

MAŁGORZATA KLOC

[HTTPS://ORCID.ORG/0000-0002-5192-8584](https://orcid.org/0000-0002-5192-8584)

The Houston Methodist Research Institute, Transplant Immunology, Houston, TX, USA

The Houston Methodist Hospital, Department of Surgery, Houston, TX, USA

The University of Texas, MD Anderson Cancer Center, Department of Genetics, Houston, TX, USA

The Houston Methodist Hospital Research Institute, 6670 Bertner Ave., Houston, TX 77030, MS: R7–203

e-mail: mkloc@houstonmethodist.org

Przeszczepy narządów: postęp i problemy do rozwiązania

Organ transplantation: progress and challenges

https://doi.org/10.36921/kos.2023_2926

Abstrakt

Przeszczep narządu jest jedynym ratunkiem dla osób których organy zostały nieodwracalnie zniszczone. Odrzucanie chroniczne (przewlekłe) przeszczepu jest nierozwiązanym problemem w transplantacji. W ciągu 10 lat po transplantacji około 70% przeszczepionych narządów jest odrzucanych właśnie z powodu odrzucania chronicznego. Jest ono powodowane zablokowaniem światła naczyń krwionośnych i zwłóknieniem tkanek przeszczepionego narządu. Zmiany te zachodzą pod wpływem makrofagów, które migrują do przeszczepu z krwi biorcy. Wnikanie makrofagów do przeszczepu regulowane jest przez ścieżkę sygnalizacją małej GTPazy RhoA, która reguluje aktywny cytoskielet niezbędny do poruszania się makrofagów. Zablokowanie funkcji tego białka genetyczne (usunięcie genu RhoA) lub farmakologiczne (podanie inhibitorów chemicznych ścieżki RhoA) zapobiega wędrowaniu makrofagów do przeszczepu i eliminuje jego odrzucanie chroniczne. W poniższym artykule opisujemy nasze badania dotyczące chronicznego odrzucania przeszczepu oraz nowe kierunki terapeutyczne w transplantacji, jak również metody rozwiązujące problem braku narządów do przeszczepów, takie jak trójwymiarowe drukowanie narządów, genetyczne manipulacje i uczłowiczanie świń jako źródła narządów do transplantacji.

Słowa kluczowe: odrzucanie chroniczne, makrofag, RhoA, sztuczne organy, ksenotransplantacja

Abstract

Chronic rejection of transplanted organs remains an unresolved problem in transplantation. Around 70% of all transplanted organs fail within 10 years due to chronic rejection. Chronic rejection is caused by vessel occlusion and fibrosis, which starve the organ, destroy tissue architecture, and result in organ failure. Our studies in the rodent cardiac transplantation model showed that chronic rejection depends on host macrophages that enter the graft within 7 days post-transplantation and induce vessel occlusion and fibrosis. The movement of macrophages to the graft depends on the actin cytoskeleton regulated by small GTPase RhoA. We showed that inhibition of the RhoA pathway prevents macrophage movement to the graft and inhibits chronic rejection. We discuss the therapeutic applications of our findings, and the novel methods to remedy the lack of organs for transplantation, such as 3D-printed organs and genetic modifications and humanization of pigs as a source of organs.

Keywords: chronic rejection, macrophage, RhoA, artificial organs, xenotransplantation

WSTĘP

Wiele chorób czy wypadków losowych powoduje nieodwracalne uszkodzenie narządów. W takiej sytuacji jedyną szansą na przeżycie pacjenta jest przeszczep.

Historia przeszczepów ma ponad 3000 lat (Nordham i Ninokawa 2021). Pierwsza zapisana informacja o przeprowadzonym przeszczepie skóry w celu leczenia poparzeń pochodzi z około 1550 p.n.e. i znajduje się w papirusie Ebersa, jednym z najstarszych zachowanych dokumentów medycznych. Został on zakupiony przez niemieckiego egiptologa Georga Ebersa w Luxorze, w 1874 roku i od tej pory znajduje się w zbiorach biblioteki Uniwersytetu w Lipsku. Papirus Ebersa to ponad 110 stronicowy rulon papirusu o długości ponad 20 metrów, zawierający opisy ponad 700 metod medycznych i zapobiegawczych oraz spis ówczesnych lekarstw przeciwko różnym schorzeniom.

W czasach współczesnych, pierwszy zweryfikowany przeszczep zewnętrznej warstwy skóry (epidermis) wykonany został przez szwajcarskiego chirurga Jacques-Louis Reverdin w 1869 roku. Od tej pory, przeszczepy skóry były i są powszechnie stosowane w leczeniu poparzeń i w chirurgii rekonstrukcyjnej (Nordham i Ninokawa 2021).

Pierwsze przeszczepy narządów rozpoczęto w latach 1930–1950 i ograniczały się do przeszczepu nerek, ponieważ żyjąca osoba (nie pobierano wtedy narządów od zmarłych) mogła być dawcą jednej z dwóch nerek. Pierwszy przeszczep nerki przeprowadzono w Ukrainie w 1933 roku. Pacjent przeżył tylko 2 dni, ponieważ przeszczepiony narząd został odrzucony w procesie nadostrego odrzucania przeszczepu. Przeszczepione narządy, o ile nie pochodzą od genetycznie identycznego osobnika (bliźniaka jednojajowego), są rozpoznawane przez układ odpornościowy biorcy jako obce i są niszczone, czyli odrzucane. Poza tym każdy przeszczepiany narząd podczas pobrania, transportu, przechowywania i po podłączeniu do krwioobiegu biorcy, podlega częściowemu uszkodzeniu (tzw. uszkodzenie niedokrwiennie-reperfuzyjne). Tak uszkodzony narząd dodatkowo stymuluje układ odpornościowy biorcy i wzmaga proces odrzucania ostrego. Jedynymi metodami na zahamowanie odrzucania przeszczepu jest dobieranie biorcy i dawcy o najmniejszych różnicach genetycznych, hamowanie działalności układu odpornościowego biorcy (tzw. immunosupresja) oraz minimalizowanie uszkodzenia niedokrwiennie-reperfuzyjnego narządu poprzez skracanie czasu transportu narządu i przechowywanie na lodzie. Około 10 lat temu wprowadzono do chirurgii transplantacyjnej tzw. urządzenia *ex vivo*,

które poprzez perfuzję pobranego narządu usuwają szkodliwe metabolity, dostarczają substancje odżywcze i utrzymują krążenie w mikronaczyniach, co przedłuża przeżywalność narządu poza organizmem i poprawia jego stan ogólny przed transplantacją. Historia przeszczepów opisana jest dokładnie w pracy Nordham i Ninokawa (2021). Pierwszy udany przeszczep nerki pomiędzy genetycznie różnymi osobnikami (bliźniakami dwujajowymi) przeprowadzono w 1959 roku w Luizjanie (USA). Ponieważ nie było wtedy jeszcze metod blokowania funkcji układu odpornościowego (immunosupresji), biorca narządu został poddany naświetleniu promieniami rentgena w celu zniszczenia komórek odpornościowych. Pacjent przeżył i prowadził normalne, aktywne życie. Zmarł na chorobę serca 25 lat po przeszczepie. Pod koniec lat 60. XX wieku przeprowadzono również pierwsze udane przeszczepy serca, wątroby i trzustki pobranych od zmarłych dawców. W 1988 roku wprowadzono pierwsze leki immunosupresyjne, takie jak cyklosporyna czy tacrolimus (Prograf), blokujące funkcje komórek odpornościowych. Leki immunosupresyjne umożliwiły dalszy postęp w transplantacji, nie tylko narządów, ale także złożonych części ciała, takich jak kończyny czy twarz.

Do lat 70. XX wieku każdy szpital transplantacyjny w USA szukał dawców narządów do przeszczepu na własną rękę. Na początku lat 80. utworzono skomputeryzowaną bazę danych UNOS (United Network for Organ Sharing), zawierającą ogólnokrajowe informacje o dostępnych narządach i pacjentach oczekujących na przeszczep. Umożliwiło to wymianę dostępnych narządów pomiędzy szpitalami i priorytet przeszczepów według stanu zdrowotnego pacjentów (pacjenci w najgorszym stanie i wymagający natychmiastowego przeszczepu są umieszczani na początku listy). Obecnie, na liście UNOS jest 110 tysięcy pacjentów oczekujących na przeszczep. Lista ta stale się wydłuża z powodu braku dawców narządów do transplantacji (Nordham i Ninokawa 2021).

ODRZUCANIE PRZESZCZEPU

Oprócz braku dawców, największym i dotychczas nierozwiązanym problemem w transplantacji jest tzw. chroniczne (przewlekłe) odrzucanie przeszczepów. Statystyki przeżywalności przeszczepionych organów wykazują, że w ciągu 10 lat po transplantacji około 70% wszystkich narządów jest odrzucanych z powodu długotrwałego procesu (chronicznego) odrzucania przeszczepu (Kloc i Ghobrial 2014).

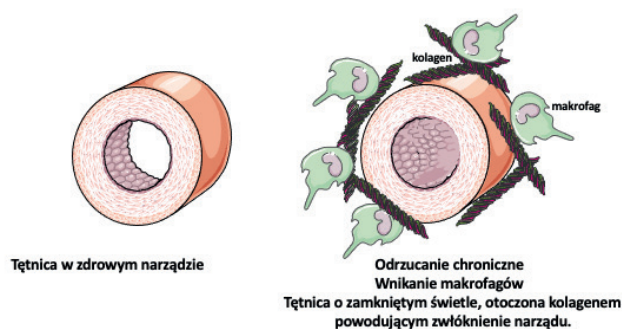
Istnieją trzy typy odrzucania przeszczepu: nadostre, ostre i chroniczne (przewlekłe). Odrzucanie nadostre jest spowodowane natychmiastową (w cią-

gu kilku minut) odpowiedzią organizmu biorcy na obecność antygenów dawcy (na przykład na inną grupę krwi). Taki przeszczep jest nie do uratowania i musi być natychmiast usunięty. We współczesnej transplantacji odrzucanie nadostre praktycznie nie istnieje, gdyż biorca i dawca są testowani na obecność odpowiednich antygenów.

Odrzucanie ostre zachodzi po 5–10 dniach po przeszczepie i jest powodowane aktywnością limfocytów T i B układu odpornościowego. Odrzucanie ostre jest blokowane lekami immunosupresyjnymi, które pacjent musi pobierać przez całe życie. Odrzucanie chronicznie zachodzi w ciągu paru miesięcy lub lat po przeszczepie i polega na stopniowym zamykaniu światła naczyń krwionośnych narządu i postępujących zmianach zwłóknieniowych (fibroza), które z czasem powodują niedokrwienie, zniszczenie struktury narządu i jego obumarcie (Ryc. 1). Jak dotąd, odrzucanie chroniczne jest nieuleczalne. Jego mechanizmy są bardzo słabo poznane, a wszystkie znane leki immunosupresyjne nie tylko nie hamują odrzucania chronicznego, ale nawet je wzmagają.

Moje badania na wydziale Immunologii Transplantacyjnej w Houston Methodist Research Institute w Houston, USA, są skoncentrowane na wyjaśnieniu komórkowych i molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za chroniczne odrzucanie przeszczepów i na poszukiwaniu metody spowolnienia, zahamowania, lub zlikwidowania chronicznego odrzucania przeszczepu. W naszych badaniach używamy modeli zwierzęcych (szczur, mysz) transplantacji serca. Gryzonie o znanym podłożu genetycznym otrzymują przeszczep serca od analogicznego dawcy (szczura lub myszy) o innym podłożu genetycznym. Drugie serce przeszczepiane jest do jamy brzusznej zwierzęcia i podłączane do układu krążenia biorcy: aorta wstępująca serca dawcy jest przyszywana do aorty podnerkowej bior-

cy, a tętnica płucna serca dawcy jest przyszywana do żyły głównej dolnej (*inferior vena cava*, IVC) biorcy. W ten sposób, zwierzę, które otrzymało taki przeszczep ma dwa serca: własne i przeszczepione, to drugie o innym podłożu genetycznym, umieszczone w jamie brzusznej. Przy przeprowadzaniu transplantacji serca u ludzi własne serce pacjenta jest odcinane od krwioobiegu i zastępowane nowym sercem, gdyż istnieją urządzenia zapewniające krążenie krwi i oddychanie na czas usuwania własnego serca pacjenta i zespalania nowego serca z jego krwioobiegiem. Przy przeszczepach dokonywanych eksperymentalnie u myszy czy szczurów takich urządzeń nie ma. W związku z tym zwierzę nie mogłoby przeżyć odcięcia własnego serca od krwioobiegu na czas zastąpienia go nowym. Z tego powodu transplant przeszczepia się jako dodatek do istniejącego serca. Zwierzę po przeszczepie otrzymuje przez cały czas trwania eksperymentu (zwykle 60–100 dni, bo tyle trwa rozwinięcie odrzucania chronicznego u myszy czy szczura) leki immunosupresyjne, które blokują limfocyty T i B i ostre odrzucanie przeszczepu, co pozwala na monitorowanie postępu odrzucania chronicznego w przeszczepionym sercu. Używając takiego modelu transplantacyjnego wykazaliśmy, że komórki odpornościowe odpowiedzialne za rozwój odrzucania chronicznego to makrofagi, które wędrują z krwioobiegu biorcy do przeszczepionego serca w ciągu pierwszych 7 dni po transplantacji. Po zasiedleniu przeszczepionego serca, makrofagi indukują namnażanie komórek ściany tętnic i stopniowe zamykanie ich światła, oraz stopniowe odkładanie kolagenu w ich okolicach, prowadzące do zwłóknienia przeszczepu (Ryc. 1). Zmiany te powodują w ciągu 60–100 dni obumarcie przeszczepionego serca u myszy lub szczura z powodu odrzucenia chronicznego (Kloc i współaut. 2015, 2016; Liu i współaut. 2016 a).



Ryc. 1. Odrzucanie chronicznie przeszczepu zachodzi w ciągu paru miesięcy-lat po transplantacji i polega na stopniowym zamykaniu światła naczyń krwionośnych narządu i postępującym odkładaniu kolagenu i zmian zwłóknieniowych, które z czasem powodują niedokrwienie, zniszczenie struktury narządu i jego obumarcie. Zmiany te inicjowane są przez makrofagi, które wędrują do przeszczepionego narządu z krwioobiegu biorcy przeszczepu.

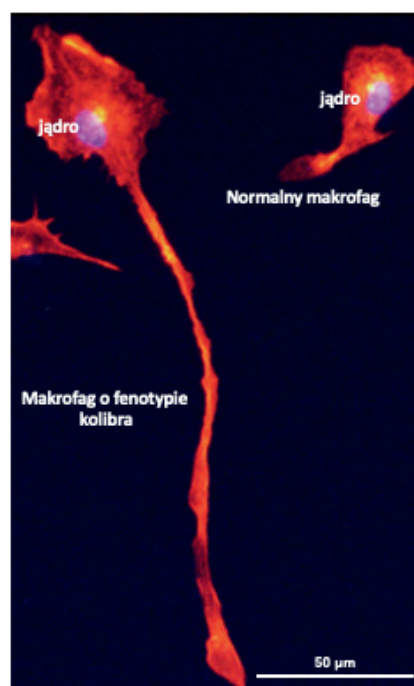
ROLA MAKROFAGÓW W PRZESZCZEPIE

Makrofagi są komórkami odpornościowymi tzw. wrodzonej odpowiedzi immunologicznej (Kloc i współaut. 2020, 2022; Kloc i Kubiak 2022; Liu i współaut. 2016 a, 2017 a). Ich główna rola polega na pochłanianiu i niszczeniu (fagocytowaniu) patogenów (wirusów, bakterii, grzybów) i fragmentów martwych komórek, oraz sygnalizacji istniejącego niebezpieczeństwa do komórek adaptacyjnej (nabytej) odpowiedzi immunologicznej, takich jak limfocyty T i B, które z kolei rozwijają swoistą odpowiedź immunologiczną (Liu i współaut. 2016 a).

Makrofagi mają około 50 μm długości i przypominają z wyglądu amebę. Morfologicznie makrofagi są wyraźnie spolaryzowane na część przednią i tylną. Część przednia makrofaga jest rozszerzona i zawiera jądro komórkowe, aparat Golgiego, siateczkę śródplazmatyczną i mitochondria, a część tylna jest wydłużona na kształt ogonka. Makrofagi, podobnie jak ameby, mają zdolność aktywnego poruszania się. Przemieszczanie się makrofaga umożliwia dynamiczny cytoszkielet, zbudowany z włókien aktyny i bogate w aktynę struktury kontaktowe (adhezyjne). Ruch makrofagów polega na sekwencyjnym przyczepianiu się i odzypianiu końca ogona za pomocą struktur adhezyjnych do i od podłoża, z jednocześnie zachodzącym ruchem postępowym przedniej części makrofaga. Kierunek ruchu sygnalizują cząsteczki wydzielane przez komórki narządu docelowego, które przyłączają się do odpowiednich receptorów na powierzchni makrofaga. W czasie ruchu, włókna aktyny w przedniej części makrofaga i struktury adhezyjne w jego ogonie ulegają sekwencyjnej polimeryzacji i depolimeryzacji. Dynamika (polimeryzacja i depolimeryzacja) włókien aktynowych regulowana jest przez białko RhoA należące do grupy małych GTPaz, oraz przez białka ścieżki sygnalizacyjnej RhoA, takie jak kinaza Rock1 i Rock2 (Liu i współaut. 2016 a, b, c; 2017 a, b)

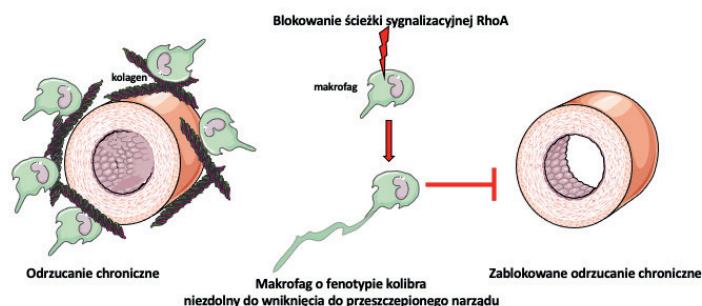
Blokowanie ścieżki sygnalizacyjnej RhoA zmienia morfologię makrofagów, zapobiega ich migracji do przeszczepu i hamuje odrzucanie chroniczne. Przeszczepiony narząd, który jest zawsze częściowo uszkodzony z powodu procesów niedokrwiennie-reperfuzyjnych, wydziela substancje sygnalizacyjne (cytokiny/chemokiny) informujące otaczające komórki i krwiobieg o istnieniu uszkodzenia. Substancje te przyłączają się do specyficznych receptorów na powierzchni komórek układu odpornościowego, między innymi makrofagów i ukierunkowują ruch tych komórek do miejsca uszkodzenia. Nasze badania wykazały, że u gryzonia w pierwszym tygodniu po przeszczepie, olbrzymia ilość makrofagów jest

wabiona do przeszczepionego narządu. Makrofagi te gromadzą się wokół naczyń krwionośnych przeszczepu i inicjują procesy odrzucania chronicznego.



Ryc. 2. Zdjęcie pokazuje dwa makrofagi: normalny makrofag o długości około 50 μm i silnie wydłużony makrofag (~250 μm) o fenotypie kolibra. Cytoszkielet aktynowy zabarwiony jest na czerwono, a jądra komórkowe makrofagów na niebiesko.

Wykazaliśmy, że inhibitory chemiczne, które blokują ścieżkę RhoA poprzez hamowanie aktywności kinazy Rock1/2 powodują znaczne wydłużenie makrofagów, czasem do ponad 800 μm , zaburzenie ich polaryzacji oraz nieprawidłowe umiejscowienie i funkcjonowanie receptorów, decydujących o kierunku ruchu makrofaga. Jądro komórkowe makrofaga, jego mitochondria, aparat Golgiego i receptory powierzchniowe, często przemieszczają się z części przedniej do niezwykle wydłużonego ogona (Kloc i współaut. 2019; Liu i współaut. 2016 c, d). Fenotyp tak wydłużonego makrofaga nazwano „fenotypem kolibra” (ang. hummingbird phenotype) (Ryc. 2). Mechanizm wydłużenia makrofaga polega na tym, że po zablokowaniu ścieżki RhoA, struktury adhezyjne w ogonie makrofaga nie mogą ulec rozpadowi i ogon ten pozostaje na stałe przyczepiony do podłoża. Równocześnie cały makrofag usiłuje posuwać się do przodu, wykonując ruchy podobne to odżywiania się kolibra (stąd nazwa tego fenotypu). Wykazaliśmy również, że identyczny fenotyp powstaje, gdy cały gen RhoA zostaje usunięty specyficznie z DNA makrofagów myszy (ang. macrophage-specific RhoA knockout)



Ryc. 3. Zablokowanie ścieżki sygnalizacyjnej RhoA, za pomocą inhibitorów chemicznych lub usunięcie z makrofagów genu RhoA, indukuje fenotyp kolibra, zapobiega wnikaniu makrofagów do przeszczepu i hamuje odrzucanie chroniczne.

(Liu i współaut. 2016 b, c, d; 2017 b; Kloc i współaut. 2019, 2021; Wosik i współaut. 2019; Chen i współaut. 2017). Nasze dalsze badania na modelu transplantacyjnym myszy i szczurów wykazały, że podanie biorcy przeszczepu inhibitorów RhoA/Rock blokuje wędrówkę takich wydłużonych makrofagów do przeszczepionego serca i w efekcie zapobiega zamykaniu naczyń i zwłóknieniu, a więc hamuje chroniczne odrzucanie przeszczepu (Ryc. 3). Identyczny rezultat zahamowania odrzucania chronicznego uzyskaliśmy, kiedy mysz otrzymująca przeszczep została genetycznie zmodyfikowana poprzez usunięcie genu RhoA z jej makrofagów. Podsumowując, nasze badania na modelu transplantacyjnym myszy i szczura wykazały, że blokowanie ścieżki sygnalizacyjnej RhoA może być potencjalnie użyte klinicznie do hamowania odrzucania chronicznego u pacjentów otrzymujących przeszczep narządu (Wosik i współaut., 2019; Kloc i współaut. 2021; Chen i współaut. 2018 a, b, c).

Problem z zastosowaniem klinicznym naszej metody polegał na tym, że ludzie nie mogą być modyfikowani genetycznie w celu usunięcia genu RhoA z makrofagów, a wszystkie przetestowane przez nas inhibitory ścieżki RhoA nie są dopuszczone do użycia klinicznego u ludzi. Po długich poszukiwaniach, udało się nam jednak znaleźć substancję o nazwie Fingolimod (Gilenya), która blokuje ścieżkę RhoA i jest dopuszczona do użycia klinicznego jako lek zapobiegający rozwojowi stwardnienia rozsianego (multiple sclerosis), czyli choroby nie związanej w żaden sposób z transplantacją narządów. Nasze ponowne badania na modelu przeszczepów u szczurów i myszy wykazały, że zgodnie z naszym przewidywaniem Fingolimod również blokuje wnikanie makrofagów do przeszczepu i hamuje jego odrzucanie chroniczne (Chen i współaut. 2018 b, c; 2021). Bazując na tych danych rozpoczęliśmy w Houston Methodist Hospital pierwsze próby kliniczne,

stosujące Fingolimod u pacjentów z przeszczepem nerek.

NIEROZWIĄZANE PROBLEMY W TRANSPLANTACJI I POTENCJALNE METODY ZARADCZE

Pomimo, że Fingolimod może być potencjalnie nowym lekiem hamującym rozwój odrzucania chronicznego u pacjentów, nierozwiązanym problemem pozostaje permanentny niedobór organów do przeszczepów. W USA, każdego dnia 17 osób umiera nie doczekawszy się na przeszczep, a co 9 minut jedna osoba jest dodawana do listy oczekujących na przeszczep.

Jedną z metod zaradczych jest pobieranie narządów od żywych dawców. Jednak narządy, które mogą być pobierane od żywych dawców ograniczają się tylko do nerek, fragmentów wątroby, a rzadziej jednego płuca lub fragmentu płuca, części trzustki lub części jelit. Nerki są organem parzystym, więc jedna nerka może być pobrana na przeszczep bez skutków ubocznych i obniżenia jakości życia dawcy. Wątroba ma zaś zdolność bardzo szybkiej regeneracji, więc przeszczepiony nawet mały fragment tego narządu po krótkim czasie odbudowuje całą wątrobę o prawie normalnej wielkości, a wątroba dawcy powraca do wyjściowych rozmiarów. Do niedawna, pobieranie fragmentów wątroby lub innych narządów, często wiązało się z dużymi powikłaniami pooperacyjnymi u dawcy, dlatego rzadko stosowano tę metodę. Jednakże stały postęp metod chirurgicznych pozwala obecnie na stosunkowo bezpieczne pobieranie fragmentów wątroby i innych narządów, więc pobieranie narządów od żyjących dawców jest stosowane coraz szerzej.

Najlepszym środkiem zaradczym na niedobór organów do przeszczepów byłoby produkowanie sztucznych organów lub pobieranie organów od

zwierząt, np. świń, które są anatomicznie najbardziej podobne do człowieka. W chwili obecnej naukowcy i lekarze pracują nad wprowadzeniem w życie obydwu tych rozwiązań.

DRUKOWANE SZTUCZNE ORGANY

Produkcja sztucznych organów opiera się na metodzie tzw. trójwymiarowego biodrukowania (ang. 3D bioprinting) (Xie i współaut. 2023; Rani i współaut. 2023). Biodrukowanie organu polega na użyciu technologii drukowania trójwymiarowego, w którym nakłada się kolejne warstwy składające się z różnych typów komórek pobranych od pacjenta, czynników wzrostowych i biomateriałów. Jako efekt końcowy otrzymuje się sztuczny bionarząd, który idealnie imituje pod względem anatomicznym i komórkowym narząd naturalny. Już w 2006 roku w USA, trzy wyprodukowane sztucznie pęcherze moczowe zostały wszczepione i uratowały życie trojgu dzieciom (El-Taji i współaut. 2015).

Produkcja sztucznego organu zaczyna się od pobrania małego (wielkości znaczka pocztowego) fragmentu narządu od pacjenta. Fragment ten, zawierający różne typy komórek, jest rozdzielany na indywidualne komórki, które następnie są w laboratorium namnażane w hodowli komórkowej. Każdy typ komórek jest hodowany oddzielnie w pożywce specyficznej dla danego typu komórek. W następnym etapie, namnożone komórki tego samego typu miesza się z hydrożelem (zawierającym kolagen i żelatynę), który spełnia rolę kleju naśladującego macierz pozakomórkową, występującą pomiędzy komórkami oryginalnego narządu i utrzymującą ich spójność. Taka mieszanka komórek i hydrożelu jest odpowiednikiem tuszu drukarskiego. Ponieważ mamy kilka typów komórek, mamy też kilka typów tuszu – tak jak w drukarce mamy kasetę z wieloma kolorami tuszu. W następnym etapie te różnokomórkowe „tusze” załadowuje się do drukarki, która drukuje kolejne warstwy komórkowe. Kolejność drukowania i nakładania poszczególnych warstw jest zaprogramowana w drukarce na podstawie zeskanowanych obrazów narządu pacjenta. Proces drukowania trwa około 6 godzin, a cała procedura od momentu pobrania próbki narządu do transplantacji zajmuje zwykle około 6 tygodni. Pomimo że po przeszczepie takiego bioorganu hydrożel ulega stopniowemu rozpuczeniu, komórki nie rozpraszają się, gdyż zachowują się jak w normalnym narządzie i produkują własną macierz międzykomórkową, która je spaja. Firmy bioinżynieryjne, zajmujące się produkcją bioorganów twierdzą, że w ciągu paru lat bioorgany będą powszechnie dostępne i używane do przeszczepów.

PRZESZCZEP ORGANÓW ZWIERZĘCYCH (KSENOTRANSPLANTACJA)

Historia przeszczepiania narządów zwierzęcych do ludzi jest długa i pełna porażek (Cooper i Pierson 2023). W latach 20. XX wieku francuski chirurg pochodzenia rosyjskiego Serge Voronoff przeszczepiał fragment jąder szympansa starszym mężczyznom w celu ich odmłodzenia. W latach 60. XX wieku przeprowadzono kilka prób przeszczepów narządów od małp, ale wszystkie zakończyły się śmiercią pacjentów w bardzo krótkim czasie po transplantacji. Amerykański transplantolog Keith Reemtsma przeszczepił nerki kilkunastu pacjentom, którzy zmarli po 9 miesiącach od momentu transplantacji. Inny amerykański chirurg James Hardy przeszczepił pacjentowi serce szympansa, które biło w ciele biorcy tylko przez 90 minut. Thomas Starzl przeszczepił wątrobę pawiana pacjentowi, który przeżył 70 dni.

Na początku lat 90. XX wieku przeprowadzono u człowieka pierwszy przeszczep wysp trzustkowych świń (Cooper i Pierson 2023). Pomimo, że świnię są najlepszym źródłem narządów do przeszczepów u ludzi ze względu na podobieństwo anatomii i fizjologii obu gatunków, używanie ich organów napotyka na kilka zasadniczych trudności. Pierwszy problem polega na tym, że świnię mają dużo krótszy czas życia (około 27 lat) niż ludzie. A więc zegar biologiczny ich narządów zaprogramowany jest na starzenie szybsze niż u ludzi. Następnym problemem jest to, że organy świni mają większe rozmiary niż organy ludzkie, i po przeszczepie do organizmu człowieka rosną do rozmiarów typowych dla świni i niezgodnych z ludzką anatomią. Problem niezgodności wymiaru narządów pomiędzy świnią i człowiekiem rozwiązano ostatnio poprzez genetyczne usunięcie (tzw. knock out) u świni genu receptora hormonu wzrostu, który reguluje rozmiary organów. Taka genetyczna modyfikacja pozwoliła na wyhodowanie świń o zredukowanych o 60% wymiarach narządów. Następnym problemem z używaniem świń jako dawców narządów jest taki, że świnię, tak jak wszystkie zwierzęta, mogą być zakażone różnymi wirusami zwierzęcymi. Na przykład są one nosicielami retrovirusa PERV, który po przeniesieniu do ludzi może spowodować nieprzewidywalne choroby i skutki (Liu i współaut. 2023). Innym problemem jest to, że ksenotransplant (czyli przeszczep organu od osobnika innego gatunku) jest rozpoznawany i niszczone przez ludzki układ immunologiczny jeszcze silniej niż tzw. allotransplant, czyli narząd pochodzący z innego genetycznie osobnika, ale tego samego gatunku. Postęp

w medycynie i biologii molekularnej pozwolił na poczynienie pierwszych kroków w pokonaniu tych przeszkód. W roku 2021, w USA, przeszczepiono pierwsze nerki (UKidney) z genetycznie zmodyfikowanych świń, a w roku 2022 przeprowadzono udane przeszczepy serc świń (UHeart) do niedawno zmarłych (nie wykazujących funkcji mózgu) osób, które były podłączone do wentylatora. Nerki funkcjonowały normalnie i bez śladu odrzucania przez 74 godziny, kiedy eksperyment został zakończony. Przeszczepione serca funkcjonowały normalnie przez 3 dni i nie wykazywały żadnych oznak wczesnego odrzucania. W 2022, w USA, po raz pierwszy przeszczepiono serce świni pacjentowi. Pomimo, że żył on tylko 2 miesiące po przeszczepie i prawdopodobnie zmarł z powodu zainfekowania świńskim wirusem obecnym w przeszczepionym sercu, wyniki tych transplantacji dały olbrzymią ilość informacji pozwalających na zoptymalizowanie ksenotransplantacji.

Świnie, które posłużyły jako dawcy przeszczepionych serc, zostały uprzednio zmodyfikowane genetycznie w amerykańskiej firmie biotechnologicznej Rivivacor Inc. Posiadały one 10 różnych mutacji genetycznych w genomach. Cztery mutacje polegały na usunięciu (knock-out) 4 genów świni, które regulują wzrost organu i włączają odpowiedź immunologiczną u człowieka. Dalszych 6 mutacji polegało na wprowadzeniu (knock-in) genów odpowiedzialnych za zapobieganie procesom uruchamianym przez niezgodność genetyczną pomiędzy człowiekiem a świnia (Chan i współaut. 2023; Watanabe i Gageshima 2023).

Nieco inne podejście, pozwalające w przyszłości na użycie świń jako dawców narządów, polega na hodowaniu tzw. uczłowiczonych świń (ang. humanized pigs) (Garry i współaut. 2022; Ren i współaut. 2022). Zarówno ludzie jak i świnie rodzą się czasem z niedorozwiniętym lub w ogóle niesfunkcjonującym układem odpornościowym. Taka wada genetyczna to tzw. ciężki złożony niedobór odporności [ang. Severe Combined Immunodeficiency (SCID)]. Sławnym przykładem zespołu SCID u ludzi był tzw. chłopiec w plastikowej bańce (bubble boy) David Vetter, który urodził się w 1971 roku z zespołem SCID i tuż po urodzeniu został umieszczony w całkowicie sterylnej plastikowej komorze izolującej go od środowiska zewnętrznego i drobnoustrojów. Chłopiec nie wychodził z komory przez 12 lat, poza kilkoma spacerami w kosmicznym skafandrze nadal izolującym go od środowiska. Jedyną metodą na uleczenie SCID to przeszczep szpiku kostnego (źródła komórek odpornościowych) od osoby zdrowej. David Vetter po 12 latach przebywania w sterylnej komorze otrzymał przeszczep szpiku od siostry. Niestety,

siostra (a więc i jej szpik kostny) była zakażona wirusem Epstein-Barra, który przy braku odporności pacjenta stał się dla niego zabójczy. U chłopca rozwinął się nowotwór i zmarł w 1984 r. W latach 80. XX wieku naukowcy zaobserwowali, że myszom, które urodziły się z SCID, można wstrzyknąć ludzkie komórki odpornościowe. Takie uczłowiczone myszy (humanized mice) mają funkcjonujący ludzki system odpornościowy. W roku 2012, naukowcy amerykańscy odkryli, że również świnie rodzą się czasem z zespołem SCID (Boettcher i współaut. 2018). Zastosowanie wiedzy z badań na myszach pozwoliło, w roku 2018, na przeniesienie ludzkich komórek macierzystych do rozwijających się prosiąt i wyhodowanie uczłowiczonych świń (Boettcher i współaut. 2018). U świń, tak jak i u ludzi, komórki odpornościowe powstają w wątrobie płodu. W związku z tym wstrzyknięto ludzkie komórki macierzyste do wątroby płodu świni. W miarę rozwoju, wstrzyknięte komórki macierzyste różnicowały się w różne typy ludzkich komórek odpornościowych, które rozprzestrzeniły się i zasiedliły narządy prosięcia. Potencjalnie, po dalszych modyfikacjach genetycznych, takie uczłowiczone świnie mogą być dobrym źródłem narządów do przeszczepów u ludzi.

Dostępność genetycznie zmodyfikowanych świń i produkcja trójwymiarowo drukowanych narządów napawają nadzieją, że w ciągu kilku następnych lat te nowatorskie metody całkowicie zmienią dziedzinę transplantologii, umożliwią produkcję przeszczepów na żądanie i uratują życie milionom pacjentów na całym świecie oczekujących na narząd do przeszczepu.

Podziękowanie: niektóre rysunki użyte do przygotowania ilustracji pochodzą z Servier Medical ART: SMART, smart.servier.com.

LITERATURA

- Boettcher A.N., Loving C., Cunnick J.E., Tuggle C.K., 2018. *Development of Severe Combined Immunodeficient (SCID) pig models for translational cancer modeling: future insights on how humanized SCID pigs can improve preclinical cancer research*. Front Oncol. 8, 559.
- Chan J.C. Y., Chaban R., Chang S.H., Angel L.F., Montgomery R.A. i współaut., 2023. *Future of lung transplantation: xenotransplantation and bioengineering lungs*. Clin Chest Med. 44, 201–214.
- Chen W., Chen W., Li X.C., Ghobrial R.M., Kloc M., 2018a. *Coinhibition of mTORC1/mTORC2 and RhoA /ROCK pathways prevents chronic rejection of rat cardiac allografts*. Transplantation Reports. 3, 21–28.

- Chen W., Chen S., Chen W., Li X.C., Ghobrial R.M. i współaut., 2018b. *Screening RhoA/ROCK inhibitors for the ability to prevent chronic rejection of mouse cardiac allografts*. *Transpl Immunol.* pii: S0966–3274(18)30029–7.
- Chen W., Ghobrial R.M., Li X.C., Kloc M., 2018c. *Inhibition of RhoA and mTORC2/Rictor by Fingolimod (FTY720) induces p21-activated kinase 1, PAK-1 and amplifies podosomes in mouse peritoneal macrophages*. *Immunobiology.* pii: S0171–2985(18)30046–9.
- Chen W., Chen W., Chen S., Uosef A., Ghobrial R.M. i współaut., 2021. *Fingolimod (FTY720) prevents chronic rejection of rodent cardiac allografts through inhibition of the RhoA pathway*. *Transpl Immunol.* 65:101347.
- Chen W., Zhao Y., Li X.C., Kubiak J.Z., Ghobrial R.M. i współaut., 2017. *Rho-specific Guanine nucleotide exchange factors (Rho-GEFs) inhibition affects macrophage phenotype and disrupts Golgi complex*. *Int J Biochem Cell Biol.* 93:12–24.
- Cooper D.K. C., Pierson R.N. 3RD., 2023. *Milestones on the path to clinical pig organ xenotransplantation*. *Am J Transplant.* S1600–6135(23)00222–8.
- El-Taji OM, Khattak AQ, Hussain SA., 2015. *Bladder reconstruction: The past, present and future*. *Oncol Lett.* 10, 3–10.
- Garry M.G., Caplan A.L., Garry D.J., 2022. *Emerging technologies and ethics-exogenic chimeric humanized organs*. *Am J Transplant.* 22, 2786–2790.
- Kloc M., Ghobrial R.M., 2014. *Chronic allograft rejection: A significant hurdle to transplant success*. *Burns Trauma.* 2, 3–10.
- Kloc M., Kubiak J.Z., Li X.C., Ghobrial R.M., 2015. *Pericytes, microvascular dysfunction, and chronic rejection*. *Transplantation.* 99, 658–67.
- Kloc M., Kubiak J.Z., 2022. *Monocyte and macrophage function diversity*. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 12404.
- Kloc M., Kubiak J.Z., Li X.C., Ghobrial R.M., 2016. *Fighting chronic rejection of transplanted organs*. *Atlas of Science.* 2016. <https://atlasofscience.org/fighting-chronic-rejection-of-transplanted-organs/>
- Kloc M., Kubiak J.Z., Zdanowski R., Ghobrial R.M., 2022. *Memory macrophages*. *Int J Mol Sci.* 24; 38.
- Kloc M., Uosef A., Kubiak J.Z., Ghobrial R.M., 2020. *Macrophage proinflammatory responses to microorganisms and transplanted organs*. *Int J Mol Sci.* 21, 9669.
- Kloc M., Uosef A., Villagran M., Zdanowski R., Kubiak J.Z. i współaut., 2021. *RhoA- and actin-dependent functions of macrophages from the rodent cardiac transplantation model perspective-timing is the essence*. *Biology (Basel).* 10, E70.
- Kloc M., Uosef A., Wosik J., Kubiak J.Z., Ghobrial R.M., 2019. *RhoA pathway and actin regulation of the Golgi/centriole complex*. *Results Probl Cell Differ.* 67:81–93.
- Liu Y., Chen W., Minze L.J., Kubiak J.Z., Li X.C. i współaut. 2016. *Dissonant response of Mo/M2 and M1 bone marrow derived macrophages to RhoA pathway interference*. *Cell Tissue Res.* 366, 707–720.
- Liu Y., Chen W., Wu C., Minze L.J., Kubiak J.Z. i współaut. 2017. *Macrophage/monocyte-specific deletion of Ras homolog gene family member A (RhoA) downregulates fractalkine receptor and inhibits chronic rejection of mouse cardiac allografts*. *J Heart Lung Transplant.* 36, 340–354.
- Liu Y., Kloc M., Li X.C., 2016. *Macrophages as effectors of acute and chronic allograft injury*. *Curr Transplant Rep.* 3, 303–312.
- Liu Y., Tejpal N., You J., Li X.C., Ghobrial R.M. i współaut. 2016. *ROCK inhibition impedes macrophage polarity and functions*. *Cell Immunol.* 300, 54–62.
- Liu Y., Kubiak J.Z., Li X.C., Ghobrial R.M., Kloc M., 2017. *Macrophages and RhoA Pathway in transplanted organs*. *Results Probl Cell Differ.* 62, 365–376.
- Liu Y., Minze L.J., Mumma L., Li X.C., Ghobrial R.M. i współaut., 2016. *Mouse macrophage polarity and ROCK1 activity depend on RhoA and non-apoptotic Caspase 3*. *Exp Cell Res.* 341, 225–236.
- Liu Y., Niu Y., Ma X., Xiang Y., Wu D. i współaut., 2023. *Porcine endogenous retrovirus: classification, molecular structure, regulation, function, and potential risk in xenotransplantation*. *Funct Integr Genomics.* 23, 60.
- Nordham K.D., Ninokawa S., 2021. *The history of organ transplantation*. *Proc Bayl Univ Med Cent.* 35, 124–128.
- Rani D., Chitara N., Kanchan T., Krishan K., 2023. *3D printed bionic ear and microtia-anotia: Medical and forensic implications*. *Congenit Anom (Kyoto).* 63, 60–65.
- Ren J., Yu D., Wang J., Xu K., Xu Y. i współaut., 2022. *Generation of immunodeficient pig with hereditary tyrosinemia type 1 and their preliminary application for humanized liver*. *Cell Biosci.* 12, 26.
- Watanabe M., Nagashima H., 2023. *Genome editing of pig*. *Methods Mol Biol.* 2637, 269–292.
- Wosik J., Suarez-Villagran M., Miller Jr J.H., Ghobrial R.M., Kloc M., 2019. *Macrophage phenotype bioengineered by magnetic, genetic or pharmacologic interference*. *Immunol Res.* 67, 1–11.
- Xie M., Su J., Zhou S., Li J., Zhang K., 2023. *Application of hydrogels as three-dimensional bioprinting ink for tissue engineering*. *Gels.* 9, 88.