

Ksenotransplantacja narządów świni – nierealna czy już bliska?*

Ryszard Słomski^{1,2}, Marlena Szalata^{1,2},
Daniel Lipiński^{1,2}, Piotr Groniek¹

¹AR w Poznaniu, ²Zakład Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

W wielu stanach chorobowych jedynie transplantacja może uratować życie chorego. Potrzebna jest duża, ciągle wzrastająca liczba odpowiednich narządów do wykonywania przeszczepów. Rocznie z powodu ich braku umierają tysiące ludzi. Czy jest to sytuacja bez wyjścia i pozostaje jedynie oczekiwanie na odpowiedniego dawcę? Jedną z możliwości, stworzoną przez współczesną medycynę i biotechnologię, jest ksenotransplantacja, czyli przeszczepianie człowiekowi narządów zwierząt. Czy może ona ocalić życie człowieka i zapewnić mu odpowiednią jakość?

Dawcy

Przeprowadzenie transplantacji serca, wątroby czy naczyń krwionośnych możliwe jest po śmierci innego człowieka, gdyż tylko w ten sposób można uzyskać narząd do przeszczepu. Wskaźnik sukcesu transplantacji jest różny i zależy od rodzaju przeszczepu. Tylko w nielicznych sytuacjach, takich jak przeszczep szpiku kostnego czy transplantacja nerek, możliwe jest pobranie narządu bez zagrożenia życia dawcy. Podobnie jest w przypadku zniszczenia komórek beta wysp trzustkowych wydzielających insulinę, prowadzącego do wystąpienia cukrzycy insulinozależnej. Wtedy chory musi przez całe życie przyjmować precyzyjnie dobrane dawki insuliny oraz stosować odpowiednią dietę. Zastąpienie nie w pełni funkcjonalnych narządów mogłoby poprawić jakość życia wielu chorych, a w najbardziej dramatycznych przypadkach także uratować życie.

Przeprowadzenie zabiegu transplantacji nie stanowi już dla wysokiej klasy chirurgów technicznej bariery. Pozostaje do rozwiązania znacznie trudniejszy problem – skąd uzyskać narządy do transplantacji. W takiej sytuacji ksenotransplantacja jest kontrowersyjną, ale obecnie jedną z niewielu możliwości rozwiązania problemu.

Człowiek podobny do świni?

Wiele badań przeprowadzonych nad międzygatunkową homologią DNA człowieka i zwierząt, także w zespole kierowanym przez jednego z autorów – prof. Ryszarda Słomskiego, wskazuje, że za wyjątkiem naczelnych największa homologia występuje pomiędzy człowiekiem i świnia. Taki też jest warunek *sine qua non*, ponieważ dawcą może być organizm podobny nie tyle fizycznie, co przede wszystkim fizjologicznie i immunologicznie. Niestety większość zwierząt, nie tylko laboratoryjnych, takich jak szczury, myszy, chomiki i świnki

*Praca finansowana z grantu PBZ/KBN/048/P05/03

morskie, nie spełnia tego kryterium. Ponadto oczywiste jest, że nerka myszy, o wielkości zbliżonej do ziarna fasoli, nie mogłaby sprostać wymaganiom jakie stawia temu narządowi organizm człowieka. Na szczęście naukowcom udało się znaleźć zwierzęta, które nie tylko są na wyciągnięcie ręki, ale także w wielu najważniejszych aspektach dotyczących transplantacji są do człowieka bardzo podobne. Po pierwsze, dużo wiadomo o biologii gatunku świnia domowa (*Sus scrofa*). Po drugie, budowa i wielkość narządów wewnętrznych ludzi i świń jest bardzo zbliżona. Dla wprawnego operatora zabieg transplantacji jest możliwy do przeprowadzenia. Zatem skoro świnie stanowią źródło organów do przeszczepów, to dlaczego ksenotransplantacje nie są przeprowadzane rutynowo? Pierwszy problem stanowi zgodność immunologiczna.

Zgodność immunologiczna – rozpoznawanie „obcego”

Najpoważniejsza kwestia związana z transplantacją w ogóle, a ksenotransplantacją w szczególności, to problem zgodności immunologicznej narządu dawcy i organizmu biorcy. Jednym z najważniejszych mechanizmów obronnych organizmu jest układ odpornościowy. Dzięki niemu organizm zwalcza niemal wszystko co obce, a co dostało się w jakikolwiek sposób do organizmu (za wyjątkiem pokarmu). Trudno nawet sobie wyobrazić jak wyglądałby gatunek, choćby po kilku pokoleniach, w którym dochodziłoby do inkorporacji obcego DNA. Jednak to, co jest bezcennym mechanizmem obronnym, w pewnych okolicznościach staje się barierą nie do pokonania. Tak jest w przypadku transplantacji. Komórki układu odpornościowego wyspecjalizowały się w odnajdywaniu i niszczeniu obcych komórek oraz własnych uszkodzonych komórek, np. nowotworowych czy zakażonych przez wirusy lub bakterie. Układ odpornościowy broni organizmu biorcy narażonego na gwałtowny atak ze strony przeszczepu, próbuje zniszczyć komórki przeszczepu przy pomocy przeciwciał i cytotoksycznych limfocytów T.

Nawet tak bliskie spokrewnienie jak rodzic–dziecko nie gwarantuje zgodności immunologicznej. Jedynie bliźnięta jednojajowe, posiadając taki sam zestaw białek, są wzajemnie idealnymi dawcami i biorcami przeszczepów. Jeszcze dramatyczniej wygląda sytuacja w przypadku osób niespokrewnionych. W każdym przypadku istnieje ryzyko odrzucenia przeszczepionego narządu, dlatego pacjentowi podaje się leki immunosupresyjne, hamujące aktywność układu odpornościowego. Takimi lekami są między innymi glikokortykoidy, które pobudzają apoptozę w dojrzewających limfocytach T oraz hamują aktywność genów kodujących cytokiny – związków wykorzystywanych przez komórki układu odpornościowego do porozumiewania się między sobą. Innym ważnym lekiem immunosupresyjnym jest cyklosporyna, która hamuje przekazywanie sygnałów pomiędzy komórkami układu odpornościowego, chroniąc przeszczepiony narząd przed zniszczeniem.

Ryzyko odrzucenia narządów świni jest znacznie większe niż ryzyko odrzucenia narządów człowieka. Sekwencja aminokwasów w białkach komórek świni różni się od sekwencji białek człowieka, co jest natychmiast rozpoznawane przez układ odpornościowy człowieka. To jednak nie jest jedyny problem, jaki wiąże się z komórkami świni. Świnie inaczej modyfikują wszystkie białka, które mają być umieszczone

w błonie komórkowej. Białka przeznaczone do wydzielenia poza komórkę są najczęściej wytwarzane na rybosomach szorstkiej siateczki śródplazmatycznej. Nowe cząsteczki białek są transportowane z siateczki do aparatu Golgiego, gdzie następuje glikozylacja – przyłączanie reszt cukrowych do białek. Pęcherzyki transportowe przenoszą glikozylowane białka w kierunku błony komórkowej, a nowe cząsteczki białek albo są usuwane poza komórkę, albo pozostają związane z błoną komórkową. Podczas glikozylacji białek – choć zasadniczo jest to proces przebiegający identycznie – u każdego gatunku przyłączany jest specyficzny zestaw cukrowców. Komórki świń mogą przyłączyć do białka dwie cząsteczki galaktozy połączone wiązaniem alfa-1,3-glikozydowym (Gal(α -1,3)-Gal). W komórkach człowieka nie występują enzymy tak modyfikujące białka. Także drobnoustroje, które dokonują inwazji organizmu człowieka, mogą mieć na powierzchni taki specyficzny układ cząsteczek galaktozy. Z tego powodu we krwi człowieka krążą przeciwciała rozpoznające antygen Gal(α -1,3)-Gal. Ten dodatkowy cukrowiec jest głównym sygnałem rozpoznawczym.

Przeszczepienie człowiekowi narządu świni wywołuje natychmiastową reakcję własnych przeciwciał, skierowaną przeciw cząsteczkom obcych dwucukrów znajdujących się na powierzchni komórek, np. nerki świni. Odpowiedź układu odpornościowego jest bardzo silna, a jej celem jest zniszczenie obcych komórek. Odrzucenie przeszczepu może nastąpić nawet w ciągu kilkunastu minut. Atak komórek układu odpornościowego skierowany jest na obce naczynia krwionośne, skutkiem czego krew w przeszczepionym narządzie przestaje krążyć. Powstałe niedotlenienie i brak substancji odżywczych staje się przyczyną śmierci komórek przeszczepionego narządu. Jest to nadostre odrzucenie przeszczepu (ang. hyperacute rejection). Bardzo wysoka dawka leków immunosupresyjnych mogłaby prawie całkowicie zahamować działanie układu odpornościowego biorcy. Konsekwencją byłby jednak całkowity brak odporności (uśpienie układu odpornościowego), który mógłby przyczynić się do śmierci choćby z powodu zwykłego kataru. Ponadto stosowanie silnych dawek leków immunosupresyjnych prowadzi w rezultacie do podwyższenia ryzyka zachorowania na nowotwory złośliwe. Jakże zatem jest wyjście z tak skomplikowanej sytuacji?

Inżynieria genetyczna w ksenotransplantacji

Gdyby udało się usunąć dwucukier Gal(α -1,3)-Gal znajdujący się na powierzchni komórek świni można by oczekiwać, że takie komórki nie zostaną odrzucone przez organizm człowieka. Jak jednak upodobnić komórki świni do komórek człowieka? Rozwiązanie problemu umożliwia zastosowanie inżynierii genetycznej. Wystarczy „jedynie” wyhodować świnię, której komórki są pozbawione antygeny Gal(α -1,3)-Gal. Aby tego dokonać, należy inaktywować lub usunąć gen świni kodujący enzym odpowiedzialny za przyłączanie reszt Gal(α -1,3)-Gal do glikozylowanych białek. Wówczas, stanowiące problem reszty cukrowe nie pojawią się na powierzchni komórek świni, a narządy od tak zmodyfikowanego genetycznie zwierzęcia będą biologicznie bardziej podobne do narządów człowieka.

Wprowadzanie informacji genetycznej do komórek

Proces transgenezy jest już dość dobrze poznany i wiele ośrodków na świecie prowadzi badania w tym zakresie. Także

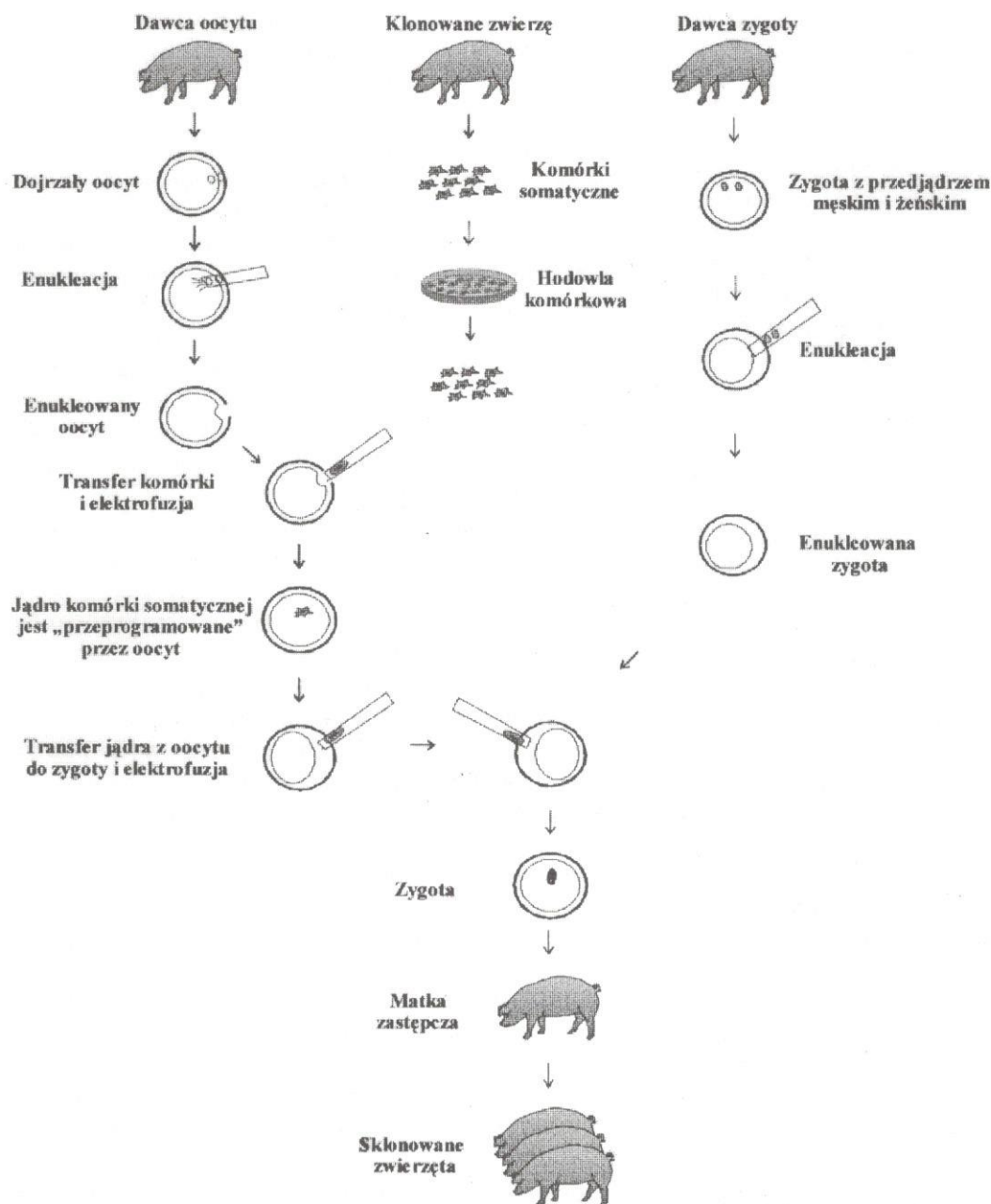
w zespole kierowanym przez jednego z autorów – prof. Ryszarda Słomskiego, takie prace są wykonywane, choć trzeba obiektywnie przyznać, że możliwości finansowe niektórych innych ośrodków są nieporównywalnie większe.

Zarówno dla komórek zwierzęcych, jak i komórek roślinnych opracowano cały szereg bardzo zbliżonych metod. Najpowszechniej stosowaną techniką wprowadzania informacji genetycznej do genomu zwierząt jest mikroiniekcja do męskiego przedjądra zygoty. Technikę tę wykorzystano z powodzeniem w licznych przypadkach, szczególnie do modyfikacji funkcji gruczołu mlekowego u zwierząt transgenicznych. Mikroiniekcję do komórek zwierzęcych zastosowano po raz pierwszy w 1980 r., a do komórek roślinnych w 1984 r. Zaletą mikroiniekcji jest możliwość obserwowania jej pod mikroskopem, wadą – niewielka liczba komórek, które można jej poddać (100-200 komórek/godz.). Mikroiniekcja jest jedyną metodą wprowadzania DNA do protoplastów, komórek jajowych i zygot. Inne metody są stosowane znacznie rzadziej i uważane za mniej skuteczne.

Próbowano na przykład wstrzeliwać konstrukcje genowe przez skórę do gruczołu mlekowego myszy i owcy [3]. Metoda ta jest bardzo zbliżona do biolistyki, w której za pomocą mikrowyrzutni wprowadza się do całych komórek i tkanek makrocząstki pokryte DNA. Wyrzut uzyskuje się za pomocą prochu strzelniczego, wysokiego ciśnienia lub rozładowania elektrycznego. Kuleczki wolframu lub złota o średnicy 0,2-2 μ m pokrywane są DNA w ten sposób, aby DNA zatrzymał się w komórce. Dochodzi do okresowej, przemijającej ekspresji lub trwałego wbudowania DNA w genom biorcy. W ten sposób uzyskano transformacje wielu roślin odpornych na inne metody transgenezy, np. sorgo, owies, pszenicę, ryż, soję, kukurydzę. Możliwa jest również transformacja organelli komórkowych. Komórki bombardowane w fazie G2 i M dają 4-6 razy wyższą transformację. Biolistyka w przypadku zwierząt okazała się znacznie mniej przydatna. Ekspresję genu hGH w gruczole mlekowym owcy udało się jednak tą metodą uzyskać [4].

Stosowanie czynników destabilizujących błony komórkowe jest stosunkowo tanią metodą wprowadzenia DNA do komórek. Najczęściej protoplasty inkubowane są z DNA w obecności glikolu polietylenowego (PEG), L-ornityny, alkoholu poliwinylowego lub jonów dwuwartościowych. Technika ta dała zadowalające efekty dla dużej grupy roślin. Inkubacja trwa zwykle 2-5 lub 20-30 minut. Bardzo ważne jest przygotowanie protoplastów, odpowiednie pH, stężenie czynników chemicznych i forma DNA.

Spośród innych metod wprowadzania DNA należy wymienić elektroporację, elektroforezę i elektroiniekcję [2, 11]. Są to bardzo podobne techniki, w których komórki w roztworze DNA umieszcza się w polu elektrycznym, a następnie stosuje wysokonapięciowy impuls elektryczny. W rezultacie dochodzi do okresowej perforacji błony komórkowej, wystarczającej do przejścia DNA do komórki. W elektroforezie (elektrorefekcja) DNA migruje w polu elektrycznym i wnika do komórek. Elektroporacja stosowana jest rutynowo, a elektroforeza jedynie sporadycznie. Elektroporacji można poddać całe komórki, skrawki tkanek, a w przypadku roślin również protoplasty



Rys. Schemat klonowania świnie

i pyłek. Mechanizm pobierania DNA pozostaje jednak jeszcze do wyjaśnienia.

Metodą zbliżoną do naturalnej infekcji komórek przez bakterie jest lipofekcja [5, 14, 16]. Konstrukcje genowe umieszczone w liposomach wykazują stabilność i chronione są przed działaniem enzymów nukleolitycznych. Głównie wykorzystuje się duże liposomy (LUV) lub agregaty DNA i lipidów. Dochodzi do fuzji liposomów z plazmolemmą. Z metodą tą wiąże się bardzo duże nadzieje w pracach nad terapią genową u myszy i człowieka. Sporo uwagi poświęcono wprowadzeniu DNA do komórek przy zastosowaniu lasera mikrowiązkowego. Komórki umieszcza się w pożywce hipertonicznej, a następnie perforuje laserem, co prowadzi do pobrania DNA. DNA ulega zwykle przejściowej ekspresji. Jest to technika podobna do elektroporacji, lecz niewspółmiernie droższa, dlatego mało konkurencyjna. Do perforacji komórek można za-

stosować również włókna silikonowe. Włókna miesza się intensywnie z komórkami i DNA. Dochodzi do wielokrotnych uszkodzeń błony komórkowej i wprowadzenia do komórki DNA. Mechanizm zjawiska nie jest w pełni wyjaśniony. Zaletą metody jest prostota, wadą – duża śmiertelność transformowanych komórek, zachodzi również niebezpieczeństwo utraty chromosomów.

Jednym z najprostszyc sposobów wprowadzenia DNA do komórek pozostaje bezpośrednia inkubacja komórek z DNA. Jest to najstarsza metoda transgenezy, uważana za mało wydajną, jednak dzięki niej udało się uzyskać transformacje wielu komórek myszy. Mimo upływu czasu jest metodą nadal stosowaną i ulepszaną [8, 15]. Zastosować można również białka chroniące DNA przed degradacją, np. histony lub protaminy, jak również utworzyć precypitaty DNA, stosując jony wapnia lub strontu [1, 6, 7, 9]. Pobranie DNA z pożywki może być ułatwione poprzez łagodne działanie ultradźwiękami (sonikacja).

Metody bezpośrednio wprowadzania DNA, chociaż łatwiejsze i tańsze niż mikroiniekcja do przedjądrza zygoty, przez długi czas uważane były za metody uzyskania przejściowej lub lokalnej ekspresji transgeny. Próby wprowadzania konstrukcji genowych za pośrednictwem plemników, chociaż bardzo obiecujące, nie rozpowszechniły się dotychczas wystarczająco, a ich skuteczność nie została w pełni potwierdzona.

Klonowanie świnie

Przez długie lata naukowcy nie mogli pokonać licznych ograniczeń klonowania. Dostępną techniką był podział zarodka, polegający na jego mikrochirurgicznym przecięciu, gdy znajdował się w stadium od dwóch do ośmiu komórek. U człowieka podobne zabiegi nazwano klonowaniem terapeutycznym. Jednak naukowcy dążyli do sklonowania komórek somatycznych, tzw. klonowania reprodukcyjnego. Sklonowano już owcę, mysz, kota, a ostatnio również świnie [13]. Liczne niepo-

wodzenia naukowców w klonowaniu ssaków przerwał jako pierwszy Ian Wilmut, dzięki niewielkiej modyfikacji, która zdecydowała o końcowym sukcesie. Polegała ona na tym, że przed przeniesieniem jądra komórkowego dawcy do oocytu biorcy, hodowano komórki dawcy, pozbawiając je czynników wzrostu, co pozwoliło „zmusić” je do wejścia w fazę G0 cyklu komórkowego. Jądra komórkowe znajdujące się w fazie G0 są bardziej podatne na przeprogramowanie. Mimo niedoskonałości tej metody – niska wydajność (uzyskanie 1 owcy na 277 prób) i duża pracochłonność – jest to pierwsza udana próba klonowania ssaka w historii. Wkrótce Wakayama opublikował wyniki udanego klonowania dorosłych myszy. Pierwsza sklonowana mysz, o imieniu Cumulina, posiadała materiał genetyczny pobrany z komórki somatycznej jajnika (*Cumulus oophorus* – wzgórek jajonośny).

W procesie kolonowania można wyróżnić kilka etapów (rys.). W pierwszym etapie z komórki somatycznej pobiera się jądro, następnie z oocytu usuwa się jądro i do enukleowanego (pozbawionego jądra) oocytu wprowadza się jądro z komórki klonowanego organizmu, a oocyt pobudza do podziałów. Klonowanie świń, zwłaszcza modyfikowanych genetycznie, jest ważne w kontekście transplantacji organów. Pierwsze zmodyfikowane genetycznie świnię w zakresie antygeny Gal(α -1,3)-Gal uzyskali naukowcy z brytyjskiej firmy biotechnologicznej Imutran. Pobrane od zmodyfikowanych świń serca przeszczepiono małpom, u których pracowały około 60 dni, co uznano za dowód pokonania bariery nadostrego odrzucania. Firma Imutran stała się natychmiast obiektem zainteresowania potentatów branży farmaceutycznej i została wykupiona przez szwajcarską firmę Sandoz, która jest częścią koncernu Novartis, jednej z najpotężniejszych kompanii farmaceutycznych na świecie.

Ryzyko

Z całą pewnością trzeba mieć świadomość potencjalnych zagrożeń, jakie niesie ze sobą ksenotransplantacja. Jednym z nich jest możliwość zarażenia człowieka retrowirusami świń. Komórki świń zawierają utajone retrowirusy PERV (ang. porcine endogenous retroviruses). Choć dla świni nie są one niebezpieczne, to nie wiadomo czy takie będą dla człowieka

[10]. Konieczna jest w tej mierze najwyższa ostrożność, bowiem wirus teoretycznie najpierw mógłby zakazić pozostałe tkanki biorcy, a później zaatakować inne osoby i rozprzestrzenić się w populacji [12]. Zdolności przystosowawcze retrowirusów są powszechnie znane, zatem możliwość zajścia u nich mutacji, które zwiększyłyby ich zdolności przystosowawcze, nie są wcale małe. Nikt obecnie nie zna odpowiedzi na pytanie, jak duże jest to zagrożenie.

Być może w przyszłości problem transplantacji zostanie rozwiązany, gdy nauczymy się pobierać komórki macierzyste od chorych i pobudzać je do przekształcania się w narządy. Wówczas transgeniczne świnię nie będą potrzebne. Na obecnym jednak etapie wydaje się jak najbardziej uzasadnione prowadzenie badań dotyczących możliwości wykorzystania organów świni do transplantacji w medycynie, tym bardziej, że liczba osób oczekujących na przeszczepę ciągle wzrasta.

Literatura: 1. Ambrosini E., Ceccherini-Silberstein F., Erfle V., Aloisi F., Levi G.: *J. Neurosci. Res.*, Mar. 1, 55 (5), 569-577, 1999. 2. Callis J., Fromm M., Walbot V.: *Nucleic Acids Res.*, Jul. 24, 15 (14), 5823-5831, 1987. 3. Furth P.A., Shamay A., Wall R.J., Hennighausen L.: *Anal. Biochem.*, Sep., 205 (2), 365-368, 1992. 4. Furth P.A., Kerr D., Wall R.: *Mol. Biotechnol.* 4, 121-127, 1995. 5. Hargest R., Eldin A., Williamson R.: *Adv. Exp. Med. Biol.* 451, 385-391, 1998. 6. Kaighn M.E., Reddel R.R., Lechner J.F., Peehl D.M., Camalier R.F., Brash D.E., Saffiotti U., Harris C.C.: *Cancer Res.*, Jun. 1, 49 (11), 3050-3056, 1989. 7. MacDonald C.: *Crit. Rev. Biotechnol.* 10 (2), 155-178, 1990. 8. Mack K.D., Wei R., Elbagarri A., Abbey N., McGrath M.S.: *J. Immunol. Methods*, Feb. 1, 211 (1-2), 79-86, 1998. 9. Nielsen T., Bell D., Lamoureux C., Zannis-Hadjopoulos M., Price G.: *Mol. Gen. Genet.*, Feb., 242 (3), 280-288, 1994. 10. Paradis K., Langford G., Long Z., Heneine W., Sandstrom P., Switzer W.M., Chapman L., Lockey C., Onions D., Otto E.: *Science* 285, 1236-1241, 1999. 11. Pfau J., Youderian P.: *Nucleic Acids Res.*, Oct. 25, 18 (20), 6165, 1990. 12. Platt J.L.: *Nature* 407, 27-30, 2000. 13. Polaejeva I.A., Chen S., Vaught T., Page R.L., Mullins J., Ball S., Dai Y., Boone J., Walker S., Ayares D., Colman A., Campbell K.H.S.: *Nature* 407, 86-90, 2000. 14. Son K.K., Tkach D., Hall K.J.: *Biochim. Biophys. Acta.*, Sep. 29, 1468 (1-2), 6-10, 1990. 15. Yang Y.W., Yang J.C.: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, Feb., 25 (Pt 1), 47-51, 1997. 16. Watanabe Y., Nomoto H., Takezawa R., Miyoshi N., Akaike T.: *J. Biochem.* (Tokyo) 116 (6), 1220-1226, 1994.

Stadnina Koni Posadowo (Cz. II)

Anna Nowicka-Posłuszna

AR w Poznaniu

W latach siedemdziesiątych, w związku ze zmianami polityki hodowlanej i wzrostem zainteresowania wierzchowym użytkowaniem koni, rozpoczęto szereg działań hodowlanych, ma-

jących na celu poprawienie w populacji posadowskiej pożądanych cech. Założeniem Stadniny było wyhodowanie konia wierzchowego z doskonałym ruchem i o dużych walorach użytkowych (skoczność), urodziwego, o zrównoważonym temperamentem i łagodnych cechach charakteru.

W tym celu hodowcy używali ogierów ras holsztyńskiej i hanowerskiej z najlepszych linii zachodnioeuropejskich oraz ogierów pełnej krwi angielskiej i półkwi rodzimej (w tym własnej) hodowli, sprawdzonych pod względem przydatności sportowej i o odpowiednim pokroju.

Linie ogierów czołowych użytkowanych współcześnie w SK Posadowo

Podstawą sukcesów hodowlanych Stadniny Koni Posadowo był niewątpliwie trafny dobór ogierów czołowych. Jedną z najcenniejszych w hodowli posadowskiej była linia ogiera **Rittersporn** xx, siwy, ur. 1917 r. w Belgii (St. Saulge xx od Molly