



Infekcje wirusowe w ksenotransplantacjach i strategię ich wykrywania

Urszula Mazurek¹, Grażyna Janikowska², Zenobia Wydmuch³,
Tadeusz Wilczok¹

¹Katedra Biologii Molekularnej i Genetyki Medycznej,

²Katedra Chemii Ogólnej i Analitycznej,

³Katedra i Zakład Mikrobiologii, Wydział Farmaceutyczny,
Śląska Akademia Medyczna, Sosnowiec

Viral infections in xenotransplantation and their detection strategies

Summary

Utilizing animals as organ donors for humans may cause transmission of foreign species pathogens to the recipient. To minimize the risk of transmission of infectious diseases from animals to humans, the strategy of appropriate animal selection is being assessed. The aim of the selection of specific pathogen-free pigs was the differentiation of active viruses from latent ones in both the recipients and donors in search of the host gene expression profiles which would differentiate the beginning of transplant rejection from an active infection. Additionally, the researchers searched for gene profile expressions indicating the type of infection which would considerably reduce the time of detection, and the cause of disease in the recipient which would offer a better chance of a positive result of the surgery.

Key words:

PERV, PCMV, xenotransplantation, RT-PCR, microarrays, gene-expression profile, host-pathogen interactions.

Adres do korespondencji

Urszula Mazurek,
Katedra Biologii
Molekularnej
i Genetyki Medycznej,
ul. Ostrogórska 30,
41-200 Sosnowiec.

1. Wprowadzenie

Ksenotransplantacje są to przeszczepy żywych narządów, tkanek, komórek z jednego gatunku na drugi. Bardziej szczegółową definicję podaje PHS (ang. United States Public Health Service) oraz

FDA (ang. United States Food and Drug Administration) określając ksenotransplantację jako każdą procedurę obejmującą transplantację, implantację, czy infuzję człowiekowi, jako biorcy, zarówno żywych komórek, tkanek, czy organów pochodzących od zwierząt, jak i ludzkich płynów ustrojowych, komórek, tkanek, czy organów mających kontakt *ex vivo* z żywymi komórkami, tkankami, czy organami pochodzącymi od zwierząt (1).

Koncepcja wykorzystania zwierząt jako dawców narządów dla człowieka wynika głównie z dysproporcji między liczbą osób oczekujących na przeszczep serca, nerek, płuc, wątroby czy trzustki a ograniczoną liczbą narządów dostępnych do przeszczepów. Ksenotransplantacje mają zapewniony dostęp do nieograniczonego źródła organów, co umożliwia planowanie zabiegów z odpowiednim wyprzedzeniem i pobieranie narządów do natychmiastowego przeszczepu oraz wcześniejsze wdrażanie leczenia immunosupresyjnego (2). Przeprowadzane zgodnie z przepisami dotyczącymi eksperymentów medycznych (3) dopuszczalne są po odpowiednim wyborze zwierzęcia jako dawcy przeszczepu dla człowieka.

2. Dawcy organów do ksenotransplantacji

Początkowo uwaga naukowców skupiała się na małpach naczelnych, genetycznie najbliższych człowiekowi. Jednak bliskość filogenetyczna ma swoje złe strony. Przypuszcza się, że może ona ułatwiać zakażenie ludzi wirusami charakterystycznymi dla ssaków naczelnych. To właśnie stało się głównym powodem rezygnacji z wykorzystania małp naczelnych jako dawców organów. Wystarczy wspomnieć choćby ludzki wirus upośledzenia odporności HIV-1 lub HIV-2 (ang. *Human Immunodeficiency Virus*), czy wirusa Marburg, które przeniosły się na ludzi odpowiednio z szympanów, mangabów i koczokodanów oraz makaków zielonych (4).

Obecnie za potencjalnego dawcę w ksenotransplantacjach uważana jest świnia i to z nią wiąże się plany zastępowania zniszczonych ludzkich narządów zwierzęcymi. Dobra znajomość flory mikrobiologicznej świń w połączeniu z ciągle udoskonalanymi metodami hodowli i z coraz większą precyzją monitorowania poziomu wiremii, umożliwia wyselekcjonowanie zwierząt wolnych od określonych patogenów (ang. *Specific Pathogen Free Pig, SPF pig*), a stosunkowo duża odległość filogenetyczna między świnia i człowiekiem, znacznie zmniejsza ryzyko przeniesienia zwierzęcych czynników infekcyjnych na biorców przeszczepu (2).

3. Ryzyko zakażeń wirusowych w ksenotransplantacjach

Stosowanie komórek, tkanek lub narządów świni do ksenotransplantacji ciągle budzi pytanie jak duże istnieje ryzyko zakażenia wirusami dawcy i jakie jest prawdopodobieństwo pokonania przez te wirusy bariery międzygatunkowej. Większość

patogenów stanowiących ryzyko zakażeń wirusowych w ksenotransplantacjach może być wyeliminowana w wyborze dawcy narządów, na drodze selekcji stad. Podczas gdy endogenne retrowirusy świni (PERV, ang. *Porcine Endogenous Retroviruses*), stanowiące integralną część ich genomu (5) są bardzo trudne do wyeliminowania ze względu na dużą liczbę miejsc integracji w genomie świni np. Lee i wsp. (2002), wskazują 32 miejsca integracji PERV do genomu świni (6). W konsekwencji DNA PERV zostanie wprowadzony wraz z przeszczepianym narządem do organizmu człowieka.

Inne wirusy świni zdolne do wywoływania trwałych infekcji to PLHV (ang. *porcine lymphotropic herpesvirus*), PCMV (ang. *porcine cytomegalovirus*) i PCV (ang. *porcine circovirus*). Wszystkie z wymienionych patogenów są wysoce rozpowszechnione w populacji świń i coraz częściej są objęte programem kontrolnym dla odbiorców przeszczepów komórek świni (7).

Ryzyko aktywnej wiremii w ksenotransplantacjach obejmuje wirusy, które mogą występować zarówno u dawcy jak i u biorcy przeszczepu. W każdym przypadku zakażenia mogą przebiegać jako zakażenie pierwotne, (gdy biorca seronegatywny otrzymuje narząd od seropozytywnego dawcy) lub jako zakażenie wtórne zależne od reaktywacji własnego latentnego wirusa lub wirusa dawcy. Intensywność reinfekcji wirusa w dużym stopniu zależy od rodzaju zastosowanego leczenia immunosupresyjnego, a zależność pomiędzy zakażeniem a odrzucaniem przeszczepu, chociaż sugerowana przez wielu autorów, nadal pozostaje kontrowersyjna. Niezależnie od pochodzenia uaktywniony wirus może być powodem negatywnego wyniku transplantacji. Latentne wirusy dawcy lub biorcy mogą podlegać samoistnej aktywacji, albo utworzyć aktywne pseudotypy w wyniku rekombinacji z wirusami obecnymi w komórce. Możliwość szybkiego wychwycenia reaktywacji wirusów umożliwia opracowanie strategii terapeutycznych zmierzających do regulacji ekspresji genów wirusowych lub genów gospodarza (wyciszenie lub indukcja), odpowiedzialnych za zdefiniowaną patologię wynikającą z zakażenia. Możliwości diagnostyki, jak i terapii zakażeń wirusowych są ogromne, jednak ilość otrzymanych informacji na podstawie otrzymanych wyników prowadzonych badań w wykrywaniu wirusów, zależy od niełatwej sztuki stawiania pytań i wyboru strategii w poszukiwaniu odpowiedzi na zadane pytania.

4. Retrowirusy endogenne

W większości przypadków endogenne retrowirusy (ERV) są nieaktywne transkrypcyjnie, tylko niektóre zachowały zdolność ekspresji genów, replikacji i wywoływania wiremii. U innych dochodzi do ekspresji tylko pojedynczych genów i syntezy określonych białek. W przypadku uaktywnienia ERV może pojawić się szereg zmian chorobowych u biorcy przeszczepu. Należy jednak podkreślić, że obecność retrowirusów endogennych w komórce nie zawsze ma negatywny wpływ na jej me-

tabolizm i funkcjonowanie. W niektórych przypadkach obecność ERV w komórce może być korzystna. Na przykład endogenne retrowirusy mogą chronić organizm gospodarza przed zakażeniem egzogennymi retrowirusami (8), a mechanizm ochrony przed kolejnym zakażeniem polega na łączeniu się białek produkowanych przez endogenne retrowirusy z receptorami rozpoznawanymi przez inne wirusy egzogenne uniemożliwiając im wniknięcie do komórek.

Wiedza na temat retrowirusów endogennych świń jest coraz pełniejsza, ciągle jednak brakuje odpowiedzi na pytanie w jakim stopniu PERV może stanowić zagrożenie, a w jakim ochronę dla ksenotransplantacji.

Retrowirusy występujące u świni posiadają organizację genomu typową dla podrodziny α -retrowirusów oraz γ 1-retrowirusów w obrębie której wyodrębniono trzy subtypy -PERV-A, PERV-B i PERV-C, różniące się sekwencją nukleotydów genu *env*, kodującego glikoproteiny otoczki (9,10). Obecność wirusów subtypu A i B potwierdzono u wszystkich przebadanych dotychczas świń, zidentyfikowano natomiast osobniki pozbawione PERV-C (10). Z naszych badań wynika, że w grupie świń niemodyfikowanych genetycznie ok. 42% zwierząt charakteryzuje brak DNA PERV-C w komórkach.

Analizując infekcyjność poszczególnych subtypów w przypadku PERV-A, jak i PERV-B wykazano zdolność do zakażenia większej liczby gatunków, w tym kilka linii komórkowych człowieka *in vitro*. PERV-C jest całkowicie niezdolny do zakażenia ludzkich komórek, jednak uczestnicząc w procesie rekombinacji z subtypem PERV-A zdolny jest do utworzenia cząstki wirusowej o zwiększonej infekcyjności w stosunku do komórek ludzkich (12,13). Nie można jednak odnosić badań *in vitro* do rzeczywistego potencjału cząstek PERV *in vivo*, zwłaszcza w przypadku przeszczepów międzygatunkowych. Stwierdzenie takie potwierdza brak pozytywnych wyników badań transmisji PERV do komórek człowieka *in vivo* (14).

Na świecie żyją już pacjenci, którzy otrzymali przeszczepy świńskich tkanek albo w inny, równie bliski sposób kontaktowali się z narządami świń. Paradaisi i wsp. prowadząc badania nad 160. osobową grupą chorych, mających bezpośredni kontakt z różnorodnymi komórkami, tkankami lub organami pochodzącymi od świń, również nie uzyskali wyników świadczących o zakażeniu wirusem PERV *in vivo*. W 81% detekcja DNA PERV dała wynik negatywny natomiast u 23 pacjentów stwierdzono obecność świńskiego DNA w krążeniu (mikrochimerizm), a u 4 ze 160. pacjentów wykazano obecność przeciwciał anti-PERVs (15). Badania infekcyjności PERV *in vivo* ciągle trwają, a w kolejno ukazujących się publikacjach potwierdza się brak zdolności zakażenia komórek człowieka *in vivo*. Na przykład w roku 2004 Garkavenko i wsp. (16) przedstawili wyniki wieloletnich badań prowadzonych na grupie 18. pacjentów z przeszczepionymi komórkami wysp trzustkowych pochodzącymi od świń, Autorzy potwierdzają, że w żadnym przypadku nie wykryto zakażenia wirusem PERV.

Brak danych na temat zdolności zakażenia wirusem PERV *in vivo* może być wynikiem niezdolności do produkcji cząstek wirusowych przez badane świńskie komórki czy tkanki, lub też efektywnej odpowiedzi układu odpornościowego. Należy jednak

podkreślić, że w opisanych przypadkach jedynymi komórkami badanymi pod kątem zakażenia wirusem były jednojądrzaste komórki krwi obwodowej. Brakuje informacji na temat transmisji PERVs do innych komórek *in vivo*.

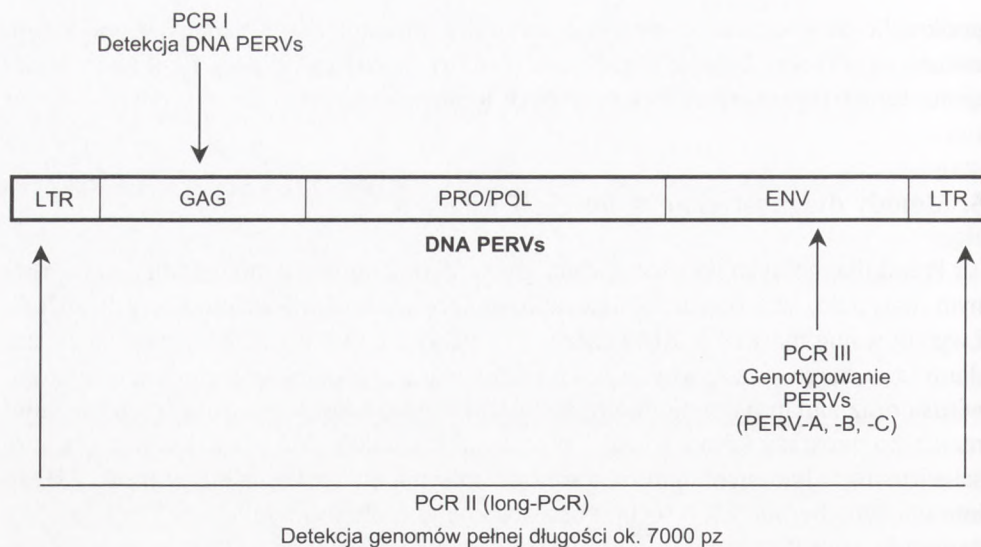
5. Metody diagnostyczne w detekcji wirusów

Przed diagnostyką wirusologiczną, prowadzoną odmiennymi technikami i w różnym materiale, stoi ogromne wyzwanie mające na celu wskazanie nowych technik i wytypowanie markerów dla wczesnego wykrywania wirusów, ich przejścia ze stadium latentnego w aktywne, a w konsekwencji prognozowanie zmian liczby kopii wirusa oraz zmian na poziomie molekularnym gospodarza, prowadzących do zaburzenia homeostazy komórkowej. Polecanymi technikami do poszukiwania obecności wirusów w badanym materiale są: transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM), immunocytochemia (ICC), techniki stosowane w biologii molekularnej na poziomie genomiki, transkryptomiki i proteomiki, badania infekcyjności z zastosowaniem hodowli odpowiednich linii komórkowych i inne.

W większości przypadków techniki te umożliwiają wykrywanie wirusów przed wystąpieniem objawów klinicznych, a także umożliwiają precyzyjne monitorowanie skuteczności terapii. Początkowo w diagnostyce klinicznej wykorzystywano głównie metody jakościowe wykazujące brak lub obecność zdefiniowanego wirusa. Obecnie obiektywne wykazanie braku lub obecności wirusa w badanym materiale nie jest już wystarczające. Coraz częściej pojawia się pytanie o genotyp i o liczbę kopii DNA lub RNA wirusowego oraz o profil zmian ekspresji wybranych genów w zakażonych komórkach, prowadzący do patologii o różnym stopniu zaawansowania. Odpowiedź na te pytania z coraz większą precyzją umożliwia dynamiczny rozwój metod biologii molekularnej (17,18), a ich wybór zależy od postawionego pytania, od genomu oraz etapu cyklu replikacyjnego wirusa i cyklu komórkowego gospodarza

Diagnostyka PERV prowadzona na podstawie wyników łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), z zastosowaniem starterów, komplementarnych do różnych sekwencji DNA PERV, umożliwia precyzyjną ocenę stopnia zagrożenia transmisji PERV do komórek człowieka w ksenotransplantacjach. Pozytywny wynik PCR-*gag* PERV fragmentu konserwatywnego genu (kodującego białka kapsydu) (PCR I, rys.) wskazuje na obecność DNA PERV w badanych komórkach. Wykonanie ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy QPCR-*gag* PERV wskazuje poziom wirusii w badanym materiale. Natomiast na podstawie tego wyniku nie można odpowiedzieć na pytanie jaki to genotyp PERV oraz czy obecny DNA stanowi cały genom wirusowy. Znalezienie odpowiedzi na te pytania wymaga wykonania kolejnych reakcji PCR (rys.)

Genotypowanie PERV na podstawie wyników PCR *env* PERV z zastosowaniem starterów komplementarnych tylko do jednego genotypu endogennego retrowirusa można przeprowadzić techniką PCR genu-*env* charakteryzującego się dużą zmiennością, kodującego dwie glikoproteiny otoczki (PCR III rys.) umożliwia odpowiedź na pyta-



Rys. Genom PERV z zaznaczeniem amplifikowanych sekwencji DNA w diagnostyce wirusologicznej wykonywanej w celu: PCR I – wykazania obecności DNA PERV w badanych komórkach (np. biorcy przeszczepu). PCR II (*long-PCR*) – wykazania obecności pełnej długości genomu PERV – formy infekcyjnej, PCR III – genotypowanie PERV z zastosowaniem starterów specyficznych dla określonego typu wirusa.

nie, które subtypy PERV są obecne w badanych komórkach, a następnie wykluczenie z ksenotransplantacji zwierząt u których występuje subtyp PERV C. Zapobiega to możliwości powstania rekombinantów PERV A /PERV C, które charakteryzują się bardzo dużą infekcyjnością. Reakcja PCR *env* PERV wykonana w obecności specyficznych sond wyznakowanych fluorochromami lub interkalatora SYBER GREEN umożliwi wyznaczenie liczby kopii określonego subtypu PERV w badanych komórkach.

(Q-PCR) Wykonanie kilku reakcji ilościowych QPCR *env* PERV – rys. z zastosowaniem starterów komplementarnych tylko do jednego subtypu PERV pozwala na ocenę relacji ilościowych pomiędzy wirusami w koinfekcjach. W przypadku gdy zachodzi proces przejścia wirusa ze stadium latentnego w aktywne, wtedy następuje zmiana profilu stężeń DNA PERVs w badanym materiale Q-PCR może zatem stanowić marker różnicujący infekcję latentną od aktywnej.

W poszukiwaniu odpowiedzi na pytanie: czy w badanych komórkach występuje PERV infekcyjny, oraz czy wykryte wirusy mają zdolność zakażenia komórek człowieka w pierwszym etapie wykorzystywana jest reakcja *long-PCR* (PCR II – rys.). Zgodnie z założeniem, obecność całej długości genomu (ok. 7000 pz) oznacza obecność formy infekcyjnej PERV co wyklucza kandydata na dawcę narządów z ksenotransplantacji.

W celu zwiększenia precyzji informacji diagnostycznych i zoptymalizowania protokołu badań przebiegu infekcji PERV u biorców do badań włącza się analizę sekwencyjną genomów umożliwiającą wykluczenie u dawcy narządów obecności zrekombinowanych form PERV, których infekcyjność jest trudna do określenia.

W kolejnym etapie badań prowadzona jest analiza tropizmu PERV obecnych w komórkach świnii typowanych do ksenotransplantacji do komórek człowieka *in vivo* oraz *in vitro*. Badania prowadzone są z wykorzystaniem modelowych linii komórkowych, np. linia komórek ludzkich zarodków nerki 293 (ATCC CRL-1573), linia fibroblastów płuca wydry (ATCC CCL-64), linia kocich komórek (PG-4; ATCC CRL-2032) lub linia testowych komórek świńskich ST(ATCC CRL-1746). W przypadku wykazania transmisji PERV do komórek człowieka, FDA zaleca konsultację z powołaną do tych spraw komisją w Centrum Oznaczeń i Badań Biologicznych (CBER, ang. Center for Biologics Evaluation and Research).

Czynniki infekcyjne w ksenotransplantacjach mogą być nie identyfikowane. Jedynie zmiany profilu ekspresji genów gospodarza mogą wskazywać na zakażenie komórki aktywnym wirusem. Badania interakcji pomiędzy wirusem i komórką gospodarza prowadzone są techniką mikromacierzy DNA, białek lub przeciwciał w tym większość interakcji była badana przy użyciu macierzy DNA. Zmiany transkryptomu w zakażonych komórkach indukowane aktywnością wirusa, analizowano np. w zakażeniu: retrowirusami (19), herpesvirusami (20,21), ortomyksowirusami (22), enterowirusami (23,24), adenowirusami (25), wirusami zapalenia wątroby typu B i C (26,27). We wszystkich tych badaniach wskazuje się, że ekspresja genów wirusa ma wpływ na profil ekspresji genów gospodarza.

Najbardziej zaawansowane są badania profilu stężeń mRNA transkryptomu, które stanowią podstawę w typowaniu genów różnicujących komórki prawidłowe od tych patologicznie zmienionych. Badania mające na celu typowanie genów różnicujących wiramię latentną od aktywnej oraz genów różnicujących początek odrzutu przeszczepu od aktywnej wirerii są w toku. Mimo ogromnych kosztów wprowadzenie tych badań do diagnostyki, jak się wydaje, jest realne, zwłaszcza w związku z ustanowieniem standardów minimalnych dla adnotacji badań dotyczących mikromacierzy (ang. *Minimum standards for the Annotation of Microarray Experiments*) (<http://www.mged.org/Annotations-wg/index.html>) i z utworzeniem międzynarodowej bazy danych macierzy (ArrayExpress), która ma służyć jako składnica danych eksperymentalnych (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>).

6. Podsumowanie

Wykorzystanie zwierząt jako dawcy narządów dla człowieka, niesie obawy transmisji na organizm biorcy obcych gatunkowo patogenów. W celu maksymalnego zmniejszenia ryzyka transmisji chorób infekcyjnych ze zwierząt na ludzi bardzo intensywnie prowadzone są badania mające na celu opracowanie strategii selekcji zwierząt u których wykluczono określone patogeny, np. PERV C (wynik PCR env PERV C jest negatywny), brak infekcyjnego lub PCMV, różnicowania wirerii aktywnej od latentnej u biorcy narządów oraz poszukiwanie profilu ekspresji genów gospodarza różnicujących początek odrzutu przeszczepu od aktywnej wirerii. Dodat-

kowo poszukiwane są profile ekspresji genów gospodarza wskazujące typ zakażenia, co znacznie skróci czas detekcji przyczyny zmian chorobowych u biorcy przeszczepu, zwiększając szansę na pozytywny wynik leczenia.

Literatura

1. FDA, *Guidance for Industry: Source Animal, Product, Preclinical, and Clinical Issues Concerning the Use of Xenotransplantation Products in Humans*, (2003), 4/3.
2. Boneva R. S., Folks T. M., Chapman L. E., (2001), *CMR*, 14(1), 1-14.
3. Ustawa z 26 października 1995 r. o pobieraniu i przeszczepianiu komórek, tkanek i narządów. *Dz. U.*, nr 138, poz. 682.
4. Gao F., Bailes E., Robertson D. L., Chen Y., Rodenbyrg C. M., Michael S. F., Cummins L. B., Arthur L. O., Peters M., Shaw G. M., Sharp P. M., Hahn B.H., (1999), *Nature*, 397, 436-441.
5. Toenjes R. R., Niebert M., (2003), *J. Virol.*, 77(22), 12363-12368.
6. Lee J., Webb G., Allen R., Moran C. J., (2002), *Virol.*, 76 (11), 5548-5556.
7. Garkavenko O., Croxson M. C., Irgang M., Karlas A., Denner J., Elliott R. B., (2004), *J. of Clinical Microbiol.*, vol. 42, 11, 5353-5356.
8. Larsson E., Andersson G., (1998), *Scand. J. Immunol.*, 48, 329-338.
9. Ericsson T., Opldmixon B., Blomberg J., Rosa M., et al., (2001), *J. Virol.*, 75 (6), 2765-2770.
10. Blusch J. H., Patience C., Martin U., (2002), *Xenotransplantation*, 9, 242-251.
11. Takeuchi Y., Patience C., Magre S., et al., (1998), *J. Virol.*, 72, 9986-9991.
12. Klymiuk N., Müller M., Brem G., Aigner B., (2003), *J. Gen. Virol.*, 84, 2729-2734.
13. Wilson C. A., Wong S., Muller J., Davidson C. E., Rose T. M., Burd P., (1998), *Journal of Virology*, 72(4), 3082-3087.
14. Patience C., Takeuchi Y., Weiss R., (1997), *Nat. Med.*, 3, 282-286.
15. Paradis K., Langford G., Long Z., Heneine W., Sandstrom P., Switzer W. M., Chapman L. E., Lockey C., Onions D., Otto E., (1999), *Science*, 285(5431), 1236-1241.
16. Garkavenko O., Croxson M. C., Irgang M., Karlas A., Denner J., Elliott R. B., (2004), *Journal of Clinical Microbiology*, 42(11), 5353-5356.
17. Słomski R., Wielgus K., (1998), *Postępy Biologii Komórki*, 24(10), 195-217.
18. Słomski R., Siemieniako B., Kwiatkowska J., Napierała D., Groniek P., (1998), *Postępy Biologii Komórki*, 24(10), 9-28.
19. Geiss G. K., Bumgarner R. E., An M. C., (2000), *Virology*, 266, 8-16.
20. Mossman K. L., Macgregor P. F., Rozmus J. J., Goryachev A. B., Edwards A. M., Smiley J. R., (2001), *J. Virol.*, 75, 750-758.
21. Zhu H., Cong J. P., Mamtora G., Gingeras T., Shenk T., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 14470-14475.
22. Geiss G. K., An M. C., Bumgarner R. E., Hammersmark E., Cunningham D., Katze M. G., (2001), *J. Virol.*, 75, 4321-4331.
23. Peng T., Sadosky T., Li Y., Coulton G. R., Zhang H., Archard L. C., (2001), *Cardiovasc Res.*, 50, 46-55.
24. Taylor L. A., Carthy C. M., Yang D., et al., (2000), *Circ. Res.*, 87, 328-334.
25. Vertegaal A. C., Kuiperij H. B., van Laar T., Scharnhorst V., van der Eb A. J., Zantema A., (2000), *FEBS Lett.*, 487, 151-155.
26. Okabe H., Satoh S., Kato T., et al., (2001), *Cancer Res.*, 61: 2129-2137.
27. Honda M., Kaneko S., Kawai H., Shiota Y., Kobayashi K., (2001), *Gastroenterology*, 120, (4) 955-966.