

# Wykorzystanie nerek transgenicznych świń do przeszczepów allogenicznych i ksenogenicznych

JERZY SKUCIŃSKI, WOJCIECH NOWAK, JAROSŁAW WIECZOREK\*, RAFAŁ SOLECKI

I Katedra Chirurgii Ogólnej Collegium Medicum UJ, ul. Kopernika 40, 31-501 Kraków

\*Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt Instytut Zootechniki w Balicach, ul. Krakowska 1, 32-883 Balice k. Krakowa

Skuciński J., Nowak W., Wieczorek J., Solecki R.

## Use of kidney transgenic pigs to allogenic and xenogenic transplantation

### Summary

In the conducted study the possibility of using the transgenic pig kidneys for allogenic and heterogenic transplantation was evaluated with regards to the clinical context. There were 3 nontransgenic and 6 transgenic pig donors with a human  $\alpha 1.3$ -fukosyltransferase gene. The recipient of the kidneys were 6 nontransgenic and 3 transgenic pigs. The kidneys were heterotopic transplanted to intraperitoneal space. The kidney was transplanted to the left side at the level of 4-5 lumbar vertebra with end-to-side anastomosis of the renal vein and artery with vena cava caudale and aorta, respectively. The proposed surgical model of homological transplantation of kidneys in pigs allows for rapid organ collection without disturbing the structure, with continuous and tight vessel. The immunological response on the base of the changed levels of IL-1, IL-4 IL-6 IL-10 TNF- $\alpha$  and INF- $\gamma$  in the serum were investigated. The acute immunological rejection of the graft was found on cell and humoral bases. There was a weaker immunological response after the transplantation of transgenic kidneys in comparison to nontransgenic organs. Transgenesis has a positive effect on the immunological response.

**Keywords:** xenotransplantation, kidney, pigs

Transplantacje są obecnie rutynową metodą w leczeniu zaawansowanej niewydolności nerek u ludzi. Największym problemem współczesnej transplantologii medycznej jest brak narządów do przeszczepów. Rozwiązaniem problemu będą w przyszłości najprawdopodobniej przeszczepy obcogatunkowe, czyli hetero- lub ksenoprzeszczepy. Pierwszą próbę transplantacji heterogenicznej wykonał Emerich Ulmann, w 1902 r., przeszczepiając nerkę psa chorej w schyłkowym stadium niewydolności nerek (8). Obecnie w 20 ośrodkach na świecie prowadzone są bardzo intensywne badania w tym zakresie (3). Mimo widocznych osiągnięć i perspektyw ksenotransplantacji istnieją bardzo liczne, istotne problemy. Obejmują one aspekty kliniczne, odpowiedź immunologiczną biorcy na przeszczep, ryzyko infekcji i przenoszenia chorób zakaźnych od zwierząt oraz wątpliwości etyczne.

Najistotniejsze wydają się różnice międzygatunkowe. Odrzucanie przeszczepu obcogatunkowego następuje w reakcji humoralnej przez naturalne przeciwciała skierowane swoicie przeciwko epitopom galaktozy- $\alpha 1$ -3galaktozy ( $\alpha$  Gal). Przeciwciała anty- $\alpha$ -gal powstają w pierwszych kilku tygodniach życia w naturalnej odpowiedzi na kolonizację układu pokarmowego przez mikroorganizmy, wykazujące ekspresję struktur  $\alpha$ -gal na błonach komórkowych (9). Epitopy

( $\alpha$  Gal) występują na powierzchni śródbłonna naczyń u większości gatunków z wyjątkiem ludzi, małą cząłkkształtnych i małą starego świata (10). Wbudowane są w struktury komórkowych glikolipidów i glikoprotein (23). Powstające przeciwciała skierowane przeciwko epitopom  $\alpha$  Gal należą do grup IgM, IgG i IgA (4). Na skutek wysokiego miana przeciwciał odrzucenie przeszczepu obcogatunkowego w nadostrej reakcji odrzucania (Hyperacute Reaction HAR) rozpoczyna się w ciągu zaledwie kilkunastu-kilkudziesięciu minut, na drodze klasycznej aktywacji układu dopełniacza (3, 12). Gdy nie dojdzie do nadostrej reakcji, transplant może zostać odrzucony w ciągu kilku dni na drodze ostrego odrzucania naczyniowego (Acute Vascular Reaction AVR), w mieszanej odpowiedzi immunologicznej (22), trzecią drogą odrzucenia przeszczepu jest odpowiedź komórkowa, w której biorą udział limfocyty NK, CD4+, CD8, makrofagi (11, 20).

Celem badań było określenie możliwości wykorzystania nerek transgenicznych świń do przeszczepów allogenicznych i heterogenicznych w aspekcie klinicznym z uwzględnieniem metodyki chirurgicznej. Badania miały na celu opracowanie techniki przeszczepiania nerek i określenie odpowiedzi immunologicznej biorcy na przeszczepioną nerkę. Niniejsza publikacja jest pierwszą w Polsce dotyczącą tego tematu.

## Materiał i metody

**Przeszczepianie nerek.** W doświadczeniu wykorzystano 9 transgenicznych i 9 nietransgenicznych loszek w wieku ok. 6 miesięcy, masie ciała 40-55 kg, bez widocznych objawów chorobowych. Zwierzęta podzielono na 3 grupy po 6 zwierząt w każdej według układu podanego w tab. 1.

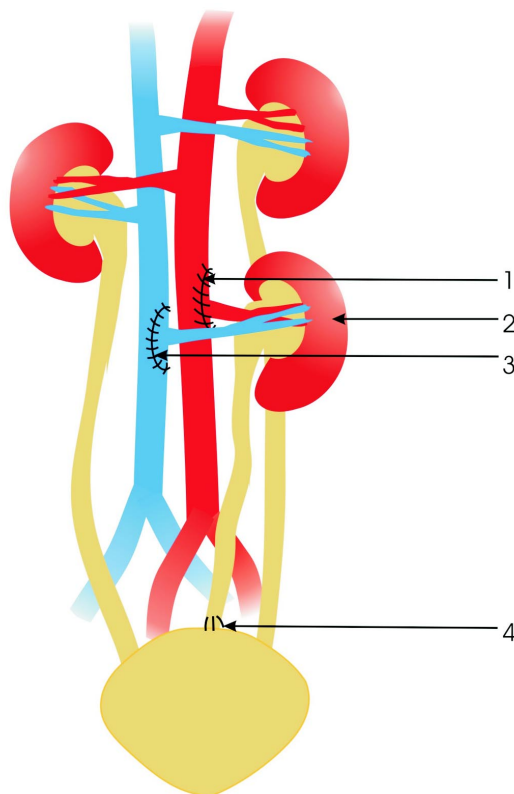
Dodatkową grupę stanowiło 5 zwierząt nietransgenicznych trzymany w warunkach hodowlanych przez cały czas trwania doświadczenia. Taki układ doświadczenia pozwalał na ocenę reakcji operowanych zwierząt oraz porównanie między zwierzętami transgenicznymi i nietransgenicznymi.

Pobranie, perfuzję i kwalifikację do przeszczepu pobranych nerek przeprowadzono według wcześniej opisanego schematu (19). Nerkę przed przeszczepieniem umieszczono w elastycznym opatrunku zapewniającym możliwość swobodnego i bezurazowego manipulowania z zachowaniem stałej temperatury 4°C do momentu zakończenia zespolenia naczyniowego i zwolnienia klemów naczyniowych.

Przygotowanie biorców do zabiegu, premedykacja, indukcja i prowadzenie znieczulenia były analogiczne jak podczas operacji pobrania nerek (19). W trakcie zabiegu prowadzono ciągły wlew płynów izotonicznych o składzie 1/3 objętości 5% glukozy i 2/3 objętości 0,9% NaCl w ilości 15 ml/kg m.c./h.

**Tab. 1. Układ doświadczenia. Podział na grupy w zależności od statusu genetycznego dawców i biorców nerek**

Lp.	Grupa	Dawca	Biorca
1	N-N	nietransgeniczny	nietransgeniczny
2	T-N	transgeniczny	nietransgeniczny
3	T-T	transgeniczny	transgeniczny



**Ryc. 1. Schemat wszczepienia nerek**

Objaśnienia: 1 – zespolenie tętnicze; 2 – wszczepiona nerka; 3 – zespolenie żylny; 4 – zespolenie moczowodowe

Nerkę przeszczepiono lewostronnie do przestrzeni wewnątrztrzewnowej na wysokości 4.-5. kręgu lędźwiowego. Dostęp do jamy otrzewnej wykonano analogicznie jak podczas operacji pobrania. Wypreparowano aortę i jej rozwidlenie, żyłę czczą tylną oraz dno pęcherza moczowego. Wszczępienie pobranej uprzednio nerki wykonano przez zespolenie żyły i tętnicy nerkowej odpowiednio z żyłą główną tylną i aortą typu koniec do boku na łacie naczyniowej, przy użyciu szwu ciągłego typu Prolen 4.0 (J&J Inc.). Najpierw wykonywano zespolenie żylny, następnie tętnicze. W przypadku nieszczelności zespolień zakładano pojedyncze dodatkowe szwy uszczelniające. Na czas wykonywania zespolień na żyłę czczą i aortę w miejscu zespolenia zakładano styczne klemy naczyniowe Satyńskiego, w sposób nie upośledzający ukrwienia kończyn tylnych i pozwalający na wykonanie zespolień w bezkrwawym polu operacyjnym. Naczynia nacinano na długości odpowiadającej długości wstawianej łąty. Ostatnim etapem wszczępienia nerki było zespolenie moczowodowe polegające na swobodnym umieszczeniu moczowodu w otworze w dnie pęcherza i umocowaniu go szwami pojedynczymi przez całą grubość ściany pęcherza i moczowodu szwem Dexon 3.0 (J&J Inc.) (ryc. 1). Ranę pooperacyjną zeszyto trzema piętarami szwów: pierwszym piętrem otrzewną trzewną, otrzewną ścienną z powięzią i mięśniami, w drugim zakładając na mięśnie szew ciągły Vicryl 2, w trzecim skórę szwem ciągłym Prolen 2. Bezpośrednio po zabiegu podano furosemid (Furosemidum Polpharma S.A.) w dawce 1 mg/kg i.v., którą powtórzono po 2 i 4 godzinach, chlorowodorek tramadolu (Tramal Grunenthal GmbH) w dawce 2 mg/kg i.m., ketoprofen (Ketonal®, Lek) w dawce 2 mg/kg i.m., enrofloksacyne (Enroxil 5%, Krka) w dawce 5 mg/kg i.m., kontynuowano wlew płynów izotonicznych do ogólnej ilości 3500 ml przez następne 5 godzin.

**Postępowanie pooperacyjne** w zależności od stanu ogólnego biorczyń obejmowało: wlew płynów izotonicznych w ilości 3000 ml/dobę przez 3-5 dni po zabiegu, podanie chlorowodoru tramadolu (Tramal Grunenthal GmbH) 2-4 mg/kg i.m., w trzech dawkach podzielonych, ketoprofenu (Ketonal®, Lek) 2-4 mg/kg i.m., w dwóch dawkach podzielonych, azaperonu (Stresnil, Janssen Animal Health BVBA) 3 mg/kg i.m., w trzech dawkach podzielonych. przez 5-6 dni po zabiegu, enrofloksacyne (Enroxil 5%, Krka) 5 mg/kg i.m. przez pierwsze 5 dni po zabiegu i 2,5 mg/kg i.m. przez kolejne 12 dni.

U biorczyń narządów 7-krotnie pobierano 20 ml krwi żyłnej: tuż przed zabiegiem, bezpośrednio po zabiegu, po 24, 48 i 72 godzinach oraz w 7. i 14. dniu po przeszczepie. Z krwi pełnej pozyskiwano surowicę, którą przechowywano do dalszych badań w temp. początkowo -20°C, a następnie -70°C.

W surowicy badano poziom cytokin: IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  i INF- $\gamma$ . IL-1, IL-4 IL-6 IL-10 TNF- $\alpha$  oznaczano metodą elisa testami: porcine IL-1 $\beta$ /IL-1F2 (nr kat. DY681), porcine IL-4 (nr kat. DY654), porcine IL-6 (nr kat. DY686), porcine IL-10 (nr kat. DY693), porcine TNF- $\alpha$ /TNFSF1A (nr kat. DY690) firm R&D. Interferon gamma oznaczono testem elisa: swIFN-gamma Elisa (nr kat. 45-IFNGS-4021) firmy IBL. Oznaczenie wykonano aparatem Tecan IDEXX Spectra Classic, Austria.

Analizę statystyczną wyników wykonano programem Statistica 6.0 Pl. Sprawdzenie zgodności rozkładu zmiennej losowej z rozkładem normalnym wykonano testem Shapiro-Wilka, analizę danych pod kątem jednorodności wariancji testem Levena i analizę wariancji dla powtarzanych pomiarów z uwzględnieniem zmian w czasie i najniższych istotnych różnic testem NIR.

## Wyniki i omówienie

Podobnie jak operacja pobrania nerek, zaproponowana metoda przeszczepienia nerki u świni wywodziła się z metodyki stosowanej w medycynie człowieka.

Czas operacji transplantacji nerki wynosił 90-120 minut. W operacji przeszczepienia nerki wprowadzono zasadnicze modyfikacje. Przeszczep heterotropowy z pozostawieniem nerek biorczyń wykonano do przestrzeni wewnątrztrzewnowej z zespoleniem naczyń nerkowych z głównymi pniami naczyniowymi i luźnym umieszczeniem transplantu w jamie brzusznej. Zespolenie naczyń wykonano na wysokości 4.-5. kręgu lędźwiowego, możliwie blisko odejścia tętnicy kręzkowej doogonowej i odgałęzień końcowych aorty. Zaproponowana technika wszczepienia nerki zapewniała swobodny dostęp do miejsca operacji, prosty dostęp do głównych pni naczyniowych i ich izolację, wykonanie zespolenia żylnego i tętniczego przy zachowanym ukrwieniu położonych niżej zespolenia części ciała oraz prostą anastomozę moczowodu. Zespolenie naczyń krwionośnych wykonano techniką koniec do boku z zachowaniem 3-4 mm łaty na tętnicy i żyłę nerkowej a przyjęto ją jako metodę z wyboru ze względu na liczne odmiany anatomiczne naczyń, które obserwowano u 6 z 18 pobranych nerek (19). Bezpośrednio po uwolnieniu klemy naczyniowej obserwowano prawidłowe wypełnianie nerki, ze zmianą jędrności i barwy narządu. W dwóch przypadkach założono po jednym dodatkowym szwie pojedynczym na zespolenie żyłne i tętnicze, jedno zespolenie żyłne pozostawiono do samouszczelnienia. Z 9 operacji przeszczepienia 8 zakończyło się powodzeniem. U zwierząt obserwowano obniżenie pragnienia trwające 24-36 godzin po zabiegu, stopniowy powrót apetytu w ciągu 4-12 dni po zabiegu i niskiego stopnia objawy bólowe, ustępujące stopniowo w ciągu 4-6 dni po operacji. Ilość oddawanego moczu wynosiła 1-2 l/dobę. U jednej lochy od 12. dnia wystąpiło szybkie pogorszenie stanu zdrowia z objawami utraty pragnienia i apetytu, błądząścią błon śluzowych naturalnych otworów ciała, niewydolnością sercowo-oddechową, powiększeniem, napięciem i wzmożoną tkliwością powłok brzusznych i oligurią. Sekcyjnie stwierdzono ropne zapalenie nerek, ropne zapalenie pęcherza moczowego, znaczną ilość płynu w jamie brzusznej, zapalenie otrzewnej i nieszczelność zespolenia moczowodowego. Pozostałe zwierzęta były obserwowane do 60. dnia po operacji, nie wykazywały w tym czasie widocznych objawów chorobowych. Nie obserwowano różnic

stanu klinicznego w okresie 60 dni po operacji między zwierzętami nietransgenicznymi i transgenicznymi.

W niniejszych badaniach uzyskano lepsze rezultaty w porównaniu z różnymi stosowanymi wcześniej sposobami postępowania. Uzyskano znacznie wyższą przeżywalność zwierząt w porównaniu do transplantacji heterotropowej do przestrzeni wewnątrztrzewnowej z przeszczepieniem obu nerek w bloku z zespoleniem głównych pni naczyniowych koniec do boku lub zespoleniem żyły czczej tylnej przeszczepu z żyłą wrotną biorczyni (13, 14). Wykazano także wyższą przeżywalność biorczyń w porównaniu z transplantacją do przestrzeni wewnątrztrzewnowej z zespoleniem naczyń nerkowych z tętnicą i żyłą biodrową wspólną (24). Uzyskano porównywalne wyniki z techniką ortotopową, w której przeszczep *en block* wstawiono w miejsce nerek własnych biorczyni (21). Oceniono, że osiągnięto prawidłową pracę przeszczepionej nerki do momentu odrzucenia transplantu przez organizm biorcy.

Różnice genetyczne między dawcą a biorcą prowadzą do rozpoznania przeszczepu niezgodnego antygenowo i do odrzucenia go na drodze humoralnej i komórkowej. W niniejszym doświadczeniu reakcję immunologiczną określono na podstawie wybranych cytokin.

Uzyskane wyniki przedstawiono w tab. 2-7.

U wszystkich biorców stwierdzono znaczny wzrost poziomu cytokin w pierwszych 48-72 godzinach po zabiegu, ze spadkiem ich wartości w ciągu kolejnych 11 dni, tj. do 14. dnia po transplantacji. Pomimo spadku wartości cytokin utrzymywały się na wysokim poziomie i 14. dnia po przeszczepie były znacznie wyższe w porównaniu z wartościami wyjściowymi. U świń biorców stwierdzono także przez cały okres doświadczenia znacznie wyższe wartości w porównaniu z grupą kontrolną zwierząt hodowlanych.

Wystąpiły istotne różnice między grupami biorców. W grupie 1 (biorcy po transplantacji nietransgeniczny-nietransgeniczny) w porównaniu z grupą 2 i 3 stwierdzono znacznie wyższe wartości cytokin: IL-1, IL-10, TNF i INF- $\gamma$  utrzymujące się przez cały okres doświadczenia, a w przypadku IL-6 od 72 godziny po zabiegu. Jedynie IL-4 w grupie 1 wykazała wartości niższe w porównaniu z grupą 3 (transgeniczny-transgeniczny) i porównywalne z grupą 2 (transgeniczny-nietransgeniczny). Wyniki uzyskane w grupach 2 i 3 w większości badanych cytokin są porównywalne, z wyjątkiem IL-4 i częściowo IL-6, gdzie obserwowano wyższe wartości w grupie 3 (transgeniczny-transgeniczny). Uzyskane

Tab. 2. Zmiana zawartości interleukiny 1 (IL-1) w surowicy świń (ng/ml) w zależności od grupy i czasu po przeszczepie

Grupa	Pobranie						
	0	3 h	24 h	48 h	72 h	7 dni	14 dni
Kontrola	20,18 ± 2,64	23,74 ± 2,63	27,32 <sup>abc</sup> ± 2,34	25,40 <sup>abc</sup> ± 3,61	24,25 <sup>abc</sup> ± 4,37	30,73 <sup>abc</sup> ± 5,42	28,41 <sup>abc</sup> ± 3,66
N-N (1)	21,53 ± 1,95	24,83 ± 2,88	50,95 <sup>cde</sup> ± 7,03	63,09 <sup>cde</sup> ± 4,30	59,99 <sup>cde</sup> ± 6,00	63,04 <sup>cde</sup> ± 7,57	48,15 <sup>cde</sup> ± 5,54
T-N (2)	22,03 ± 1,62	27,18 ± 2,37	44,11 <sup>ad</sup> ± 3,00	57,39 <sup>ad</sup> ± 3,84	50,20 <sup>ad</sup> ± 4,70	53,12 <sup>ad</sup> ± 3,98	42,17 <sup>ad</sup> ± 2,83
T-T (3)	21,93 ± 1,14	23,69 ± 4,27	45,53 <sup>be</sup> ± 3,56	53,36 <sup>be</sup> ± 3,95	50,91 <sup>be</sup> ± 3,63	46,20 <sup>be</sup> ± 4,67	39,64 <sup>be</sup> ± 4,36

Objaśnienia: średnie wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy: a, b –  $p \leq 0,001$ ; c –  $p \leq 0,003$ ; d, e –  $p \leq 0,05$

Tab. 3. Zmiana zawartości interleukiny 4 (IL-4) w surowicy świń (ng/ml) w zależności od grupy i czasu po przeszczepie

Grupa	Pobranie						
	0	3 h	24 h	48 h	72 h	7 dni	14 dni
Kontrola	55,86 ± 4,29	59,22 <sup>abc</sup> ± 9,32	46,873 <sup>abc</sup> ± 8,57	44,02 <sup>abc</sup> ± 6,15	58,99 <sup>abc</sup> ± 4,22	69,51 <sup>abc</sup> ± 5,93	61,88 <sup>abc</sup> ± 7,61
N-N (1)	68,45 ± 11,66	81,93 <sup>c</sup> ± 8,37	122,88 <sup>cd</sup> ± 9,20	122,38 <sup>cde</sup> ± 19,71	96,20 <sup>cde</sup> ± 7,49	88,22 <sup>cde</sup> ± 6,57	101,12 <sup>cde</sup> ± 13,05
T-N (2)	69,03 ± 4,03	92,37 <sup>b</sup> ± 2,97	117,55 <sup>bd</sup> ± 9,48	114,22 <sup>bd</sup> ± 7,23	100,33 <sup>bd</sup> ± 3,73	91,83 <sup>bd</sup> ± 6,93	94,53 <sup>bd</sup> ± 5,33
T-T (3)	70,83 ± 4,20	85,67 <sup>a</sup> ± 8,71	125,82 <sup>a</sup> ± 8,02	137,58 <sup>ae</sup> ± 10,09	115,10 <sup>ae</sup> ± 3,81	104,12 <sup>ae</sup> ± 11,29	107,75 <sup>ae</sup> ± 12,13

Objaśnienia: średnie wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy: a –  $p \leq 0,001$ ; b –  $p \leq 0,003$ ; c –  $p \leq 0,005$ ; d, e –  $p \leq 0,05$

Tab. 4. Zmiana zawartości interleukiny 6 (IL-6) w surowicy świń (ng/ml) w zależności od grupy i czasu po przeszczepie

Grupa	Pobranie						
	0	3 h	24 h	48 h	72 h	7 dni	14 dni
Kontrola	10,82 ± 4,19	11,45 <sup>ac</sup> ± 3,81	12,88 <sup>abc</sup> ± 2,08	11,36 <sup>abc</sup> ± 1,23	11,41 <sup>abc</sup> ± 3,58	14,80 <sup>abc</sup> ± 2,61	14,21 <sup>abc</sup> ± 1,87
N-N (1)	12,01 ± 0,86	15,77 <sup>a</sup> ± 0,80	17,56 <sup>a</sup> ± 1,26	20,26 <sup>a</sup> ± 0,99	25,04 <sup>ad</sup> ± 1,27	22,42 <sup>ad</sup> ± 1,93	19,70 <sup>a</sup> ± 1,22
T-N (2)	11,39 ± 0,49	15,54 <sup>c</sup> ± 0,99	18,03 <sup>c</sup> ± 1,08	19,17 <sup>c</sup> ± 1,16	20,47 <sup>cd</sup> ± 1,20	19,87 <sup>cd</sup> ± 1,44	18,69 <sup>c</sup> ± 0,83
T-T (3)	12,28 ± 0,68	14,17 ± 1,10	20,84 <sup>b</sup> ± 1,51	22,91 <sup>b</sup> ± 2,64	22,16 <sup>b</sup> ± 1,62	19,07 <sup>b</sup> ± 1,35	16,60 <sup>b</sup> ± 1,25

Objaśnienia: średnie wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy: a –  $p \leq 0,00005$ ; b –  $p \leq 0,0002$ ; c –  $p \leq 0,0005$ ; d –  $p \leq 0,02$

Tab. 5. Zmiana zawartości interleukiny 10 (IL-10) w surowicy świń (ng/ml) w zależności od grupy i czasu po przeszczepie

Grupa	Pobranie						
	0	3 h	24 h	48 h	72 h	7 dni	14 dni
Kontrola	13,47 ± 1,26	13,32 <sup>abd</sup> ± 0,47	14,69 <sup>abd</sup> ± 0,67	13,62 <sup>abd</sup> ± 1,62	13,94 <sup>abd</sup> ± 1,54	15,07 <sup>abd</sup> ± 0,98	14,12 <sup>abd</sup> ± 0,63
N-N (1)	11,16 ± 1,37	17,78 <sup>ac</sup> ± 3,16	22,96 <sup>ac</sup> ± 3,70	26,29 <sup>ac</sup> ± 1,53	25,64 <sup>ac</sup> ± 2,85	22,39 <sup>ac</sup> ± 2,74	21,60 <sup>ac</sup> ± 1,94
T-N (2)	11,65 ± 1,12	15,60 <sup>cd</sup> ± 0,63	20,11 <sup>cd</sup> ± 1,19	22,77 <sup>cd</sup> ± 1,40	22,42 <sup>cd</sup> ± 1,83	18,79 <sup>cd</sup> ± 1,47	17,30 <sup>cd</sup> ± 0,82
T-T (3)	11,09 ± 1,23	19,60 <sup>b</sup> ± 1,90	21,32 <sup>b</sup> ± 1,67	23,21 <sup>b</sup> ± 2,52	21,91 <sup>b</sup> ± 2,68	20,43 <sup>b</sup> ± 3,80	18,74 <sup>b</sup> ± 1,20

Objaśnienia: średnie wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy: a –  $p \leq 0,002$ ; b, c –  $p \leq 0,02$ ; d –  $p \leq 0,05$

Tab. 6. Zmiana zawartości TNF- $\alpha$  w surowicy świń (ng/ml) w zależności od grupy i czasu po przeszczepie

Grupa	Pobranie						
	0	3 h	24 h	48 h	72 h	7 dni	14 dni
Kontrola	13,02 ± 1,49	14,56 ± 1,74	16,82 <sup>abc</sup> ± 1,13	15,35 <sup>abc</sup> ± 1,32	18,63 <sup>abc</sup> ± 1,47	18,37 <sup>abc</sup> ± 1,28	15,72 <sup>abc</sup> ± 1,45
N-N (1)	10,66 ± 1,08	13,12 ± 2,05	31,33 <sup>ade</sup> ± 3,97	40,35 <sup>ade</sup> ± 4,70	50,48 <sup>ade</sup> ± 4,54	45,16 <sup>ade</sup> ± 3,96	36,20 <sup>ad</sup> ± 3,50
T-N (2)	11,64 ± 0,94	14,32 ± 0,94	20,40 <sup>bd</sup> ± 1,14	35,99 <sup>bd</sup> ± 2,28	43,35 <sup>bd</sup> ± 2,20	36,53 <sup>bd</sup> ± 2,04	28,29 <sup>bd</sup> ± 2,21
T-T (3)	11,95 ± 1,47	13,89 ± 2,28	23,73 <sup>ce</sup> ± 4,24	35,54 <sup>ce</sup> ± 3,11	43,11 ± 3,49	35,49 <sup>ce</sup> ± 2,54	31,00 <sup>c</sup> ± 3,10

Objaśnienia: średnie wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy: a –  $p \leq 0,0001$ ; b, c –  $p \leq 0,0002$ ; d –  $p \leq 0,003$ ; e –  $p \leq 0,005$

Tab. 7. Zmiana zawartości interferonu gamma (IFN- $\gamma$ ) w surowicy świń (pg/ml) w zależności od grupy i czasu po przeszczepie

Grupa	Pobranie						
	0	3 h	24 h	48 h	72 h	7 dni	14 dni
Kontrola	82,03 ± 7,46	80,15 <sup>abc</sup> ± 13,14	94,05 <sup>abc</sup> ± 9,06	79,97 <sup>abc</sup> ± 10,24	97,69 <sup>abc</sup> ± 8,43	117,46 <sup>abc</sup> ± 13,10	141,00 <sup>abc</sup> ± 10,11
N-N (1)	128,33 ± 21,29	177,83 <sup>ad</sup> ± 44,91	252,00 <sup>ad</sup> ± 45,14	315,00 <sup>ad</sup> ± 59,91	448,33 <sup>ad</sup> ± 72,07	386,33 <sup>a</sup> ± 87,79	365,83 <sup>a</sup> ± 79,83
T-N (2)	88,00 ± 2,76	113,17 <sup>bd</sup> ± 7,31	158,83 <sup>bd</sup> ± 20,20	256,50 ± 21,27	375,00 <sup>bd</sup> ± 20,71	351,67 <sup>b</sup> ± 13,52	325,67 <sup>b</sup> ± 17,90
T-T (3)	82,50 ± 10,37	105,3 <sup>c</sup> ± 21,43	176,7 <sup>c</sup> ± 18,86	247,3 <sup>c</sup> ± 47,91	388,3 <sup>c</sup> ± 45,94	369,7 <sup>c</sup> ± 71,23	342,3 <sup>c</sup> ± 38,17

Objaśnienia: średnie wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy: a –  $p \leq 0,0001$ ; b, c –  $p \leq 0,001$ ; d –  $p \leq 0,05$

wyniki wskazują na ostrą reakcję komórkową i humoralną biorców z ostrym odrzuceniem greftu.

Cytokiny są głównym mediatorem odrzucenia przeszczepu, przenoszą informację między komórkami, a ich istotną cechą jest wywoływanie różnych efektów na różnych komórkach. Stwierdzono, że w odrzuceniu przeszczepu uczestniczą IL-1, -2, -4, -5, -6, -7, -12, -15, -18, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  na różnych poziomach odpowiedzi. Cytokiny są bardzo czułym wskaźnikiem procesów zapalnych. U świń w badaniach *in vitro* stwierdzono bardzo wysoki, kilkunastokrotny wzrost poziomu IFN- $\gamma$ , IL-10 i IL-4 na antygeny wirusowe PCV2 w ciągu 48-72 godzin po ekspozycji wirusa (5). Wyniki szeregu badań wykazały znaczne zmiany poziomu cytokin u świń po transplantacji nerek. Odnotowano znaczny wzrost poziomu IL-6 od 4. do 10. dnia po transplantacji z towarzyszącym naciekiem makrofagów i znacznym wzrostem IgM i IgG skierowanym przeciwko błonom komórkowym przeszczepu (1). Zwraca się uwagę na wzrost poziomu IL-4, której przypisuje się rolę ochronną przeszczepu przez neutralizujący wpływ na TNF- $\alpha$  (17). Interesujące wyniki uzyskali Blanco i wsp., wskazali na bardzo wysoki wzrost INF- $\gamma$  w ciągu pierwszych 4 dni po zabiegu bez zmian poziomu IL-10 u biorców, u których doszło do odrzutu przeszczepu. Wskazali także niewielkie zmiany poziomu INF i wysoki wzrost poziomu IL-10 od 8. dnia po transplantacji u biorców, u których nie doszło do odrzucenia (2). Najistotniejszymi wydają się cytokiny związane z limfocytami pomocniczymi Th1 i Th2, z których pierwsze wspomagają reakcje komórkowe, drugie humoralne. Główną cytokiną produkowaną przez Th1 jest IFN- $\gamma$  aktywujący makrofagi, komórki cytotoksyczne NK, zwiększający ekspresję antygenów, ale uczestniczący także w różnicowaniu limfocytów B i hamowaniu Th2 (6, 16). Aktywowane makrofagi wytwarzają mediatory stanu zapalnego IL-1 i TNF- $\alpha$ . Te ostatnie zaś powodują pojawienie się w limfocytów, neutrofilii i monocytów powodujących destrukcję tkanki (15, 18), w konsekwencji proliferację fibroblastów, wytwarzanie kolagenu i zwłóknienie tkanki.

Limfocyty subpopulacji Th2 produkują większą ilość cytokin, do których należą: IL-4 stymulująca limfocyty B do proliferacji i wytwarzania przeciwciał, aktywacji makrofagów i komórek tucznych, IL-6 stymulująca limfocyty B do produkcji przeciwciał, IL-10 hamująca wytwarzanie cytokin przez Th1, monocyty i makrofagi (2, 6, 7, 24).

W niniejszej pracy stwierdzono wyraźne różnice między grupami. U biorców transgenicznych i nietransgenicznych wystąpiła podobna reakcja immunologiczna po transplantacji nerek transgenicznych. Na tej podstawie można sądzić, że status genetyczny biorcy nie odgrywał tak istotnego znaczenia. Istotne znaczenie wydaje się mieć status genetyczny dawcy, bowiem po transplantacji nerek transgenicznych stwierdzono mniejsze zmiany wartości cytokin niż po transplantacji nerek pochodzących od zwierząt nietransgenicznych. Wykazano słabszą reakcję immunologiczną w porównaniu z przeszczepami niemodyfikowanymi genetycznie, przeprowadzona transgeneza wpłynęła zatem korzystnie na

immunogenność przeszczepu. Dodatkowo biorąc pod uwagę, że badania prowadzono bez immunosupresji, uzyskane wyniki pozwalają na wysunięcie hipotezy o zmniejszonej immunogenności transplantatu także w warunkach klinicznych z zastosowaniem pełnej immunosupresji analogicznej jak w transplantologii człowieka.

## Piśmiennictwo

1. Benda B., Korsgren O.: Interleukin-6 in islet xenograft rejection. *Transpl. Int.* 2001, 14, 63-71.
2. Blacho G., Gianello P., Germana S., Baetschert M., Sachs D. H., Leguern C.: Molecular identification of porcine interleukin 10: Regulation of expression in a kidney allograft model. *Proc. Natl Acad. Sci.* 1995, 92, 2800-2804.
3. Bühler L., Friedman T., Iacomini J., Cooper D. K. C.: Xenotransplantation – state of the hear – update 1999. *Frontiers Biosci.* 1999, 4, 416-432.
4. Cooper D. K., Koren E., Oriol R.: Oligosaccharides and discordant xenotransplantation. *Immunol Rev.* 1994, 141, 31-58.
5. Darwich L., Balasch M., Plana-Durán J., Segalés J., Domingo M., Mateu E.: Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome in response to mitogen, superantigen or recall viral antigens. *J. Gen. Virol.* 2003, 84, 3453-3457.
6. De Groot J., Kruijt L., Scholten J. W., Boersma W. J. A., Buist W. G., Engel B., van Reenen C. G.: Age, gender and litter-related variation in T-lymphocyte cytokine production in young pigs. *Immunology* 2005, 115, 495-505.
7. Deol H. S., Tuch B. E.: Effect of interleukin-10 on human anti-porcine xenogeneic cellular response in vitro. *Transplantation* 2000, 69, 112-119.
8. Deschamps J. Y., Roux J. Y., Sai P., Gouin E.: History of xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2005, 12, 91-109.
9. Galili U., Mandrell R. E., Hamadeh R. M., Shohet R. B., Griffiss J. M.: The interaction between the human natural anti-a galactosyl IgG (anti-Gal) and bacteria of the human flora. *Infect. Immun.* 1988, 57, 1730-1737.
10. Hammerman M. R.: Xenotransplantation of developing kidneys. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2002, 283, 601-606.
11. Karlsson-Parra A., Ridderstad A., Wallgren A. C., Moller E., Ljunggren H. G., Korsgren O.: Xenograft rejection of porcine islet-like cell clusters in normal and natural killer cell-depleted mice. *Transplantation* 1996, 61, 1313-1320.
12. Lambrijs D., Sachs D. H., Cooper D. K. C.: Discordant organ xenotransplantation in primates – world experience and current status. *Transplantation* 1998, 66, 547-561.
13. Mazzoni G., Di Martino C., Demofonti A., Valli A., Pellegrini S., Genili B., Melis M.: Simultaneous allografts of both kidneys in pigs with different portal and caval venous drainage. *Am. J. Surg.* 1972, 124, 39-42.
14. Mazzoni G., Di Martino C., demofonti A., Valli A., Pellegrini S., Genili B., Melis M.: A comparison of portal and systemic venous drainage in porcine renal allografts. *Br. J. Surg.* 1972, 59, 541-544.
15. Noronha I. L., Oliveira S. G., Tavares T. S., Di Petta A., Dominguez W. V., Perosa M., Genzini T., Romao J. E. Jr., Abensur H., Moura L. A., Filho D. M.: Apoptosis in kidney and pancreas allograft biopsies. *Transplantation* 2005, 79, 1231-1235.
16. Olack B., Jaramillo A., Benschhoff N. D., Kaleem Z., Swanson C. J., Lowell J. A., Mohanakumar T.: Rejection of porcine islet xenografts mediated by CD4+ T cells activated through the indirect antigen recognition pathway. *Xenotransplantation* 2002, 9, 393-401.
17. Olack B., Manna P., Jaramillo A., Steward N., Swanson C., Kaesberg K., Poindexter N., Howard T., Mohanakumar T.: Indirect recognition of porcine swine leukocyte Ag class I molecules expressed on islets by human CD4+ T lymphocytes. *J. Immunol.* 2000, 165, 1294-1299.
18. Shimizu A., Yamada K., Meehan S. M., Sachs D. H., Colvin R. B.: Acceptance reaction: intragraft events associated with tolerance to renal allografts in miniature swine. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000, 11, 2371-2380.
19. Skuciński J., Nowak W., Wieczorek J., Solecki R.: Chirurgiczne aspekty pobierania nerek u świń dla celów ksenotransplantacji. *Medycyna Wet.* (w druku).
20. Wallgren A. C., Karlsson-Parra A., Korsgren O.: The main infiltrating cell in xenograft rejection is a CD4+ macrophage and not a T lymphocyte. *Transplantation* 1995, 60, 594-601.
21. Wang K., Li Y., Jiang H., Shen J., Zhang L.: Pig orthotopic renal allotransplantation model. *Transplant Proc.* 2003, 35, 191.
22. Williams J. M., Holzknecht Z. E., Plummer T. B., Lin S. S., Brun G. J., Platt J. L.: Acute vascular rejection and accommodation: divergent outcomes of the humoral response to organ transplantation. *Transplantation* 2004, 78, 1471-1478.
23. Xu X. C., Naziruddin B., Sasaki H., Smith D. M., Mohanakumar T.: Allele-specific and peptide-dependent recognition of swine leukocyte antigen class I by human cytotoxic T-cell clones. *Transplantation* 1999, 68, 473-479.
24. Yanaga K., Makowka L., Shimada M., Lebeau G., Kahn D., Miesles L. A., Sher L., Chapchap P., Podesta L. G., Starzl T. E.: Improved method of porcine renal allografting for transplantation research. *J. Invest. Surg.* 1991, 4, 231-236.

Adres autora: dr n. med. Jerzy Skuciński, ul. Kopernika 40, 31-501 Kraków; e-mail: msskucin@cyf-kr.edu.pl