



Transplantacja narządów – wyzwanie dla biotechnologii

Adam Jasiński¹, Ryszard Słomski^{1,2}, Marlena Szalata^{1,2},
Daniel Lipiński²

¹Katedra Biochemii i Biotechnologii, Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań

²Instytut Genetyki Człowieka, Polska Akademia Nauk, Poznań

The organ transplantation – a challenge for biotechnology

Summary

The use of animals as a source of organs and tissues for xenotransplantation can overcome the growing shortage of human organ donors. However, xenoreactive antibodies present in humans directed against swine Gal antigen on the surface of xenograft donor cells leads to the complement activation and immediate xenograft rejection as a consequence of hyperacute immunological reaction. The graft of genetically modified organ of a swine would be tolerated with simultaneous administration of medicines decreasing other less severe immunological reactions. This review summarizes the clinical history and rationale for xenotransplantation, recent progress in understanding the physiologic, immunologic, and infectious obstacles to xenotransplantation and some of the strategies being pursued to overcome these difficulties.

Key words:

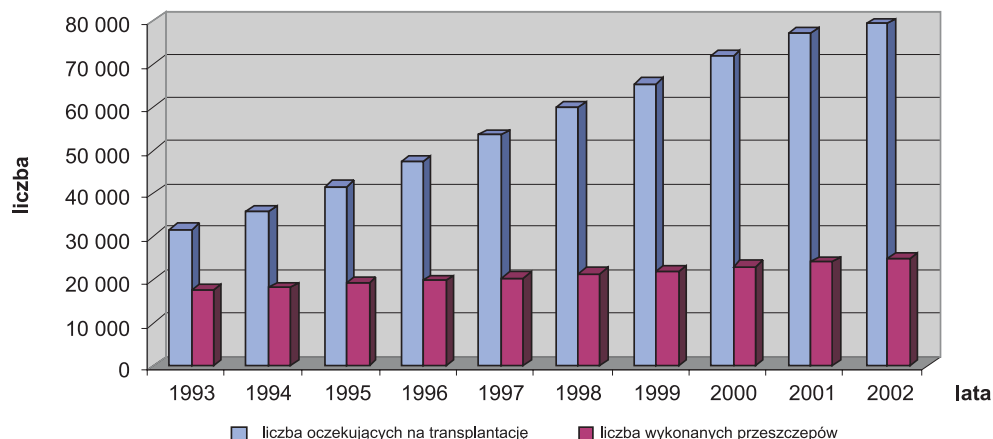
xenotransplantation, transgenic pigs, hyperacute rejection.

Adres do korespondencji

Ryszard Słomski,
Katedra Biochemii
i Biotechnologii,
Akademia Rolnicza
im. Augusta Cieszkowskiego,
ul. Wołyńska 32,
60-637 Poznań.

1. Wstęp

Przeszczep komórek, tkanek i narządów jest dziś realną, skuteczną, często jedyną drogą leczenia chorych. Zabieg ten już od ponad pięćdziesięciu lat ratuje życie pacjentom ze schyłkową niewydolnością wielu narządów, ofiarom wypadków oraz cierpiącym na nowotwory układu krwiotwórczego, czy złożone niedobory immunologiczne. Od momentu pierwszej, zakończonej powodzeniem transplantacji nerki, jakiej dokonał Joseph E. Murray



Wykres. Porównanie liczby pacjentów oczekujących na przeszczep narządów unaczynionych z liczbą wykonywanych zabiegów w USA. Według OPTN/SRTR.

w 1954 r., transplantologia jako dziedzina kliniczna uległa ogromnemu rozwojowi, co skutkuje dziś zarówno podniesieniem skuteczności tej metody terapeutycznej, jak i znacznym rozszerzeniem wskazań do jej zastosowania. Rutynowo wykonuje się przeszczepy nerki, nerki i trzustki, samej trzustki, wątroby oraz serca. Coraz częściej przedmiotem zabiegów stają się płuca, płuca i serce, a także fragmenty jelita. Powodzeniem zakończyły się również przeszczepy krtani (1) oraz kończyny górnej (2). Oprócz narządów unaczynionych wykonuje się również transplantacje komórek krwiotwórczych, skóry, zastawek serca, fragmentów kostnych i rogówki oka.

Nie bez znaczenia było również ustanowienie norm prawnych regulujących problem pozyskiwania narządów od osób zmarłych i żywych dawców oraz utworzenie wyspecjalizowanych instytucji organizacyjno-koordynacyjnych do spraw transplantacji organów (Eurotransplant, Poltransplant, UNOS-United Network For Organ Sharing).

W przypadku najczęściej przeszczepianego narządu, jakim jest nerka śmiertelność u pacjentów dorosłych jest obecnie niemal o połowę niższa w stosunku do wartości z początku lat osiemdziesiątych. Przeżywalność w okresie pięcioletnim sięga 84%. Podobnemu zmniejszeniu uległa też częstość powikłań w postaci odrzucenia przeszczepu (3). Jeszcze lepsze wyniki uzyskują niektóre ośrodki pediatryczne, gdzie w ciągu pięciu lat od zabiegu przeszczepu wątroby odnotowuje się 93% przeżycie pacjentów (4). W 2000 r. odnotowano najdłuższe przeżycie biorcy nerki od żywego, genetycznie spokrewnionego dawcy, które wynosiło 40 lat, nieco krócej – 34 lata, żył pacjent z nerką pobraną ze zwłok, z wątrobą – 30 lat, z sercem – 23 lata, z trzustką i nerką – 19 lat, z trzustką – 18 lat, z płucem – 13 lat (5). Niestety z roku na rok liczba chorych ze wskazaniami do przeszczepu zwiększa się nieproporcjonalnie do liczby wykonywanych zabiegów (wykres). Dysproporcja ta wzrasta

o 10-15% rocznie (6). Powodem tego jest brak dostatecznej liczby organów do transplantacji oraz coraz częstsze wskazania do wykonywania przeszczepów. Poważnym wyzwaniem jest zniwelowanie dysproporcji między liczbą dostępnych organów a liczbą pacjentów kwalifikujących się do przeszczepu. Istnieje duża dysproporcja pomiędzy liczbą oczekujących a liczbą zabiegów w zależności od przeszczepianego narządu (tab.). Powodem tego jest brak organów do transplantacji.

Tabela

Liczba oczekujących na przeszczep oraz liczba narządów do transplantacji dla krajów zrzeszonych w Eurotransplant (Austria, Belgia, Holandia, Luksemburg, Niemcy). Według Eurotransplant (www.eurotransplant.nl).

Narząd	Liczba oczekujących na przeszczep (styczeń 2006 r.)	Liczba organów do transplantacji (2005 r.)
nerka	11 814	3383
wątroba	2134	1243
trzustka	63	70
trzustka i nerka	218	303
serce	946	542
serce i płuca	64	21
płuca	738	450

2. Przyszłość transplantologii

Narządy do przeszczepów pobierane są najczęściej od osób zmarłych, rzadziej pochodzą one od żywych genetycznie lub emocjonalnie spokrewnionych dawców. W Polsce problem ten reguluje ustawa z 26 października 1995 r. „O pobieraniu i przeszczepianiu komórek, tkanek i narządów” (Dz.U., nr 138, poz. 682). Niestety obecne źródła organów nie są w stanie pokryć zapotrzebowania. 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, stworzenie sztucznych narządów czy bioreaktorów, które będą pełnił ich funkcje oraz ksenotransplantację.

2.1. Inżynieria tkankowa

Inżynieria tkankowa zakłada możliwość stworzenia *in vitro* gotowych tkanek, a w przyszłości całych narządów. Dziedzina ta dynamicznie się rozwija. Najbardziej zaawansowane są badania nad tworzeniem *in vitro* skóry, chrząstki i kości. Pierwsze preparaty tak wyhodowanej skóry są już dostępne i z powodzeniem stosowane

w leczeniu oparzeń i trudno gojących się ran w przebiegu cukrzycy czy pęcherzowym wrodzonym oddzielaniu naskórka.

Współczesna inżynieria tkankowa proponuje dwa podejścia do tworzenia nowych tkanek. Pierwszym jest podawanie czynników wzrostowych *in situ*. Powoduje to wytworzenie nowej tkanki w miejscu uszkodzenia (w ranie lub narządzie). Drugi sposób polega na hodowli *in vitro* tkanek na sztucznym zrębie z kolagenu lub łatwo ulegających degradacji polimerów. Na takiej zasadzie hoduje się obecnie „sztuczną skórę” (7), zaawansowane są także prace nad tworzeniem chrząstki (8) i kości (9), a także wątroby (10).

2.2. Wykorzystanie komórek macierzystych

Komórki macierzyste (SC, ang. *stem cells*) są niezróżnicowane, totipotencjalne i mogą dać początek każdemu rodzajowi tkanki. Istnieją dwa rodzaje komórek macierzystych. Pierwszym są pierwotne komórki zarodkowe (ang. *embryonic stem cells*), występujące na wczesnych etapach rozwoju zarodkowego. Dają one początek wszystkim trzem listkom zarodkowym. Drugim rodzajem są komórki macierzyste tkanek osobników dorosłych (ang. *progenitor cells*), które ulegają podziałom przez całe życie, pozostając na tym samym etapie rozwoju. Znajdą one, jak się wydaje, szczególne zastosowanie w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych (11-13) oraz naprawie tkanek (14,15), np. po zawałach serca czy uszkodzeniu wątroby i w terapii nowotworów układu krwiotwórczego.

2.3. Terapia biohybrydowa

Terapia biohybrydowa (terapia „opakowanymi” komórkami, immunoizolacja) to metoda wszczepiania do organizmu komórek „opakowanych” w selektywnie przepuszczalnej membranie w celu przejęcia funkcji komórek, które uległy zniszczeniu. Warstwa oddzielająca komórki musi chronić przed atakiem układu odpornościowego, a jednocześnie zapewniać swobodny przepływ substancji odżywczych i tlenu do wnętrza oraz wydzielanych przez nie związków na zewnątrz. Implanty wszczepiane do organizmu chorych osób mogą mieć postać mikrokapsulek (o pojemności 1000-5000 komórek), makrokapsulek (o pojemności 1-100 milionów komórek) oraz przepływowych urządzeń naczyniowych (o pojemności ponad miliarda komórek).

Pierwszym celem terapii biohybrydowej było stworzenie biohybrydowej trzustki w leczeniu cukrzycy (16). Obecnie metodę tę stosuje się z powodzeniem w leczeniu przewlekłych zespołów bólowych (17). Testuje się jej przydatność w leczeniu stwardnienia zanikowego bocznego, chorobie Huntingtona, chorobie Parkinsona, niedokrwistościach, hemofilii A, cukrzycy typu II, czy zwyrodnieniu plamki. Ze wzglę-

du na ograniczoną żywotność komórek, a tym samym ograniczony czas „działania” implantu, zastosowano w nich nieśmiertelne linie komórkowe, jak np. PC-12 wyizolowaną z nowotworu nadnercza gryzoni (dokładniej z guza chromochłonnego produkującego znaczne ilości dopaminy). Implanty zawierające nieśmiertelne linie komórkowe działają znacznie dłużej, gdyż komórki w nich zamknięte ulegają ciągłej odnowie, i co ciekawe, nie przerastają kapsulek, nie następuje też w nich indukcja nowotworzenia (18,19).

2.4. Bioreaktory

Bioreaktory mogą pełnić rolę narządów do czasu właściwej transplantacji. Powszechne zastosowanie zyskał bioreaktor pełniący funkcję wątroby (BAL, ang. *bioartificial liver*). W urządzeniu tym osocze przepływające przez sieć kapilar zanurzonych w komorze z wolnymi lub związanymi hepatocytami ulega detoksykacji. Hepatocyty pochodzą najczęściej od świni, co wynika z trudności w uzyskaniu wystarczającej ilości komórek ludzkich oraz ich stosunkowo małej odporności na krioprezervację. Pierwsze zastosowanie BAL odbyło się w roku 1997 u chorych z niewydolnością wątroby oczekujących na właściwą transplantację (20). Prowadzone są też prace nad skonstruowaniem bioreaktorów pełniących funkcję nerki. Są one w stanie pełnić nie tylko podstawowe funkcje filtracyjne nerki, ale także metaboliczne czy endokrynne (21).

2.5. Sztuczne narządy

Prace nad stworzeniem sztucznych narządów trwają od dawna. Szczególnie zaawansowane są badania nad stworzeniem w pełni sztucznego serca, które mają miejsce w USA, Japonii, Niemczech i Polsce. Pierwszego, zakończonego jednak niepowodzeniem, wszczepienia sztucznego serca dokonał Cooley w 1969 r. Przeprowadzony w 1982 r. przez Joyce'a zabieg zakończył się już pomyślnie. Obecnie w mechanicznych systemach wspomaganego krążenia zakłada się implantację w pełni funkcjonalnego urządzenia, pełniącego funkcję serca oraz pomp wspomagających pracę komór. Pompy wspomagające pracę lewej komory serca są dziś powszechnie stosowane u pacjentów oczekujących na znalezienie odpowiedniego dawcy serca. O celowości ich stosowania świadczy fakt obniżenia o 55% śmiertelności związanej z oczekiwaniem na właściwy narząd (22). Zakończono niedawno prace nad zbudowaniem pomp „drugiej generacji”. Posiadają one znacznie lepsze parametry, ale przede wszystkim są dużo mniejsze, co pozwala na ich zastosowanie także u dzieci. Przeżycie pacjentów ze sztucznym sercem w okresie jednorocznym wynosi 86%, natomiast w okresie pięcioletnim 64% (23). Stosowanie sztucznych narządów jest związane z pewnymi komplikacjami natury technicznej.

3. Ksenotransplantacje

Ksenotransplantacja to przeszczepianie komórek, tkanek i narządów pomiędzy różnymi gatunkami. Niestety taki przeszczep jest immunologicznie wysoce niezgodny, co wynika z różnic genetycznych pomiędzy dawcą a biorcą. W transplantologii funkcjonuje pojęcie gatunków filogenetycznie bliskich (ang. *concordant*) i odległych (ang. *discordant*), a czas przeżycia przeszczepu jest zależny od dystansu filogenetycznego, jaki dzieli dawcę i biorcę. W przypadku gatunków bliskich proces odrzucenia przeszczepu jest względnie długi i wynosi od kilku godzin do paru dni. W przypadku gatunków odległych 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 oraz infuzję ludzkiemu biorcy żywych komórek, tkanek lub organów pochodzących od zwierząt, a także ludzkich płynów ustrojowych, komórek, tkanek czy narządów, które weszły w kontakt *ex vivo* ze zwierzęcymi komórkami, tkankami lub narządami. Poważnym utrudnieniem jest istnienie różnicy antygenowej odpowiedzialnej za reakcje immunologiczne. Pod uwagę bierze się małpy naczelne – pawiany (*Papio* sp.) i szympany (*Pan troglodydes*), a także świnię domową (*Sus scrofa*).

3.1. Naczelne

Najbliższymi spokrewnionymi filogenetycznie z człowiekiem zwierzętami są małpy naczelne (NHPs, ang. *Nonhuman Primates*). Szympany i pawiany były początkowo brane pod uwagę jako potencjalni dawcy ze względu na duże podobieństwo anatomiczne i fizjologiczne ich narządów do organów ludzkich. Problemem są, jak się wydaje, małe rozmiary narządów pawiana czy szympansa i 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. W latach sześćdziesiątych w USA przeszczepiono nerki szympansów sześciu pacjentom z niewydolnością tych narządów, a jeden z nich przeżył nawet 9 miesięcy (24). W roku 1985 przeszczepiono serce pawiana dziecku z zespołem hipoplazji lewokomorowej. Po upływie 4 tygodni nastąpił jednak zgon (25). W 1990 r. Thomas Starzl przeszczepił wątrobę pawiana pacjentom zakażonym wirusami HIV i HBV, którzy przeżyli odpowiednio 27 i 70 dni (26). Pomimo dość owocnych wyników w klinice naczelne straciły zainteresowanie jako potencjalni dawcy narządów ludziom 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. Mała efektywność ich pozyskiwania mogłaby również nie pokryć w całości zapotrzebowania terapeutycznego na narządy (27). Ich wykorzystanie bu-

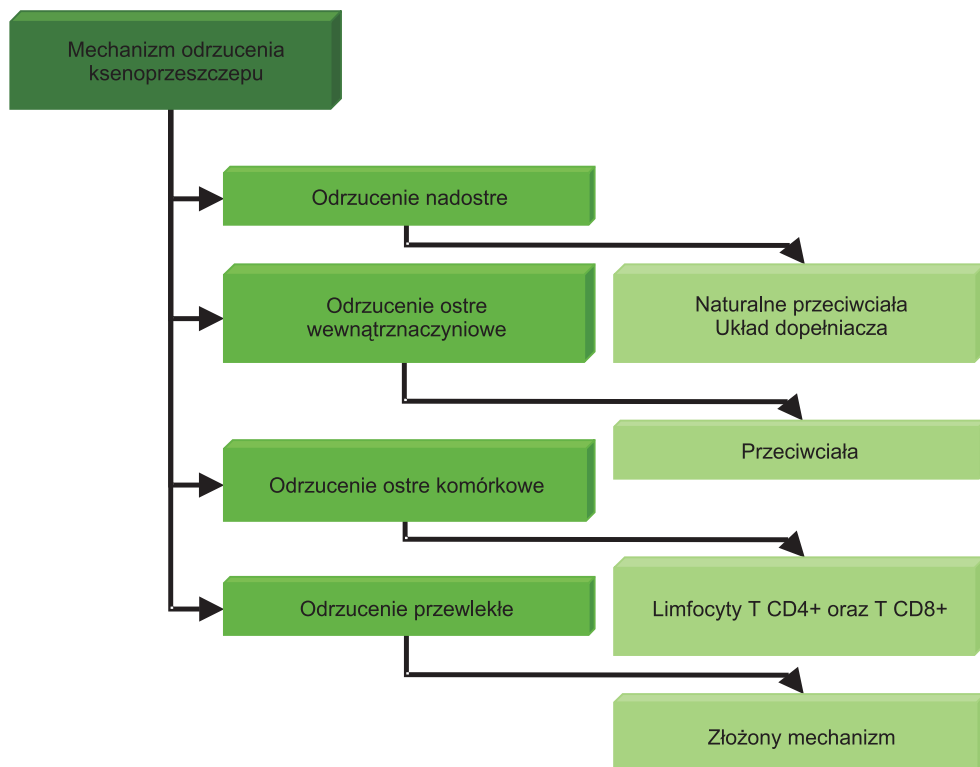
dzi także ogromny sprzeciw opinii publicznej. Filogenetyczna bliskość jest jednocześnie najsilniejszym atutem i największą barierą. Tak duże podobieństwo biochemiczne sprawia, że znaczna część patogenów wirusowych pawianów i szympanów jest w stanie z powodzeniem zarażać ludzi. Do retrowirusów mogących 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 (28).

3.2. Świnia – optymalny dawca

Zbyt wiele problemów związanych z wykorzystaniem w ksenotransplantacji gatunków bliskich wymagało znalezienia potencjalnego dawcy wśród gatunków filogenetycznie odległych. Optymalna okazała się świnia. Świnie są łatwe i tanie w hodowli, rozmnażają się szybko, mają liczne potomstwo. Zróżnicowanie wielkości wśród odmian pozwala na dobranie organów o odpowiedniej wielkości dla różnych biorców. Zwierzęta te łatwo poddają się zabiegom inżynierii genetycznej (27). 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 ludzki, co potwierdza ich zastosowanie w klinice. Perfuzja krwi przez wątrobę świńską pozwala na detoksykację chorych w śpiączce wątrobowej (29). Znaczny dystans filogenetyczny jest jednak powodem ogromnych problemów immunologicznych po przeszczepie, ale potencjalnie zmniejsza ryzyko zakażeń wirusowych.

4. Patogeneza odrzucenia ksenoprzeszczepu

Przeszczep wysoce niezgodnego narządu, tkanki czy komórek pochodzących od organizmu innego gatunku prowadzi do uruchomienia odpowiedzi układu odpornościowego biorcy w celu ich wyeliminowania z ustroju. Odrzucenie może być zależne od przeciwciał (odrzucenie humoralne), jego powodem może być reakcja komórkowa (odrzucenie komórkowe) lub może mieć charakter mieszany (odrzucenie mieszane). Każdy z podanych mechanizmów wykazuje odmienny obraz patomorfologiczny (30). W zależności od czasu wystąpienia odrzucenia po transplantacji można podzielić je na odrzucenie nadostre, odrzucenie ostre naczyniowe, odrzucenie ostre komórkowe i odrzucenie przewlekłe (rys. 1).



Rys. 1. Typy odrzucenia ksenoprzeszczepu oraz podstawowe mechanizmy, które je wywołują.

4.1. Odrzucenie nadostre

Odrzucenie nadostre (HAR, ang. *hyperacute rejection*) występuje w ciągu kilku do kilkunastu minut po przeszczepieniu narządu. Zmiany zachodzą w naczyniach włosowatych i małych tętniczkach. Za jego wystąpienie odpowiedzialne są naturalne, preformowane przeciwciała obecne we krwi biorcy przeciwko antygenom występującym na powierzchni śródbłonna naczyniowego przeszczepianego narządu. Antygeny te są różne u człowieka i świni (27). Interakcja między antygenami a przeciwciałami powoduje aktywację układu dopełniacza na drodze klasycznej zależnej od immunoglobulin IgM (31). Do uruchomienia enzymatycznej kaskady dopełniacza może też dojść na drodze alternatywnej, niezależnej od przeciwciał. W badaniach przeprowadzonych *in vitro* wykazano, że w mechanizmie tym mogą jednak brać pomocniczy udział immunoglobuliny klasy A w formie dimerów dIgA (32).

Głównym czynnikiem aktywującym układ dopełniacza, będącym jednocześnie przyczyną wystąpienia HAR są przeciwciała przeciwko tzw. antygenowi Gal, który jest obecny na glikoproteinach i glikolipidach (33). Oszacowano, że ok. 1% wszystkich immunoglobulin krążących we krwi ma charakter anty-Gal (34). Około 80%

przeciwciał skierowanych przeciwko wszystkim antygenom świni jest skierowana przeciwko antygenowi Gal. Stanowią one od 1 do 2,4% całkowitej frakcji IgG oraz od 3,9 do 8,0% całkowitej frakcji IgM (35). Zidentyfikowano także inne epitopy, przeciw którym człowiek wytwarza naturalne przeciwciała (27). Antygen Gal będący częścią Gal α 1,3Gal powstaje przez dołączenie galaktozy do N-acetylolaktozoaminy przy udziale α (1,3)galaktozylotransferazy (36). Antygen ten nie występuje na powierzchni komórek człowieka, małp człekokształtnych i małp Starego Świata, występuje natomiast u niższych naczelnych i pozostałych ssaków, co można wytłumaczyć inaktywacją genu α (1,3)galaktozylotransferazy u wyższych naczelnych w drodze ewolucji (37). Obecność naturalnych przeciwciał w surowicy tłumaczy się faktem wcześniejszego kontaktu układu immunologicznego człowieka z epitopem Gal, który jest także obecny na powierzchni komórek flory bakteryjnej naturalnie kolonizującej jelito (34).

Proces odrzucenia przebiega w kilku etapach. Przyłączenie ksenoprzeciwciał do antygenów śródbłonkowych prowadzi do aktywacji dopełniacza. Następuje uruchomienie kaskady enzymatycznej, której efektem jest powstawanie anafilatoksyn, opsonin oraz kompleksu atakującego błonę (MAC, ang. *membrane attack complex*). Anafilatoksyny C3a i C5a posiadają właściwości chemotaktyczne w stosunku do granulocytów, monocytów i komórek tłuszcznych. Powodują ich chemotaksję i degranulację. Komórki tłuszczne uwalniają mediatory zapalne, co prowadzi do skurczu mięśni gładkich i wzrostu przepuszczalności ściany naczyń krwionośnych. Neutrofile uruchamiają proces „wybuchu tlenowego”. Produkty C3b i C4b mają właściwości opsonin i ułatwiają fagocytozę. Składniki C5b-C9 tworzą kompleks atakujący błony, który wbudowując się w błonę komórkową prowadzi do dezintegracji i lizy komórki. Uszkodzone w ten sposób komórki śródbłonka tracą siarczany heparanu odpowiedzialny za ich funkcję antytrombogeniczną, na jego miejsce pojawia się selektyna P, wzrasta wydzielanie czynnika von Willebrandta, PAF i prostacykliny. Wzrost ekspresji selektyny P dodatkowo zwiększa adhezję neutrofilii. Dochodzi do aktywacji śródbłonka, co skutkuje utratą zdolności hamowania układu krzepnięcia. Na powierzchni komórek pojawiają się aktywatory krzepnięcia: PAF i PAI-1. Dochodzi do agregacji płytek krwi i powstawania skrzepu (38)

Patomorfologicznie w reakcji nadostrego odrzucenia obserwuje się wewnątrznaczyniowe odkładanie immunoglobulin i dopełniacza, agregację płytek krwi, aktywację układu krzepnięcia oraz nacieki leukocytarne. Pozaustrojowa perfuzja wątroby *Rhesus* krwią ludzką prowadzi do rozwinięcia ostrej reakcji pomiędzy przepływającą krwią a komórkami narządu. We krwi podnosi się stężenie IL-1 β , IL-2, IL-6, interferonu γ i prostaglandyny 6kPGF1 α . Obniża się natomiast stężenie molekuł adhezyjnych ELAM-1 i ICAM-1 (29).

4.2. Ostre odrzucenie wewnątrznaczyniowe

W przypadku opanowania nadostrego odrzucenia (przez wyczerpanie dopełniacza, np. po podaniu CVF) rozwija się ostre odrzucenie wewnątrznaczyniowe (AVR, ang. *acute vascular rejection*; DXR, ang. *delayed xenograft rejection*). Występuje ono po upływie kilku godzin od ksenotransplantacji. Mechanizm tego procesu nie jest do końca wyjaśniony. Wiadomo jednak, że jest on zależny od przeciwciał (39), ale niezależny od układu dopełniacza (40). Znaczącą rolę mogą pełnić komórki NK i makrofagi (41).

Przebieg ostrego odrzucenia naczyniowego jest bardzo zbliżony do przebiegu HAR, z tą różnicą, że nie bierze w nim udziału dopełniacz i rozpoczyna się ono w świetle tętnic. Aktywacja śródbłonnków naczyniowych przeszczepionego narządu prowadzi do wystąpienia szeregu zjawisk. Następuje aktywacja płytek krwi, wzrost sekrecji chemokin i rekrutacja komórek NK oraz monocytów/makrofagów. Obecność związanych z antygenem Gal ksenospecyficznych przeciwciał zwiększa adhezję komórek NK do śródbłonnków i tym samym wzmaga ich aktywację. Nie stwierdzono znaczącej roli limfocytów T w przebiegu tego procesu. Komórki NK oraz monocyty przyłączają się do powierzchni śródbłonka i przenikają do przestrzeni śródmiąższowej narządu. Poprzez adhezję i wydzielanie cytokin (monocyty – $\text{TNF}\alpha$, komórki NK – $\text{IFN}\gamma$) komórki NK i monocyty indukują ekspresję w komórkach śródbłonkowych licznych genów odpowiedzialnych za syntezę molekuł adhezyjnych oraz czynników chemotaktycznych. Doprowadza to do nasilenia procesu adhezji i agregacji płytek krwi. Następuje ich aktywacja, co prowadzi do zmian prokoagulacyjnych i powstawania skrzepów (27). W wyniku cytotoksycznej aktywności komórek NK oraz zmian zakrzepowych narząd zostaje odrzucony.

4.3. Ostre odrzucenie komórkowe

Ten rodzaj reakcji odrzucenia jest rzadko obserwowany *in vivo* ze względu na dominującą rolę mechanizmów nadostrego (HAR) i ostrego odrzucenia naczyniowego (AVR), co prowadzi do szybkiej destrukcji narządu. Sugeruje się, że w procesie ostrego odrzucenia komórkowego (ang. *acute cellular rejection*) w układzie świnia-człowiek główną rolę odgrywa pośrednia droga prezentacji antygenów. Ostre odrzucenie komórkowe występuje w ciągu kilku dni od transplantacji.

Różnice genetyczne pomiędzy głównym układem zgodności tkankowej (MHC) dawcy (w przypadku świni SLA, ang. *swine leukocyte antigens*) a biorcy powinny teoretycznie utrudniać oddziaływanie pomiędzy limfocytami a komórkami prezentującymi antygen. Brak takich interakcji mógłby zatem blokować w pewnym stopniu odpowiedź komórkową na ksenoprzeszczep. W układzie świnia-człowiek obserwuje się jednak pobudzenie mechanizmów komórkowych. Z reguły obserwowane jest jedynie upośledzenie odpowiedzi ze strony limfocytów T CD8^+ rozpoznających

MHC klasy I. Upośledzenie nie dotyczy limfocytów T CD4+ rozpoznających MHC klasy II. Komórki NK ulegają silnej aktywacji na skutek niemożności rozpoznania MHC klasy I, co jest warunkiem ich supresji w normalnych warunkach (38). W badaniach przeprowadzonych na modelu zwierzęcym z wykorzystaniem myszy immunologiczniekompetentnych, świńskich wysp trzustkowych i limfocytów ludzkich wykazano, że główną rolę w odrzuceniu komórkowym odgrywają limfocyty T CD4+. Aktywność limfocytów T CD8+ była obserwowana później i z mniejszym nasileniem. Patomorfologiczne w tym typie odrzucenia obserwowano nacieki komórek jednojądrzastych występujące śródmiąższowo w tkankach (42).

4.4. Odrzucenie przewlekłe

Odrzucenie przewlekłe (ang. *chronic rejection*) jest najczęstszą przyczyną niepowodzeń transplantacyjnych w układzie allogenicznym. Występuje ono w ciągu miesięcy, czy nawet lat od przeszczepu. Obserwuje się w nim zmiany naczyniowe, a dokładniej rozplem błony śluzowej tętnic średniego kalibru. Zmniejszenie światła naczynia powoduje niedokrwienie zaopatrywanej przez nie części narządu. Obszar czynnego mięszu zostaje zastąpiony tkanką łączną. W nerkach obserwuje się zmiany w kłębuszkach, będące wynikiem niedokrwienia i zmian zapalnych. W wątrobie dochodzi do zastoju żółci, zaniku przewodów żółciowych i hepatocytów. W sercu obserwuje się zwężenie naczyń wieńcowych, w płucach zarastanie oskrzelików, a w trzustce przewlekłe zapalenie zanikowe. Czasami zmianom tym towarzyszą nacieki komórek jednojądrzastych. Patogeneza odrzucenia przewlekłego nie jest określona. Uważa się jednak, że czynnikiem inicjującym jest uszkodzenie komórek śród-błonkowych przez limfocyty T cytotoksyczne i swoiste przeciwciała (38).

5. Metody hamowania odrzucenia ksenoprzeszczepu

Podstawowym problemem ksenotransplantologii jest nadostre odrzucenie przeszczepu. Dlatego główne wysiłki badaczy skupiają się obecnie na poznaniu mechanizmów, które warunkują jego występowanie oraz na opracowaniu metod przeciwdziałających jego wystąpieniu. W dalszym etapie podejmowane będą badania mające na celu ograniczenie mniej nasilonych reakcji immunologicznych, czy nawet wywołanie tolerancji na ksenoprzeszczep.

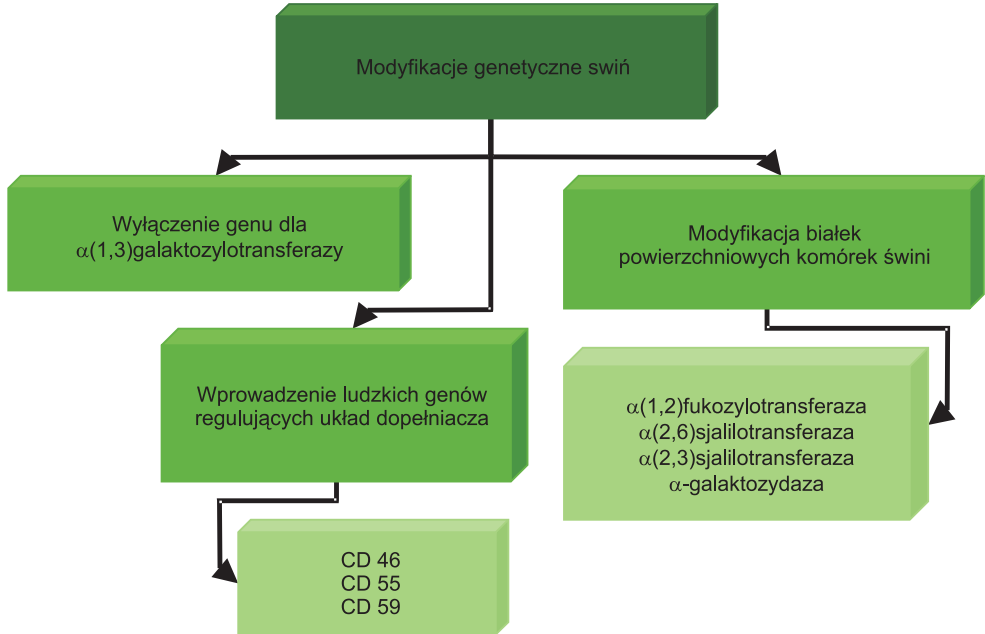
5.1. Usuwanie lub blokowanie naturalnych przeciwciał u biorcy

Naturalne ksenoprzeciwciała są zaangażowane w proces odrzucenia przeszczepu w mechanizmie nadostrym (HAR) i ostrym naczyniowym (AVR). Usunięcie lub za-

blokowanie tych przeciwciał znacznie ogranicza wystąpienie zjawisk związanych z HAR lub AVR. Istnieje kilka sposobów zablokowania lub usunięcia ksenoprzeciwciał z krwi biorcy. Bardzo skuteczną metodą powodującą opóźnienie wystąpienia nadostrego odrzucenia, ale charakteryzującą się krótkotrwałym działaniem jest plazmafereza. Metoda ta polega na pobraniu krwi, usunięciu lub wymianie plazmy i z powrotem przetoczeniu jej choremu (43). Skuteczność metody wzrasta jeszcze bardziej po zastosowaniu leków hamujących układ krzepnięcia (44). Ksenoprzeciwciała można usunąć z krwi metodą chromatografii immunopowinowactwa. Substancją wiążącą wykorzystaną w tej metodzie może być, np. białko A pochodzące ze *Stephylococcus* sp. lub przeciwciała poliklonalne przeciwko ludzkim immunoglobulinom IgG i IgM (45). Ilość ksenoprzeciwciał obecnych we krwi znacznie obniża perfuzja *ex vivo* krwi biorcy przez ksenogeniczny narząd. Większą skutecznością charakteryzuje się perfuzja przez nerkę niż przez wątrobę. Lepsze wyniki daje także perfuzja samego osocza niż pełnej krwi biorcy (46). Jedną z metod mających na celu zmniejszenie odpowiedzi immunologicznej jest usunięcie śledziony (splenektomia) (47). Przez zastosowanie rycyny A związanej z syntetycznym antygenem Gal można wyeliminować specyficzne wobec antygeny Gal limfocyty B. Koniugat taki jest rozpoznawany przez limfocyt B i powoduje jego destrukcję. Ograniczeniem metody jest dawka, która nie może być toksyczna dla całego ustroju (48). Wprowadzenie do krwiobiegu syntetycznych lub naturalnych antygenów Gal w postaci koniugatu z polilizyną, prowadzi do niemal 90% redukcji ilości ksenoprzeciwciał i znacznie obniża cytotoksyczność osocza w stosunku do antygenów świńskich. Wykazano także, że kompleks przeciwciał z polimerem jest metabolizowany w wątrobie, a produkty rozkładu są wydalane przez nerki (49). Podawanie leków immunosupresyjnych może skutecznie hamować aktywność limfocytów B, a tym samym ograniczać produkcję przeciwciał (38). Wspomagające działanie w immunosupresji transplantacyjnej może mieć naświetlanie tkanek chłonnych promieniowaniem γ (47). Również przeciwciała antyidiotypowe skierowane przeciwko ksenospecyficznym immunoglobulinom wykazują bardzo wysoką skuteczność w przeciwdziałaniu wystąpienia nadostrego odrzucenia (50).

5.2. Inaktywacja układu dopełniacza

Celem inaktywacji układu dopełniacza możliwe jest zastosowanie dwóch rozwiązań. Pierwsze z nich polega na unieczynnieniu białek obecnych we krwi. W drugim zakłada się wprowadzenie do komórek świni genów człowieka odpowiedzialnych za syntezę czynników regulujących kaskadę enzymatyczną dopełniacza. Aktywację kaskady dopełniacza można zahamować przez podanie jadu kobry (CVF, ang. *cobra venom factor*), rozpuszczalnego receptora dopełniacza typu I (sCR1, ang. *soluble complement receptor type 1*), inhibitora C1, FUT-175, K-76, przeciwciał przeciw składnikom C5 i C8 oraz dużej dawki IgG (51). Należy podkreślić, że nawet całkowi-



Rys. 2. Podstawowe kierunki modyfikacji genetycznej świń na potrzeby ksenotransplantacji.

ta inaktywacja dopełniacza nie chroni przed odrzuceniem przeszczepianego narządu. Inhibicja dopełniacza przeciwdziała rozwojowi nadostrego odrzucenia, nie wpływa jednak na ostre odrzucenie naczyniowe.

5.3. Modyfikacja genetyczna świń

Najskuteczniejszym sposobem przeciwdziałania nadostremu odrzuceniu jest stworzenie genetycznie zmodyfikowanych zwierząt. Działania inżynierii genetycznej skupiają się na trzech zasadniczych kwestiach: wprowadzenia do genomu świni ludzkich genów regulujących system dopełniacza, wyłączenia genu warunkującego powstawanie antygeny Gal oraz modyfikacji białek powierzchniowych komórek dawcy. Badania nad regulacją układu krzepnięcia nie dają jeszcze satysfakcjonujących rezultatów.

5.3.1. Usuwanie antygeny Gal u dawcy

Obecność na powierzchni komórek świńskich antygeny Gal jest główną przyczyną wystąpienia nadostrego odrzucenia i tym samym podstawową przeszkodą w uzyskaniu narządów nadających się do transplantacji u człowieka. Za powstawa-

nie tej cząsteczki odpowiedzialna jest, jak wiadomo, $\alpha(1,3)$ galaktozylotransferaza ($\alpha 1,3GT$). Enzym kodowany jest przez pojedynczy gen, dlatego jego wyłączenie pozwala na usunięcie antygeny Gal z powierzchni komórek dawcy narządu.

Po raz pierwszy gen $\alpha(1,3)$ galaktozylotransferazy udało się wyłączyć u myszy. W tym celu do przerwania eksonu 9 kodującego katalityczną domenę enzymu wykorzystano konstrukcję genową zawierającą gen oporności na neomycynę (52). Następnie uzyskano zwierzęta homozygotyczne pod względem inaktywowanego genu. U homozygotycznych osobników nie wykryto mRNA specyficznego dla genu, który był obecny u osobników typu dzikiego i zwierząt heterozygotycznych. Jedyną anomalią jaką zaobserwowano po wyłączeniu genu była zaćma korowa, która rozwijała się u wszystkich homozygotycznych osobników w 4-6 tygodniu życia. Po wyłączeniu genu $\alpha(1,3)$ galaktozylotransferazy u myszy stwierdzono, że nie ma to letalnego skutku. Nie zaobserwowano ekspresji antygeny Gal w żadnych tkankach oraz stwierdzono obecność przeciwciał anty-Gal we krwi myszy (53).

W roku 2002 udało się inaktywować gen $\alpha(1,3)$ galaktozylotransferazy *in vitro* w fibroblastach płodowych świni. Przez zastosowanie transferu jądrowego uzyskano transgeniczne heterozygotyczne zwierzęta charakteryzujące się prawidłowym rozwojem (54). Rok później uzyskano zwierzęta homozygotyczne (55). Na powierzchni fibroblastów płodowych świni z inaktywowanym w układzie homozygotycznym genem $\alpha(1,3)$ galaktozylotransferazy można jednak zaobserwować niewielką ilość antygeny Gal (56).

5.3.2. Regulacja systemu dopełniacza

System układu dopełniacza jest jednym z elementów odporności nieswoistej i może w pewnych warunkach ulegać autoaktywacji i niszczyć komórki własnego organizmu. Istnieją jednak pewne mechanizmy obronne, które umożliwiają jego regulację przez podobne do siebie strukturalnie i funkcjonalnie białka. Białka te blokują aktywację dopełniacza i zapobiegają powstawaniu kompleksu atakującego błonę. Mogą one występować w postaci związanej z błoną komórkową lub wolnej w płynach tkankowych. Do czynników związanych z błonami zalicza się: CR1, DAF, MCP, MIRL i HRF. W płynach tkankowych występują natomiast: inhibitor C1, czynnik I, białko wiążące C4, czynnik H, rekonektyna, inaktywatory anafilatoksyn, witronektyna, klasteryna (57). Zastosowanie w transgenезie zwierząt na potrzeby ksenotransplantacji mają jednak tylko trzy z nich, mianowicie: MCP, DAF i MIRL.

Czynnik CD59 (MIRL, ang. *membrane inhibitor of reactive lysis*), wiąże się ze składnikami C8 i C9 blokując tym samym polimeryzację czynnika C9. Zapobiega przez to wejściu kompleksu do błony komórkowej. Serca transgenicznych świń z genem CD59 przeszczepiono pawianom, a następnie poddano analizie immunohistochemicznej. Stwierdzono znaczne zmniejszenie odkładania się w naczyniach składnika C5b i MAC, jednak ilość składnika C3 była zachowana na poziomie grupy kontrolnej.

Ekspresja czynnika CD59 nie chroni zatem całkowicie przed nadostym odrzuceniem (58). Lepsze wyniki daje jednoczesna ekspresja CD59 i CD55. Kombinacja taka chroni przed nadostym odrzuceniem (59).

Czynnik CD55, czynnik przyspieszający rozkład (DAF, ang. *decay accelerating factor*), występuje powszechnie na większości komórek. Głównym zadaniem CD55 jest przyspieszanie rozpadu uformowanych już kompleksów konwertaz C3 i C5. DAF zapobiega też tworzeniu kompleksu konwertazy C3. Czynnik DAF ulegający konstytutywnej ekspresji we wszystkich tkankach transgenicznych świń chroni serca tych zwierząt po transplantacji pawianom przed wystąpieniem nadostrego odrzucenia. Niestety ostre odrzucenie naczyniowe nadal ma miejsce, co prowadzi do utraty funkcji narządu w różnym czasie od transplantacji. Niewydolność narządowa rozwija się w czasie od kilkunastu godzin do kilkunastu dni (60,61).

Czynnik CD46, błonowy kofaktor białkowy (MCP, ang. *membrane cofactor protein*). Czynnik ten wiąże składniki C4b i C3b, jest kofaktorem dla czynnika I. Głównym efektem działania CD46 jest blokowanie formowania kompleksu konwertazy C3. Ekspresja czynnika CD46 jest tkankowospecyficzna, co utrudniało jego zastosowanie w transgenezie. Problem ten rozwiązano przez zastosowanie dużej konstrukcji z genomowym DNA, zawierającej wszystkie elementy biorące udział w regulacji ekspresji i składania czynnika MCP. W ten sposób uzyskano transgeniczne myszy i świnię, w których specyficzność tkankowa została zachowana. Skuteczność czynnika CD46 w opóźnianiu odrzucenia potwierdził przeszczep świńskiego serca pawianowi. Zostało ono odrzucone dopiero po 23 dniach, natomiast w doświadczeniu kontrolnym (serce nietransgenicznej świni) zjawisko to nastąpiło już po 90 minutach (62).

5.3.3. Modyfikacja antygenów powierzchniowych dawcy

Enzym $\alpha(1,2)$ fukozylotransferaza (transferaza H) wykorzystuje ten sam akceptor N-acetylolaktozaminę, co $\alpha(1,3)$ galaktozylotransferaza (63). Enzym katalizuje reakcję przyłączenia reszty fukozy, co prowadzi do utworzenia tzw. struktury H. Transfekcja komórek COS, wykazujących ekspresję N-acetylolaktozaminę, genami $\alpha(1,3)$ galaktozylotransferazy świni lub $\alpha(1,2)$ fukozylotransferazy człowieka prowadziła do zbliżonej ekspresji odpowiednio epitopu Gal lub epitopu H. Natomiast jednoczesna ekspresja obu enzymów, ze względu na znacznie większą aktywność enzymu $\alpha(1,2)$ fukozylotransferazy prowadziła do niemal całkowitego wyeliminowania obecności antygeny Gal w komórce (64). Wprowadzenie do organizmu dawcy dodatkowych kopii genu kodującego enzym $\alpha(1,2)$ fukozylotransferazę umożliwiłoby modyfikację białek powierzchniowych komórek dawcy, co ograniczyłoby immunogenność (65,66). Możliwe jest również wykorzystanie innych glikozylotransferaz takich jak $\alpha(2,6)$ sjaliltransferaza, czy $\alpha(2,3)$ sjaliltransferaza (67).

Zastosowanie enzymu α -galaktozydazy (izolowanej z ziaren kawy lub komórek bakterii) w stosunku do erytrocytów, limfocytów i komórek śródbłonkowych usu-

wało końcową resztę α -D-galaktozy z epitopu Gal obecnego na powierzchni komórek (68). Ponadto perfuzje tkanki przeznaczonej do transplantacji bakteryjną α -galaktozydazą opóźniało nadostrą reakcję immunologiczną. Ekspresja cDNA genu α -galaktozydazy w komórkach śródbłonkowych świni prowadziła do 10-krotnego obniżenia zdolności wiązania przez ksenoreaktywne przeciwciała skierowane przeciwko antygenowi Gal świni w porównaniu z komórkami kontrolnymi.

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 $\alpha(1,2)$ fukozylotransferazy. Addytywny efekt zastosowania obu enzymów zaobserwowano w przypadku kotrasfekcji komórek COS α -galaktozydazą i $\alpha(1,2)$ fukozylotransferazą oraz $\alpha(1,3)$ galaktozylotransferazą. W tym przypadku nie zaobserwowano ekspresji epitopu Gal na powierzchni komórek (69).

5.4. Hamowanie procesu krzepnięcia

Po opanowaniu mechanizmów odrzucenia związanych z aktywacją dopełniacza główną przyczyną wystąpienia dysfunkcji narządowych i odrzucenia przeszczepu staje się wykrzepianie krwi w naczyniach organu. Za taki stan odpowiedzialne są najprawdopodobniej różnice genetyczne pomiędzy dawcą a biorcą, które prowadzą do zachwiania równowagi układu krzepnięcia. Takie różnice obserwuje się np. w budowie i funkcji świńskiej trombomoduliny (70) czy czynnika von Willebrandta (71). W przyszłości planuje się wprowadzenie do genomu świni genów ludzkich odpowiedzialnych za regulację systemu krzepnięcia. Alternatywą jest też zastosowanie środków farmakologicznych takich jak: leki heparynopodobne, leki przeciwplytkowe, leki przeciwtrombinowe czy trombomodulina (29).

5.5. Hamowanie aktywacji komórek śródbłonka

Aktywowane komórki śródbłonka naczyniowego charakteryzują się wzmożoną ekspresją molekuł adhezyjnych, co w konsekwencji prowadzi do przylegania, a następnie infiltracji do miększu narządu komórek układu odpornościowego. Zablockowanie cząsteczek adhezyjnych takich jak: E-selektyna, A-selektyna czy β 2-integryna przez specyficzne przeciwciała monoklonalne prowadzi do skutecznego ograniczenia adhezji neutrofilii i limfocytów. Konsekwencją tego jest ograniczenie mechanizmów związanych z wystąpieniem odrzucenia naczyniowego (72).

5.6. Hamowanie aktywacji limfocytów T

Aby nastąpiła pełna aktywacja limfocyta T niezbędne są dwa sygnały. Receptor TCR, rozpoznający antygen na powierzchni komórki APC (ang. *antigen presenting cells*) przekazuje dzięki kompleksowi CD3 pierwszy sygnał do wnętrza limfocyta. Drugi sygnał pochodzi z cząsteczek kostymulujących. Do najważniejszych receptorów drugiego sygnału należą CD28, które łączą się z cząsteczkami CD80/CD86 (B7.1/B7.2) komórek APC oraz CD40L, który łączy się z cząsteczką CD40 komórki APC. Zablockowanie drugiego sygnału w ksenogenicznym przeszczepie szczurzych wysp trzustkowych myszom nie powoduje aktywacji limfocytów T. Blokadę taką można uzyskać przez zastosowanie rozpuszczalnego fuzyjnego białka CTLA-4Fc dla drogi CD28-B7 oraz monoklonalnego przeciwciała anti-CD40L dla drogi CD40/CD40L (73).

5.7. Tolerancja immunologiczna

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 narządowej tolerancja jest stanem braku odpowiedzi na antygeny przeszczepu bez konieczności stosowania przewlekłego leczenia immunosupresyjnego. Możliwość wywołania takiego stanu rozwiązałaby szereg problemów związanych z odrzuceniem przeszczepu. Indukcja tolerancji immunologicznej może nastąpić poprzez wywołanie anergii specyficznych limfocytów T, indukcję regulatorowych komórek T, przesunięcie odpowiedzi komórek Th1 w kierunku Th2 lub usunięcie specyficznych limfocytów T (73).

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 dla galaktozylotransferazy. Produkcja antygeny Gal przez zmienione genetycznie komórki wywołuje tolerancję na ten antygen. Drugim podejściem jest uzyskanie chimeryzmu komórek hematopoetycznych. W tym celu proponuje się transplantację ksenogenicznych komórek progenitorowych szpiku z jednoczesną tymektomią (27).

6. Próby kliniczne

Do tej pory dokonano niewielu prób klinicznych z zastosowaniem komórek, tkanek i narządów pochodzących od zwierząt. Przeszczepy narządowe dotyczyły nerek szympansov (24), serc pawianów (25), wątroby pawianów (26) oraz serca świni (74).

Nie można jednak mówić o skuteczności terapeutycznej tych zabiegów. Zawsze kończyły się one niepowodzeniami ze względu na rozwinięcie się nadostrej reakcji immunologicznej.

Z dużo wyższą skutecznością odbywają się natomiast przeszczepy ksenogenicznych wysp trzustkowych u ludzi. Świńskie płodowe wyspy trzustkowe przeszczepione do żyły wrotnej chorych z cukrzycą w wielu przypadkach podjęły czynność. U chorych z nefropatią cukrzycową przeszczepiano wyspy wraz z nerką, wszczepiając je pod torebkę nerki. Ich obecność potwierdzono biopsyjnie po okresie 3 tygodni (29). Wszczepienie świńskich wysp trzustkowych powoduje wytworzenie przeciwciał IgG1 skierowanych przeciw antygenom wysp oraz IgG2 przeciwko antygenom komórek niepełniących funkcji endokrynych. Powoduje to niszczenie ksenogenicznych komórek w mechanizmie zależnym od przeciwciał – ADCC (75).

7. Zagrożenia ksenotransplantacji

Wykorzystanie praktyczne narządów odzwierzęcych, najprawdopodobniej świńskich, 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 świńskich w stosunku do organów ludzkich oraz 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, erytopoetyna w 18%, natomiast dopełniacz w 30% (29). 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. 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 nie znane do tej pory zespoły kliniczne (76).

Kontrolowana hodowla umożliwiła uzyskanie zwierząt wolnych od wielu mikroorganizmów. Wykorzystanie środków farmakologicznych może zahamować ich rozwój zarówno u dawcy jak i biorcy, jeśli ulegnie zakażeniu. Także wykorzystanie testów przesiewowych ograniczyłoby do minimum ryzyko przeniesienia infekcji. Jednak minimum trzy rodzaje wirusów świni stanowią zagrożenie dla ludzi: PERV (ang. *porcine*

endogenous retroviruses), PCMV (ang. *porcine cytomegaloviruses*) i PLHV (ang. *porcine lymphotropic herpesviruses*) (77). Także świński wirus EMCV (ang. *porcine encephalomyocarditis virus*) jest zdolny do zakażenia komórek miokardium człowieka (78). W doświadczalnym przeszczepie w układzie świnia-naczelne stwierdzono aktywację, szczególnie przy zastosowaniu immunosupresji, świńskich cytomegalowirusów (PCMV), co sugeruje, że patogen ten mógłby powodować zakażenia u ludzi (79). Ryzyko związane z wirusem PLHV pozostaje nie zdefiniowane (77).

Największą uwagę przyciągają endogenne retrowirusy świni. Ich specyfika związana z trwałą integracją w genom gospodarza budzi wiele obaw transplantologów. W układach *in vitro* wykazano możliwość transmisji wirusa PERV z komórek świni do komórek ludzkich (80). Zidentyfikowano receptory wirusów PERV, od których zależy możliwość wnikania wirusów do komórek ludzkich (HuPAR-1 i HuPAR-2) (81) oraz stwierdzono możliwość alternatywnej, niezależnej od receptorów drogi wnikania wirusów (82). Nie stwierdzono transmisji wirusa do komórek ludzkich *in vivo* podczas 25-tygodniowej hodowli limfopoetycznych komórek świńskich zakażonych wirusem PERV oraz limfopoetycznych komórek ludzkich u immunoniekompetentnych myszy (83). Pełne wykluczenie możliwości infekowania komórek ludzkich mogą jednak przynieść tylko badania kliniczne. Aby zmniejszyć potencjalne ryzyko zakażenia postuluje się zastosowanie krótkich interferujących RNA (siRNA) w transgenezie świń przeznaczonych do ksenotransplantacji (84).

Praca finansowana z grantów PBZ-KBN-048/P05/2001/03 i PBZ-KBN-048/P05/2002/04.

Literatura

1. Monaco A. P., (2001), *N. Engl. J. Med.*, 344, 1712-1714.
2. Lanzetta M., Petruzzo P., Vitale G., Lucchina S., Owen E. R., Dubernard J. M., Hakim N., Kapila H., (2004), *Transplant Proc.*, 36, 664-668.
3. Schaubel D. E., Jeffery J. R., Mao Y., Semenciw R., Yeates K., Fenton S. S., (2002), *CMAJ*, 167, 137-142.
4. Atkison P. R., Ross B. C., Williams S., Howard J., Sommerauer J., Quan D., Wall W., (2002), *CMAJ*, 166, 1663-1671.
5. Wałaszewski J., Stryjecka-Rowińska D., (2004), *Transplantologia kliniczna*, red. Rowiński W., Wałaszewski J., Pączek L., 35-49, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
6. Cooper D. K. C., (1993), *Xeno*, 1, 25-26.
7. Parenteau N., (1999), *Sci. Am.*, 280, 83-84.
8. Temenoff J. S., Mikos A. G., (2000), *Biomaterials*, 21, 431-440.
9. Ishaug S. L., Crane G. M., Miller M. J., Yasko A. W., Yaszemski M. J., Mikos A. G., (1997), *J. Biomed. Mater. Res.*, 36, 17-28.
10. Kulig K. M., Vacanti J. P., (2004), *Transpl. Immunol.*, 12, 303-310.
11. Lindvall O., Kokaia Z., Martinez-Serrano A., (2004), *Nat. Med.*, 10, S42-50.
12. Drucker-Colin R., Verdugo-Diaz L., (2004), *Cell. Mol. Neurobiol.*, 24, 301-316.
13. Kim D. W., (2004), *Yonsei Med. J.*, 45, 1203.
14. Wang J. S., Shum-Tim D., Chedrawy E., Chiu R. C., (2001), *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 122, 699-705.

15. Kocher A. A., Schuster M. D., Szabolcs M. J., Takuma S., Burkhoﬀ D., Wang J., Homma S., Edwards N. M., Itescu S., (2001), *Nat. Med.*, 7, 430-436.
16. Chick W. L., Like A. A., Lauris V., Galletti P. M., Richardson P. D., Panol G., Mix T. W., Colton C. K., (1975), *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs.*, 21, 8-15.
17. Buchser E., Goddard M., Heyd B., Joseph J. M., Favre J., de Tribolet N., Lysaght M., Aebischer P., (1996), *Anesthesiology*, 85, 1005-1012.
18. Winn S. R., Tresco P. A., Zielinski B., Greene L. A., Jaeger C. B., Aebischer P., (1991), *Exp. Neurol.*, 113, 322-329.
19. Tresco P. A., Winn S. R., Tan S., Jaeger C. B., Greene L. A., Aebischer P., (1992), *Cell Transplant.*, 1, 255-264.
20. Chen S. C., Mullon C., Kahaku E., Watanabe F., Hewitt W., Eguchi S., Middleton Y., Arkadopoulos N., Rozga J., Solomon B., Demetriou A. A., (1997), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 831, 350-360.
21. Humes H. D., Weitzel W. F., Bartlett R. H., Swaniker F. C., Paganini E. P., Luderer J. R., Sobota J., (2004), *Kidney Int.*, 66, 1578-1588.
22. Frazier O. H., Myers T. J., Radovancevic B., (1998), *Tex. Heart Inst. J.*, 25, 265-271.
23. Copeland J. G., Smith R. G., Arabia F. A., Nolan P. E., Sethi G. K., Tsau P. H., McClellan D., Slepian M. J., (2004), *N. Engl. J. Med.*, 351, 859-867.
24. Reemtsma K., (1966), *Adv. Surg.*, 2, 285-293.
25. Bailey L. L., Nehlsen-Cannarella S. L., Concepcion W., Jolley W. B., (1985), *JAMA*, 254, 3321-3329.
26. Starzl T. E., Fung J., Tzakis A., Todo S., Demetris A. J., Marino I. R., Doyle H., Zeevi A., Warty V., Michaels M., (1993), *Lancet*, 341, 65-71.
27. Buhler L., Friedman T., Iacomini J., Cooper D. K., (1999), *Front. Biosci.*, 4, 416-432.
28. Boneva R. S., Folks T. M., Chapman L. E., (2001), *Clin. Microbiol. Rev.*, 14, 1-14.
29. Olszewski W. L., (2004), *Transplantologia kliniczna*, red. Rowiński W., Wałaszewski J., Pączek L., 276-291, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
30. Rose A. G., Cooper D. K., Human P. A., Reichenspurner H., Reichart B., (1991), *J. Heart Lung. Transplant.*, 10, 223-234.
31. Kerr S. R., Dalmaso A. P., Apasova E. V., Chen S. S., Kirschfink M., Matas A. J., (1999), *Transplantation*, 67, 360-365.
32. Schaapherder A. F., Gooszen H. G., te Bulte M. T., Daha M. R., (1995), *Transplantation*, 60, 287-291.
33. Galili U., Rachmilewitz E. A., Peleg A., Flechner I., (1984), *J. Exp. Med.*, 160, 1519-1531.
34. Galili U., Mandrell R. E., Hamadeh R. M., Shohet S. B., Griffiss J. M., (1988), *Infect. Immun.*, 56, 1730-1737.
35. McMorro I. M., Comrack C. A., Sachs D. H., DerSimonian H., (1997), *Transplantation*, 64, 501-510.
36. Sandrin M. S., McKenzie I. F., (1994), *Immunol. Rev.*, 141, 169-190.
37. Galili U., Swanson K., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 7401-7404.
38. Gacjong Z., Korczak-Kowalska G., (2002), *Immunologia*, red. Gołąb J., Jakóbiśiak M., Lasek W., 493-521, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
39. Sato K., Takigami K., Miyatake T., Czismadia E., Latinne D., Bazin H., Bach F. H., Soares M. P., (1999), *Transplantation*, 68, 844-854.
40. Wang H., Rollins S. A., Gao Z., Garcia B., Zhang Z., Xing J., Li L., Kellersmann R., Matis L. A., Zhong R., (1999), *Transplantation*, 68, 1643-1651.
41. Pearse M. J., Witort E., Mottram P., Han W., Murray-Segal L., Romanella M., Salvaris E., Shinkel T. A., Goodman D. J., d'Apice A. J., (1998), *Transplantation*, 66, 748-754.
42. Friedman T., Smith R. N., Colvin R. B., Iacomini J., (1999), *Diabetes*, 48, 2340-2348.
43. Suga H., Ishida H., Kimikawa M., Hayasaka Y., Teraoka S., Agishi T., Ota K., (1991), *ASAIO Trans*, 37, 433-434.
44. Taniguchi S., Kitamura S., Kawachi K., Fukutomi M., Yoshida Y., Kondo Y. J., (1992), *Heart Lung. Transplant.*, 11, 1200-1208.
45. Kroshus T. J., Dalmaso A. P., Leventhal J. R., John J., Matas A. J., Bolman M. M., (1995), *J. Surg. Res.*, 59, 43-50.
46. Azimzadeh A., Meyer C., Watier H., Beller B. P., Chenard-Neu M. P., Kiény R., Boudjema K., Jaeck D., Cinqualbre J., Wolf P., (1998), *Transpl. Immunol.*, 6, 13-22.

47. Asano M., Gundry S. R., Izutani H., Cannarella S. N., Fagoaga O., Bailey L. L., (2003), *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 125, 60-69.
48. Tanemura M., Ogawa H., Yin D. P., Chen Z. C., DiSesa V. J., Galili U., (2002), *Transplantation*, 73, 1859-1868.
49. Katopodis A. G., Warner R. G., Duthaler R. O., Streiff M. B., Bruelisauer A., Kretz O., Dorobek B., Persohn E., Andres H., Schweitzer A., Thoma G., Kinzy W., Quesniaux V. F., Cozzi E., Davies H. F., Manez R., White D., (2002), *J. Clin. Invest.*, 110, 1869-1877.
50. Koren E., Milotic F., Neethling F. A., Koscec M., Fei D., Kobayashi T., Taniguchi S., Cooper D. K., (1996), *Transplantation*, 62, 837-843.
51. Makrides S. C., (1998), *Pharmacol. Rev.*, 50, 59-87.
52. 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., (1996), *Transplantation*, 61, 13-19.
53. Sandrin M. S., Osman N., McKenzie I. F., (1997), *Front. Biosci.*, 2, 1-11.
54. 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., (2002), *Nat. Biotechnol.*, 20, 251-255.
55. 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., (2003), *Science*, 299, 411-414.
56. 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., (2003), *Transplantation*, 75, 430-436.
57. Jakóbsiak M., (2002), *Immunologia*, red. Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek W., 118-130, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
58. Diamond L. E., McCurry K. R., Martin M. J., McClellan S. B., Oldham E. R., Platt J. L., Logan J. S., (1996), *Transplantation*, 61, 1241-1249.
59. Chen R. H., Naficy S., Logan J. S., Diamond L. E., Adams D. H., (1999), *Xenotransplantation*, 6, 194-200.
60. Schmoeckel M., Bhatti F. N., Zaidi A., Cozzi E., Waterworth P. D., Tolan M. J., Pino-Chavez G., Goddard M., Warner R. G., Langford G. A., Dunning J. J., Wallwork J., White D. J., (1998), *Transplantation*, 65, 1570-1577.
61. Waterworth P. D., Dunning J., Tolan M., Cozzi E., Langford G., Chavez G., White D., Wallwork J., (1998), *J. Heart. Lung Transplant.*, 17, 1201-1207.
62. Diamond L. E., Quinn C. M., Martin M. J., Lawson J., Platt J. L., Logan J. S., (2001), *Transplantation*, 71, 132-142.
63. Larsen R. D., Ernst L. K., Nair R. P., Lowe J. B., (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 6674-6678.
64. Sandrin M. S., Fodor W. L., Mouhtouris E., Osman N., Cohney S., Rollins S. A., Guilmette E. R., Setter E., Squinto S. P., McKenzie I. F., (1995), *Nat. Med.*, 1, 1261-1267.
65. Sharma A., Okabe J., Birch P., McClellan S. B., Martin M. J., Platt J. L., Logan J. S., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 7190-7195.
66. 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., (1999), *FASEB J.*, 13, 1762-1773.
67. Tanemura M., Miyagawa S., Koyota S., Koma M., Matsuda H., Tsuji S., Shirakura R., Taniguchi N., (1998), *J. Biol. Chem.*, 273, 16421-16425.
68. LaVecchio J. A., Dunne A. D., Edge A. S., (1995), *Transplantation*, 60, 841-847.
69. Osman N., McKenzie I. F., Ostenried K., Ioannou Y. A., Desnick R. J., Sandrin M. S., (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 14677-14682.
70. Siegel J. B., Grey S. T., Lesnikoski B. A., Kopp C. W., Soares M., Schulte am Esch J., Bach F. H., Robson S. C., (1997), *Transplantation*, 64, 888-896.
71. Schulte am Esch J., Cruz M. A., Siegel J. B., Anrather J., Robson S. C., (1997), *Blood*, 90, 4425-4437.

72. Robinson L. A., Tu L., Steeber D. A., Preis O., Platt J. L., Tedder T. F., (1998), *J. Immunol.*, 161, 6931-6938.
73. Pączek A., Foroniewicz B., (2003), *Postępy Nauk Medycznych*, t. XVI, 1-2.
74. Czaplicki J., Blonska B., Religa Z., (1992), *J. Heart. Lung Transplant.*, 11, 393-397.
75. Lindeborg E., Kumagai-Braesch M., Tibell A., Christensson B., Moller E., (2004), *Xenotransplantation*, 11, 457-470.
76. Fishman J. A., (1998), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 862, 52-66.
77. Fishman J. A., Patience C., (2004), *Am. J. Transplant.*, 4, 1383-1390.
78. Brewer L. A., Lwamba H. C., Murtaugh M. P., Palmenberg A. C., Brown C., Njenga M. K., (2001), *J. Virol.*, 75, 11621-11629.
79. Mueller N. J., Barth R. N., Yamamoto S., Kitamura H., Patience C., Yamada K., Cooper D. K., Sachs D. H., Kaur A., Fishman J. A., (2002), *J. Virol.*, 76, 4734-4740.
80. Wilson C. A., Wong S., Muller J., Davidson C. E., Rose T. M., Burd P., (1998), *J. Virol.*, 72, 3082-3087.
81. Ericsson T. A., Takeuchi Y., Templin C., Quinn G., Farhadian S. F., Wood J. C., Oldmixon B. A., Suling K. M., Ishii J. K., Kitagawa Y., Miyazawa T., Salomon D. R., Weiss R. A., Patience C., (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 6759-6764.
82. Lavillette D., Kabat D., (2004), *J. Virol.*, 78, 8868-8877.
83. Yang Y. G., Wood J. C., Lan P., Wilkinson R. A., Sykes M., Fishman J. A., Patience C., (2004), *J. Clin. Invest.*, 114, 695-700.
84. Karlas A., Kurth R., Denner J., (2004), *Virology*, 325, 18-23.