

Serce transgenicznych świń jako substytut serca ludzkiego — oczekiwania i realia

Grzegorz Grzybowski¹

Joanna Lubieniecka¹

Michał J. Kańtoch²

¹Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt

Polska Akademia Nauk

Jastrzębiec

²University of Alberta Hospitals

Heritage Pediatric Cardiology Program

Edmonton

Kanada

1. Wprowadzenie

Ksenotransplantacje są obiektem rosnącego zainteresowania. O rozwoju badań z tego zakresu świadczyć może zasobność naukowych baz danych (np. w bazie MEDLINE znajdują się już 1453 artykuły na temat ksenotransplantacji serca, maj 1998 r.). Natomiast o aktualności zagadnienia świadczą ukazujące się opracowania ekspertów (1-3), a także opinie zamieszczone w światowych czasopismach i w publikacjach prasowych (4-8).

Ksenotransplantacje uważane są jako jedno z najbardziej interesujących i zarazem kontrowersyjnych zagadnień cywilizacyjnych. Przewodnim motywem jednego z numerów „Nature” (391, 6665, 22 styczeń 1998) jest bieżąca w uprzęży świnia (zapewne z genetycznie zmodyfikowanymi narządami wewnętrznymi), kierowana przez człowieka (zapewne biotechnologa) i przesłanie: *Xenotransplant hopes and fears* („Ksenoprzeszczep nadzieje i obawy”).

Współczesne badania genetyczne coraz bardziej absorbują uwagę ośrodków zainteresowanych wprowadzaniem na rynek wytworów inżynierii genetycznej i biotechnologii. Serce genetycznie zmienionych świń jako substytut serca ludzkiego jest szczególnym polem, gdzie z informacjami o najnowszych zdobyczach naukowych splatają się elementy rozważań i spekulacji nad przyszłością ksenoprzeszczepów w medycynie klinicznej. Wielu naukowców-eksperymentatorów pracuje dla firm biotechnologicznych, dlatego w publikacjach dotyczących praktycznych zastosowań ich wytworów rynkowych występować mogą tendencje do promocji własnych osiągnięć i zamierzeń.

Celem artykułu jest przedstawienie skali zapotrzebowania na ksenogeniczne przeszczepy serca u ludzi, omówienie głównych kierunków badań mogących doprowadzić do skutecznego zastosowania serca transgenicznych świń w klinicznej transplantologii człowieka, zaprezentowanie dotychczasowych dokonań w tej dziedzinie, oraz przedstawienie zagadnienia tzw. poziomego transferu genów między genomem ludzi i genomem świni domowej.

2. Serce jako przeszczep

Serce od stuleci traktowano jako narząd szczególny i niezastąpiony. O ile nie kwestionuje się poglądu, że serce jest szczególne (jest tylko jedno), to teza o jego niezastępowalności już dawno została praktycznie podważona. Z punktu widzenia kryteriów kardiochirurgicznych oraz aktualnego stanu zaawansowania techniki medycznej, przeszczepianie serca można uznać za zabieg rutynowy. Serce i płuca spełniają w organizmie głównie mechaniczne zadania, nie pełniąc poważniejszych funkcji metabolicznych. Z tego punktu widzenia są dogodnymi narządami jako ksenoprzeszczepy (nie trzeba przebudowywać ich metabolizmu, a tylko uchronić je przed odrzuceniem).

Za najpoważniejsze problemy ograniczające rozwinięcie na szeroką skalę programów allogenicznych przeszczepów serca ludzkiego uznaje się:

- pozyskanie odpowiednio dużej liczby narządów do transplantacji,
- optymalne dobranie dawcy i biorcy pod względem cech zgodności tkankowej, oraz
- opracowanie skutecznych metod zabezpieczenia serca przed odrzuceniem (przy jednoczesnym zachowaniu w miarę normalnych mechanizmów immunologicznych u biorcy).

„Popyt” i „podaż” w zakresie przeszczepiania serca ludzkiego są w wysokim stopniu niezrównoważone. W USA, gdzie programy allogenicznych przeszczepów serca realizuje się już od szeregu lat i gdzie od dawna wprowadzono w tym zakresie szczegółowe procedury legislacyjne, zbilansowanie potrzeb i możliwości kształtuje się następująco (9). Rocznie około 40 000 – 60 000 pacjentów mogłoby skorzystać z przeszczepu serca. Biorąc pod uwagę tzw. kryteria śmierci mózgowej potencjalnych dawców (co jest nieodzownym warunkiem pozyskania narządu do przeszczepienia), do dyspozycji transplantologów może być najwyżej 10 000 serc rocznie. Deficyt narządów allogenicznych jest zatem ogromny.

Tendencje w zakresie dużego zapotrzebowania na przeszczepy i małych możliwości ich zaspokojenia są regułą na całym świecie. Poszukuje się zatem rozwiązań problemu dużego deficytu narządów m.in. poprzez wprowadzenie „części zamiennych”, pozyskiwanych od zwierząt (10).

3. Tkanki zwierzęce w medycynie ludzkiej

Tkanki zwierzęce od szeregu lat wykorzystywano do potrzeb medycznych. Powięzcie, rozciągna i kości bydlęce stosuje się w ortopedii jako przeszczepy

biostatyczne, zastawki świńskie znalazły zastosowanie w kardiochirurgii, katgut (produkowany z podśluzówki jelit baranich) od lat stosuje się do szycia ran itd. Również preparaty lecznicze dla ludzi takie jak insulina czy czynnik VIII krzepnięcia krwi pozyskiwano kiedyś z trzustek i krwi świń.

Pierwszą próbę ksenotransplantacji serca podjęto w USA w 1964 r. (cyt. za 2). Serce małego szympansa przeszczepione człowiekowi przestało funkcjonować po dwóch godzinach. Natomiast pierwszą próbę przeszczepienia człowiekowi serca świńskiego podjęto w Zjednoczonym Królestwie w 1968 r. Zaimplantowano pacjentowi serce świńskie nie usuwając serca chorego (taki sposób postępowania z narządem, tzn. wszczepienie go w miejsce, gdzie normalnie nie rozwija się, określa się mianem przeszczepu heterotopowego). Serce świńskie zostało natychmiast odrzucone w wyniku nadostrej reakcji immunologicznej (ang. *hyperacute rejection*) — (cyt. za 2).

3.1. „Polski ślad” w problematyce przeszczepów ksenogenicznych świnia → człowiek

W 1991 r. prof. Religa ze swym zespołem dokonał w Polsce drugiej na świecie próby przeszczepienia człowiekowi serca świńskiego (11). Przypadek ten odnotowywany jest jako przykład niekonwencjonalnego podejścia immunologicznego i kardiochirurgicznego (12). W miejsce usuniętego serca chorego cierpiącego na zespół Marfana, wszczepiono serce świńskie (był to zatem przeszczep ortotopowy). Przed wykonaniem właściwego przeszczepienia, do krwiobiegu pacjenta podłączono dwa inne serca świńskie dla wychwycenia z krążenia naturalnych przeciwciał ukierunkowanych na antygen (epitop tkankowy) Gal obecny na świńskich glikoproteinach i glikolipidach. Serce świńskie okazało się niedostatecznie wydolne aby sprostać wymogom krążenia, pacjent przeżył 24 godziny. Mimo klinicznego niepowodzenia, pozytywnym faktem eksperymentu był brak oznak immunologicznego procesu nadostrego odrzucania narządu. Uzyskano w ten sposób bezpośredni dowód na znaczenie przeciwciał anti-Gal dla losów ksenogenicznego serca świńskiego w organizmie człowieka. Stało się to inspiracją do dalszych poszukiwań metod wyeliminowania wpływu na przeszczep naturalnych przeciwciał anti-Gal odpowiedzialnych za uruchamianie nadostrego procesu immunologicznego odrzucania narządu.

Dotychczasowe próby w zakresie ksenoprzeszczepów świnia → człowiek były przedsięwzięciami realizowanymi w szczególnych okolicznościach tzn. po wyczerpaniu wszystkich dostępnych możliwości ratowania życia chorych. W kazuistyce medycznej skumulowano już dużą liczbę podobnych przykładów. Z tego punktu widzenia, dotychczasowe próby ksenoprzeszczepu serca świnia → człowiek nie były szczególnym ewenementem.

Istotną kontrowersją dzielącą środowiska naukowców-eksperymentatorów, klinicystów, biologów, genetyków itd. jest odpowiedź na pytanie, czy aktualny stan wiedzy nad przełamywaniem przeszkód występujących przy ksenotransplantacjach świnia → człowiek jest wystarczający do przeniesienia badań na poziom prób klinicznych.

4. Gatunki zwierząt „perspektywiczne” w ksenotransplantacjach

Z punktu widzenia podobieństw anatomicznych z człowiekiem, najbardziej odpowiednim do przeszczepienia człowiekowi jest serce świń, kangurów i naczelnych (szympansy, pawiany, gibony i orangutany). W zakresie układu sercowo-naczyniowego szczególnie wiele podobieństw z człowiekiem wykazuje świnia domowa.

Narządy ksenogeniczne dzieli się na przeszczepy *concordant* i przeszczepy *discordant*. Kryterium tego podziału jest obecność w krążeniu człowieka naturalnych przeciwciał przeciw obcogatunkowym tkankom (zagadnienie naturalnych przeciwciał omówiono już w „Biotechnologii” 1/98). Na przykład przeszczepami *concordant* są dla człowieka narządy pawianów i szympansov ponieważ u *Homo sapiens* nie występują naturalne ksenoreaktywne przeciwciała przeciw antygenom tych gatunków. W obrębie przeszczepów *concordant* występuje duża zmienność w zakresie ich tolerowania przez człowieka. Na przykład szympansy są bardziej „podobne” z tkankami ludzkimi niż pawiany. W zakresie przeszczepów *concordant* najdłuższy czas przeżycia odnotowano po przeszczepieniu dwutygodniowemu ludzkiemu noworodkowi (znanemu w piśmiennictwie naukowym jako *Baby Fae*) serca pawiana, które po trzech tygodniach zostało zniszczone w wyniku reakcji immunologicznej (cyt za 13).

Po podłączeniu narządu do krwioobiegu biorcy, proces odrzucania przeszczepów *discordant* rozpoczyna się już po kilku sekundach (lub minutach). Głównym elementem tego procesu jest uruchomienie kaskady enzymatycznej dopełniacza, a bezpośrednim impulsem jest powstawanie kompleksów immunologicznych antygen-przeciwciało (naturalne przeciwciała anty-Gal obecne w krążeniu człowieka wiążą się z epitopami antygenowymi obecnymi w tkankach przeszczepionego narządu). Skumulowano już bogatą wiedzę na temat przebiegu tych procesów, pochodzącą z obserwacji izolowanych narządów świńskich poddawanych perfuzji krwią ludzką. Tak na przykład już po 30 minutach perfuzji płuc świńskich krwią ludzką dochodzi do silnego wzrostu ciśnienia wewnątrzplucnego, rozedmy, zakrzepów i krwotoków, a po około 115 minutach następuje niemal całkowite zniszczenie narządu (14). Jednocześnie w okresie tym następuje silne obniżanie poziomu krążących we krwi przeciwciał anty-Gal (co świadczy, że wiążą się one ze świńskim antygenem Gal w tkance płuc), obniża się aktywność dopełniacza (co oznacza, iż zużywane są jego składniki na skutek uruchomienia kaskady enzymatycznej) oraz następuje szybkie zużywanie czynników krzepnięcia krwi. Stan ten jest typowym obrazem nadostrego odrzucania przeszczepu, który już po około 150 minutach perfuzji wykazuje całkowitą i nieodwracalną utratę swych funkcji. W podobnych doświadczeniach Piersona i wsp. (15) zniszczenie płuc świńskich następowało po 45 minutach (średnio po 20 min).

5. Przeciwdziałanie odrzucaniu przeszczepów

Proces immunologicznego odrzucania przeszczepu ma swą gradację, co uzależnione jest od różnorodnych czynników, m.in. od rodzaju przeszczepu (allogeniczny czy ksenogeniczny), stopnia antygenowego podobieństwa biorcy i dawcy, rodzaju prewencji immunosupresorowej, itd. Najgwałtowniejszą z form jest wspomniane nadostre odrzucenie (*hyperacute rejection*). Jeśli ominie się ten próg, przeszczep jest narażony na szybkie odrzucenie w formie określanej jako ostry odrzut naczyńniowy (*acute vascular rejection*). Mechanizm ten wiąże się z dezintegracją krążenia w przeszczepie. Dochodzi tu do aktywacji śródbłonna naczyńniowego w przeszczepie, a następnie do tzw. prokoagulacji przedradzającej się w skrzep.

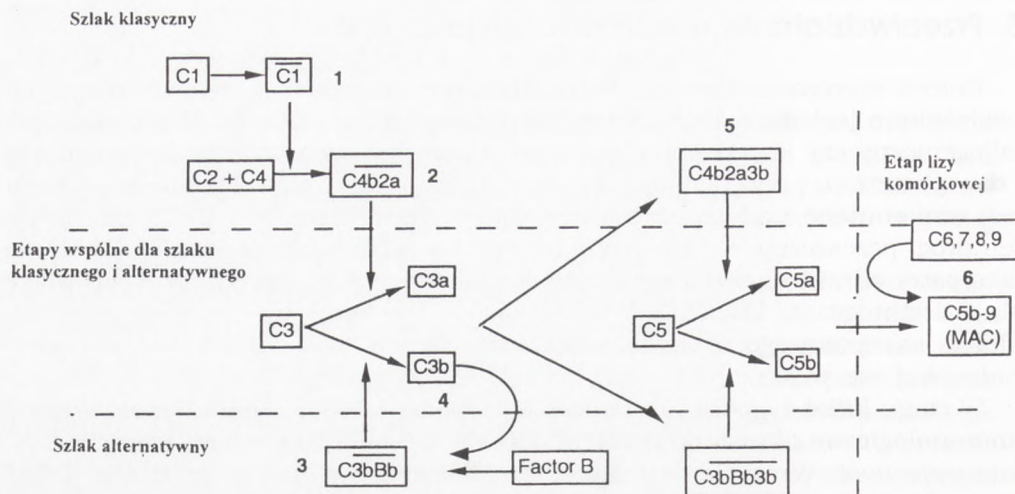
W ciągu kilku tygodni lub miesięcy problemem stają się inne mechanizmy immunologiczne określane mianem ostrego odrzutu komórkowego (*acute cellular rejection*). Wreszcie, w ciągu wielu miesięcy, (a nawet wielu lat) nawet stosunkowo dobrze dopasowany przeszczep allogeniczny chroniony immunosupresorami podlega chronicznej fazie odrzutu (*chronic rejection*). „Walka” układu immunologicznego z obcą tkanką praktycznie nie kończy się. Czas przeżycia narządu oraz szybkość narastania zmian miażdżycowych będących klinicznym rezultatem procesu chronicznego odrzutu jest kwestią czasu.

W informacjach tych odzwierciedlona jest skala problemów występujących nawet przy przeszczepach wymienianych między osobnikami tego samego gatunku. Natomiast w zakresie przeszczepów ksenogenicznych świnia → człowiek prowadzone są badania mające na celu pokonanie progu nadostrego odrzutu. Liczba problemów pozostających do rozwiązania jest zatem olbrzymia.

Główną przeszkodą genetyczną uniemożliwiającą skuteczne przeszczepianie tkanek jest główny kompleks zgodności tkankowej (MHC) kontrolujący m.in. osobnicze cechy somatyczne określane jako antygeny transplantacyjne. Mechanizmy funkcjonowania nadzoru immunologicznego i podstawowe znaczenie w tych procesach produktów głównego kompleksu zgodności tkankowej dyskutowane jest w wielu artykułach, m.in. w najnowszych opracowaniach Zinkernagela oraz Doherty (16,17) — laureatów Nagrody Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny.

Zmienność ludzi i innych ssaków w zakresie cech MHC jest olbrzymia. Poza przypadkami bliźniąt jednojajowych i sporadycznymi przypadkami wystąpienia trwałej tolerancji immunologicznej (przypadki takie występują u bydła u większości bliźniąt dwujajowych), nie jest możliwe znalezienie dawcy i biorcy o identycznej formule antygenowej (zagadnienia te omówiono w „Biotechnologii” 1/98). Natomiast zbieżności między człowiekiem i zwierzętami w formule antygenów transplantacyjnych nie istnieją i jakiegokolwiek próby badawczych poszukiwań w tym zakresie byłyby bezcelowe. Powodzenie ksenotransplantacji należy wiązać wyłącznie z „niegenetycznymi” możliwościami przeciwdziałania odrzucaniu przeszczepu lub z przebudowaniem genomu zwierząt w zakresie elementów decydujących o nadostrym odrzucaniu tkanki.

„Niegenetyczne” sposoby przeciwdziałania odrzucaniu przeszczepów prezentowane są w wielu artykułach. Wymienia się tu: stosowanie immunosupreso-



Rys. 1. Szlaki aktywacji kaskady enzymatycznej dopełniacza oraz miejsca oddziaływania regulatorów (wg Dorling (21)).

rów (18) unieczynnianie kaskady enzymatycznej dopełniacza przez jad węży (*cobra venom factor*) — (19), usuwanie z organizmu biorcy ksenoreaktywnych przeciwciał przez immunoabsorpcję lub antyidiotypowe przeciwciała monoklonalne (20,21), indukowanie u biorcy tolerancji immunologicznej na przeszczep (22,23) itd. We wszystkich wymienionych dziedzinach dokonano ogromnego postępu. Jednak w praktyce klinicznej związanej z przeszczepami serca stosowana jest głównie terapia/prewencja immunosupresorowa (12).

6. Inżynieria genetyczna nadzieją na dokonywanie skutecznych ksenotransplantacji

6.1. Unieczynnienie (nokaut) genu $\alpha 1,3GT$

W krążeniu każdego człowieka występują naturalne antyświńskie przeciwciała (głównie klasy IgM) rozpoznające i wiążące się do świńskiego antygeny tkankowe Gal. Mechanizm, a zwłaszcza symptomy nadostrego odrzucania przeszczepu są dobrze rozpoznane. Aktywowanie kaskady enzymatycznej dopełniacza tzw. szlakiem klasycznym jest uzależnione od powstawania kompleksu antygen-przeciwciała. Jeśli nie ma struktury docelowej (antygeny Gal) dla przeciwciał anti-Gal, szybkość aktywacji tej kaskady i zniszczenie przeszczepu w krótkim czasie po wykonaniu ksenotransplantacji powinno zostać opóźnione z uwagi na opóźnione sformowanie się wspomnianych kompleksów immunologicznych.

Dopełniacz to zestaw ponad dwudziestu białek enzymatycznych występujących w nieaktywnej formie w surowicy krwi ssaków. Na rysunku 1 przed-

stawiono schemat funkcjonowania tego ważnego mechanizmu biologicznego. Zaktywowanie pierwszego składnika, co ma miejsce w sytuacji sformowania się na komórce kompleksu antygen-przeciwciała, prowadzi do aktywacji następnego składnika, to z kolei aktywuje dalszy składnik itd. Końcowym elementem kaskady jest utworzenie kompleksu MAC (*membrane attack complex*) niszczącego błonę komórkową. Kaskadę dopełniacza można porównać do swojego domina enzymatycznego kończącego się zniszczeniem komórek i całego przeszczepu. Aktywowanie dopełniacza w reakcjach immunologicznych następować może także w innych sytuacjach, niezależnych od uprzedniego utworzenia się kompleksu antygen przeciwciała (jest to tzw. alternatywny szlak aktywacji).

W zagadnieniu przeszczepów ksenogenicznych świnia → człowiek obiektem zainteresowania jest gen za pośrednictwem którego (poprzez enzym α -1,3-galactosyltransferazę) tworzony jest w organizmie wspomniany antygen tkankowy Gal. Gdyby udało się unieczynnić ten gen (oznaczany jest on jako GalT lub α 1,3GT), teoretycznie możliwe byłoby uzyskanie świń bez antygeny Gal.

Gen α 1,3GT sklonowano u myszy, bydła, świń oraz małp „Nowego Świata” (*New World monkey*). Natomiast w genomie człowieka wykazano obecność trzech pseudogenów, lecz brak funkcjonalnego genu α 1,3GT (cyt. za 24). Można przyjąć, że Natura dokonała u gatunku *Homo sapiens* swoistego nokautu genu α 1,3GT, dzięki czemu możliwe jest występowanie u człowieka naturalnych przeciwciał anty-Gal.

Myszy ze znokautowanym genem α 1,3GT uzyskano już w 1996 r. (25) modyfikując genom pierwotnych komórek zarodkowych hodowanych *in vitro*. Dokonano tego metodą homologicznej rekombinacji wprowadzając gen oporności na neomycynę (neo^R) do eksonu nr 9 genu α 1,3GT kodującego katalityczną domenę enzymu α -1,3-galactosyltransferazy. Osobniki ze znokautowanym genem GalT były zdolne do życia i rozmnażania. Przy kojarzeniach osobników heterozygotycznych, posiadających jedną znokautowaną kopię omawianego genu (genotyp GalT^{+/-}) zaobserwowano statystycznie wysoko istotne odchylenia od spodziewanej proporcji genotypów 1:2:1. Na 227 osobników urodzonych z takich kojarzeń aż 76 miało genotyp normalny GalT^{+/+}, tylko 97 myszy miało genotyp GalT^{+/-}, a u 54 osobników wystąpił genotyp GalT^{-/-} (spodziewane wartości wynosiły odpowiednio: 56,75, 113,5 i 56,75). Wyniki wskazują na obecność w okresie prenatalnym presji selekcyjnej przeciw genotypowi GalT^{+/-}. U wszystkich myszy posiadających obydwie znokautowane kopie genu 1,3-galactosyltransferazy (genotyp GalT^{-/-}) rozwijała się w 4-6 tygodniu życia zaćma (*cortical cataracts*) prowadząca do ślepoty.

Z punktu widzenia ksenotransplantacji najistotniejszy był fakt, że komórki myszy z unieczynnionym genem α 1,3GT wykazywały o 60% mniejszą zdolność wiązania ludzkich przeciwciał anty-Gal. Unieczynniając gen α 1,3GT u dawcy przeszczepu można zatem oczekiwać pożądanego efektu u biorcy w zakresie ograniczenia gwałtowności odrzucania ksenoprzeszczepu *discordant*.

Omawiane doświadczenia prowadzone na myszach stanowią dobrą podstawę podjęcia podobnych prób celowego modyfikowania genomu świń. Jednak genetycy nie dysponują dotychczas pierwotnymi komórkami zarodkowy-

mi tego gatunku, co jest warunkiem nieodzownym podjęcia eksperymentów. O ile udałoby się uzyskać świnię ze znokautowanym genem $\alpha 1,3GT$, ważną byłaby zdolność takich osobników do normalnego życia. Gdyby podobnie do myszy dotknięte były one ślepotą, byłoby to hodowlaną i etyczną przeszkodą uzyskiwania i utrzymywania takich osobników. Wskazuje się, że tęczówka oka jest szczególnie wrażliwa na zmiany biochemiczne. Na komórkach epitelialnych tęczówki świń wykazano obecność epitopu antygenowego Gal. Nie można zatem wykluczyć możliwości wystąpienia ślepoty u świń ze znokautowanym genem $\alpha 1,3GT$ (tzn. z usuniętym epitopem antygenowym Gal). Zakładając, że już wkrótce uda się uzyskać pierwotne komórki zarodkowe świń i powiedzie się nokaut genu $\alpha 1,3GT$ u tego gatunku, już wcześniej należy opracować sposób genetycznej modyfikacji genomu świń dla skutecznego usunięcia tej prawdopodobnej przeszkody — (cyt. za 25).

6.2. Transgeneza u świń w zakresie składników regulujących kaskadę dopełniacza

Doniosłym faktem naukowym było uzyskanie transgenicznych świń ze zintegrowanymi genami człowieka regulującymi kaskadę enzymatyczną dopełniacza. Pierwszą informację zawierającą wyraźną sugestię, że transgeniczne świnię mogą być potencjalnymi dawcami organów dla człowieka opublikowano w końcu 1995 r. (26). Najnowszą publikację na ten temat pochodzącą od pracowników firmy Imutran Ltd. — należącej do Novartis Pharma AG, przedstawiono w 1997 r. (27).

King (7) oraz Butler (13) podają, że Imutran z Wielkiej Brytanii jest jedną z największych firm na świecie zajmujących się ksenotransplantacjami. Pozostałe to firmy amerykańskie: Protein Pharmaceuticals, Alexion i Nextran.

Perspektywa zastępowania serca ludzkiego sercem świńskim wzbudziła zrozumiałe zainteresowanie, nadzieje, a także — emocje. Zagadnienie nabrało rangi problemu cywilizacyjnego i stało się przedmiotem rozważań ekspertów z różnych dziedzin (1-3).

Z punktu widzenia aktualnego zaawansowania technik stosowanych w inżynierii genetycznej, transgeneza świń choć kosztowna (uzyskanie jednego osobnika to koszty rzędu 25 000 – 50 000 USD) jest względnie prosta (28). Obecnie, głównym obiektem zainteresowania transplantologów są świnię transgeniczne w zakresie składnika komplementu DAF (*decay accelerating factor*) i CD59 (*membrane inhibitor of reactive lysis*).

Szlaki aktywacji komplementu oraz jego składniki strukturalne i regulacyjne przedstawiono na rysunku 1 oraz w tabeli 1. DAF (określany niekiedy jako CD55) oraz CD59 regulują aktywność komplementu i są związane z błoną komórkową. DAF wraz z innymi czynnikami regulacyjnymi będącymi białkami plazmy krwi oddziałuje na aktywność kaskady w kilku jej miejscach (21,26), natomiast CD59 bierze udział wyłącznie w tzw. ścieżce litycznej inhibując tworzenie kompleksu MAC niszczącego błonę komórkową (21).

TABELA 1
REGULATORY AKTYWNOŚCI DOPEŁNIACZA ORAZ ICH MIEJSCE I MECHANIZM DZIAŁANIA

Regulatory dopełniacza		Miejsce negatywnej regulacji	Efekt regulacji
Związane z błoną komórkową	Białka plazmy		
—	C1 inh	1	inaktywacja C1s i C1r
CR1, MCP, DAF	czynnik I, C4bp	2	dysocjacja C4b2a i degradacja C4b
CR1, MCP, DAF	czynnik H	3	zwiększanie rozkładu 3bBb
CR1, MCP	czynnik H, czynnik I	4	zahamowanie wiązania czynnika B, spowolnienie szlaku amplifikacji, rozkład C3b
CR1, DAF	C4bp	5	dysocjacja C4b2a3b
CD59	—	6	zahamowanie formowania MAC i dezintegracji błony komórkowej

C1 inh: inhibitor C1; C4bp: białko wiążące C4; CR1: receptor dopełniacza 1; DAF: czynnik przyspieszania rozkładu; MAC: kompleks ataku błony komórkowej; MCP: kofaktor MCP.

Początek do rozważań nad możliwością zastosowania serca świń transgenicznych w klinicznej transplantologii człowieka dały obserwacje poczynione przez naukowców kierowanych przez Platta (29). Serce świń transgenicznych posiadających ludzkie geny dla czynników DAF i CD59 poddawane perfuzji krwią ludzką pracowało do 4 godzin, natomiast normalne serce świńskie zaprzestawało pracy już po kilku minutach (cyt za 2). Serce transgenicznych świń przeszczepione heterotopowo trzem pawianom nie podlegało nadostremu odrzuceniu i pracowało od 4 do 30 godzin. Porównywalny czas notowano w stosunku do kontrolnego (tzn. nietransgenicznego) serca świńskiego przeszczepianego małpom (*cynomolgus monkeys*). W kontekście prezentowanych danych liczbowych (30-godzinny czas przeżycia „ulepszonych” serca świńskiego u pawianów), na uwagę zasługuje relatywnie dobry wynik eksperymentu polskich naukowców (24-godzinny czas przeżycia pacjenta z „nieulepszonym” sercem świńskim) — (11). Podobnie do serca transgenicznego nie podlegało ono nadostremu procesowi odrzucania. W polskim eksperymencie, czas „immunologicznego” przeżycia serca był zatem dłuższy niż czas życia pacjenta.

7. Przyszłość w zakresie przeszczepiania ludziom serca świńskiego

Transgeniczne świny z ludzkimi genami regulacyjnych składników komplementu są wielkim osiągnięciem genetyków i stanowią dobry materiał do badań nad mechanizmami immunologicznymi allo- i ksenotransplantacji. W przedstawionych rezultatach badań wskazuje się, że główna bariera wy-

stępująca przy ksenotransplantacjach serca świnia → człowiek polegająca na natychmiastowym odrzucaniu obcej tkanki (*hyperacute rejection*) jest możliwa do sforsowania. Pomocne w tym względzie mogą być także rezultaty badań nad uzyskiwaniem nowych (skuteczniejszych) immunosupresorów, a także osiągnięcia w zakresie nowych metod indukowania u biorców tolerancji immunologicznej na przeszczep.

Odkrycia naukowe z reguły wyprzedzają ich praktyczne zastosowania. Dlatego obecnie trudno sprecyzować czy i kiedy ksenotransplantacje serca transgenicznych świń ludziom uznane zostaną przez klinicystów-praktyków jako alternatywa przeszczepów allogenicznych.

7.1. Komercyjne aspekty ksenoprzeszczepów

Firmy biotechnologiczne dążą do jak najszybszego wprowadzenia na rynek medyczny serca swych transgenicznych świń traktując to także jako przedsięwzięcie komercyjne. Intensywną argumentację potrzeby wprowadzenia badań na poziom prób klinicznych prezentują m.in. naukowcy brytyjscy zaangażowani we wspomnianej już firmie Imutran/Novartis z Cambridge.

Bank Inwestycyjny Salmon Brothers oszacował ile firma SANDOZ (będąca właścicielem Imutranu) ma do zyskania (lub do stracenia) na rynku immunosupresorów i organów do ksenotransplantacji (cyt. za 7). Przypomina się, że SANDOZ posiada do 2012 r. patent na cyklosporynę — najefektywniejszy obecnie preparat immunosupresyjny stosowany w zapobieganiu odrzucaniu przeszczepów. Jeśli rozwinąłby się rynek ksenoprzeszczepów zwiększyłby się także popyt na cyklosporynę. Bank ten szacuje, że SANDOZ sprzedawca będzie każdy organ świński za 12 000 USD. Na tej podstawie prognozuje, że sprzedaż cyklosporyny i organów świńskich do ksenotransplantacji zwiększyłaby każdego roku (do 2010 r.) dochody tej firmy o 7-8 miliardów USD.

7.2. Biologiczne i etyczne aspekty ksenoprzeszczepów

Stan dużego zaawansowania badań nad uzyskiwaniem świńskiego „transgenicznego” serca z ludzkimi genami, silna promocja tych osiągnięć genetycznych i rozbudzone oczekiwania opinii publicznej na nowe rozwiązania ratujące życie ludzkie, doprowadziły do powołania interdyscyplinarnych grup ekspertów dla oceny ksenotransplantacji świnia → człowiek w szerokim kontekście możliwych następstw dla gatunku *Homo sapiens*. Dla społeczności europejskiej za modelowe można uznać dwa raporty (bardzo podobne w ocenach i konkluzjach) opublikowane w Anglii w 1996 r. (1) i 1997 r. (2). To ostatnie opracowanie wyraża oficjalne stanowisko władz brytyjskich w sprawie przeszczepiania ludziom serca świńskiego (30). Natomiast jurysdykcja i podejście do ksenotransplantacji w USA analizowane są m.in. w artykule Fredrickson (3).

Z punktu widzenia prawa zwierząt do tzw. dobrostanu (*animal welfare*), wykorzystanie w ksenotransplantacjach organów świńskich nie budzi zastrzeżeń. Świnie od wieków hodowane są przez człowieka jako źródło poży-

wienia i potrzeba ich uboju jest oczywistością. Powszechnie występuje tzw. pomocniczość gatunków w przyrodzie, gdzie jedne gatunki stanowią źródło pożywienia dla innych.

Natomiast za nieetyczne uznaje się wykorzystanie w ksenotransplantacjach organów pochodzących od małp (cyt. za 31). Populacja pawianów i szympanсів (tzn. gatunków najbardziej „perspektywicznych” w ksenotransplantacjach) nie jest liczna, a szybkość rotacji pokoleń u tych gatunków i ich rozrodczość nie są duże. Dlatego rozwiązanie problemu dużego deficytu organów poprzez wykorzystanie tych gatunków nie jest możliwe. Ponadto możliwość przenoszenia poprzez materiał biologiczny chorobotwórczych czynników z naczelnych na człowieka jest realnym zagrożeniem dla gatunku *Homo sapiens*. Wskazuje się na fakt, że problem wirusa HIV-1 zaistniał przypuszczalnie (problem wirusa HIV-2 na pewno) na skutek poziomego transferu genów między tymi gatunkami (32).

Na problem zoonoz niebezpiecznych dla człowieka zwrócono szczególną uwagę m.in. po wykazaniu prawdopodobnego związku między występowaniem gąbczastej encefalopatii bydła BSE (określanej jako choroba „szalonych krów”) a występowaniem u ludzi nietypowej odmiany (tzw. „bydlęcy wariant”) choroby Creutzfeldta-Jacoba (33).

Zagrożenia człowieka retrowirusami zintegrowanymi w genomie świń uznano za główny argument wstrzymania w Wielkiej Brytanii prób klinicznych nad przeszczepianiem człowiekowi organów świńskich. Argumentuje się, że świńskie retrowirusy nie stanowiłyby bezpośredniego zagrożenia dla życia pacjenta z przeszczepionym sercem, lecz on sam mając w organizmie takie elementy mógłby stwarzać zagrożenie dla innych ludzi.

W 1997 r. (a zatem w okresie kiedy dopuszczenie do prób klinicznych ksenotransplantacji świnia → człowiek było już dyskutowane i wydawało się realne) wykryto u świń co najmniej dwie grupy endogennych retrowirusów PERV (*porcine endogenous proviruses*) — (34) wykazujących tropizm do komórek ludzkich. W dalszych eksperymentach wykazano (35), że dwie linie komórkowe świńskich nerek (w tym linia PK-15) spontanicznie produkowały cząsteczki retrowirusa typu C. Wolne cząsteczki retrowirusa (PERV-PK) linii komórkowej PK-15 wykazywały zdolność infekowania komórki nerek świń, nerek i człowieka. Ponadto, wspólna hodowla świńskich komórek PK-15 (napromieniowanych promieniami X) z komórkami człowieka zwiększała efektywność infekowania ludzkich fibroblastów oraz limfocytów B i T. W omawianych badaniach wykazano, że komórki nerek, serca i śledziony pobrane od wielu świń domowych, zawierały wiele kopii PERV zintegrowanego w genomie i wykazywały ekspresję wirusowego RNA. Pasażowanie PERV-PK z komórkami ludzkimi prowadziło do uaktywnienia retrowirusowego wektora Maloneya (jest to tzw. defektywny retrowirus, który utracił zdolność samodzielnej replikacji), a komórki stawały się niewrażliwe na komplemento-zależną liżę.

Wyniki tych badań, a także wykazanie, że świńskie endogenne retrowirusy mogą poprzez rekombinację uaktywniać onkogeny obecne w genomie ludzi były głównym uzasadnieniem wprowadzenia moratorium na badania kliniczne ksenotransplantacji świnia → człowiek (2,30,31,36). Pozbycie się endo-

gennych retrowirusów świń wykazujących tropizm do komórek człowieka nie jest możliwe przy zastosowaniu konwencjonalnych metod hodowli (w tym także przy wykorzystaniu metody utrzymywania zwierząt w środowisku bez patogenów — *germ free*). Wykazano, że w genomie świń występuje około 50 kopii PERV (35). Dlatego wyhodowanie zwierząt bez endogennych wirusów może być trudne, a ich całkowite usunięcie z genomu świń nie jest obecnie możliwe. Osiem prowirusowych fragmentów występowało u wszystkich dotychczas przebadanych osobników, dlatego zastosowanie konwencjonalnych metod hodowlanych dla pozbycia się tego „bagażu biologicznego” jest bezskuteczne (35).

W USA nie wprowadzono oficjalnego zakazu na ksenotransplantacje świnia → człowiek. Wynika to m.in. ze szczególnego prawnego usytuowania FDA (*Food and Drug Administration*) w ogólnej jurysdykcji federalnej. FDA jest organizacją regulującą dopuszczanie na rynek leków, urządzeń i preparatów biologicznych. Przed dopuszczeniem do testów klinicznych na ludziach producenci muszą spełnić wymogi tzw. IND (*investigational new drug*), w którym określone muszą być dane na temat bezpieczeństwa i brak toksyczności dla ludzi. Ksenoprzeszczepy traktowane są przez FDA jako leki, gdyż wymagane jest dla nich IND. Natomiast procedury przeszczepiania organów są poza zasięgiem jurysdykcji FDA ponieważ uważane są one jako zabiegi medyczne. W USA administracja nie może regulować praktyki medycznej licencjonowanego lekarza.

W USA kwestia dopuszczenia do ksenotransplantacji podlega zatem wewnętrznym regulacjom *institutional review boards* będących lokalnymi komisjami lekarskimi do rozstrzygania wątpliwych zagadnień prawno-medycznych. Zdobyte biologii molekularnej związane z transgenezą i ksenoprzeszczepami, jak się wydaje, znacznie wyprzedziły w USA wyobraźnię legislacyjną. Istniejący w USA stan zreasumować można następująco. FDA kontroluje dopuszczalność ksenotransplantacji serca świnia → człowiek poprzez kontrolę samego organu. Producent musi zatem przedstawić kompletną listę wymaganych testów aby udowodnić, że przeszczep (traktowany tak samo jak lek) jest bezpieczny dla ludzi.

Porównując tzw. opcję europejską (wprowadzenie moratorium na ksenotransplantacje), oraz tzw. opcję amerykańską (wymagania FDA przed dopuszczeniem do prób klinicznych na ludziach) stwierdzić można, że w istocie zmierzają one do tego samego celu. Formalnie ksenotransplantacje serca świnia → człowiek nie są zabronione. W Anglii wprowadzono jedynie moratorium na badania kliniczne z tego zakresu, natomiast amerykańska FDA czeka na dowody, że genetycznie zmodyfikowany organ świński i niesiony przezeń „bagaż biologiczny” nie stwarzają zagrożeń dla jednostki i gatunku *Homo sapiens*. Istota obydwu rozwiązań jest taka, że kliniczne próby nad ksenotransplantacją świńskiego serca ludziom są obecnie zablokowane.

8. Podsumowanie

Genetyka molekularna wkracza w dziedziny życia, które dotychczas wydawały się bardzo specjalistyczne. Szczególna dziedzina genetyczno-medyczna związana z przebudową organów do przeszczepiania i wykorzystania ich jako „części zamiennych” dla człowieka odkrywa problemy etyczne i biologiczne dotychczas niezbyt jasno uświadamiane.

Ksenotransplantacje serca świnia → człowiek postawiły przed cywilizacją dylemat czy i w jakim zakresie człowiek może iść na somatyczne i genetyczne zbliżenie ze światem zwierząt i czy wynikający z tego zakres dobra przewyższa margines dopuszczalnego ryzyka dla gatunku. Zwolennicy wprowadzenia szybkich prób klinicznych (zgrupowani głównie w wymienionych już firmach biotechnologicznych) wskazują m.in. na wielkie oczekiwania chorych, którzy są całkowicie ich poplecznikami. Inni naukowcy wskazują na potrzebę ochrony genomu człowieka jako szczególnego dziedzictwa, w które nie można ingerować. Wskazują także na zagrożenia związane z tzw. onkogenezą insercyjną mogącą wymknąć się spod kontroli (zagadnienie to przedstawia się jako przykład tzw. „świni trojańskiej”) — (13). Trwa wymiana argumentów naukowych i należy jedynie żywić nadzieję, że emocje związane ze wspomnianym już „czynnikiem komercyjnym” pozostaną na jej marginesie. Problem świńskich retrowirusów wykazujących tropizm do komórek i genomu człowieka, jak się wydaje, pojawił się w odpowiednim momencie. Daje to nauce czas na pogłębienie badań nad genomem człowieka i zwierząt domowych oraz umożliwia spokojną refleksję nad wszystkimi aspektami ksenoprzeszczepów.

Literatura

1. Nuffield Council on Bioethics, (1996), *Animal to human transplants: the ethics of xenotransplantation*, London.
2. *The advisory group on the ethics of xenotransplantation*, (1997), *Animal tissue into humans*, Department of Health, London.
3. Frederickson J. K., (1997), *Food and Drug Law Journal*, 52, 429-451.
4. *Thanks, but no thanks*, (1995), *The Economist*, (October 21).
5. *From the belly of the beast*, (1995), *The Economist*, (October 21).
6. Hinde J., (1997), *Warning over animal organs*. *Times Higher Educational Supplement*, (January 17).
7. King D., (1996), *Pork that could give us the chop*, *Times Higher, Educational Supplement*, (September 13).
8. Lanza R. P., Cooper D. K. C., Chick W. L., (1997), *Świat Nauki*, (wrzesień), 42-48.
9. DiSesa V. J., (1997), *Annals of Thoracic Surgery*, 64, 1858-1865.
10. Platt J. L., (1997), *Transplantation Proceedings*, 29 (8), 3324-3326.
11. Czaplicki J., Błońska B., Religa Z., (1992), *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 11, 393-397.
12. Michler R. E., Chen J.M., (1996), *Handbook of Cardiac Transplantation*, Eds. Emery R. W., Miller L. W., Hanley and Belfus, Inc. Philadelphia, 22, 231-246.
13. Butler D., (1998), *Nature*, 391 (6665), 320-326.
14. Macchiarini P., Mazmanian G. M., Oriol R., Demontpreville V., Dulmet E., Fattal S., Libert J. M., Doubine S., Nochy D., Rieben R., Darteville P., (1997), *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 114 (3), 315-325.

15. Pierson R. N., Kasperkonig W., Tew D. N., Young V. K., Dunning J. J., Horsley J., Carey N. R. B., Walwork J., White D. J. G., (1997), *Transplantation*, 63 (4), 594-603.
16. Zinkernagel R. M., (1997), *Bioscience Reports*, 17 (2), 91-111.
17. Zinkernagel R. M., Doherty P. C., (1997), *Immunology Today*, 18 (1), 14-17.
18. Perico N., Remuzzi G., (1997), *Drugs*, 54 (4), 533-570.
19. Kobayashi T., Taniguchi S., Neethling F. A., Rose A. G., Hancock W. W., Ye Y., Niekrasz M., Kosanke S., Wright L. J., White D. J. G., Cooper D. K. C., (1997), *Transplantation*, 64 (9), 1255-1261.
20. Pascher A., Poehlein Ch., Stangl M., Thiery J., Mueller-Derlich J., Hammer C., (1997), *Transplantation Proceedings*, 29, 962-963.
21. Dorling A., (1997), *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 7 (11), 1307-1319.
22. Nolic B., Sykes M., (1997), *Immunologic Research*, 16/3, 217-228.
23. Perico N., Remuzzi G., (1997), *International Journal of Clinical and Laboratory Research*, 27, 156-177.
24. Cho S. K., Yeh J-Ch., Cummings R. D., (1997), *Glycoconjugate Journal*, 14, 1-11.
25. Tearle R. G., Tange M. J., Zannettino Z. L., Katerelos M., Shinkel T. A., van Denderen B. J. W., 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., Dapice A. J. F., (1996), *Transplantation*, 61 (1), 13-19.
26. Cozzi E., White D. J. G., (1995), *Nature Medicine*, 1 (9), 964-966.
27. Schmoekel M., Bhatti F. N. K., Zaidi A., Cozzi E., Pino-Chavez G., Dunning J. J., Walwork J., White D. J. G., (1997), *Transplantation Proceedings*, 29, 3157-3158.
28. Houdebine L. M., (1997), *Veterinary Research*, 28, 201-205.
29. McCurry K. R., Kooyman D. L., Alvarado C. G., Cotterell A. H., Martin M. J., Logan J. S., Platt J. L., (1995), *National Medicine*, 1, 423-427.
30. Wise J., (1997), *British Medical Journal*, 314, 247.
31. Morris P. J., (1997), *British Medical Journal*, 314, 242.
32. Weiss R. A., (1998), *Nature*, 391 (6665), 327-328.
33. Prusiner S. B., (1997), *Science*, 278, 245-251.
34. Le Tissier P., Stoye J., Takeuchi Y., Patience C., Weiss R., (1997), *Nature*, 389, 681-682.
35. Patience C., Takeuchi Y., Weiss R. A., (1997), *Nature Medicine*, 3 (3), 282-286.
36. Nasto B., (1997), *Nature Biotechnology*, 15, 214.

Heart of transgenic pigs as a substitute of human heart. Expectations and reality

Summary

The authors discuss hopes and fears, expectations and reality of xenotransplantations.

Key words:

xenotransplantation, transgenic animals.

Adres do korespondencji:

Grzegorz Grzybowski, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Jastrzębiec, 05-551 Mroków.