

# Modyfikacje cech tkankowych zwierząt metodami inżynierii genetycznej i ich przypuszczalne znaczenie aplikacyjne\*

Grzegorz Grzybowski

Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt

Polska Akademia Nauk

Jastrzębiec

**W** obrębie nauki o przeszczepach zwanej transplantologią rozwijana jest m.in. dziedzina badań dotycząca wymiany przeszczepów między osobnikami różnych gatunków. Są to ksenotransplantacje, tj. przeszczepy obce gatunkowo, z którymi wiąże się nadzieje na rozwiązanie problemu znalezienia odpowiednio dużej liczby dawców organów przeznaczonych do przeszczepiania ludziom.

Teoretyczne podstawy odnoszące się do przeszczepiania organów, problemy związane z tolerancją immunologiczną allogeniczną oraz obcych gatunkowo tkanek, a także zagadnienia dotyczące komórkowych i humoralnych procesów odrzucania przeszczepu poruszane są w wielu opracowaniach. Dyskutowane są one m.in. w najnowszych artykułach przeglądowych Platta (1,2) Lu i wsp. (3) oraz Sykesa i wsp. (4).

W biomedycznych analizach porównawczych stosowanych w medycynie ludzkiej, jednym z najczęściej wykorzystywanych gatunków jest świnia domowa. Istotne są tu podobieństwa anatomiczne (podobny kaliber ciała), zbliżony typ odżywiania (wszystkożerność) i podobieństwa w zakresie fizjologii trawienia, bilansu energetycznego (np. termoregulacja) itd. (5).

Jednak największe zainteresowanie, jak również najpoważniejsze kontrowersje wzbudza idea przeszczepiania serca świńskiego ludziom. Związana z tym polemika naukowa jest bardzo aktualna ponieważ biorąc pod uwagę wyłącznie techniczne uwarunkowania, zdawać by się mogło, że są już niezbędne dane umożliwiające dokonywanie tego rodzaju przeszczepów. Morris podkreśla (6), że celowo rozbudzone są w tym względzie zainteresowania i nadzieje, a nagłośnienie tych koncepcji następuje m.in. poprzez publikacje prasowe stymulowane przez ośrodki zainteresowane finansowo takimi przedsięwzięciami. Z zamieszczanych informacji wynikałoby, że przeszczepianie ludziom serca świńskiego mogłoby się zacząć już niebawem.

---

\* Pan prof. Grzybowski będzie pisać na temat ksenotransplantacji także w następnym numerze „Biotechnologii” — przyp. Redakcji.



W Polsce nie rozpowszechniano dotychczas takich informacji, jednak obecnie sytuacja ta ulega zmianie. Nawet w poważnych tytułach prasowych, o dużym zasięgu, upowszechniane są na cały kraj informacje w rodzaju: „Wyhodowano już całe stada świń ze zmienionymi genetycznie narządami wewnętrznymi: sercem, nerkami i wątrobą. Za kilka lat będzie można przeszczepiać je ludziom” (7).

Tego rodzaju stwierdzenia o rysujących się możliwościach ingerencji, na dużą skalę we właściwości genetyczne i somatyczne ludzi i zwierząt, silnie oddziałują na wyobraźnię oraz rodzić mogą różne obawy i zastrzeżenia, a nawet lęk przed konsekwencjami burzliwie rozwijającej się genetyki molekularnej i biotechnologii.

W problematykę przeszczepów obcych gatunkowo wprzęgnięte jest uzyskiwanie zwierząt transgenicznych. Badania z tej dziedziny są w kraju prowadzone m.in. w IGiHZ PAN w Jastrzębcu. Przed szeregiem laty podjęta tu została również problematyka dotycząca głównego kompleksu zgodności tkanekowej u świń (kompleks SLA) oraz u bydła (kompleks BoLA).

Polskie ustawodawstwo nie zawiera uregulowań w zakresie badań dotyczących transgenezy oraz dopuszczalności zastosowań produktów wytworzonych za pomocą takich metod. Stwarza to w tych kwestiach wrażenie zamieszania i umożliwia dowolność interpretacji.

Celem artykułu jest zaprezentowanie podstawowych problemów z zakresu modyfikacji tkanek zwierząt metodami inżynierii genetycznej oraz przedstawienie poglądów opartych na aktualnych wynikach badań światowych na temat realności wymiany tkanek między osobnikami różnych gatunków. Szczególną uwagę zwrócono na zagadnienia ksenogenicznych przeszczepów świnia-człowiek.

W wielu światowych raportach poświęconych bioetycznym aspektom ksenotransplantacji stwierdza się, że nie ma przeciwwskazań do wykorzystywania w tym celu świń pod warunkiem ich właściwego traktowania (6). Natomiast niedozwolone jest wykorzystywanie do tego celu małp człekokształtnych (*primates*). Mogą być one obiektem doświadczeń tylko w szczególnych, ściśle kontrolowanych eksperymentach naukowych.

Serce świńskie jest dla naczelnych oraz dla człowieka przeszczepem tkanekowo wysoce niezgodnym (*discordant*), który zaczyna być przez biorcę odrzucany już po kilku minutach w wyniku gwałtownego procesu określanego mianem nadostrej reakcji immunologicznej (*hyperacute rejection*). Mimo to, w grupie serc pochodzących od osobników innych gatunków, uznawane jest ono za relatywnie najodpowiedniejsze do zastosowania w klinicznej transplantologii u ludzi (6).

W szeregu publikacjach światowych sygnalizowany jest fakt prowadzenia badań nad uzyskiwaniem transgenicznych świń zmienionych tak, aby do nadostrej reakcji immunologicznego odrzutu nie dochodziło, a wszczepiony świński organ mógł funkcjonować do czasu znalezienia odpowiedniego allogenicznego (ludzkiego) serca (8).

U naczelnych, we wspomnianym nadoстрыm procesie odrzucania serca świńskiego najważniejsze są dwa elementy. Pierwszy, to występujące w krążeniu naczyniowym człowieka naturalne, ksenoreaktywne przeciwciała (głów-



nie IgM) rozpoznające świński epitop tkankowy Gal $\alpha$ 1-3Gal (tzw. antygen Gal) obecny na glikolipidach i glikoproteinach. Ma to daleko idące reperkusje dla wszystkich unaczynionych przeszczepów obcych gatunkowo.

Formowanie antygeny Gal dokonywane jest za pośrednictwem enzymu  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferazy. Małpy człekokształtne „Nowego Świata” oraz niższe ssaki posiadają ten enzym. Natomiast ludzie, małpy (*apes*) oraz małpy człekokształtne „Starego Świata” (*monkeys*) nie posiadają funkcjonalnego enzymu odpowiadającego za występowanie antygeny Gal. Występują u nich owe naturalne przeciwciała anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal co nie pociąga za sobą niekorzystnych następstw z uwagi na nieobecność w organizmie antygeny Gal. Fizjologiczna rola tych ksenoreaktywnych przeciwciał nie jest znana. Drugim elementem przesadzającym o nadoстрыm odrzucie serca świńskiego jest szybkie zaktywowanie u biorcy kaskady enzymatycznej dopełniacza.

Podjęmowane eksperymenty nad uzyskiwaniem świń transgenicznych jako dawców serca dla ludzi ukierunkowane są na zneutralizowanie tych dwóch zasadniczych problemów. Po pierwsze, prowadzone są eksperymenty nad uzyskiwaniem transgenicznych świń wyposażonych w ludzkie geny odpowiedzialne za wytwarzanie składników regulacyjnych, istotnych w kontrolowaniu efektorowych ogniw kaskady enzymatycznej dopełniacza. Chodzi tu przede wszystkim o czynnik CD55 (*DAF* — *decay accelerating factor*), czynnik CD59 (*membrane inhibitor of reactive lysis*) oraz czynnik CD46 (*MCP* — *membrane co-factor protein*). Czynniki CD55 i CD46 hamują aktywację komplementu na etapie rozszczepiania składnika C3, natomiast czynnik CD59 zapobiega formowaniu kompleksu atakującego błonę komórkową (*MAC* — *membrane attack complex*).

McCurry i wsp. wykazali po raz pierwszy (9), że możliwe jest pewne ograniczenie gwałtowności odrzucania ksenogenicznego przeszczepu tkankowego poprzez wprowadzenie do genomu świń ludzkich genów regulujących kaskadę enzymatyczną dopełniacza. Mianowicie, przeszczepiane pawianom organy świń transgenicznych wykazujących niewielki poziom CD55 i CD59 odporne były na gwałtowne niszczenie i odrzucanie zależne od dopełniacza.

Eksperymenty nad transgenezą u zwierząt gospodarskich podlegają obiektywnym ograniczeniom biologicznym, a przede wszystkim ekonomicznym i nie mogą być prowadzone na dużą skalę. Wall podaje (8), że dotychczas w bazie danych Medline zgromadzono 6000 artykułów naukowych na temat zwierząt transgenicznych (głównie myszy). Tylko 289 artykułów (niespełna 5%) dotyczy transgenezy u zwierząt gospodarskich. Ponadto aż 24% artykułów na ten temat stanowią opracowania o charakterze przeglądowym.

Istnieje zatem duże zainteresowanie transgenezą w ogóle, ale występuje niewspółmiernie do tego małe zaangażowanie w bezpośrednie badania prowadzone na zwierzętach gospodarskich.

We współczesnych technikach wprowadzania do genomu nowej informacji uzyskuje się zwierzęta transgeniczne bardzo wysokim kosztem. Na przykład, koszty uzyskania jednej transgenicznej świni szacowane są na 25.000 USD (8) lub na 50.000 USD (10). U podstawowych gatunków zwierząt gospodarskich (bydło, owce, świnię) poziom integracji transgeny w zapłodnionych oocytach nie przekracza 1%. Przy najpomyślniejszym zbiegu okoliczności,



tylko jeden z 33 oocytów nastrzykiwanych transgenem daje po przeniesieniu do macicy biornicy zwierzę transgeniczne. Natomiast przy mało pomyślnej sytuacji proporcja ta jest jak 1:150 (8).

Inną koncepcją rokującą nadzieje na ograniczenie intensywności odrzucania przeszczepu jest uzyskanie świń zmodyfikowanych metodami inżynierii genetycznej w taki sposób aby nie występował u nich antygen *Gal* (1), który, jak już wspomniano, jest strukturą docelową dla ludzkich naturalnych ksenoreaktywnych przeciwciał.

Przy zastosowaniu najnowocześniejszych technik biologii molekularnej określanymi jako homologiczna rekombinacja i ukierunkowana mutageniza udało się w 1996 r. uzyskać myszy z wyłączonym genem  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferazy (11). W badaniach wykazano, że omawiany enzym nie jest konieczny do życia tak zmienionych osobników. Myszy z wyłączonym genem dla enzymu  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferazy wyprowadzone z pierwotnych komórek zarodkowych (*embryonal stem cells*) zmodyfikowanych podczas hodowli *in vitro*, charakteryzowały się istotnie zmniejszoną (o około 60%) zdolnością wiązania ludzkich ksenoreaktywnych przeciwciał anty-Gal $\alpha$ 1-3Gal.

Aktywowanie dopełniacza drogą klasyczną jest uzależnione od powstawania kompleksu antygen-przeciwciało. A zatem, jeśli nie ma struktury docelowej (antygeny) dla odpowiadających mu przeciwciał, aktywacja kompleksu drogą klasyczną powinna zostać zablokowana ponieważ nie tworzą się kompleksy immunologiczne.

Zagadnienie uzyskania transgenicznych świń z wyłączonym genem enzymu  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferazy, a zatem pozbawionych antygeny *Gal*, jest dotychczas koncepcją roboczą. Realność jej urzeczywistnienia mogłaby być zweryfikowana dopiero w przyszłości, po uzyskaniu w hodowli *in vitro* tzw. pierwotnych komórek zarodkowych świń.

Dotychczas, uzyskano pierwotne komórki zarodkowe tylko u myszy. Na modelu tym prowadzone są m.in. eksperymenty i obserwacje patofizjologicznych skutków wyłączania poszczególnych genów (12).

Z przedstawionych danych wynika, że w zakresie teoretycznych podstaw ksenotransplantacji oraz koncepcji modyfikowania tkanek poprzez transgenezę poczyniono wymierne postępy. Nie wydaje się jednak, aby zdobyte w tej dziedzinie doświadczenia badawcze były choćby w minimalnym stopniu wystarczające, aby podejmować kliniczne eksperymenty w medycynie ludzkiej. Dlatego nie ma racjonalnego uzasadnienia rozbudzanie w tym zakresie przesadnych nadziei.

Ksenogeniczne serce jest nie tylko bardzo szybko odrzucane, lecz generowane jest przy tym tzw. uczulenie (pamięć immunologiczna) na olbrzymią liczbę antygenów transplantacyjnych co ogromnie utrudnia lub wręcz uniemożliwia immunologiczną akceptację przeszczepionego później normalnego serca (allogenicznego). Szeroki zakres immunologicznego uczulenia ma ścisły związek z fizjologicznymi mechanizmami tzw. aktywacji klonalnej przy stymulacji antygenowej, a także właściwościami budowy samych antygenów transplantacyjnych i podobieństwem szeregu czynników (epitopów *common*) obecnych na



antygenach transplantacyjnych u różnych gatunków. W badaniach serologicznych zjawisko to przejawia się jako tzw. reaktywność krzyżowa przeciwciał.

W ostatnim okresie duże zainteresowanie wzbudza systematyczna grupa lentiwirusów (13,14). Są to retrowirusy posiadające zdolność inkorporowania się w genomie różnych gatunków. W grupie tej klasyfikowany jest m. in. wirus immunodefencji bydła (BIV), wirus zakaźnej anemii koni (EIAV), wirus zapalenia stawów i mózgu u kóz (CAEV), wirus immunodefencji małp (SIV), oraz wirus HIV odpowiedzialny za występowanie syndromu nabytego braku odporności AIDS (*acquired immune deficiency syndrome*) u ludzi. Charakterystyczną cechą tych retrowirusów jest długi okres utrzymywania się w organizmie gospodarza bez wywoływania widocznych zmian patologicznych. Patogenność dla ludzi zwierzęcych lentiwirusów nie jest definitywnie wyjaśniona. Jest to jednym z argumentów bardzo restrykcyjnego podejścia odnośnie do dopuszczalności zastosowań zwierzęcego materiału biologicznego lub produktów zwierzęcych w medycynie ludzkiej. Na przykład, obok wielu poważnych argumentów biologiczno-medycznych (m.in. olbrzymie różnice w zakresie antygenów HLA u ludzi i antygenów SLA u świń) oraz bioetycznych barier niedopuszczalności dokonywania transplantacji ludziom serca świńskiego, odnotowywane jest zagrożenie biorcy przeszczepu świńskim retrowirusem, który jak wykazano w doświadczeniach *in vitro* może infekować komórki ludzkie (6).

U myszy udowodniono występowanie tzw. onkogenezy insercyjnej (*insertional oncogenesis*) mogącej wystąpić wtedy, kiedy retrowirus integruje się w pobliżu onkogenu. Zjawisko to uważane jest za potencjalnie duże zagrożenie dla homeostazy organizmu. Dlatego, np. w USA obowiązuje podstawowy wymóg Komitetu Doradczego do spraw Rekombinacji DNA — RAC (*Recombinant DNA Advisory Committee*) oraz Agencję Kontroli Żywności i Leków — FDA (*Food and Drug Administration*) tzn. organizacji regulujących dopuszczalność zastosowań w medycynie i żywieniu różnorodnych preparatów biologicznych, aby wektory retrowirusowe stosowane w inżynierii genetycznej (m.in. w eksperymentach terapii genowej) były sprawdzone także pod kątem wspomnianej onkogenezy insercyjnej (15).

Opisane trudności związane z występowaniem u człowieka naturalnych ksenoreaktywnych przeciwciał oraz szybkie aktywowanie kaskady enzymatycznej dopełniacza, jak się wydaje, są jedynie drobnymi przeszkodami w konfrontacji z rzeczywistymi barierami biologicznymi występującymi nawet przy przeszczepach w obrębie tego samego gatunku (są to przeszczepy allogeniczne).

Barierą przesądzającą o losie transplantowanej tkanki jest (nie)zgodność tkankowa między dawcą a biorcą, ta zaś determinowana jest przez niezwykle złożony polimorficzny układ genetyczny określany jako główny kompleks zgodności tkankowej MHC (*major histocompatibility complex*). Wyłączając przypadki bliźniąt jednojajowych, spotkanie w obrębie nie spokrewnionej populacji (*outbred*) dwóch osobników o jednakowych cechach tkankowych jest niemożliwe. W tym tkwi istota somatycznej niepowtarzalności każdego człowieka. Jest to głównym atrybutem zmienności genetycznej populacji i jej zdolności adaptacyjnych, lecz całkiem przypadkowo stanowi przeszkodę przy



przeszczepianiu tkanek. Całkowitą zgodność tkankową udało się uzyskać eksperymentalnie tylko u silnie zimbredowanych linii myszy (linie kongeniczne utrzymywane w chowie wsobnym przez kilkadziesiąt pokoleń) (16,17). Jednak nawet przy wymienianiu przeszczepu między samcami (dawca) i samicami (biorca) linii kongenicznej jest on odrzucany z uwagi na niezgodność w zakresie samczego antygenu transplantacyjnego H-Y (16).

Immunologiczne rozpoznawanie własnych struktur antygenowych (*self*) oraz własnych komórek zmienionych antygenowo, traktowanych w takiej postaci jako obce (*non self*) zarejestrowane zostało przed ponad dwudziestu laty jako zjawisko DZSB (*Doherty-Zinkernagel-Shearer-Bevan phenomenon*). Jest ono uważane za podstawowe dla współczesnej immunologii i medycyny. Doherty i Zinkernagel, którzy pierwsi sformułowali prawa immunologicznego rozpoznania w zakresie własnych i obcych struktur antygenowych, uhonorowani zostali w 1996 r. za to odkrycie Nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny (18). Omawiane mechanizmy nadzoru immunologicznego są przeszkodą przy stosowaniu (głównie poprzez iniekcje) różnych produktów wytworzonych metodami inżynierii genetycznej. Dotyczy to, np. uzyskiwania immunosupresorów nowej generacji przydatnych w klinicznej transplantologii. Stosowane dotychczas preparaty immunosupresyjne są w zasadzie niespecyficzne i dławią niedostatecznie wybiórczo procesy immunologiczne związane z odrzucaniem przeszczepu. Poszukuje się zatem nowych rozwiązań w tym zakresie, np. poprzez uzyskiwanie monoklonalnych chimerowych przeciwciał (mysz-człowiek) ukierunkowanych na receptor interleukin (IL-2) — (19). Jednak istotną przeszkodą utrudniającą ich stosowanie jest immunogenność (generowanie reakcji immunologicznych). Przeciwciała monoklonalne syntetyzowane *in vitro* przez komórki hybrydowe, czy też przeciwciała uzyskiwane metodami inżynierii genetycznej nie mogą być aplikowane pozajelitowo. Są one bowiem antygenowo obce dla organizmu (*non self*) do którego są wprowadzane. W tej sytuacji, nie ma możliwości osiągnięcia zamierzonego efektu leczniczego ponieważ wzbudzana jest odpowiedź immunologiczna tzn. wytwarzane są w organizmie przeciwciała przeciw tym przeciwciałom monoklonalnym (20). Nawet między osobnikami tego samego gatunku, zmienność antygenowa jest olbrzymia. U jej podłoża leży przede wszystkim ogromny polimorfizm w zakresie genów i antygenów zgodności tkankowej.

Główny kompleks zgodności tkankowej MHC (*major histocompatibility complex*) nazywany u ludzi kompleksem HLA (*human leukocyte antigens*) jest jednym z najintensywniej badanych regionów genomu człowieka. Jest on odpowiedzialny m.in. za sprawne funkcjonowanie mechanizmów nadzoru immunologicznego (21). Dlatego MHC odgrywa główną rolę w zakresie rozpoznawania i usuwania z organizmu antygenów wnikaających z zewnątrz (odnosi się to m.in. do przeszczepów allogenicznych i ksenogenicznych) oraz w zakresie rozpoznawania i usuwania wszelkich antygenowo zmienionych elementów powstających w organizmie (np. usuwanie komórek własnych, zmienionych poprzez aberracje genetyczne, nowotworowe itd.) — (22,23).

Fundamentalne informacje o MHC pochodzą z badań nad zwierzętami laboratoryjnymi. Dotyczy to przede wszystkim odkrycia przez Gorera (24) w połowie



lat trzydziestych erytrocytarnego antygeny myszy oznaczonego II, oraz udowodnienie jego roli jako silnego alloantygeny transplantacyjnego. Termin *histocompatibility* używany jest dla podkreślenia roli jaką MHC odgrywa w transplantacji, zaś termin *main* (obecnie zastąpiony przez *major*) podkreśla decydujące znaczenie MHC w wywoływaniu ostrych reakcji transplantacyjnych w procesie gwałtownego odrzucania niedopasowanej tkanki. Używany początkowo termin „system” zastąpiono obecnie określeniem „kompleks”, dla przeciwstawienia MHC jakimkolwiek klasycznemu układowi alloantygenowemu organizmu (np. układom grupowym krwi) oraz zaakcentowania, że nie jest to prosty układ, lecz kompleks ściśle sprzężonych genów. Chociaż kompleks HLA uważany jest za jeden z najlepiej poznanych regionów w genomie człowieka to uzyskanie pełnej informacji o jego strukturze, funkcji i roli fizjologicznej jest jeszcze odległe (21,25). HLA umiejscowiony jest na krótszym ramieniu chromosomu nr 6 (6p21.3). Jego wielkość szacowana jest na ok. 4000 kb. W obrębie HLA wyodrębnione zostały dotychczas 3 główne regiony genetyczne. Najbliżej centromeru zlokalizowany jest region HLA klasy II (ok. 900 kb), gdzie umiejscowione są loci HLA-DP, -DQ i -DR kontrolujące różnorodne sekwencje kodujące antygenów tkankowych klasy II. Rozpoznano już w tym regionie co najmniej 32 genów. Immunologiczne rozpoznanie i będąca jego konsekwencją ogromnie złożona specyficzna odpowiedź immunologiczna nie jest możliwa bez udziału cząsteczek MHC tego regionu. Obecne są tu m.in geny TAP 1 i 2 (*transporter associated with antigen processing*) istotne w rozpoznawaniu własnych i obcych antygenów (np. wnikających do organizmu patogenów lub własnych zdefektowanych cząsteczek i komórek). Cząsteczki TAP 1 i 2 transportują peptydy będące produktami degradacji antygenów (*processing*) na powierzchnię błony komórkowej, gdzie łączą się one z cząsteczkami MHC klasy II. Konformacja takiego tworu prezentowana jest limfocytom T, których powierzchniowo zlokalizowane receptory weryfikują czy jest to struktura właściwa organizmowi (*self*), czy też jest antygenowo obca (*non self*). Jeżeli zachodzi drugi przypadek, to za pośrednictwem mediatorów komórkowych (głównie interleukin) uruchamiane są immunologiczne mechanizmy dostosowawcze określane zbiorczym mianem jako komórkowa i humoralna odpowiedź immunologiczna. Centralnie zlokalizowany jest region HLA klasy III (ok. 1100 kb) zawierający dużą liczbę genów (co najmniej 39), wśród których uwagę zwraca obecność TNF (*tumor necrosis factor*), genów dla 21 hydroksylazy (metabolizm hormonów sterydowych), genów dla składników dopełniacza C2 i C4 (aktywowanie kaskady enzymatycznej dopełniacza drogą klasyczną) oraz genów dla białek szoku termicznego HSP70 (*heat shock protein*). Najbardziej oddalony od centromeru jest region HLA klasy I (ok. 2000 kb), gdzie są umiejscowione loci HLA-A, -B i -C kontrolujące klasyczne (silne) antygeny transplantacyjne. Niezgodność między dawcą a biorcą przeszczepu w zakresie jakiegokolwiek antygeny z tej grupy wiąże się z silną reakcją immunologiczną u biorcy co przejawia się w ostrym (szybkim) odrzuceniu przeszczepu. Polimorfizm w zakresie tych antygenów jest olbrzymi. W loci HLA-A, HLA-B i HLA-C rozpoznano dotychczas odpowiednio — 59, 118 i 36 genów. Niezależnie od tego, w regionie I ludzkiego MHC występują loci HLA-E, HLA-F i HLA-G kontrolujące wiele nieklasycznych anty-



genów tkankowych (klasa Ib). W obrębie regionu I HLA wykrywane są wciąż nowe geny i pseudogeny (26), których rola w funkcjonowaniu układu immunologicznego nie jest jeszcze dokładnie sprecyzowana.

Generalnie, organizacja genetyczna świńskiego MHC (kompleks SLA) jest bardzo podobna do organizacji HLA (27,28) co wskazuje na rodowód MHC wspólny dla wszystkich ssaków (21). Polimorfizm SLA jest bardzo bogaty, podobnie do MHC innych gatunków. Oprócz antygenów MHC, w organizmie występuje duża liczba słabych antygenów transplantacyjnych (*minor histocompatibility antigens*), np. wspomniany już samczy antygen H-Y, które wprawdzie nie generują gwałtownych (szybkich) reakcji immunologicznych, lecz po ich wprowadzeniu występują u antygenowo niedopasowanego biorcy tzw. chroniczne objawy odrzucania przeszczepu.

Biorąc pod uwagę przytoczone dane na temat złożoności ludzkiego MHC (HLA) — (25,26) oraz wyniki m.in. polskich badań nad świńskim MHC (SLA) — (29) przebudowanie poprzez transgenezę („humanizowanie”) serca świńskiego tak, aby było ono choćby w przybliżeniu tkankowo zgodne z sercem ludzkim jest obecnie, jak się wydaje, mało realne. Nie deprecjonując znaczenia i celowości badań w tej dziedzinie oraz nie przekreślając przypuszczalnych walorów aplikacyjnych ksenotransplantacji, korzyści klinicznych należy obecnie upatrywać przede wszystkim w programach przeszczepów allogenicznych (człowiek-człowiek), w badaniach nad nowymi specyficznymi immunosupresorami odpowiedzi immunologicznej oraz dotyczących protetyki narządowej.

Morris uważa (6), że przy obecnym poziomie wiedzy na temat ksenotransplantacji, dopuszczenie do prób przeszczepu serca świnia-człowiek i nieuchronna klęska takich przedsięwzięć zaszkodziłaby klinicznym programom allogenicznych transplantacji. Autor ten stwierdza ponadto, że byłoby to tym bardziej dotkliwe ponieważ od takich allogenicznych przeszczepów ludzkość uzależniona będzie przez długie lata, a prawdopodobnie — już zawsze. Komitety bioetyczne przeciwdziałające dezinformacjom i kreowaniu opinii o realności dokonywania już obecnie (lub w najbliższej przyszłości) skutecznych przeszczepów ksenogenicznych formułują jednoznaczne stanowisko na temat niedopuszczalności tego rodzaju praktyk (cyt. za 6).

Reasumując, uzyskano świnie transgeniczne zmodyfikowane w zakresie genów niektórych ludzkich składników dopełniacza. Jest to z pewnością krok w kierunku rozpoznania mechanizmów związanych z odrzucaniem przeszczepów wymienianych między osobnikami różnych gatunków. Podkreślić należy, że aktywowanie dopełniacza i obecność u ludzi ksenoreaktywnych przeciwciał *anty-Gal*, to jedynie małe elementy bardzo złożonych, komórkowych i humoralnych procesów immunologicznych decydujących o losie przeszczepionej tkanki. Pokonanie tych barier nie jest obecnie możliwe ponieważ nie zgromadzono dotychczas wystarczającej wiedzy na temat przeszczepów obcych gatunkowo. Ponadto, możliwości modyfikowania tkanek zwierząt za pomocą metod inżynierii genetycznej są jeszcze bardzo ograniczone. Dlatego należy stwierdzić, że wiedza o biologicznych podstawach ksenotransplantacji jaką aktualnie dysponuje genetyka, immunologia i medycyna jest niewystarczająca w konfrontacji z aplikacyjnymi potrzebami wymaganymi w klinicznej transplantologii.



## Literatura

1. Platt J. L., (1996), *Current Opinion in Immunology*, 8, 721-728.
2. Platt J. L., (1996), *Critical Reviews in Immunology*, 16, 331-358.
3. Lu C. Y., Khair-el-din T. A., Dawidson I. A., Butler T. M., Brasky K. M., Vazquez M. A., Sicher S. C., (1994), *The FASEB Journal*, 8, 1122-1130.
4. Sykes M., Lee L. A., Sachs D. H., (1994), *Immunological Reviews*, 141, 245-276.
5. Petters R. M., (1994), *Reproduction Fertility and Development*, 6, 643-645.
6. Morris P. J., (1997), *British Medical Journal*, 314, 242.
7. Wojtasiński Z., (1997), *Transgeniczny zawrót głowy*, Rzeczpospolita (7-8 czerwca).
8. Wall R. J., (1996), *Theriogenology*, 45, 57-68.
9. 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.
10. Sharma A., Martin M. J., Okabe J. F., Truglio R. A., Dhanjal N. K., Logan J. S., Kumar R., (1994), *Bio/Technology*, 12, (January), 55-59.
11. 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., D'Apice A. J. F., (1996), *Transplantation*, 61, (1), 13-19.
12. Ryffel B., (1996), *International Journal of Experimental Pathology*, 77, 125-141.
13. Cremer K. J., Gruber J., (1992), *Veterinary Pathology*, 29, 572-578.
14. Joag S. V., Narayan O., (1993), *Current Opinion in Immunology*, 5, 595-599.
15. Evans M., Affara N., Lever A. M. L., (1995), *British Medical Bulletin*, 51 (1), 226-234.
16. Klein J., (1975), *Congenic lines: Biology of the mouse histocompatibility-2 complex*, Springer-Verlag, Berlin, 31-39.
17. Snell G. D., (1981), *Science*, 213, 172-178.
18. Masood E., Weiss U., (1996), *Nature*, 383, (10 October), 465.
19. Hughes S. E., Gruber S. A., (1996), *Journal of Clinical Pharmacology*, 36, 1081-1092.
20. Khazaeli M. B., Conry R. M., LoBuglio A. F., (1994), *Journal of Immunotherapy*, 15, 42-52.
21. Bodmer W., (1995), *Cancer Surveys*, 22, 5-16.
22. Harding C. V., (1996), *Journal of Clinical Immunology*, 16 (2), 90-96.
23. Neffjes J. J., (1996), *Immunobiology*, 195, 455-460.
24. Gorer P. A., (1936), *British Journal of Experimental Pathology*, 17, 42-50.
25. Pichon L., Giffont T., Chauvel B., Le Gall J. Y., David V., (1996), *Medecine Sciences*, 12, (11), 1209-1218.
26. Gruen J. R., Nalabolu S. R., Chu T. W., Bowlus C., Fan W. F., Goei L., Wei H., Sivakamasudari R., Liu Y. C., Xu H. X., Parimoo S., Nallur G., Ajioka R., Shiukla H., Bray-Ward P., Pan J., Weissman S. M., (1996), *Genomics*, 36, 70-85.
27. *Comparative Genome Organization of Vertebrates*, (1996), *Mammalian Genome*, 7, 717-734.
28. Wakefield M. J., Graves J. A. M., (1996), *Mammalian Genome*, 7, 715-716.
29. Grzybowski G., (1983), *Produkty głównego kompleksu zgodności tkankowej (MHC) u świń; identyfikacja nowego czynnika SLA*, rozprawa habilitacyjna, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, 15, 66.

### Modifications of animal tissues by way of genetic engineering and their possible significance in xenotransplantation

#### Summary

The paper presents the problems connected with the modification of animal tissues through transgenesis. Special attention has been given to the xenogenic heart transplant between pigs and human beings.



The heart of pigs is a highly discordant graft both for primates and humans, which is hyperacutely rejected already several minutes after operation. Graft rejection is mainly due to the presence of natural xenoreactive antibodies which recognize the pigs' tissue epitope Gal $\alpha$ 1-3Gal (known as the *Gal* antigene), as well as to the quick activation of the complement in the recipient.

In 1995 transgenic pigs with human genes responsible for complement CD55 (*DAF* — *decay accelerating factor*) and CD59 factor (*membrane inhibitor of reactive lysis*) were obtained. Organs of such animals, grafted into baboons, were resistant to complement-related rejection.

The possibilities of modifying animal tissues by way of genetic manipulation are still limited and total "humanization" of pig's heart as regards the histocompatibility antigens is not yet feasible. For this reason the fulfilment of the idea of xenografting between pigs and human beings is still remote.

**Key words:**

transgenesis, xenograft, pig-human transplants, hyperacute rejection, MHC, complement.

*Adres do korespondencji:*

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