

# Xenotransplantace: nová éra transplantační medicíny právě začala

Porrett PM, Orandi BJ, Kumar V, et al. First clinical-grade porcine kidney xenotransplant using a human decedent model.

*Am J Transplant* 2022 Jan 20. doi: 10.1111/ajt.16930. Epub ahead of print.

**KLÍČOVÁ SLOVA:**  $\alpha$ -galaktosidáza – rejekce – transplantace ledviny – xenotransplantace

Pro mnoho nemocných žijících se selháním ledvin je provedení transplantace ledviny nedostižnou iluzí, a to i přes rozšíření indikací pro zemřelé i žijící dárce. Prase domácí je slibným zdrojem ledvinových xenograftů. Již byly provedeny tzv. proof of concept studie s xenotransplantacemi ledvin od prasete primátům kvůli podobnosti s biologii člověka. Tyto práce ukázaly, že hlavním problémem xenotransplantací je imunitní bariéra spočívající v přítomnosti sacharidových antigenů na endotelu cév, které jsou pro lidi a opičí primáty cizí. Genové modifikace, které odstranily tyto antigeny, zlepšily výsledky prasečích xenotransplantací u opičích primátů, protože se přestaly vyskytovat hyperakutní rejekce. Model byl dále zlepšen modifikací rizika cytotoxicity zprostředkované komplementem a snížením rizika cévní trombózy.

Navzdory úspěchům s těmito experimentálními modely není pravděpodobné, že poznatky, které z nich vycházejí, budou jednoduše přenositelné na člověka, protože existuje mnoho biologických rozdílů mezi primáty a lidmi, a to včetně humorální imunity. Je tak jasné, že jedině provedení xenotransplantací u lidí se stane základem budoucího poznání, podobně jako tomu bylo u prvních alotransplantací.

Program xenotransplantací byl v University of Alabama v Birminghamu zahájen v roce 2015 s cílem vytvořit robustní, udržitelný a etický model u člověka. V těsné blízkosti transplantačního centra proto byla pro chov zvířat postavena budova, jež splňuje nejpřísnější nároky na přítomnost jakýchkoliv patogenů a je určena výhradně pro xenotransplantace u lidí. Byl vytvořen multidisciplinární tým expertů znalých translačního výzkumu a konečně bylo vytvořeno strategické partnerství s komerčními subjekty a regulačními úřady, což jsou nezbytné předpoklady k zavedení xenotransplantací do klinické praxe.

Nejdříve bylo rozhodnuto o vytvoření preklinického modelu, který má řešit základní otázky týkající se bez-

pečnosti a proveditelnosti xenotransplantací od prasat lidem. To je nezbytným předpokladem zahájení budoucího klinického zkoušení, protože je nutné posoudit rizika hyperakutní rejekce, chirurgických komplikací a přenosu virů ještě před zahájením fáze I klinického zkoušení u lidí.

Autoři proto vytvořili preklinický model xenotransplantace ledvin u pacientů se smrtí mozku, kteří nebyli indikováni jako dárce orgánů. Nejdříve získali souhlas k tomuto experimentu od rodiny. Podmínkou transplantace byl negativní cross-match s dárcovským prasetem. Xenogenní štěpy byly odebrány geneticky modifikovaným prasatům, která poskytla společnost Revivicor, Inc. Tato prasata mají ve svém genomu 10 genetických modifikací zahrnujících inzerci dvou lidských genů potlačujících aktivaci komplementu (*hDAF* a *hCD46*), dvou lidských genů podílejících se na antikoagulaci (*hTBM* a *hEPCR*), delecí (knock-out) tří prasečích genů pro sacharidové antigeny a receptor pro prasečí růstový hormon. Tato prasata neexprimují žádné antigeny na erytrocytech, a jsou tak univerzálními dárce vzhledem ke krevním skupinám. Prasata nemají ve svém genomu prasečí cytomegalovirus a endogenní retrovirus C. Prasata jsou testována každé tři měsíce na přítomnost virů. Před transplantací byly provedeny křížové zkoušky pomocí průtokové cytometrie. Ledviny byly asepticky odebrány *en bloc*. Příjemcům byla provedena bilaterální nefrektomie otevřenou cestou k navození anurie. Před transplantací byly ledviny odděleny a byly provedeny preimplantační biopsie. V porovnání s lidskými ledvinami měly štěpy velmi jemné pouzdro a byly palpačně měkké. Uretery byly širší než u lidí. Proto byla chirurgická manipulace náročnější. Pravá a levá ledvina byla transplantována heterotopicky pomocí běžné techniky. Pravý ureter byl anastomozován do měchýře a levý ureter byl vyústěn urostomií. Postreperfuze biopsie byla provedena jenom u levého xenograftu. Indukční imuno-

suprese sestávala ze sestupných dávek methylprednisolonu, antithymocytárního globulinu (ATG) v celkové dávce 6 mg/kg a aplikace anti-CD20 monoklonální protilátky. Udržovací imunosuprese zahrnovala mykofenolát mofetil, takrolimus a prednison. Předtransplantační fáze trvala 19 hodin, transplantace 4 hodiny a potransplantační sledování (follow-up) trvalo 74 hodin. Primárním cílem bylo ověření technické bezpečnosti a realizovatelnosti výkonu. Autoři nepředpokládali posouzení účinnosti vzhledem k přítomnosti smrti mozku příjemce a z toho vyplývajících hemodynamických a dalších změn, které mají závažné dopady na renální hemodynamiku.

Doba teplé ischemie byla 28 a 29 minut a doba studené ischemie byla 4 hodiny pro levý xenograft a 5 hodin a 37 minut pro pravý xenograft. Methylprednisolon a ATG byly podány před xenotransplantací. Obě ledviny byly dobře perfundovány a perfuze následně ověřena dopplerovskou sonografií. Příjemce byl po celou dobu operace oběhově stabilní, byl mu podáván fenylefrin a dopamin před reperfuzí a po reperfuzi. Pravá ledvina začala produkovat moč po 23 minutách, diuréza z levé ledviny byla pomalá. Ledviny byly observovány po dobu 60 minut, známky hyperakutní rejeckce se neobjevily. Postreperfuzní biopsie prokázala střední tubulární poškození a normální glomeruly. Nebyly přítomny žádné známky poškození endotelu, fibrinových trombů ani pozitivita barvení IgG, IgM a C4d.

### KOMENTÁŘ

Prof. MUDr. Ondřej Viklický, CSc., FERA

Dlouhou dobu se v odborné literatuře mluvilo o tom, že xenotransplantace vyřeší nedostatek orgánů použitelných pro transplantace. Doba, kdy se tak stane, ale byla vždy mlhavě vzdálená. Na sklonku roku 2021 bylo v médiích referováno o xenotransplantacích ledvin a později i srdce od geneticky upravených prasat lidem. Komentovaný článek je první odbornou publikací na toto téma. Tým z University of Alabama v Birminghamu se rozhodl publikovat v odborném tisku dříve než v laických médiích, a proto se o jejich úspěchu příliš nevědělo. Daleko větší pozornosti se dostalo identickému experimentu, který u pacientů s prokázanou smrtí mozku provedl v prosinci 2021 Robert Montgomery z Langone Transplant Institute v New Yorku, a konečně 7. ledna 2022 Barley Griffith z University of Maryland Medical Center pak provedl xenotransplantaci srdce 57letému Davidu Bennettovi, žijícímu pacientovi se srdečním selháním, který byl k transplantaci srdce nebo k dlouhodobé přístrojové podpoře odmítnut i v ostatních transplantačních centrech. Pozoruhodné je, že tým z Marylandu měl k dispozici stovky podobných pacientů, kteří souhlasili se zařazením do tohoto experimentu.

Prasata geneticky připravil komerční subjekt, firma Revivicor, která je spin-off podnikem společnosti PPL Therapeutics, jejíž pracovníci jako první připravili známou ovci Dolly, prvního klonovaného savce. U těchto prasat, označených

Během tří denního sledování se u příjemce vyvinuly známky multiorganového selhání, pancytopenie a diseminované intravaskulární koagulace (DIC). Pro acidózu byl podáván bikarbonát, kontinuálně heparin, krevní transfuze a vysoké dávky methylprednisolonu k překonání fyziologie mozkové smrti. Štěpy byly prohlédnuty první a třetí den a byly provedeny biopsie. Dopplerovsky byla potvrzena dobrá perfuze, měly normální turgor. Studie byla ukončena po 77 hodinách a 32 minutách po reperfuzi a 8 dní po prokázání mozkové smrti. Během pokusu nedošlo k poklesu koncentrace kreatininu v séru a žádná z ledvin nevyučovala signifikantní množství kreatininu. Sérové hodnoty elektrolytů byly po dobu experimentu normální. Biopsie první den prokázaly přítomnost trombotické mikroangiopatie s difúzní kongescí kapilár glomerulů a přítomností fibrinových trombů. Biopsie provedené třetí den prokázaly zhoršení tubulárního poškození s akutní tubulární nekrózou (ATN), další známky trombotické mikroangiopatie (TMA) jako mezangiolyza ale přítomny nebyly. Barvení C4d bylo negativní v obou biopsiích. Nebylo prokázáno přenesení prasečích endogenních retrovirů vyšetřením periferní krve a ani nebyl pozorován chimérismus, protože exprese prasečího ribozomálního proteinu u příjemce zůstala negativní. Tento experiment tak byl jednou z prvních xenotransplantací geneticky upravených prasečích ledvin člověku ve zvláštním preklinickém modelu příjemce se smrtí mozku.

jako „ten-GE“, bylo známou metodou CRISPR modifikováno 10 genů z 30 000. Revivicor vypnul některé geny odpovědné za hyperakutní rejeckci pozorovanou v minulosti, a naopak do genomu prasat přidal další geny, které mají chránit před poškozením zprostředkovaným komplementem a koagulační kaskádou. K hyperakutní rejeckci zjevně nedošlo, takže hlavní cíl byl splněn. Vyřazení (knock-out) genů pro hlavní sacharidy ( $\alpha$ -galaktosidázu [ $\alpha$ -gal] a další) bylo dlouhodobě známou podmínkou pro úspěch xenotransplantací.<sup>1</sup> Oligosacharid  $\alpha$ -1,3-galaktóza ( $\alpha$ -gal) je podobný lidským krevně skupinovým oligosacharidům, který je ale přítomen u savců, ovšem nikoliv u opičích primátů a u člověka, kteří naopak disponují anti- $\alpha$ -gal IgM, anti-IgG a anti-IgA protilátkami. Nevíme a nemůžeme zatím vědět, jaký byl přínos jednotlivých genových manipulací, protože autoři použili celou kazetu deseti genů. Vzhledem k enormním nákladům a pracnosti přípravy „ten-GE“ prasat je jasné, že ani v budoucnu nebudeme znát podíl jednotlivých genů na výsledku xenotransplantací. Spíše budeme svědky vytvoření podobných zvířat s inzercí a delecí mnoha dalších genů, které se uplatňují v patogenезi humorální rejeckce.

Série xenotransplantací provedených recentně v předních amerických transplantačních centrech je samozřejmě zcela bezprecedentním pionýrským činem. Z pohledu nefrologa je rovněž pozoruhodné, že se autoři zatím vyhnuli první fázi

klinického zkoušení tím, že vytvořili lidský preklinický model využitím pacientů hospitalizovaných s již prokázanou smrtí mozku, u kterých by se jinak uvažovalo o dárcovství orgánů. Podmínkou bylo získání souhlasu rodiny těchto zemřelých lidí. Souhlas definoval čas trvání experimentu. Autoři vzdali hold prvnímu příjemci a pojmenovali po něm svůj preklinický model (Parsonův model), protože je možné, že v budoucnu bude tento nápad využit i při testování jiných postupů či léků, kdy není možné studii provést na živých lidech.

Smrt mozku je spojena s celou řadou různých patofyziologických dějů, které ovlivňují hormonální regulaci a v konečném důsledku perfuzi orgánů a mikrocirkulaci. Proto nemohou být morfologické známky TMA pozorované po xenotransplantaci brány jednoznačně jako projev protilátkami zprostředkované rejekce xenoštěpu. Slibné je, že k aktivaci komplementu nedošlo a ukládání imunoglobulinů nebylo zaznamenáno. Je pravděpo-

dobné, že dříve než xenotransplantace ledvin budou do prvních fází klinického zkoušení zařazováni nemocní, kteří nemají šanci na provedení transplantace srdce ani dlouhodobé přístrojové podpory. Rizika a s nimi spojené etické otázky se musejí vyřešit dříve, než se vývoj posune ke xenotransplantacím ledvin testovaným u běžných pacientů. Nezanedbatelné jsou rovněž finanční otázky. Z otevřených dat je známo, že jedna xenotransplantace od „ten-GE“ prasete stojí okolo půl milionu USD.

Tento komentovaný článek není ve skutečnosti ničím jiným než technickým popisem provedené operace a přípravy k ní. Díky uveřejnění v časopise *American Journal of Transplantation* se s touto unikátní operací mohli seznámit i ostatní. Věřme, že v případě dalších recentně provedených xenotransplantací budeme mít tuto možnost co nejdříve i v jiných než populárně-vědeckých příspěvcích.<sup>2</sup> Transplantační medicína se tak posunula k začátku nové éry.

---

#### LITERATURA

1. Niemann H, Petersen B. The production of multi-transgenic pigs: update and perspectives for xenotransplantation. *Transgenic Res* 2016;25:361–374.
2. Galchen R. The Medical Miracle of a Pig's Heart in a Human Body. <https://www.newyorker.com/magazine/2022/02/28/the-medical-mi->

racle-of-a-pigs-heart-transplant-in-a-human-body. Navštíveno: 3. 3. 2022.