przeszczepu stają się zaburzenia regulacji układu krzepnięcia wewnątrz przeszczepu oraz reakcje komórkowe z udziałem makrofagów, neutrofilów, komórek NK i limfocytów T.

Drobne różnice genetyczne, występujące między organizmem biorcy a dawcą przeszczepianego narządu, mogą prowadzić do zachwiania równowagi między prokoagulacyjną i antykoagulacyjną aktywnością systemu krzepnięcia, co w konsekwencji prowadzi do tzw. opóźnionego odrzucenia ksenoprzeszczepu (DXR, ang. *delayed xenograft rejection*). Trombomodulina świni wiąże trombinę człowieka słabiej, dlatego nie aktywuje białka C [25, 26]. TFPI świni jest nieefektywnym inhibitorem czynnika Xa człowieka [27]. Różnice pomiędzy czynnikiem von Willebranda człowieka i świni prowadzą do aktywacji i agregacji płytek człowieka [28].

Perspektywy

Duże nadzieje wiąże się z możliwością wywołania stanu tolerancji immunologicznej, która rozwiązałaby szereg problemów związanych z odrzuceniem przeszczepu. Swoista tolerancja immunologiczna jest stanem, w którym układ odpornościowy nie rozwija odpowiedzi skierowanej przeciwko konkretnemu antygenowi lub grupie antygenów, zachowując jednocześnie możliwość odpowiedzi przeciw pozostałym antygenom. W odniesieniu do transplantacji narządowych tolerancja jest stanem braku odpowiedzi na antygeny przeszczepu bez konieczności stosowania przewlekłego leczenia immunosupresyjnego. W przypadku ksenotransplantacji wywołanie tolerancji immunologicznej jest bardziej skomplikowane. Podejmowane są jednak próby jej wywołania. Proponuje się dwa podejścia w celu osiągnięcia swoistej tolerancji. Pierwszym jest wywołanie tolerancji przez uzyskanie chimeryzmu molekularnego. Metoda ta polega na autologicznej transplantacji szpiku, do komórek którego wprowadzono wcześniej gen α 1,3-galaktozylotransferazy świni. Produkcja antygeny Gal przez zmienione genetycznie komórki wywołuje tolerancje na ten antygen. Drugim podejściem jest uzyskanie chimeryzmu komórek hematopoetycznych. W tym celu proponuje się transplantację ksenogenicznych komórek progenitorowych szpiku z jednoczesną tymektomią [29].

Wykorzystanie praktyczne narządów odzwierzęcych, najprawdopodobniej świni, przyniesie z całą pewnością liczne korzyści terapeutyczne, należy jednak pamiętać o ryzyku związanym z tego rodzaju zabiegami. Szczególna uwaga powinna być zwrócona

na niezgodność funkcjonalną przeszczepianych narządów świni w stosunku do organów człowieka oraz potencjalne możliwości przeniesienia infekcji na człowieka i jej skutki. Ze względu na małą liczbę doświadczeń klinicznych brak jest dostatecznych, rozstrzygających wyników potwierdzających bezpieczeństwo tego rodzaju zabiegów. Niezgodność metaboliczna dotyczy przede wszystkim niekompatybilności enzymów i ich receptorów. Niektóre enzymy, np. proteazy, są specyficzne gatunkowo i mogą nie działać odpowiednio w ksenogenicznym środowisku. Albumina świni różni się w 35% od albuminy człowieka, erytropoetyna w 18%, natomiast dopełniacz w 30% [30]. Takie różnice mogą powodować nie tylko zaburzenia czynności przeszczepu, ale także całego organizmu.

Rozważając zagrożenia związane z możliwością przeniesienia zakażenia na człowieka, szczególną uwagę należy zwrócić na ekspozycję pacjenta na znane i nieznanne patogeny przy znacznym poziomie immunosupresji wymaganym w przeszczepieniu narządu odzwierzęcego. Aby zmniejszyć potencjalne ryzyko zakażenia, postuluje się zastosowanie krótkich interferujących RNA (siRNA) w transgenezie świń przeznaczonych do ksenotransplantacji (31). Niekompatybilność w zakresie MHC może także stwarzać problem w skutecznej odpowiedzi immunologicznej na nowy czynnik chorobotwórczy, który ponadto w nowym środowisku, jakim jest organizm człowieka, może nabywać odmiennych właściwości, co potencjalnie będzie powodować nieznanne do tej pory zespoły kliniczne [32].

Metody uzyskiwania zwierząt transgenicznych

Najstarszą i najczęściej stosowaną techniką wprowadzania egzogennej informacji genetycznej jest technika mikroiniekcji DNA. Technika mikroiniekcji DNA do przedjądrza zapłodnionej komórki jajowej i jej modyfikacje, tzn. mikroiniekcja do pęcherzyka zarodkowego niedojrzałego oocytu lub do jąder komórkowych zarodka dwukomórkowego, określane są dzisiaj mianem techniki standardowej [34-36]. Praktycznie wszystkie transgeniczne ssaki, jakie do tej pory udało się uzyskać, wyprodukowano, stosując tę technikę. Niewielką liczbę transgenicznych osobników (świnie, kozy i bydło) udało się uzyskać przez zastosowanie rekombinacji homologicznej (*knock-out*) w połączeniu z klonowaniem.

Mikroiniekcja DNA pozostaje nadal podstawową techniką uzyskiwania transgenicznych świń. Należy nadmienić, że współczesna biotechnologia dysponuje również innymi metodami, które pozwalają uzyskiwać transgeniczne świnię. Należą do nich: klonowanie jąder transformowanych komórek somatycznych, wykorzystanie komórek macierzystych oraz zmodyfikowanych plemników jako nośników egzogennej DNA. Wymienione metody cechuje jednak bardzo niska wydajność, brak powtarzalnych wyników w przypadku zastosowania zmodyfikowanych plemników, trudności z uzyskaniem stabilnych

linii komórek macierzystych, a w przypadku klonowania powszechnie znane problemy dotyczące tej metody, np. wczesna zamieralność płodów czy wady genetyczne [37-39]. Zabieg mikroiniekcji DNA przeprowadza się przy użyciu pary mikromanipulatorów (jeden do manipulacji zygotami, drugi do iniekcji) pod mikroskopem odwróconym.

Wydajność metody mikroiniekcji jest stosunkowo niska, odsetek transgenicznych osobników możliwych do uzyskania w odniesieniu do liczby zapłodnionych komórek jajowych poddanych mikroiniekcji wynosi u świni 2-3%. Na wydajność metody wpływa również stężenie DNA, standardowo wynosi 2-4 ng/ μ l, czystość roztworu DNA i stosowany bufor. Ważna jest także wielkość wprowadzanego odcinka DNA, która w zależności od rodzaju wektora, wielkości promotora i genu waha się od kilkuset do kilku tysięcy par zasad, im dłuższy odcinek DNA jest wprowadzany, tym prawdopodobieństwo integracji jest mniejsze. Kolejne czynniki stanowią forma wprowadzanego wektora, kolistą czy linearną z tępymi lub lepkimi końcami, jak również rodzaj zastosowanego promotora [33, 34, 36, 40, 41].

Po przeprowadzeniu mikroiniekcji zygoty ocenia się morfologicznie i zygoty z uszkodzoną cytoplazmą są eliminowane. Prawidłowe morfologicznie, transformowane zygoty przeszczepia się następnie chirurgicznie do jajowodów zsynchronizowanych loch biorczyń (synchronizacja hormonalna cyklu rujowego biorczyń – czas cyklu rujowego biorczynie musi być zsynchronizowany z czasem cyklu rozwojowego transformowanych zygot lub zarodków).

Ksenotransplantacja – kwestie etyczne, społeczne, prawne i religijne

Idea ksenotransplantacji wywołuje zrozumiałe pytania natury etycznej, prawnej, religijnej i światopoglądowej. Są one przedmiotem dyskusji prowadzonej między zwolennikami zróżnicowanych poglądów, a lista argumentów ulega ciągłym zmianom i jest otwarta. Dyskusja ta powinna mieć wpływ na kierunki rozwoju uregulowań prawnych, odnoszących się pośrednio lub bezpośrednio do ksenotransplantacji.

Ksenotransplantacje, prócz odpowiedzi na najbardziej zasadniczy problem, jakim jest niedostatek organów, tkanek, etc., odznaczają się szeregiem innych potencjalnych zalet.

W krajach, w których allotransplantacje nie są akceptowane ze względów religijnych, ksenotransplantacje mogą stać się dopuszczalną alternatywą.

Parametry konkretnego produktu ksenotransplantacyjnego mogą być bardzo dokładnie zbadane i opisane przed transplantacją. Dodatkowo sam zabieg może być precyzyjnie zaplanowany także pod względem wyboru optymalnego terminu. Wszelkie negatywne konsekwencje charakterystyczne dla transplantacji organów pozyskanych od zmarłych dawców (np. patofizjologiczny wpływ śmierci mózgu na organy) nie będą miały w tym przypadku miejsca.

Szeroki i udokumentowany dostęp do organów może sprawić, że również kryteria doboru biorców mogą zostać poszerzone.

Fakt, że produkty ksenotransplantacyjne pozyskiwane będą w warunkach pełnej kontroli oraz to, że inżynieria genetyczna pozwala na precyzyjne dostosowywanie ich parametrów, może zwiększyć skuteczność przeszczepów z punktu widzenia immunologicznego.

Etapem przełomowym, który zapewne zdecyduje o dalszym rozwoju ksenotransplantacji, będą testy kliniczne. Na tym etapie pojawia się szereg zasadniczych pytań:

- 1) Czy spełniony jest warunek, iż spodziewane korzyści w zdecydowany sposób przewyższają potencjalne ryzyko?
- 2) Czy istnieją możliwe do zastosowania metody alternatywne pozwalające pomóc pacjentowi, który rozważany jest jako kandydat do testów klinicznych?
- 3) Czy wybór pacjenta przeznaczanego do uczestnictwa w próbie klinicznej jest odpowiednio uzasadniony?

Zagadnienie, które tu rozważamy, jest zagadnieniem nowym, różny jest zatem poziom dostosowania i zaawansowania legislacji. Co więcej, pomiędzy różnymi krajami mogą zaistnieć znaczące różnice w przyjętej filozofii odnoszącej się do zasad tworzenia regulacji prawnych. Taki problem jest charakterystyczny w sytuacjach, gdy przedmiot niesie dużą zawartość emocjonalną, gdyż nie jest „obojętny” w zestawieniu z normami etycznymi, religijnymi lub światopoglądowymi. W konsekwencji istnieje ryzyko, że uregulowania prawne będą się znacznie różniły na poziomie poszczególnych krajów. Jeżeli taka sytuacja zaistnieje w rzeczywistości, jej negatywnym i bardzo prawdopodobnym efektem może być zjawisko „ksenoturystyki”, a więc przemieszczania się (również zorganizowanego) pacjentów z kraju, gdzie nie mogą być poddani zabiegowi ksenotransplantacji, do kraju, gdzie taki zabieg jest możliwy. Wydaje się, że najskuteczniejszym sposobem zapobiegania takiemu ryzyku jest międzynarodowa współpraca zarówno zespołów badawczych, środowisk medycznych, jak i prawodawców [42, 44].

Czynnikiem, o którym w szczególności środowiska naukowe i medyczne zaangażowane w projekty ksenotransplantacyjne nie powinny zapominać, jest odbiór społeczny idei ksenotransplantacji. W rzeczywistości bowiem to społeczeństwo (choćby siłą swoich głosów i opinii publicznej) będzie decydowało o rozwoju tej koncepcji. Rolą wymienionych środowisk jest cierpliwe, systematyczne i zgodne ze stanem faktycznym informowanie o oczekiwanych korzyściach, zagrożeniach i znakach zapytania związanych z ksenotransplantacjami. Dobrym przykładem takiej współpracy jest opracowany przez czołowych przedstawicieli środowisk naukowych wspólnie z Watykanem dokument precyzujący stanowisko Stolicy Apostolskiej odnośnie ksenotransplantacji [42, 43, 45].

Trzy wielkie religie monoteistyczne: chrześcijaństwo, judaizm i islam mimo dzielących je różnic posiadają wiele wspólnych lub podobnych sposobów oceny zachodzą-

cych procesów, zdarzeń i wyborów. Sprawia to, że mają wspólne zasadnicze perspektywy oceny ksenotransplantacji.

W wielu religiach niemonoteistycznych (np. w Japonii czy Indiach), gdzie allotransplantacje z wykorzystaniem organów ludzi martwych nie są dopuszczalne, ksenotransplantacje mogą okazać się znaczącym przełomem. Sposób oceny ksenotransplantacji jest zasadniczo różny w przypadku buddyzmu i hinduizmu, choćby ze względu na inny pogład na relacje człowiek – zwierzę. Niemniej obydwie te religie pozostawiają ostateczną decyzję w sferze sumienia każdego z ludzi [42].

Jak wynika z tego krótkiego przeglądu kwestii związanych z ksenotransplantacją, znajdujemy się u początku drogi, traktujemy zatem tę publikację jako pewien rodzaj wprowadzenia do dyskusji.

Ksenotransplantacja – krajowe badania i wyniki

Od ponad dwóch lat w ramach projektu zamawianego Ministerstwa Nauki i Informatyzacji realizowany jest polski projekt ksenotransplantacyjny, w którym uczestniczy 11 zespołów badawczych, reprezentujących różne specjalności naukowe takie, jak: biologia molekularna, embriologia, wirusologia, immunologia oraz chirurgia transplantacyjna. Podstawowym celem projektu jest uzyskanie transgenicznych świń dla konstrukcji genowych, obniżających barierę immunologiczną człowiek-świnia.

Pierwszym celem prowadzonych badań było uzyskanie transgenicznych świń z genem $\alpha 1,2$ -fukozylotransferazy człowieka przy zastosowaniu standardowej techniki mikroiniekcji DNA do zapłodnionych komórek jajowych świni. W pracach wykorzystano konstrukcję genową o charakterze konkurencyjnym, której zadaniem jest wprowadzenie do komórek świni genów kodujących enzymy swoiste dla tego samego substratu, co endogenny enzym dawcy [46, 47]. Przygotowana konstrukcja genowa, zawierająca gen $\alpha 1,2$ -fukozylotransferazy człowieka, konkuruje z $\alpha 1,3$ -galaktozylotransferazą o ten sam substrat N-acetylolaktozaminę. Wprowadzenie do genomu świni genu $\alpha 1,2$ -fukozylotransferazy człowieka ma spowodować maskowanie epitopu przez zmniejszenie powinowactwa przeciwciał anty-Gal. Zmniejszenie powinowactwa przeciwciał anty-Gal w układzie świnia-człowiek może obniżyć immunologiczną barierę międzygatunkową i zminimalizować ryzyko odrzucenia przeszczepu [46-48]. W badaniach własnych do przedjadrzy zapłodnionych komórek jajowych świni wprowadzano wektor CMV:FutII z genem $\alpha 1,2$ -fukozylotransferazy sklonowanym w plazmidzie pGT-N29.

W realizowanym projekcie z zakresu ksenotransplantacji zabiegowi mikroiniekcji transgenem CMV:FutII poddano 1870 zapłodnionych komórek jajowych świni uzyskanych od 135 dawczyń (14 zygot/szt.). Zygoty przeszczepiono do jajowodów 57 zsynchronizowanych biornych (średnio 32 zygoty/szt.). Od 26 loch (46%) uzyskano 117 prosiąt. Analiza molekularna genomowego DNA potencjalnie transgenicznych osobników

wykazała obecność wprowadzonego genu u jednego knura – TG1154. Badania integracji wprowadzonego genu zostały potwierdzone przez wykonanie analizy metodą FISH, gdzie lokalizację transgenu wykazano na chromosomie 14q28 u knura TG1154.

Tabela 1. Efektywność transgenezy – gen CMV:FUTII

Gen	Liczba dawczyń	Liczba owulacji	Liczba uzyskanych komórek jajowych	Liczba biorczyń	Liczba potencjalnie transgenicznych zygot	Liczba prośnych biorczyń	Liczba prosiąt	Osobniki transgeniczne
CMV:FUTII	135	3752	2776	57	1870	26	117	1

W wyniku przeprowadzonych prac uzyskano transgenicznego knura TG1154. Jest to pierwsza w Polsce transgeniczna świnka, której genotyp zmodyfikowano na potrzeby ksenotransplantacji. Oczywiście jest, że jeden transgeniczny osobnik nie rozwiąże problemu związanego z niedoborem odpowiednich organów do transplantacji u ludzi. Ponadto modyfikacja genomu, jaką uzyskano, dotyczy tylko pojedynczego genu, dlatego trwają prace nad uzyskaniem transgenicznych świń, które będą miały w swoich genomach jak najwięcej genów minimalizujących odrzut przeszczepionych organów. Wiemy już prawie wszystko o genomie człowieka i, teoretycznie, znajomość ta pozwala na zlokalizowanie i określenie budowy genów odpowiadających za większość cech układu immunologicznego człowieka. Główna przeszkoda w wykorzystaniu tej wiedzy jest natury technicznej. Wynika chociażby z faktu, że dostępne wektory (nośniki egzogennej informacji genetycznej) mają ograniczoną pojemność. Na obecnym etapie pozwalają na budowanie konstrukcji genowych, które mogą przenosić pojedyncze geny. Są one stale doskonałe. Podejmowane są próby wprowadzania mieszaniny konstrukcji genowych w jednakowych proporcjach, np. trzech uzupełniających się lub różnych genów. Efektywność takiego postępowania jest jednak niska. Geny integrują się z różną częstością, a uzyskanie osobnika o potwierdzonej ekspresji wszystkich wprowadzonych genów jest praktycznie niemożliwe [49, 50].

Transgenicznego osobnika TG1154 uzyskano w stosunkowo krótkim czasie, bo zaledwie w rok od rozpoczęcia prac. Jednak osiągnięta w prezentowanych badaniach efektywność transgenezy w odniesieniu do poddanych mikroiniekcji zygot wyniosła zaledwie 0,05%, a do uzyskanych osobników 0,9%. Jest to znacznie poniżej teoretycznie zakładanej efektywności transgenezy u świń, którą określa się w granicach 2% w stosunku do transformowanych zygot [33, 36]. Przyczyną tak niskiej efektywności może być fakt zastosowania silnego promotora ogólnoustrojowego, którego ekspresja mogła

powodować obumieranie zarodków we wczesnych stadiach rozwojowych, na co wskazywałaby liczba uzyskanych prosiąt. Z ogólnej liczby 1870 przeszczepionych zygot uzyskano 117 prosiąt, co stanowi 6,3%.

Należy jednak podkreślić, że nabyta przez transgenicznego knura cecha, wprowadzona w wyniku przeprowadzonych prac, trwale wbudowała się w jego genom. Świadczy o tym analiza przeprowadzona metodą FISH oraz przekazywanie nowo nabytej cechy na potomstwo. Prawie połowa osobników pokolenia F1 (43,5%), uzyskanych w wyniku inseminacji nasieniem knura TG1154, posiada odziedziczoną po ojcu cechę. Niska efektywność transgenezy w odniesieniu do możliwości, jakie stwarza uzyskanie transgenicznych zwierząt, całkowicie rekompensuje poniesione nakłady. Również wyniki badań opublikowanych we wrześniu 2004 roku są bardzo satysfakcjonujące, ponieważ rozwijają w znacznym stopniu obawy dotyczące endogennych retrowirusów świni jako potencjalnego źródła zakażeń po przeszczepie transgenicznych organów [50-52].

Wyselekcjonowane osobniki transgeniczne, po osiągnięciu dojrzałości i określonej masy ciała, przekazano do dyspozycji zespołom medycznym w celu przeprowadzenia dalszych badań.

Literatura

- [1] Reemtsma K., (1966), *Renal heterotransplantation*. Adv. Surg., nr 2, s. 285-293.
- [2] Bailey L.L., Nehlsen-Cannarella S.L., Concepcion W., Jolley W.B., *Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate*. JAMA 1985, nr 254, s. 3321-3329.
- [3] Starzl T.E., Fung J., Tzakis A., Todo S., Demetris A.J., Marino I.R., Doyle H., Zeevi A., Warty V., Michaels M., *Baboon-to-human liver transplantation*. Lancet 1993, nr 341, s. 65-71.
- [4] Tearle R.G., Tange M.J., Zannettino Z.L., Katerelos M., Shinkel T.A., Van Denderen B.J., Lonie A.J., Lyons I., Nottle M.B., Cox T., Becker C., Peura A.M., Wigley P.L., Crawford R.J., Robins A.J., Pearse M.J., d'Apice A.J., *The alpha-1,3-galactosyltransferase knockout mouse. Implications for xenotransplantation*. Transplantation 1996, nr 61, s. 13-19.
- [5] Dai Y., Vaught T.D., Boone J., Chen S.H., Phelps C.J., Ball S., Monahan J.A., Jobst P.M., McCreath K.J., Lamborn A.E., Cowell-Lucero J.L., Wells K.D., Colman A., Polejaeva I.A., Ayares D.L., *Targeted disruption of the alpha 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs*. Nat. Biotechnol. 2002, nr 20, s. 251-255.
- [6] Lai L., Kolber-Simonds D., Park K.W., Cheong H.T., Greenstein J.L., Im G.S., Samuel M., Bonk A., Rieke A., Day B.N., Murphy C.N., Carter D.B., Hawley R.J., Prather R.S., *Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning*. Science 2002, nr 295, s. 1089-1092.
- [7] Phelps C.J., Koike C., Vaught T.D., Boone J., Wells K.D., Chen S.H., Ball S., Specht S.M., Polejaeva I.A., Monahan J.A., Jobst P.M., Sharma S.B., Lamborn A.E., Garst A.S., Moore M., Demetris A.J., Rudert W.A., Bottino R., Bertera S., Trucco M., Starzl T.E., Dai Y., Ayares D.L., *Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs*. Science 2003, nr 299, s. 411-414.

- [8] Sharma A., Naziruddin B., Cui C., Martin M.J., Xu H., Wan H., Lei Y., Harrison C., Yin J., Okabe J., Mathews C., Stark A., Adams C.S., Houtz J., Wiseman B.S., Byrne G.W., Logan J.S., *Pig cells that lack the gene for alpha 1-3 galactosyltransferase express low levels of the gal antigen*. *Transplantation* 2003, nr 75, s. 430-436.
- [9] McCurry K.R., Kooyman D.L., Alvarado C.G., Cotterell A.H., Martin M.J., Logan J.S., Platt J.L., *Human complement regulatory proteins protect swine-to-primate cardiac xenografts from humoral injury*. *Nat. Med.* 1995, nr 1, s. 423-427.
- [10] Morgan B.P. *Complement regulatory molecules: application to therapy and transplantation*. *Immunol. Today* 1995, nr 16, s. 257-259.
- [11] Zhao J., Rollins S.A., Maher S.E., Bothwell A.L., Sims P.J., *Amplified gene expression in CD59-transfected Chinese hamster ovary cells confers protection against the membrane attack complex of human complement*. *J. Biol. Chem.* 1991, nr 266, s. 13418-13422.
- [12] Fodor W.L., Williams B.L., Matis L.A., Madri J.A., Rollins S.A., Knight J.W., Velandar W., Squinto S.P., *Expression of a functional human complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogeneic hyperacute organ rejection*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, nr 91, s. 11153-11157.
- [13] Diamond L.E., McCurry K.R., Martin M.J., McClellan S.B., Oldham E.R., Platt J.L., Logan J.S., *Characterization of transgenic pigs expressing functionally active human CD59 on cardiac endothelium*. *Transplantation* 1996, nr 61, s. 1241-1249.
- [14] Chen R.H., Naficy S., Logan J.S., Diamond L.E., Adams D.H., *Hearts from transgenic pigs constructed with CD59/DAF genomic clones demonstrate improved survival in primates*. *Xenotransplantation* 1999, nr 3, s. 194-200.
- [15] Langford G.A., Yannoutsos N., Cozzi E., Lancaster R., Elsome K., Chen P., Richards A., White D.J., *Production of pigs transgenic for human decay accelerating factor*. *Transplant Proc.* 1994, nr 26, s. 1400-1401.
- [16] Waterworth P.D., Dunning J., Tolan M., Cozzi E., Langford G., Chavez G., White D., Wallwork J., *Life-supporting pig-to-baboon heart xenotransplantation*. *J. Heart Lung Transplant.* 1998, nr 17, s. 1201-1207.
- [17] Cozzi E., Bhatti F., Schmoeckel M., Chavez G., Smith K.G., Zaidi A., Bradley J.R., Thiru S., Goddard M., Vial C., Ostlie D., Wallwork J., White D.J., Friend P.J. *Long-term survival of nonhuman primates receiving life-supporting transgenic porcine kidney xenografts*. *Transplantation* 2000, nr 70, s. 15-21.
- [18] Diamond L.E., Quinn C.M., Martin M.J., Lawson J., Platt J.L., Logan J.S., *A human CD46 transgenic pig model system for the study of discordant xenotransplantation*. *Transplantation* 2001, nr 71, s. 132-142.
- [19] Larsen R.D., Ernst L.K., Nair R.P., Lowe J.B., *Molecular cloning, sequence, and expression of a human GDP-L-fucose:beta-D-galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase cDNA that can form the H blood group antigen*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, nr 87(17), s. 6674-8.
- [20] Sandrin M.S., Fodor W.L., Mouhtouris E., Osman N., Cohn S., Rollins S.A., Guilmette E.R., Setter E., Squinto S.P., McKenzie I.F., *Enzymatic remodeling of the carbohydrate surface of a xenogenic cell substantially reduces human antibody binding and complement-mediated cytotoxicity*. *Nat. Med.* 1995, nr 1, s. 1261-1267.
- [21] Costa C., Zhao L., Burton W.V., Bondioli K.R., Williams B.L., Hoagland T.A., Ditullio P.A., Ebert K.M., Fodor W.L. *Expression of the human alpha 1,2-fucosyltransferase in transgenic pigs modifies the cell surface carbohydrate phenotype and confers resistance to human serum-mediated cytotoxicity*. *FASEB J.* 1999, nr 13, s. 1762-1773.

- [22] Sharma A., Okabe J., Birch P., McClellan S.B., Martin M.J., Platt J.L., Logan J.S., *Reduction in the level of Gal(alpha1,3)Gal in transgenic mice and pigs by the expression of an alpha(1,2)fucosyltransferase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, nr 93, s. 7190-7195.
- [23] Tanemura M., Miyagawa S., Koyota S., Koma M., Matsuda H., Tsuji S., Shirakura R., Taniguchi N., *Reduction of the major swine xenoantigen, the alpha-galactosyl epitope by transfection of the alpha2,3-sialyltransferase gene*. J. Biol. Chem. 1998, nr 273, s. 16421-16425.
- [24] Osman N., McKenzie I.F., Ostenried K., Ioannou Y.A., Desnick R.J., Sandrin M.S., *Combined transgenic expression of alpha-galactosidase and alpha1,2-fucosyltransferase leads to optimal reduction in the major xenoepitope Galalpha(1,3)Gal*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, nr94, s. 14677-14682.
- [25] Siegel J.B., Grey S.T., Lesnikoski B.A., Kopp C.W., Soares M., Schulte am Esch J. 2nd, Bach F.H., Robson S.C., *Xenogeneic endothelial cells activate human prothrombin*. Transplantation 1997, nr 64, s. 888-896.
- [26] van't Veer C., Golden N.J., Kalafatis M., Mann K.G., *Inhibitory mechanism of the protein C pathway on tissue factor-induced thrombin generation. Synergistic effect in combination with tissue factor pathway inhibitor*. J. Biol. Chem. 1997, nr 272, s. 7983-7994.
- [27] Kopp C.W., Siegel J.B., Hancock W.W., Anrather J., Winkler H., Geczy C.L., Kaczmarek E., Bach F.H., Robson S.C., *Effect of porcine endothelial tissue factor pathway inhibitor on human coagulation factors*. Transplantation 1997, nr 63, s. 749-758.
- [28] Schulte am Esch J. 2nd, Cruz M.A., Siegel J.B., Anrather J., Robson S.C. *Activation of human platelets by the membrane-expressed A1 domain of von Willebrand factor*. Blood 1997, nr 90, 4425-4437.
- [29] Buhler L., Friedman T., Iacomini J., Cooper D.K., *Xenotransplantation-state of the art-update 1999* Front. Biosci. 1999, nr 4, s. 416-432.
- [30] Olszewski W.L., Transplantologia kliniczna, Red. Rowiński W., Wałaszewski J., Pączek L., Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2004, s. 276-291.
- [31] Karlas A., Kurth R., Denner J., *Inhibition of porcine endogenous retroviruses by RNA interference: increasing the safety of xenotransplantation*. Virology 2004, nr 325, s. 18-23.
- [32] Fishman J.A., *Infection and xenotransplantation. Developing strategies to minimize risk*. Ann. N Y Acad. Sci. 1998, nr 862, s. 52-66.
- [33] Jura J., Smoraǳ Z., Gajda B., Skrzyszowska M., Kopchick J.J., Kelder B., Prieto P.A., Kareta W., Pasięka J., *Efektywność transgenezy u królika, kozy i świni z zastosowaniem genu modyfikującego skład mleka*. Roczniki Naukowe Zootechniki, 2000, z.5, s. 246-250.
- [34] Hammer, R.E., Pursel, V.G., Rexroad, C.E., Wall, R.J., Bolt, D.J., Ebert, K.M., Palmiter, R.D., Brinster, R.L., *Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection*. Nature, 1985, nr 315, s.680-683.
- [35] Pursel, V.G., and Rexroad, C.E.Jr., *Status of research with transgenic farm animals*. J.Anim.Sci. 1993, nr 71(suppl.3), s. 10-19.
- [36] Jura J., Smoraǳ Z., Kańska L., Skrzyszowska M., Gajda B., Ryńska B., *Czynniki wpływające na efektywność uzyskiwania potencjalnie transgenicznych zwierząt: bydło, królik*. Biotechnologia, 1998, nr 2 (41), s. 101-110.
- [37] Palejaeva I.A., Chen S-H., Vaught T.D., Page R.L., Mullins J., Bell S., Dai Y., Bogtto J., Walker S., Ayares D.L., Colman A. & Campbell K., *Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells*. Nature, 2000, nr 407, s. 86-90.
- [38] Gandolfi. F., *Sperm-mediated transgenesis*. Theriogenology 2000, nr 53, s. 127-137.

- [39] Wall. R.J., *New gene transfer methods*. Theriogenology 2002, nr 7, s.189-201.
- [40] Kopchick J.J, Jura J., Mukerji P., Kelder B., *Transgenic technology as it applies to animal agriculture*. Biotechnologia 1995, nr 4(31), s. 36.
- [41] Smoraż Z., Jura J., Kopchick J.J., Gajda B., Skrzyszowska M., Różycki M., Pasięka J., *Transgeniczne świnię: uzyskiwanie oraz genetyczne modyfikacje*. Biotechnologia 1998, nr 2(41), s. 145-153.
- [42] *Position Paper of the Ethics Committee of the International Xenotransplantation Association*. Xenotransplantation 2003, nr 10, s. 194.
- [43] *The American Society of Transplantation and The American Society of Transplant Surgeons. Position paper on the initiation of clinical trials of xenotransplantation*. Xenotransplantation 2000, nr 7, s. 235-236.
- [44] An Ravelingien, Centre for Environmental Philosophy and Bioethics, Department of Philosophy, Ghent University, Belgium. Commentary; *The world is my patient: A discussion of Martine Rothblatt's Your Life or Mine: How geoethics can resolve the conflict between public and private interests in xenotransplantation*. Xenotransplantation 2005, nr 12, s. 88-90.
- [45] Prospects for xenotransplantation; Scientific aspects and ethical considerations. Pontifical Academy for Life.
- [46] Słomski R., Szalata M., Lipiński D., Gronek P., *Ksenotransplantacje i przygotowanie konstrukcji genetycznych do modyfikacji świń dla pozyskiwania organów do transplantacji u człowieka*. Medycyna Weterynaryjna 2003, nr 59, s. 961-965
- [47] Lipiński D., Szalata M., Kalak R., Pławski A., Nuc K., Kala M., Juzwa W., Słomska K., Gronek P., Jura J., Jura J., Smoraż Z., Pieńkowski M., Słomski R., *Ekspresyjne konstrukcje genowe prawidłowych i zmutowanych genów*. Biotechnologia, 2003, nr 60, s. 48-73.
- [48] Jura J., Gajda B., Wieczorek J., Smoraż Z., Lipiński D., Kalak R., Juzwa W., Zeyland J. Słomski R., *Genetyczne modyfikacje świń w celu uzyskiwania organów do transplantacji u człowieka*. Biologia Rozrodu oraz Zdrowie Reprodukcyjne Człowieka pod redakcją Waldemara Kuczyńskiego. Białystok 2004, s. 185.
- [49] Overbeek P.A., Aguilar-Cordova E., Hanten G., Schaffner D.L., Patel P., Lebovitz R.M., Lieberman M.W., *Coinjection strategy for visual identification of transgenic mice*. Transgenic Res. 1991, nr 1(1), s. 31-37.
- [50] Wall R.J., Paleyanda R.K., Foster J.A., Powell A., Rexroad C., Lubon H., *DNA preparation method can influence outcome of transgenic animal experiments*. Animal Biotechnology 2000, nr 11(1), s.19-32.
- [51] Yang Y-G., Wood J.C., Lan P., Wilkinson R.A., Sykes M., Fishman J.A., Patience C., *Mouse retrovirus mediates porcine endogenous retrovirus transmission into human cells in long-term human-porcine chimeric mice*. J. Clin. Invest., 2004, nr 114, s. 695-700.
- [52] Weiss R.A., *Transgenic pigs and viruses adaptation*. Nature 1998, nr 391, s. 327-328.

Xenotransplantation – prospects and limitations

There is a worldwide shortage of organs for clinical transplantation and many patients due to receive new organs die on the waiting list. It is reasonable to consider that organs from other species may soon be engineered to minimize the risk of serious rejection and used as an alternative to human tissues, possibly ending organ shortages. For most purposes, xenotransplantation will use pigs as the source of tissues and organs. Enormous progress in biotechnology

and genetic engineering in recent years may help in research on xenotransplantation and provide solution to the shortage of human allografts. The xenotransplantology is focused on receiving of genetically modified pigs lacking gene(s) involved in graft rejection by recipients. Xenotransplantation comprises of several important steps from interdisciplinary areas. The first step involves preparation of competitive, inactivating and regulatory gene constructs. These gene constructs should allow (i) knock-out of 1,3 galactosyltransferase (1,3GT) gene, (ii) expression of complement proteins and (iii) regulate expression of proteins. Transgenic pigs obtained by injection of gene construct to the fertilized oocytes can be cloned after confirmation of transgenesis. Transgenic pigs could provide an unlimited source of cells and organs for persons suffering from organ failure, diabetes or degenerative disorders. This made xenotransplantation very attractive for biotechnology companies; however the risk for transmission of infectious disease from animals to humans stays unknown and need extended research.

Key words: biotechnology, genetic engineering, transgenesis, transplantation