

Przeszczepienie wątroby w modelu zwierzęcym z wykorzystaniem wątroby świń transgenicznych

Liver transplantation in animal model with transgenic pig's liver

Krzysztof Ziaja, Tomasz Urbanek, Wacław Kuczmik, Marcin Kucharzewski, Grzegorz Biolik, Damian Ziaja, Dariusz Stańczyk, Arkadiusz Krupowies, Jacek Kostyra, Robert Latała, Tomasz Ludyga, Marek Kazibudzki, Jerzy Stojko, Barbara Sidorowicz, Henryka Chmurzewska

Katedra i Oddział Kliniczny Chirurgii Ogólnej i Naczyń Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach (Department of General and Vascular Surgery, Medical University of Silesia, Katowice, Poland)

Streszczenie

Wstęp: W pracy przedstawiono własne doświadczenia dotyczące przeszczepu wątroby w modelu zwierzęcym.

Materiał i metody: W ramach doświadczenia wykonano 27 przeszczepów wątroby w modelu świnia-świnia, z czego w 9 przypadkach wątroby świni poddanej transgenezie opartej na wprowadzeniu do komórek świń genu α -1,2-fukozylotransferazy człowieka. Ocenie poddano stan kliniczny zwierząt, jak również cechy histopatologiczne odnoszące się do reakcji odrzutu przeszczepionego narządu. Badania uzupełniono o zabiegi perfuzji wątroby świni transgenicznej krwią ludzką, oceniając spadek stężenia przeciwciał w krwi perfundującej narząd oraz ich akumulację w tkankach wątroby.

Wyniki: Wykonana transgeneza, zaproponowana w badaniu, nie miała wpływu na odpowiedź immunologiczną w obrębie wszczepionej wątroby w modelu ortotopowej transplantacji wątroby w układzie świnia-świnia oraz wykazała ograniczony wpływ na zależną od ksenoprzeciwciał reakcję immunologiczną w modelu perfuzji wątroby świńskiej krwią ludzką.

Wnioski: Udokumentowana możliwość modyfikacji odpowiedzi immunologicznej w wyniku wykonanej transgenezy skłania do dalszych badań nad wykorzystaniem wątroby transgenicznej w transplantologii — w chwili obecnej brak jednak dowodów pozwalających na wykorzystanie tego rodzaju narządu w transplantologii wątroby u człowieka.

Słowa kluczowe: przeszczepienie wątroby, transgeneza, ksenotransplantacja

Chirurgia Polska 2011, 13, 1, 28–41

Abstract

Introduction: In this paper our own experience concerning the animal model of orthotopic liver transplantation is presented.

Material and methods: Twenty seven liver transplantations (pig-to-pig) were performed, including 9 cases of transgenic animal transplantation. In the transgenesis, the human α -(1, 2)-fucosyltransferase gene was implemented. After transplantation the clinical conditions of the transplanted animals were followed and pathological studies of the transplanted livers were conducted. To prove the influence of the performed transgenesis, additionally, the human blood extracorporeal perfusion model of the transgenic animal liver was also proposed.

Results: According to the study's results, the implementation of transgenesis did not result in immunological reaction changes in the pig to pig animal model. However, a limited influence on xenoantibody-related rejection reaction in the pig liver perfusion model was observed.

Conclusions: Thus, the results highlight the necessity of further studies as currently, there are no data confirming the possibility to use such transgenic animal organs for liver xenotransplantation.

Key words: liver transplantation, transgenesis, xenotransplantation

Polish Surgery 2011, 13, 1, 28–41

Wstęp

Jednym z najistotniejszych, a równocześnie nadal trudnych do rozwiązania problemów w chirurgii transplantacyjnej pozostaje niewystarczająca liczba dawców [1, 2]. Wprowadzenie przeszczepów od dawcy żywego lub też, jak w przypadku wątroby, przeszczep części narządu w sposób istotny wpłynęły na powiększenie listy potencjalnych dawców. Od lat poszukiwane są również inne źródła narządów, w tym aspekcie szczególne zainteresowanie budzi możliwość zastosowania ksenotransplantacji z użyciem narządów od zwierząt modyfikowanych genetycznie [3, 4].

Problemy immunologiczne związane z przeszczepem wątroby zwierzęcej skłoniły do poszukiwań możliwości modyfikacji genetycznej (transgenezy) w celu wyhodowania zwierząt, których komórki, tkanki i narządy mogłyby zostać w sposób bezpieczny przeszczepione do organizmu człowieka. Wśród potencjalnych dawców wątroby ksenogenicznej wymienia się przede wszystkim dwie grupy zwierząt — spokrewnione z człowiekiem naczelnie (w tym szympansy i pawiany) oraz świnię [5–8]. Dotychczasowe badania odnoszące się do skuteczności leczenia immunosupresyjnego po ksenotransplantacji, jak również doświadczenia obejmujące próby modyfikacji genetycznej zwierząt nie przyniosły jednak wyników pozwalających bezpiecznie przeszczepić człowiekowi narząd pobrany od zwierzęcia [5, 8, 9].

W piśmiennictwie dostępne są pojedyncze doniesienia dotyczące ksenotransplantacji wątroby małpy oraz świni; doświadczeń tych nie można uznać za zakończone sukcesem [4, 5, 8, 10, 11]. W większości przypadków biorcy tych wątrób zmarli w wyniku powikłań leczenia immunosupresyjnego lub też odrzutu wykonanego przeszczepu [4, 9–11]. W poszukiwaniu rozwiązania tych problemów kolejne obecnie prowadzone badania dotyczące zwierząt transgenicznych poszukują modelu transgenezy o największej skuteczności w zakresie możliwości modyfikacji odpowiedzi immunologicznej po przeszczepieniu [1, 8, 9].

Wśród zasadniczych potencjalnych sposobów kontroli odpowiedzi immunologicznej w przypadku ksenotransplantacji wymienia się wpływ na redukcję odpowiedzi immunologicznej biorcy lub też wpływ na zmniejszenie immunogenności przeszczepianego narządu [5, 9, 7]. Spadek odpowiedzi immunologicznej biorcy można uzyskać w wyniku eliminacji przeciwciał ksenoreaktywnych za pomocą plazma- lub immunoferezy, czy też immunoabsorpcji w kolumnach zawierających odpowiedni antygen [2, 5, 9, 11]. Niestety efekt tego rodzaju zabiegów jest krótkotrwały i jedynie wydłuża czas przeżycia narządu, co sprawia, że kliniczne wykorzystanie powyższego sposobu leczenia pozostaje ograniczone.

W celu przedłużenia efektu zahamowania czynności przeciwciał ksenoreaktywnych liczni autorzy sugerują możliwość zastosowania ciągłych infuzji oligosacharydów blokujących przeciwciała anty-Gal(α 1,3)Gal lub też hamowanie aktywacji układu dopełniacza. Badania nad wpływem spadku odpowiedzi immunologicznej po ksenote-

Introduction

One of the most essential and, at the same time, still difficult problems to solve concerning transplant surgery remains the insufficient number of donors [1, 2]. The introduction of the living donor transplantation or also in case of the liver, split liver transplantation, has significantly influenced the broadening of the list of potential donors. For several years, some other sources of organs have been sought, with special interest being aroused by the possibility of the application of the xenotransplantation with usage of organs harvested from genetically-modified animals [3, 4].

The immunological problems related to the transplantation of an animal liver has led to exploration of the abilities of genetic modification (transgenesis) in order to breed animals, whose cells, tissues and organs could be safely used for transplantation into the human body. Among the potential donors of xenogenic livers, two groups of animals are to be first considered — primates, which are closely-related to human beings (including chimpanzees and baboons), as well as pigs [5–8]. Unfortunately, research up to now concerning the efficacy of immunosuppressive treatment after xenotransplantation, as well as experiments including attempts at genetic modification in animals, have not produced findings which allow one to transplant an organ harvested from an animal to the human body in a safe manner [5, 8, 9].

In the literature, as there are only single reports present concerning xenotransplantation of a liver from a monkey or a pig, these experiments cannot be recognized to have been successfully completed [4, 5, 8, 10, 11]. In most cases the recipients of these livers died due to complications related to immunosuppressive treatment or also due to graft rejection [4, 9–11]. In searching for solutions for these problems, other current research concerning transgenic animals, is attempting to find the model of transgenesis with the highest efficacy in the field of possibilities of immune response modification after transplantation [1, 8, 9].

Among the essential and potential methods of controlling the immune response in cases of xenotransplantation, the influence on reducing the immune response in the recipient, as well as the influence on lowering the immunogenicity of transplanted organs, are listed [5, 7, 9]. A decrease of immune response in the recipient may be obtained as a result of the elimination of the xenoreactive antibodies using plasmapheresis or immunoferesis, as well as immunoabsorption in columns containing proper antigen [2, 5, 9, 11]. Unfortunately, the effect of these kinds of procedures is short-lasting and only prolongs the time of graft survival which makes the clinical application of the above-mentioned treatment method remain limited.

In order to extend the effect of the inhibition of xenoreactive antibodies activity, numerous authors have suggested the possibility of applying continuous infusion of the oligosaccharides-blocking antibody anti-Gal(α 1, 3)Gal or also the inhibition of complement activation. Studies concerning the influence of the decrease of im-

ransplatacji odnoszą się również do możliwości modyfikacji ekspresji antygeny, przeciwko któremu skierowane są ksenoprzeciwciała [2, 4, 11]. Przykładem powyższych badań jest transfekcja świń za pomocą genu α -1,2-fukozylotransferazy. W procesie glikozylacji pod wpływem tego enzymu dochodzi do zastąpienia epitopu Gal(α 1,3)Gal oligosacharydem, przeciwko któremu nie wykształciły się ewolucyjnie ksenoreaktywne przeciwciała [12]. Transgeneza znalazła także zastosowanie w hodowli zwierząt modyfikowanych w zakresie niektórych wspomnianych powyżej czynników regulacyjnych kaskady dopełniacza [2, 5]. W piśmiennictwie zwracają również uwagę doniesienia odnoszące się do zjawiska mikrochimerizmu [13].

Celem pracy zrealizowanej w ramach projektu badawczego PBZ-KBN-048-P05-2001 była ocena skuteczności wykonanej transgenezy w modelu w ortotopowej transplatacji wątroby. Ocenie poddano możliwość wykorzystania wątroby zwierząt transgenicznnych w transplatacji wątroby w modelu zwierzęcym (świnia-świnia) oraz oceniono wpływ wykonanej transgenezy na reakcje odrzutu przeszczepionego narządu w modelu perfuzji wątroby świni krwią ludzką.

Materiał i metody

W doświadczeniu wykorzystano świnię zwistouchę o wadze 60–70 kilogramów. Doświadczenie wykonano w warunkach bloku operacyjnego Centralnej Zwierzętarńi Doświadczalnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach. Zwierzęta tak przed, jak i po zabiegu operacyjnym były umieszczone w boksach obserwacyjnych zwierzętarńi, z zachowaniem możliwych do uzyskania warunków aseptyki i antyseptyki. W pierwszym etapie wykonano 10 ortotopowych transplatacji wątroby (grupa I) w modelu świnia-świnia z wykorzystaniem zwierząt nietransgenicznnych bez leczenia immunosupresyjnego. W drugim etapie doświadczenia wykonano 9 ortotopowych transplatacji wątroby z zastosowaniem immunosupresji (grupa II). Trzeci etap doświadczenia obejmował 9 przeszczepów wątroby świni poddanej transgenezie (z zastosowaniem leczenia immunosupresyjnego — 4 świni i bez leczenia immunosupresyjnego — 5 świń) w modelu świnia-świnia (grupa III). Etap IV badania dotyczył perfuzji pozaustrojowej wątroby świni transgenicznej przy użyciu krwi ludzkiej.

W opisanym w pracy doświadczeniu wykorzystano model transgenezy oparty na wprowadzeniu do komórek świń genu α -1,2-fukozylotransferazy człowieka. Produkt tego genu konkuruje z α -1,3-galaktozylotransferazą o ten sam substrat N-acetylolaktozaminę, co w założeniu powinno ograniczyć reakcje nadostrego i ostrego odrzutu związaną z obecnością w organizmie człowieka ksenoreaktywnych przeciwciał.

Zabieg operacyjny

Zabiegi operacyjne wykonywano w warunkach sali operacyjnej Centralnej Zwierzętarńi Doświadczalnej, w znieczuleniu ogólnym. W trakcie zabiegu zwierzęta

mune response after xenotransplantation relate also to the possibility of the modification of antigen expression, against which the xenoantibodies are directly aimed [2, 4, 11]. An example of the above-mentioned research is pig transfection using the α (1,2)-fucosyltransferase gene. During the glycozylation process, the epitope under the influence of this enzyme, Gal(α 1,3)Gal, is replaced with oligosaccharide against which there are no evolutionarily-developed xenoreactive antibodies [12]. Transgenesis has also found application in breeding genetically-modified animals in the field of some of the above-mentioned factors controlling the complement cascade. In the literature, attention is also brought by reports concerning the microchimerism phenomenon. [13]

The aim of this research, which was carried out within the auspices of the PBZ-KBN-048-P05-2001 research project, was the estimation of the efficacy of performed transgenesis in the orthotopic liver transplantation model. The possibility of using livers from transgenic animals for liver transplantation in the animal model (pig to pig), as well as the influence of a performed transgenesis on rejection reaction of a transplanted graft in the model of perfusion of the porcine liver with human blood, was evaluated.

Material and methods

In this experiment, pigs from Polish Landrace weighing 60–70 kg were used and was performed in the Operating Suite of the Central Animal Facility of the Silesian Medical University (SMU) in Katowice. All animals, both before and after the surgical procedure, were placed in observation cubicles in the Central Animal Facility of the SMU where it was possible to obtain conditions of a sepsis and antisepsis. In the first stage, ten orthotopic liver transplantations were performed (group I) in the pig-to-pig model with the usage non-transgenic animals and without immunosuppressive treatment. In the second stage of the experiment nine orthotopic liver transplantations were performed with application of immunosuppressive treatment (group II). The third stage included nine liver transplantations in pigs after transgenesis (with immunosuppressive treatment — 4 pigs, and without immunosuppressive treatment — 5 pigs) in the pig-to-pig model (group III). The fourth stage of research concerned the extracorporeal perfusion of a transgenic pig liver with human blood.

In the above-described experiment the model of transgenesis was based on the introduction into the pig's cells of the α (1,2)-fucosyltransferase gene. As the product of this gene competes with α (1,3)-galaktosyltransferase for the same substrate — N-acetyllactoseamine — it was assumed that it should limit the reaction of hyperacute and acute rejection connected with the presence of xenoreactive antibodies in the human body.

Surgical procedure

All surgical procedures were performed in the operating rooms of the Central Animal Facility with the animals placed under general anesthesia. During surgery,

wentylowano mechanicznie po wykonaniu tracheostomii oraz założeniu rurki tracheostomijnej. Zabieg operacyjny prowadzono w znieczuleniu ogólnym złożonym, stosując dożylnie fentanyl i pankuronium oraz wziewnie tlen z podtlenkiem azotu i izofluranu. W okresie reperfuzji podawano 500 mg metyloprednizolonu tuż przed zwolnieniem zacisków naczyniowych oraz 500 mg po reperfuzji. Śródoperacyjnie monitorowano ciśnienie tętnicze (pomiar krwawy za pomocą cewnika umieszczonego w tętnicy szyjnej wspólnej) oraz ośrodkowe ciśnienie żyłne (cewnik centralny umieszczony w żyłę szyjną wewnętrzną i główną górną). Ze względu na długi śródwątrobowy przebieg żyły wrotnej oraz ryzyko dużego stopnia niestabilności hemodynamicznej w trakcie eksplantacji narządu (po zakleszczeniu żyły wrotnej i żyły głównej dolnej) wykonanie zabiegu zaplanowano przy wykorzystaniu by-passu żyłno-żylnego z wykorzystaniem Biopompy (napływ: kaniulacja żyły głównej dolnej poniżej wątroby oraz żyły wrotnej/odpływ: kaniulacja żyły głównej dolnej w odcinku nadwątrobowym).

Po znieczuleniu dawcy z cięcia pośrodkowego otwierano jamę brzuszną. Cięcie uzupełniano cięciem poprzecznym, po stronie prawej, przecinając mięśnie proste i powłoki jamy brzusznej, w celu lepszego dostępu do pobieranego narządu. Po wypreparowaniu żyły wrotnej, tętnicy wątrobowej wraz z pniem trzewnym oraz żyły głównej dolnej poniżej i powyżej wątroby, po uruchomieniu narządu poprzez przecięcie więzadeł i przepony pobierano narząd wraz z 5-centymetrowym marginesem żyły głównej dolnej poniżej i 10-centymetrowym marginesem żyły głównej dolnej powyżej wątroby. Przewód żółciowy wspólny przecinano w odcinku przydwunastniczym. Po pobraniu narządu wątrobę umieszczano w kąpielii lodowej, kaniulując naczynia (tętnicę wątrobową i żyłę wrotną), w celu przeprowadzenia perfuzji zimnym płynem UW. Perfuzję wykonywano przy użyciu 1000 ml płynu UW podawanego przez cewnik do tętnicy wątrobowej oraz 2000 ml płynu UW podawanego do żyły wrotnej. Po wypłukaniu wątroby umieszczano ją w pojemniku z lodem, gdzie przechowywano ją do momentu implantacji (czas przechowywania w płynie UW i lodzie 2–4 godzin) po wcześniejszym chirurgicznym opracowaniu. Po wykonaniu cholecystektomii podwiązywano przewód pęcherzykowy oraz tętnicę pęcherzykową. Za pomocą szwu naczyniowego zaopatrywano ewentualne bocznice żyły wrotnej oraz żyły lędźwiowe, odchodzące od żyły głównej dolnej.

W trakcie eksplantacji narządu biorcy cięciem pośrodkowym otwierano jamę brzuszną. Po uruchomieniu wątroby przecinano przeponę, podkuwając żyły przeponowe. Po wypreparowaniu żyły głównej dolnej w odcinku okołonerkowym i powyżej oraz w odcinku nadwątrobowym, kaniulowano żyłę główną dolną w odcinku okołonerkowym oraz żyłę wrotną w odcinku dystalnym (napływ). Kaniulę służącą do zapewniania odpływu z krążenia wrotnego i dystalnego odcinka żyły głównej dolnej wprowadzano do żyły głównej dolnej w odcinku nadwątrobowym. Przed podłączeniem kaniul podawano heparynę ogólnie (5000 j.) oraz do zestawu do krążenia poza-

the animals were ventilated mechanically by way of a tracheostomy. The surgical operations were performed under combined general anesthesia using fentanyl and pancuronium administered intravenously, and using oxygen with nitrogen monoxide and isoflurane in inhalation. In the phase of reperfusion 500 mg of methylprednisolone was administered right before unclamping the vascular clamps and 500 mg after reperfusion. Blood pressure (invasive direct measurement using a cannula placed into common carotid artery) and central venous pressure (a cannula placed inside the internal jugular vein and superior caval vein) were monitored intraoperatively. Due to the long intrahepatic course of the portal vein and the high grade risk of hemodynamic instability during the liver explantation (after clamping the portal vein and the inferior caval vein), the procedure was planned to be performed using a veno-venous bypass with the application of a Biopump (Inflow: cannulation the inferior caval vein below the liver and the portal vein. Outflow: cannulation the inferior caval vein above the liver).

After the donor was anaesthetized the abdominal cavity was opened using the medial incision approach. This incision was completed with a transverse incision on the right-hand side through the rectus muscle and abdominal walls in order to have better access to the organ to be harvested. After preparation of the portal vein, the hepatic artery with the celiac trunk and the inferior caval vein below and above the liver, and after mobilization of the organ by cutting off the ligaments and the diaphragm, the liver was harvested with a 5 cm margin of the inferior caval vein below the liver and a 10 cm margin of the inferior caval vein above it. The common bile duct was severed within the paraduodenal section. After harvesting, the liver was placed into an ice bath and the blood vessels (the hepatic artery and portal vein) were cannulated in order to perform a perfusion using a cold UW solution. The perfusion was carried out using 1000 ml of UW solution applied through the cannula into the hepatic artery and 2000 ml of UW solution applied into portal vein. After perfusion, the liver was placed into a container filled with ice and was preserved until the moment of implantation (preservation time in a UW solution and ice was 2–4 hours) after earlier surgical preparation. A cholecystectomy was then performed and both the cystic duct and cystic artery were ligated. Using vascular suture, all possible branches of the portal vein and lumbar veins deriving from inferior caval vein were ligated.

During the explantation of the liver from the recipient, the abdominal cavity was opened using medial incision. After the liver mobilization the diaphragm was cut and the diaphragmatic veins were tied off. Then, after preparation the inferior caval vein in the perirenal, suprahepatic and higher sections, the inferior caval vein was cannulated in the perirenal region and the portal vein was cannulated in the distal part (inflow). The cannula that delivers the blood from the portal circulation and distal part of inferior caval vein was then inserted into the inferior caval vein within the suprahepatic part. Be-

ustrojowego (2500 j.). Po podłączeniu kaniul do zestawu drenów i biopompy uruchamiano krążenie pozaustrojowe (wartości przepływu w zakresie 400–1200 ml/min — pod kontrolą ciśnienia tętniczego, tętna oraz ciśnienia żylnego ośrodkowego). Po uzyskaniu stabilności hemodynamicznej usuwano narząd biorcy, przygotowując pole do ototopowego wszczepiania wątroby u biorcy. Wątrobę dawcy bezpośrednio przed wszczepieniem przepłukiwano roztworem soli fizjologicznej (500–700 ml), kontrolując stężenie potasu w płynie wypływającym z żył wątrobowych. W trakcie implantacji w pierwszym etapie wykonywano zespolenie żyły głównej dolnej w odcinku nadwątrobowym — koniec do końca — szew naczyniowy Prolene 3,0. Po wykonaniu zespolenia proksymalnego żyły głównej dolnej wykonywano zespolenie żyły wrotnej sposobem koniec do końca szwem 4.0 (po uprzednim usunięciu kaniuli z żyły wrotnej). Po zakończeniu zespolenia wrotnego odtwarzano ciągłość żyły głównej dolnej po dekanulizacji (krążenie za pomocą by-passu żylny-żylnego) — szew 3.0 Prolene. Zespolenie tętnicze wykonywano sposobem koniec do końca pomiędzy tętnicą wątrobową dawcy i biorcy — w przypadku wąskiej tętnicy wątrobowej dawcy wykonywano zespolenie pnia trzewnego dawcy do proksymalnego odcinka tętnicy wątrobowej biorcy — szew Prolene 5.0 lub 6.0. Przewód żółciowy wspólny przeszczepu zespalano z kikutem przewodu żółciowego biorcy sposobem koniec do końca szwem ciągłym PDS 5.0. Zespolenie szynowano drenem Khera w celu monitorowania funkcji ekskrecyjnej wątroby. Po uzyskaniu hemostazy powłoki jamy brzusznej zamykano warstwowo szwami wchłanianymi, pozostawiając w okolicy nadwątrobowej i podwątrobowej dwa dreny. Po zabiegu zwierzę przenoszono do boksu obserwacyjnego Centralnej Zwierzętarni Doświadczalnej, stosując oddech z respiratora.

W schemacie immunosupresji zastosowanej w grupie II wykorzystano leczenie immunosupresyjne pod postacią cyklosporyny (wlew *i.v.*) oraz steroidów. Dawkę cyklosporyny dobierano w zależności od masy ciała biorcy. Cyklosporynę stosowano w dawce początkowej 4 mg/kg/dobę (pod kontrolą stężenia leku w surowicy: średnio 250–300 ng/ml). W okresie okotoreperfuzyjnym stosowano steroidy (metylprednizolon 500 mg bezpośrednio przed i 500 mg po reperfuzji). Dawkę metyloprednizolonu (250 mg) powtarzano po 12 i 24 godzinach od reperfuzji. W grupie III u 5 świń leczonych z wykorzystaniem leczenia immunosupresyjnego w 3 przypadkach zastosowano cyklosporynę i metyloprednizolon, w dwóch kolejnych prograf (Tacrolimus, FUJISAVA) podawany dożylnie we wlewie ciągłym w początkowej dawce 0,2 mg/kg/dobę.

Po zakończeniu okresu obserwacji klinicznej lub też w przypadku wcześniejszego zgonu świni, zwierzęta poddawano badaniu sekcijnemu, pobierając wycinki wątroby do badania histopatologicznego. W badaniach histopatologicznych zastosowano rutynowe barwienie z hematoksyliną i eozyną, ponadto ocenie poddano reakcje immunohistochemiczne z przeciwciałami anti-CD 3 (limfocyty T), anti-CD 68 (makrofagi) oraz anti-CD 20 (lim-

fore the cannulae were connected together, unfractionated heparin was applied both intravenously (5000 U) and to extracorporeal circulation machine (2500 U). After the cannulae were connected to drains and then to a biopump, extracorporeal circulation got started (the flow ranged from 400 to 1200 ml per minute, according to arterial blood pressure, heart rate and central venous pressure). After the hemodynamic stability was obtained the liver from the recipient was removed in order to prepare the site for orthotopic liver engraftment in the recipient. The liver from donor was perfused with physiological saline (500–700 ml) directly before the engraftment, controlling the kalium level in the fluid flowing out from the hepatic veins. During implantation, in the first stage an anastomosis of the inferior caval vein in suprahepatic region was performed (end-to-end method) using a Prolene 3.0 vascular suture. After the proximal anastomosis of inferior caval vein was carried out, an anastomosis of the portal vein was then performed (end-to-end method) using a 4.0 suture (after previous removal of the cannula from the portal vein). Then, after the portal anastomosis was done, the continuity of inferior caval vein was reconstructed after decannulation (circulation with the usage of a veno-venous bypass and using a Prolene 3.0 suture). An arterial anastomosis was the performed using the end-to-end method between the donor and recipient hepatic arteries — in the case of a narrow donor hepatic artery, the anastomosis was carried out between the donor celiac trunk and the proximal part of the recipient hepatic artery (Prolene 5.0 or 6.0 suture). The common bile duct of the transplanted organ was anastomosed with the remnant recipient bile duct using the end-to-end method with a continuous PDS 5.0 suture. This bile anastomosis was then drained with a T-tube in order to monitor the excretion function of the liver. After hemostasis was obtained, the abdominal walls were closed using absorbable sutures leaving two drains in the suprahepatic and infrahepatic regions. When the surgical procedure was finished, the animal was transferred to the observational box of the Central Animal Facility which employed mechanical ventilation with a respirator.

The pattern of immunosuppressive therapy that was applied in group II consisted of cyclosporine (intravenous infusion) and steroids. The dose of cyclosporine was assessed depending on body mass. The initial dose of cyclosporine was 4 mg/kg per day (controlling the drug serum concentration: average 250–300 ng/ml). During the perioperative period steroids were also applied (methylprednisolone 500 mg directly before and 500 mg after reperfusion). The dose of methylprednisolone (250 mg) was repeated 12 and 24 hours after the reperfusion. In group III, out of 5 pigs treated with immunosuppressive therapy, in 3 cases cyclosporine and methylprednisolone were applied, while in the remaining 2, Prograf (tacrolimus, FUJISAVA) was applied intravenously using continuous infusion at an initial dose of 0.2 mg/kg per day.

When the observational period had finished some specimens were collected for histopathological exami-

focyty B). W ocenie histopatologicznej porównywano obraz mikroskopowy preparatów z wycinków wątroby pobranych w trakcie badania sekcyjnego z obrazem wyjściowym (biopsja prawidłowej wątroby przed wszczepieniem), poszukując histopatologicznych cech nadostrego lub ostrego odrzutu przeszczepu wątroby. Obraz mikroskopowy odniesiono do skali oceny histopatologicznej ostrego odrzutu wątroby — *Grading of Acute Liver Allograft Rejection* (Banff 1997) oraz skali *Rejection Activity Index (RAI) /Banff schema for grading liver allograft rejection. An International Consensus Dokument*. Hepatology 1997; 25: 658–663/.

Perfuzja wątroby świni transgenicznej krwią ludzką

W związku z brakiem (na obecnym etapie eksperymentu) możliwości przeszczepienia transgenicznej wątroby człowiekowi oraz koniecznością oceny potencjalnej korzyści z wykonanej transgenezy w modelu świnia-człowiek wykonano kolejny etap doświadczenia zakładającego wykonanie perfuzji wątroby świni transgenicznej (oraz świni nietransgenicznej jako kontrola) przy użyciu świeżej krwi ludzkiej. Eksperyment perfuzji wątroby świńskiej krwią ludzką (*in vitro*) wykonano w krążeniu pozaustrojowym z wykorzystaniem oksygenatora. Jako kontrolę dla wątroby świni transgenicznej wykorzystano wątrobę zwierząt nietransgenicznych perfundowaną krwią świńską oraz wątrobę świni nietransgenicznej perfundowaną krwią ludzką. Wątrobę pobierano według zasad, jak w przypadku pobrania narządu do przeszczepu. Po przepłukaniu wątroby płynem UW i podłączeniu kanułu do żyły wrotnej i tętnicy wątrobowej (napływ) oraz żyły głównej dolnej (odpływ) dokonywano perfuzji wątroby w okresie 6 godzin świeżą krwią ludzką przy pomocy zestawu do krążenia pozaustrojowego. Każdorazowo w odstępach półgodzinnych pobierano krew do badania. W celu uniknięcia zmian niedokrwiennych zastosowano oksygenator.

Po zakończeniu perfuzji pobrano materiał do badania histopatologicznego uwzględniającego również stopień akumulacji kompleksów immunologicznych w wątrobie (odczyn z przeciwciałami anti-IgG i anti-IgM). Równocześnie ocenie poddano stężenie ksenoprzeciwciał w surowicy krwi ludzkiej wykorzystanej do krążenia poustrojowego w trakcie trwania perfuzji narządu.

Stężenie ksenoprzeciwciał w surowicy krwi ludzkiej, wykorzystanej do perfuzji wątroby, oceniono w sposób pośredni na podstawie stopnia wiązania przeciwciała anti-IgG i anti-IgM z komórkami hodowli śródbłonka (w hodowli konfluentnej). Do badań wykorzystano komórki śródbłonka świni wyizolowane poprzez enzymatyczne trawienie błony wewnętrznej aorty wieprzowej (pobranej w warunkach aseptycznych). Trawienia dokonywano 0,1-procentowym roztworem kolagenozy. Wyizolowane komórki śródbłonka hodowano w pożywce hodowlanej M199 (*GibcoBRL*) z dodatkiem 10-procentowej surowicy i 1-procentowego roztworu antybiotyków (penicylina, streptomycyna, amfoterycyna) w inkubatorze w nawilżonym powietrzu z 5-procentowym dwutlenkiem węgla w temperaturze 37 stopni. Pożywkę zmieniano co 72 go-

nation while in cases where death of the pig had earlier occurred, the animal underwent a postmortem examination. Histopathological examinations consisted of routine hematoxylin and eosin staining, as well as immunohistochemical investigations with anti-CD 3 (T lymphocytes), anti-CD 68 (macrophages) and anti-CD 20 (B lymphocytes). During the histopathological investigation, microscopic images of liver specimens taken in the postmortem examination were compared with the initial images (biopsy of normal liver before transplantation) searching for histopathological features of hyperacute or acute rejection of the transplanted liver. The microscopic images were then referred to classification of histopathological estimation of acute liver rejection — Banff 1997 (*Grading of Acute Liver Allograft Rejection*) and the RAI scale (*Rejection Activity Index*) /Banff schema for grading liver allograft rejection. An International Consensus Document. Hepatology 1997; 25: 658–63/.

Perfusion of a transgenic pig liver with human blood

Because of the lack (at this stage of the experiment) of the possibility for transplanting the transgenic liver to a human being and the necessity of estimating the potential benefits from a performed transgenesis in the pig-to-human model, another stage of experiment was performed aimed at the perfusion of a transgenic pig liver (and non-transgenic as control group) with fresh human blood. The experiment of perfusion of the porcine liver with human blood (*in vitro*) was made using extracorporeal circulation with an oxygenator. As a control for transgenic pig liver, a non-transgenic pig liver perfused with porcine blood and non-transgenic pig liver perfused with human blood were used. The liver was harvested according to the same rules as in the case of collecting organs for transplantation. After perfusing the liver with UW solution and connecting the cannulae to the portal vein and the hepatic artery (inflow) and to the inferior caval vein (outflow), perfusion was performed over a period of 6 hours using fresh human blood with the help of extracorporeal circulation devices. Blood samples were taken for examinations at thirty-minute intervals, while in order to avoid ischemic changes, an oxygenator was used.

When the perfusion was completed, specimens were taken for histopathological examination, also taking into consideration the degree of immune complexes accumulation within the liver (reaction with anti-IgG and anti-IgM antibodies). At the same time the xenoantibody titer was subjected for assessment of human serum which had been used in extracorporeal circulation during organ perfusion.

The xenoantibody titer in human serum that had been used for liver perfusion was estimated using an indirect method on the basis of IgG and IgM binding degree with cells from an epithelium culture (in confluent culture). For the study, porcine epithelium cells were used which were isolated through enzymatic digestion of the intima from a porcine aorta (harvested in aseptic conditions). Enzymatic digestion was performed using a 0.1% solution of collagenase, while the isolated epithelium cells

dziny. Do badań immunohistochemicznych wykorzystano komórki po pierwszym pasażu. W tym celu 2×10^5 komórek zawieszano w 2,5 ml pożywki hodowlanej i przenoszono do naczynia hodowlanego (35 mm szalka Petriego). Hodowlę prowadzono w atmosferze 5-procentowego dwutlenku węgla w temperaturze 37 stopni, aż rozrastające się komórki pokrywały prawie całą powierzchnię dna naczynia hodowlanego (48 godzin) wraz z umieszczonymi na dnie szkiełkami mikroskopowymi, na których dokonywano dalszych etapów badań immunohistochemicznych. Po tej inkubacji pożywkę usuwano, komórki przemywano roztworem PBS i utrwalano na szkiełkach w 70-procentowym etanolu. Uzyskane w ten sposób utrwalone na szkiełku mikroskopowym komórki poddawano dalszej analizie.

Komórki śródbłonna świni nietransgenicznego (w hodowli konfluentnej) umieszczono na szkiełkach mikroskopowych i inkubowano (przez 5 min) z kolejnymi próbkami surowicy krwi ludzkiej pobranej w trakcie perfuzji pozaustrojowej wątroby krwią ludzką. Po inkubacji i wypłukaniu pozostałej surowicy, na tych samych szkiełkach mikroskopowych wykonywano odczyny immunohistochemiczne z przeciwciałami przeciwko ludzkim immunoglobulinom IgG i IgM, w celu określenia stopnia wiązania ksenoprzeciwciał z komórkami śródbłonna świni nietransgenicznego. Porównania stężenia ksenoprzeciwciał dokonano oceniając odsetkowy spadek stężenia przeciwciał trakcie trwania krążenia pozaustrojowego.

Wyniki

Grupa I – przeszczep wątroby świni nietransgenicznego bez leczenia immunosupresyjnego

We wszystkich 10 przypadkach usunięto wątrobę dawcy, doprowadzając do reperfuzy wszczepionego narządu. Średni czas krążenia żylny-żylny w okresie początkowym wynosił 50 minut; w trakcie ostatnich 3 zabiegów 35 minut. W okresie po zabiegu zwierzęta utrzymywano w głębokiej sedacji, podając wlew ciągły fentanyle i tiopentalu. W okresie pooperacyjnym świnie otrzymywały płynoterapię przez wkłucie centralne oraz antybiotyki i heparynę drobnocząsteczkową (enoksaparyna 1 mg/kg m.c.). W ocenie histopatologicznej wycinków wątroby stanowiących równocześnie kontrolę dla pozostałych grup zabiegów stwierdzano nacieki zapalne w przestrzeniach wrotnych złożone głównie z komórek limfoidalnych. W przypadkach zabiegów 7 i 9, w których obserwowano obrzęk wszczepionego narządu w badaniu sekcyjnym (w tym w jednym przypadku z afunkcją wszczepionej wątroby — zabieg nr 7), w trakcie badania histopatologicznego nacieki te były istotnie bardziej zaznaczone niż w pozostałych przypadkach (złożone głównie z komórek limfatycznych przy obecności komórek granulocytarnych i pojedynczych eozynofili). Dodatkowo w tych dwóch przypadkach obserwowano nacieki komórek zapalnych wokół przewodów żółciowych. W przypadku wątroby charakteryzującej się afunkcją w okresie po przeszczepieniu (zabieg nr 7) w badaniu histopatologicznym stwierdzano cechy martwicy hepatocytów w okolicy żył

were cultured in an M199 (GibcoBRL) growth medium with the addition of 10% human serum and 1% solution of antibiotics (penicillin, streptomycin, amphotericin) and placed into a cell incubator with moist air containing 5% carbon dioxide at a temperature of 37 degrees centigrade. The growth medium was changed every 72 hours. For immunohistochemical investigations, cells after the first passage were used. Moreover, 2×10^5 cells were suspended into 2.5 ml of growth medium and then were transferred into a cell culture dish (35 mm Petri dish). The culture was kept in an atmosphere of 5% carbon dioxide at a temperature of 37 degrees centigrade until the moment when expanding cells had almost completely covered the bottom of the cell culture dish (48 hours), along with placed on the bottom microscopic slides (which were used for further stages of immunohistochemical investigations). After this incubation the growth medium was removed, the cells were rinsed with PBS solution and fixed onto microscopic slides placed into 70% ethanol. Having been obtained in this way and fixed onto microscopic slides, the cells were subjected to further analysis.

Epithelium cells from non-transgenic pigs (in a confluent culture) were put on microscopic slides and incubated (for 5 minutes) with other human serum samples taken during liver extracorporeal perfusion with human blood. Following the incubation and after rinsing the remaining serum, immunohistochemical reactions with antibodies against human immunoglobulin IgG and IgM were performed on the same microscopic slides, in order to estimate the binding degree of xenoantibodies with the epithelium cells from non-transgenic pigs. A comparison of xenoantibody titers was then made estimating the percentage decrease of antibody titer during extracorporeal circulation.

Results

Group I – liver transplantation in non-transgenic pig without immunosuppressive therapy

In all 10 cases the liver in the donor was removed leading to reperfusion of the implanted organ. The average time of veno-venous circulation in the initial period was 50 minutes; while during the last 3 procedures this was reduced to 35 minutes. During the postoperative period the animals were kept in deep sedation using continuous intravenous infusion of fentanyl and thiopental. Fluid therapy was also applied through a central venous catheter, antibiotics and low-molecular-weight heparin (enoxaparin at a dose of 1 mg per kilogram of body mass). In a histopathological evaluation of liver specimens, which posed at the same time the control for the others groups of operations, inflammatory infiltrations into portal areas, composed mainly of lymphoid cells, were found. In the cases of the 7th and 9th transplantations, where swelling of the implanted grafts was observed in post mortem examinations (including one case of afunction of the implanted liver — procedure No. 7), in the histopathological examination these infiltrations were signifi-

centralnych oraz dużego stopnia nacieki okołonaczyniowe (bez cech zakrzepicy). Wartości RAI oszacowane na podstawie oceny wycinków badanych przeszczepionych wątroń zawierały się w przedziale 2–7 (średnio 4). Na podstawie oceny histopatologicznej udokumentowano również brak jednoznacznych cech „nadostrego” odrzutu wątroby w tej grupie zabiegów. W większości preparatów stwierdzano jednak cechy histopatologiczne, charakterystyczne dla reakcji ostrego odrzutu wątroby o różnym stopniu nasilenia. Według skali Banffa u 40% nasilenie reakcji odrzutu określono na stopień I (niewielkiego stopnia), u kolejnych 40% jako średniego stopnia (stopień II) i w 20% w stopniu III.

Grupa II – przeszczep wątroby świni nietransgenicznej z zastosowaniem leczenia immunosupresyjnego

Z 9 zabiegów wykonanych w tej części doświadczenia 8 zwierząt przeżyło zabieg operacyjny. Po operacji zwierzęta poddano obserwacji w czasie do 48 godzin po zabiegu w boksie obserwacyjnym Centralnej Zwierzętarni Doświadczalnej. We wszystkich przypadkach obserwowano prawidłowe wydzielanie żółci przez pozostawiony w drogach żółciowych dren Khera. W badaniach biochemicznych we wszystkich przypadkach zanotowano po reperfuzyjnym wzroście stężenia aminotransferaz (ASPART, ALAT, GGTP) ulegający stopniowej normalizacji w okresie po zabiegu operacyjnym (z wyjątkiem jednego przypadku, gdzie obserwowano stały pooperacyjny wzrost stężenia aminotransferaz do momentu zakończenia obserwacji). W dwóch przypadkach (zabieg 5 i 8) w okresie po operacji obserwowano narastanie kwasicy metabolicznej oraz stężenia leukocytozy z przesunięciem w lewo.

W badaniu histologicznym w żadnym przypadku nie stwierdzono obrazu mikroskopowego sugerującego występowanie nadostrego odrzutu wątroby w okresie obserwacji po zabiegu operacyjnym. W 60% ocenianych przypadków (zabiegi 2, 6 i 7) stwierdzano prawidłowy obraz większości przestrzeni wrotnych z pojedynczymi limfocytami widocznymi w niektórych fragmentach preparatów (zmiany widoczne w ograniczonym zakresie jedynie w niektórych polach preparatów). Pod dużym powiększeniem w obrębie zrazików uwidoczniło pojedyncze, obumierające hepatocyty i pojedyncze, rozproszone komórki limfoidalne. W preparatach tych zaobserwowano również odcinkowo pojedyncze komórki limfocytarne w okolicy przewodów żółciowych oraz w okolicy okołonaczyniowej — widoczne jedynie w ograniczonych fragmentach preparatów. W pozostałych ocenianych przypadkach uwidoczniło rozproszone nacieki zapalne złożone głównie z limfocytów i w przestrzeniach wrotnych — część hepatocytów w okolicy żył centralnych z cechami apoptozy, odcinkowo komórki parenchymalne z cechami zwyrodnienia drobnokropelkowego; nieliczne komórki limfocytarne otaczające przewody żółciowe. Wartości RAI w tej grupie zwierząt były istotnie niższe niż w przypadku zabiegów wykonanych bez leczenia immunosupresyjnego i zawierały się w zakresie 1–4 (śr. 2,6). W porównaniu z grupą zwierząt, w której przeszczepu wątroby dokonano bez wspomnianej terapii immunosu-

cantly more evident than in others cases (composed mainly of lymphatic cells in the presence of granulocytic cells and single eosinophils). Additionally, in these two cases there were also observed infiltrations of inflammatory cells located around the bile ducts. In the case of a liver that was characterized by a function in the postoperative period (procedure No. 7), the histopathological examination revealed the features of hepatocyte necrosis in the regions of the central veins and large degree perivascular infiltrations (without the features of thrombosis). The RAI index (Rejection Activity Index) estimated on the basis of an evaluation that the examined specimens of transplanted livers ranged from 2 to 7 (on average 4). On the basis of a histopathological evaluation, the lack of unambiguous features of hyperacute liver rejection was also substantiated in this group of procedures. In the majority of specimens, however, histopathological features characteristic for reaction of acute liver rejection were confirmed with various degrees of intensity. According to the Banff schema, a 40% intensity of rejection reaction was established as grade I (mild degree), a further 40% as grade II (moderate degree) and 20% as grade III (severe degree).

Group II – liver transplantation in non-transgenic pig with immunosuppressive therapy

From 9 transplantations performed at this stage of experiment, 8 animals survived the operation. When the transplantations were finished, the animals were observed for 48 hours after the procedure in observation cubicles in the Central Animal Facility of the SMU. In all cases, proper bile secretion was observed through a T-tube which was placed into the bile ducts. Biochemical investigations revealed in all cases increased postreperfusional levels of aminotransferases (GOT, GPT, GGTP) gradually becoming normal during the postoperative period (with the exception of one case where the constant increase of aminotransferases levels until the end of observation was noted). In two cases — (procedures Nos. 5 and 8) during postoperative period an increase in metabolic acidosis and elevated levels of leucocytosis with the shift to the left was observed.

In the histological examination, in none of cases did the microscopic image confirm or suggest hyperacute liver rejection during the postoperative period after transplantation. In 60% of the analyzed cases (transplantations Nos. 2, 6 and 7) a correct image concerning most of the portal areas was found with single lymphocytes being visible in some parts of the specimens (changes are visible in limited range only in some areas of the specimens). Under high magnification, single necrotizing hepatocytes and single dispersed lymphoid cells were found within the lobules of liver. In these specimens also were seen segmentally single lymphocytic cells in the vicinity of bile ducts and blood vessels, which were visible only in limited parts of the specimens. In the other evaluated cases, dispersed inflammatory infiltrations were found composed mainly of lymphocytes located in portal ar-

presyjnej zmiany miejscowe w badanych preparatach w tej grupie były istotnie mniejsze.

Grupa III – przeszczep wątroby świni transgenicznej bez i z zastosowaniem leczenia immunosupresyjnego

We wszystkich 9 przypadkach przeszczepu wątroby świni transgenicznej doprowadzono do skutecznej reperfuzy narządu. W jednym przypadku (przeszczep wątroby świni transgenicznej bez leczenia immunosupresyjnego), mimo skutecznej reperfuzy narządu, zwierzę zmarło 30 minut po operacji z powodu powikłań krwotocznych. W pozostałych przypadkach po zamknięciu brzucha zwierzęta przenoszono do boksu obserwacyjnego na terenie zwierzętarni, prowadząc dalsze intensywne leczenie farmakologiczne. Zwierzęta poddano obserwacji do 48 godzin po przeszczepie (okres 48-godzinnej obserwacji przeżyły wszystkie zwierzęta). We wszystkich przypadkach obserwowano prawidłowe wydzielanie żółci bezpośrednio po zabiegu. U 1 świni w grupie przeszczepu wątroby nietransgenicznej po 12 godzinach stwierdzono stopniowy zanik drenażu żółciowego (od 24 godzin po zabiegu całkowity brak wydzielania żółci). Nie obserwowano powikłań kardiologicznych lub innych powikłań chirurgicznych zarówno w grupie bez, jak i z immunosupresją. Po początkowym wzroście stężenia aminotransferaz związanym z reperfuzyą u wszystkich zwierząt poddanych zabiegowi z wykorzystaniem leczenia immunosupresyjnego obserwowano stopniową normalizację stężenia enzymów wątrobowych w okresie 1. i 2. doby po zabiegu. W grupie zabiegów bez leczenia immunosupresyjnego, w jednym przypadku stężenie aminotransferaz pozostało wysokie, mimo skutecznej reperfuzy oraz prawidłowego wydzielania żółci po zabiegu (APAT, ALAT > 1200 μ /l). W pozostałych przypadkach po przejściowym spadku stężenia enzymów wątrobowych po zabiegu, w okresie powyżej 24 godzin od operacji, obserwowano stopniowe narastanie stężenia enzymów wraz ze wzrostem leukocytozy (u jednej świni zaburzeniom tym towarzyszyło zmniejszenie, a następnie całkowity brak wydzielania żółci). W ocenie histopatologicznej w przypadku wycinków przeszczepionych wątrób zwierząt transgenicznych bez leczenia immunosupresyjnego (zabiegi 1, 3 i 9) stwierdzono obraz histopatologiczny porównywalny z wynikami uzyskanymi w wyniku przeszczepienia wątroby nietransgenicznej bez leczenia immunosupresyjnego. W obu przypadkach udokumentowano obecność rozległych nacieków zapalnych w okolicy przestrzeni Dissego z przewagą komórek limfoidalnych. Żył centralne, miejscami słabo widoczne, zlewały się ze zrazikami. W przypadku wątroby z zabiegu nr 3 odcinkowo uwidoczniło niewielkie stopnia ogniska martwicy. Wartość indeksu RAI wyniosła odpowiednio 4 (zabieg 1), 6 (zabieg 3) i 5 punktów (zabieg 9).

W przypadku zabiegów wykonanych z wykorzystaniem leczenia immunosupresyjnego (zabiegi 4–8) w obrazie histopatologicznym stwierdzano niewielkiego stopnia rozproszone nacieki zapalne złożone z komórek limfoidalnych i pojedynczych granulocytów obojętnochłonnych. W obrębie hepatocytów zanotowano cechy zwy-

szkodliwych, while part of the hepatocytes in the vicinity of the central veins with features of apoptosis, segmentally were parenchymal cells with features of small-droplet degeneration. A sparse number of lymphocytic cells also surrounded the bile ducts, while the RAI index (Rejection Activity Index) in this group of animals was significantly lower than in cases of transplantations performed without immunosuppressive therapy and ranged from 1 to 4 (on average 2.6). In comparison with the group of animals, these liver transplantations were performed without the above-mentioned immunosuppressive therapy, while local changes in the specimens examined in this group were significantly smaller.

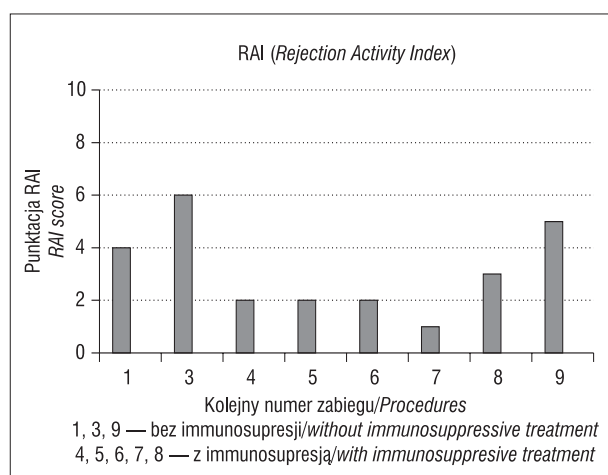
Group III – liver transplantation from transgenic pig with and without immunosuppressive treatment

In all 9 cases of liver transplantation from transgenic pigs effective graft reperfusion was reached. In one case (liver transplantation from transgenic pig without immunosuppressive treatment), despite effective graft reperfusion the animal died 30 minutes after the operation due to hemorrhagic complications. In the other cases, after abdominal closure the animal was transferred to the observational cubicle within the Facility and further intensive pharmacological treatment was applied. The animals were placed under observation until 48 hours after transplantation (during this 48-hour observation period all animals survived). In all cases, directly after transplantation proper bile secretion was observed. In one pig from the group of non-transgenic liver transplantation, after 12 hours the gradual disappearance of bile drainage was noted (24 hours after transplantation a complete lack of bile secretion was confirmed). Neither were cardiologic nor other surgical complications observed, both in the groups with and without immunosuppressive treatment. After an initial increase in aminotransferases levels related to reperfusion, in all animals after transplantation, with usage of immunosuppressive treatment, gradual normalization of hepatic enzymes levels within the 1st and 2nd day after the procedure was noted. In the group without immunosuppressive treatment, in one case levels of aminotransferases remained elevated, despite effective reperfusion and proper bile secretion after the operation (GOT, GPT over 1200 U/l). In all other cases after a transitory decrease of hepatic enzyme levels following the operation and within period over 24 hours after transplantation, a gradual increase in hepatic enzyme levels was observed along with an increase in leukocytosis (in one pig these disturbances were accompanied by a decrease, and next, a complete lack of bile secretion). In the histopathological evaluation, in cases of specimens from livers transplanted from transgenic animals without immunosuppressive treatment (procedure Nos. 1, 3 and 9) the histopathological image that was found was comparable with the results gained in transplantations of non-transgenic livers without immunosuppressive treatment. In both cases the presence of extensive inflammatory infiltrations in the vicinity of

rodnienia drobnokropelkowego, a odcinkowo słabo zaznaczone nacieki limfocytarne w okolicy kanalików żółciowych (fragmentarycznie w nielicznych polach preparatów) oraz niewielkiego stopnia nacieki komórek zapalnych w okolicy żył wrotnych i wątrobowych. Porównując obraz histopatologiczny z preparatami wycinków poprzednio wykonanych przeszczepień wątroby nietransgeniczej z zastosowaniem leczenia immunosupresyjnego, obserwowano zmiany o podobnym nasileniu (znacznie mniejsze jednak niż w przypadku przeszczepienia wątroby nietransgeniczej bez immunosupresji lub też przeszczepu wątroby zwierząt transgenicznych bez leczenia immunosupresyjnego). Indeks RAI zawierał się w tej grupie przeszczepów wątroby transgeniczej z immunosupresją w zakresie od 1 do 3 (ryc. 1).

Etap IV – perfuzja wątroby świni transgeniczej i nietransgeniczej krwią ludzką przy zastosowaniu krążenia pozaustrojowego i oksygenatora (bez zastosowania leczenia immunosupresyjnego)

Badanie histopatologiczne (odczyn immunohistochemiczny z przeciwciałami anti-IgG, anti-IgM w preparatach perfundowanej wątroby): w ocenie histopatologicznej zanotowano porównywalny odczyn anti-IgG (ludzkie) w obrębie preparatów z wycinków wątroby transgeniczej i nietransgeniczej perfundowanej krwią ludzką. Dodatni odczyn obejmował najczęściej okolice triady wątrobowej, okolice kanalika żółciowego oraz pojedyncze hepatocyty w całym preparacie. W tych samych wycinkach wątroby przeprowadzony odczyn anti-IgM wykazywał istotnie mniejsze nasilenie i był nieco słabszy (ale nadal obecny) w przypadku wątroby zwierząt transgenicznych. Zmiany immunopoztywne lokalizowały się w okolicy struktur triady wątrobowej (okolice okołocazy-



Rycina 1. Wartości punktacji RAI na podstawie oceny histopatologicznej w grupie zabiegów ortotopowej transplantacji wątroby świni transgeniczej bez (zabiegi 1, 3, 9) i z zastosowaniem leczenia immunosupresyjnego (zabiegi 4, 5, 6, 7, 8)

Figure 1. RAI score on the basis of histopathological evaluation in group of orthotopic transgenic liver transplantation without (procedures 1, 3, 9) and with usage of immunosuppressive treatment (procedures 4–8)

Disse's perisinusoidal space with advantage of lymphoid cells was documented. Moreover, the central veins were locally poorly visible and merged with the lobules. In the case of the liver from procedure No. 3 small degree focuses of necrosis were visualized locally. The RAI index was respectively 4 (procedure No. 1), 6 (procedure No. 3) and 5 points (procedure No. 9).

In cases of transplantations performed with the usage of immunosuppressive treatment (procedures 4–8) histopathological images revealed a small degree of dispersed inflammatory infiltrations composed of lymphoid cells and single neutrophil granulocytes. Within the hepatocytes were noticed the features of small-droplet degeneration and poorly-marked local lymphocytic infiltrations in the vicinity of bile canaliculi (fragmentarily in sparse eye-fields of specimens) and small degree infiltrations of inflammatory cells in the vicinity of the portal and hepatic veins. Comparing the histopathological image with specimens from previously performed non-transgenic liver transplantations with usage of immunosuppressive treatment, changes with similar intensifications (significantly lower however than in case of non-transgenic liver transplantation without immunosuppression or also transgenic liver transplantation without immunosuppression) were observed. The RAI index in this group of transgenic liver transplantations with immunosuppression ranged from 1 to 3 (Fig. 1).

Stage IV – transgenic and non-transgenic pig liver perfusion with human blood using extracorporeal circulation and oxygenator (without using immunosuppressive treatment)

Regarding histopathological examination/immunohistochemical reaction with anti-IgG, anti IgM antibodies in specimens from a perfused liver, a histopathological evaluation revealed a comparable reaction with anti-IgG (human) within specimens from transgenic and non-transgenic livers perfused with human blood. Positive reaction included mostly the regions of the hepatic triad, bile canaliculus and single hepatocytes within the whole specimen. In these same liver specimens anti-IgM reaction showed significantly lower intensification and was somewhat weaker (but still present) in cases of livers from transgenic animals. Immune-positive changes were localized in the regions of the hepatic triad (within the perivascular region and the subendothelial space in bile canaliculi).

Xenoantibody titer investigations: the comparison of xenoantibody titers was performed, estimating the percentage decrease of antibody titer during extracorporeal circulation. In the initial stage of liver perfusion procedure, similar antibody titers were observed in human blood serum in both groups, transgenic as well as non-transgenic livers (with a small and statistically insignificant decrease in the group of non-transgenic livers). This difference turned out to be statistically significant in final stage of circulation (after 4 hours perfusion — both concerning IgG and IgM) (Fig. 2).

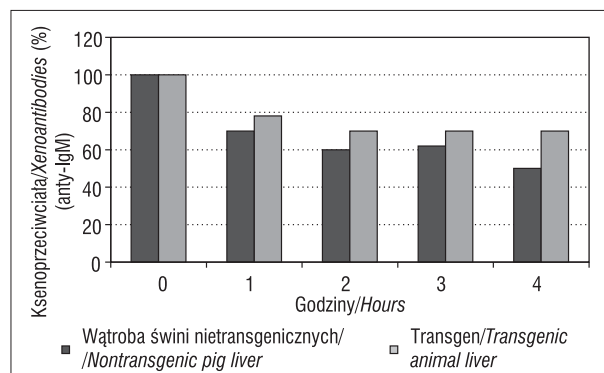
niowej oraz w okolicy podsródbłonkowej w kanalikach żółciowych).

Badanie stężenia ksenoprzeciwciał: porównania poziomu ksenoprzeciwciał dokonano oceniając procentowy spadek stężenia przeciwciał trakcie trwania krążenia pozaustrojowego. W początkowym okresie zabiegu perfuzji wątroby obserwowano podobne wartości przeciwciał w surowicy krwi ludzkiej w obu grupach, zarówno wątroby transgenicznej, jak i nietransgenicznej, z niewielkim nieistotnym statystycznie spadkiem w grupie wątrób nietransgenicznym. Różnica ta okazała się istotna statystycznie w końcowym okresie trwania krążenia po 4 godzinach perfuzji zarówno w zakresie anty-IgG, jak i anty-IgM (ryc. 2).

Dyskusja

Na podstawie oceny przebiegu klinicznego, jak i oceny histopatologicznej, w opisanym powyżej części doświadczenia opartej na modelu badawczym świnia-świnia, nie wykazano istotnych różnic na korzyść wątroby transgenicznej w przypadku jej przeszczepu w modelu świnia-świnia. Zarówno wątroby transgeniczne, jak i nietransgeniczne w okresie wczesnej obserwacji pooperacyjnej podejmowały funkcję ekskrecyjną, a w badaniach histopatologicznych nie zanotowano istotnych różnic pomiędzy obiema grupami (przeszczep wątroby transgenicznej i nietransgenicznej). Zasadnicza różnica w powyższym modelu doświadczenia (przeszczep w układzie świnia-świnia) dotyczyła jedynie stosowania terapii immunosupresyjnej. W badaniach histopatologicznych w obu grupach (przeszczep wątroby świnii nietransgenicznej lub świnii transgenicznej) nie obserwowano zmian sugerujących obraz nadostrego odrzutu wątroby. Modyfikacja genetyczna, którą stosowano w doświadczeniu powinna mieć jednak znaczenie w przypadku wykorzystania powyższej zmodyfikowanej genetycznie wątroby u człowieka. W opisanym w pracy doświadczeniu wykorzystano model transgenezy oparty na wprowadzeniu do komórek świń genu α -1,2-fukozylotransferazy człowieka [12]. Produkt tego genu konkuruje z α -1,3-galaktozylotransferazą o ten sam substrat N-acetylolaktosaminę, co w założeniu powinno ograniczyć reakcje nadostrego i ostrego odrzutu związaną z obecnością w organizmie człowieka ksenoreaktywnych przeciwciał. W procesie glikozylacji pod wpływem wprowadzonego do komórek świnii ludzkiego enzymu dochodzi do zastąpienia epitopu Gal(α 1,3)Gal oligosacharydem, przeciwko któremu nie wykształciły się ewolucyjnie ksenoreaktywne przeciwciała [12].

Mimo powyższych teoretycznych założeń odnoszących się do przeprowadzonej modyfikacji genetycznej, wykonana transgeneza miała ograniczony wpływ na wyniki drugiej części doświadczenia opartego na perfuzji wątroby świnii krwią ludzką. Wprowadzona konstrukcja genowa pozwoliła ograniczyć (nie zapobiegając jednak całkowicie) stopień akumulacji ludzkich immunoglobulin anty-IgM w wątrobie (przy braku zmian w zakresie akumulacji przeciwciał klasy anty-IgG). Podobnie w surowicy krwi perfundującej wątrobę w zastosowanym



Rycina 2. Zmiana stężenia immunoglobulin anty-IgM w surowicy krwi perfundującej wątrobę w trakcie trwania perfuzji pozaustrojowej (odczyn anty-IgM wg metodyki podanej powyżej)

Figure 2. The change of IgM immunoglobulin titer in blood serum perfusing the liver during extracorporeal perfusion (the anti-IgM reaction according to above-mentioned methodology)

Discussion

On the basis of both clinical and histopathological evaluations in the above-described part of the experiment based on a pig-to-pig experimental model, significant differences of advantage of transgenic liver was not shown in cases of liver transplantation in the pig-to-pig model. Both transgenic and non-transgenic livers during the period of early postoperative observation took up excretory functions, while in histopathological examinations significant differences between both groups were not noted (transgenic and non-transgenic liver transplantation). Fundamental differences in foregoing model of experiment (transplantation in pig-to-pig model) concerned only the usage of immunosuppressive treatment. Histopathological examinations in both groups (transgenic and non-transgenic pig liver transplantation) did not reveal changes suggesting hyperacute rejection reaction. Genetic modification, which was applied in this experiment, should however be of importance in cases of using above-mentioned genetically modified livers in human. In the experiment described in this study, the model of transgenesis used was based on the insertion of the human gene, α (1,2)-fucosyltransferase, into porcine cells [12]. As the product of this gene competes with α (1,3)-galactosyltransferase for the same substrate — N-acetylactosamine — it was assumed that this should limit the reaction of hyperacute and acute rejection connected with the presence of xenoreactive antibodies in the human body. During the glycosylation process under the influence of human enzymes introduced into porcine cells, the epitope, Gal(α 1,3)Gal, is replaced with oligosaccharide, against which there are no evolutionarily-developed xenoreactive antibodies [12].

Despite the above-listed theoretical assumptions relating to the performance of genetic modification, the transgenesis which was carried out had limited influence

modelu zauważono również ograniczenie eliminacji ludzkich anty-IgM w trakcie trwania krążenia. Zmiany te mogą dowodzić spadku wiązania ksenoprzeciwciał w zmienionej genetycznie wątrobie, nie eliminując jednak całkowicie reakcji immunologicznej związanej z wszczepieniem wątroby świni transgenicznej u człowieka.

Uzyskane obserwacje sugerują konieczność dalszych badań nad skuteczniejszym wariantem modyfikacji genetycznej. Wykorzystanie transgenicznej świni jako potencjalnego dawcy wątroby budzi w tym aspekcie szczególnie zainteresowanie [3, 11, 14, 15].

Dostępność, wysoka zdolność reprodukcyjna, krótki czas wzrostu, odpowiednia wielkość i budowa oraz możliwość manipulacji genetycznych, a także względnie niskie ryzyko przeniesienia schorzeń odzwierzęcych oraz podkreślana w piśmiennictwie oporność na reinfekcje wirusem zapalenia wątroby typu B i C, to zasadnicze zalety skłaniające do wykorzystania wątroby świńskiej w ksenotransplantacji [5, 9, 15, 16]. Wadą świni jako dawcy wątroby pozostaje jednak istotna różnica gatunkowa, co zwiększa ryzyko wystąpienia powikłań związanych z występowaniem naturalnych ksenoreaktywnych przeciwciał w surowicy biorcy (człowieka) i prowadzić może do nadostrego odrzutu przeszczepu [2, 5, 9]. Problemem pozostaje także brak całkowitej zgodności w zakresie funkcji fizjologicznych, a szczególnie różnice gatunkowe w zakresie niektórych produkowanych przez wątrobę białek, które po przeszczepieniu wątroby mogą nie spełniać swoich funkcji fizjologicznych w nowym środowisku [2, 8, 17].

Badania nad modyfikacją odpowiedzi immunologicznej, jak też możliwościami wykorzystania na tym polu transgenezy trwają w chwili obecnej w wielu ośrodkach w aspekcie zarówno ortotopowej ksenotransplantacji u człowieka, jak i czasowego pomostu dla chorych oczekujących na transplantację [3, 11, 14]. Mimo zaawansowanych badań nadal jednak brak narządu, który w bezpieczny sposób mógłby zostać przeszczepiony człowiekowi. W okresie od 1966 roku do chwili obecnej na świecie wykonano kilkanaście ksenogenicznych ortotopowych transplantacji wątroby, przeszczepiając biorcom ludzkim wątrobę szympansa, pawiana lub świni [5, 8, 9]. Do historii przeszły w szczególności wykonane już w dobie stosunkowo coraz lepiej poznawanej terapii immunosupresyjnej dwie ortotopowe ksenotransplantacje wątroby wykonane w latach 1992–1993 w Pittsburgu (Stany Zjednoczone), w których wątrobę pawiana przeszczepiono chorym z wirusem zapalenia wątroby typu B, a chorych poddano intensywnemu leczeniu immunosupresyjnemu [4, 10]. Oba przypadki zakończyły się niestety niepowodzeniem.

Inną możliwością wykorzystania wątroby zwierzęcej są podejmowane próby heterotopowego przeszczepu wątroby — zabieg ten wykorzystywany był najczęściej u chorych z ostrą lub podostrą niewydolnością wątroby, stwarzając szansę na powrót funkcji pozostawionej natywnej wątroby biorcy. Heterotopowy przeszczep wątroby wykorzystywany był także jako pomost przed właściwym przeszczepem ortotopowym oraz w leczeniu niektórych metabolicznych schorzeń wątroby. Tak jak w przypadku ortotopowego przeszczepu wątroby zwierzęcej,

on the results of the second part of the experiment based on the perfusion of a pig's liver with human blood. The inserted gene structure allowed one to limit, but not completely prevent, the degree of accumulation of human IgM immunoglobulins within the liver (with a lack of changes in the field of accumulation of the IgG immunoglobulins). Similarly, in the serum perfusing the liver in the above-presented model, the limitation of the elimination of human IgM during circulation was also noted. These changes may prove the decrease in the binding of xenoantibodies in genetically-modified livers, not completely eliminating, however, the immunological reaction connected with the transplantation a porcine transgenic liver into a human body.

The observations gained suggest the necessity of further studies concerning more effective types of genetic modification. The usage of transgenic pigs as potential liver donors arouses particular interest in this regard [3, 11, 14, 15].

The are fundamental advantages which induce one to use porcine livers in xenotransplantation, namely the accessibility of pigs, their high reproductive ability, their short time of growth, their suitable size and constitution, the possibilities to carry out their genetic manipulation, the relatively low risk of transmission of zoonosis, as well as their resistance to reinfections with hepatitis B and viruses, a factor which has been emphasized in the literature [5, 9, 15, 16]. The disadvantage of using pigs as a liver donors still remains the significant species difference, which may increase the risk of complications related to the presence of natural xenoreactive antibodies in recipient serum (human) and may lead to hyperacute graft rejection [2, 5, 9]. Another problem is the lack of complete compatibility in the field of physiological functions, especially regarding species differences in the production of certain proteins within the liver, which after transplantation may not work properly in its new environment [2, 8, 17].

Research projects concerning modifications of immunological response, as well as the possibilities of the usage of transgenesis in this field, are being run at present in many centers regarding orthotopic liver xenotransplantations in human beings and as a temporary alternative for patients waiting for transplantation [3, 11, 14]. In spite of the advanced stages of research, there is still shortage of organs which could be transplanted to humans in a safe manner. From 1966 until today dozens of xenogenic orthotopic liver transplantations, have been performed, implanting into human recipients the livers chimpanzees, baboons and pigs [5, 8, 9]. In particular, two historic orthotopic liver xenotransplantations were performed in 1992 and 1993 in Pittsburgh (USA), at a time when relatively better and better immunosuppressive treatment was available. As livers from baboons were transplanted to these patients suffering from infections of the hepatitis B virus, they were subjected to intensive immunosuppressive treatment [4, 10]. Unfortunately, both operations were unsuccessful.

The other possibilities of using animal livers have been based on attempts at heterotopic liver transplanta-

bariera immunologiczna także w tym przypadku stanowi nadal istotne przeciwwskazanie do rutynowego stosowania tego typu zabiegu u człowieka (również w przypadku chorych oczekujących na przeszczepienie wątroby ludzkiej) [4, 5, 9, 17]. Kolejne zastosowania wątroby zwierzęcej (w tym potencjalnie wątroby zwierząt transgenicznych) u chorych ze schyłkową niewydolnością wątroby obejmują wykorzystanie wątroby do perfuzji pozaustrojowej oraz przeszczepienia hepatocytów podawanych do krążenia wrotnego lub śledziony [18–23]. W przypadku przeszczepienia hepatocytów, ze względu na małą objętość podawanych komórek w celu uniknięcia miejscowych powikłań miejscowej infuzji, trudno w chwili obecnej uzyskać wyniki porównywalne z transplantacją całego narządu. Wadą tego postępowania jest też stosunkowo niskie przeżycie komórek w nowym środowisku oraz zaburzenia ich funkcji [5, 9, 20]. W chwili obecnej zasadniczym wskazaniem do przeszczepienia hepatocytów są metaboliczne choroby wątroby. W tym przypadku wszczepienie nawet stosunkowo niewielkiej liczby komórek może spowodować wyleczenie defektu metabolicznego związanego na przykład z brakiem któregoś z enzymów w komórkach natywnej wątroby [5, 9]. Przykładem mogą być tu próby leczenia zespołu Criglera Najara typu I [5]. Ze względu na dużo większą możliwość manipulacji genetycznych, postępowanie to stwarza także pole do wykorzystania hepatocytów zwierzęcych.

Doniesienia piśmiennictwa opisują także przynajmniej kilka modeli wykorzystania perfuzji pozaustrojowej z wykorzystaniem ksenogenicznego narządu lub systemów opartych na izolatach lub liniach komórkowych hepatocytów zwierzęcych lub ludzkich [21–23]. W chwili obecnej wykorzystywane są różne linie komórkowe — począwszy od naturalnych hepatocytów, zarówno ludzkich, jak i zwierzęcych (najczęściej świńskich) poprzez komórki nieśmiertelnych komórek wątrobowych, aż do komórek nowotworowych (*Human hepatoblastoma*) [5, 11, 22, 23]. Mimo że metoda ta nie jest idealna, możliwość doraźnego wykorzystania powyższego sposobu przynajmniej częściowej detoksyfikacji wątroby sprawia, że coraz częściej sięga się po tego typu rozwiązania, szczególnie w przypadku chorych z ostrą niewydolnością wątroby lub też u chorych oczekujących na przeszczepienie wątroby [21–23].

Jak widać z powyższego omówienia, istnieje wiele możliwości wykorzystania transgenicznej wątroby lub też samych hepatocytów; problemem pozostaje jednak nadal zagadnienie niezgodności immunologicznej w przypadku ksenotransplantacji [24]. Poszukiwanie nowych konstrukcji genowych (w tym złożonych wieloskładnikowych modeli transgenezy) skłania do kontynuowania badań w tym obszarze.

Wnioski

1. Wykonana transgeneza zaproponowana w badaniu nie ma wpływu na odpowiedź immunologiczną w obrębie wszczepionej wątroby w modelu ortotopowej transplantacji wątroby w układzie świnia–świnia oraz

tions, a procedure used mostly in patients affected with acute or subacute liver insufficiency. It offers one the chance for the return of functions within the remaining native recipient liver, as heterotopic liver transplantation has also been used as a temporary alternative before appropriate orthotopic liver transplantation and in the treatment of some metabolic liver diseases. As in the case of orthotopic animal liver transplantation, the immunological barrier still poses significant contraindication for routine application this type of procedures in human beings (also in cases of patients waiting for human liver transplantation) [4, 5, 9, 17]. Other attempts to use animal livers (including potentially the livers from transgenic animals) concerned patients with end-stage liver insufficiency and included the usage of the liver for extracorporeal perfusion and transplantation of hepatocytes to be applied to portal circulation or to the spleen [18–23]. In cases of hepatocyte transplantation, for the sake of the small volume of applied cells (in order to avoid local complications of local infusion), it is hard at this moment to obtain results comparable with whole organ transplantation. The disadvantage of this method is also the relatively low survival rate of hepatocytes in their new environment and disturbances concerning their functions [5, 9, 20]. At present, the fundamental indication for hepatocyte transplantation are metabolic liver diseases. In this case implantation of even small number of hepatocytes may cause a resolution of a metabolic defect related to, for example, the lack of certain enzymes within the native hepatic cells [5, 9]. An example of the above-mentioned method may include attempts to treat Type 1 Crigler-Najjar Syndrome [5]. Due to the greater and greater possibilities resulting from genetic manipulation, these developments have created a way to use animal hepatocytes.

Reports from the literature also describe at least a few models of employing extracorporeal perfusion by using a xenogenic organ or systems based on isolates or cell lineage compounds of human or animal hepatocytes [21–23]. Currently, different cell lineages are used — including those from natural hepatocytes, both human and animal (mostly from pigs), through immortalized hepatic cells and as far as neoplastic cells (*Human hepatoblastoma*) [5, 11, 22, 23]. Although this method is not perfect, the possibility of the temporary usage of the above-mentioned method for at least partial liver detoxification has resulted in surgeons considering this kind of solution more and more often, especially in cases of patients affected with acute liver insufficiency or in patients waiting for liver transplantation [21–23].

As it can be seen on the basis of the above report, there are many possibilities employing transgenic livers, or even only hepatocytes. However, the problem of immunological incompatibility in cases of xenotransplantation still remains [24]. Therefore, the search for new gene constructions (including complex and multicomponent models of transgenesis) is continuing to drive research in this field.

wykazuje ograniczony wpływ na zależną od ksenoprzeciwciał reakcję immunologiczną w modelu perfuzji wątroby świńskiej krwią ludzką.

2. Udokumentowana możliwość modyfikacji odpowiedzi immunologicznej w wyniku wykonanej transgenezy skłania do dalszych badań nad wykorzystaniem wątroby transgenicznej w transplantologii — w chwili obecnej brak jednak dowodów pozwalających na wykorzystanie tego rodzaju narządu w transplantologii wątroby u człowieka.

Piśmiennictwo (References)

1. Bartlett DC, Newsome PN. Xenotransplantation: still a bridge too far? *Transplantation*. 2010; 90: 481–482.
2. Perico N, Remuzzi G. Xenotransplantation: problems and prospects. *Nephrol Dial Transplant*. 1997; 12 (suppl.) 1: 59–64.
3. Ekser B, Gridelli B, Tector AJ, Cooper DK. Pig liver xenotransplantation as a bridge to allotransplantation: which patients might benefit? *Transplantation* 2009; 88: 1041–1049.
4. Fung J, Rao A, Phil D, Starzl T. Clinical trials and projected future of liver xenotransplantation. *World J Surg*. 1997; 21: 956–961.
5. Kanazawa A, Platt JL. Perspectives of xenotransplantation of the liver. *Seminars in Liver Disease* 2000; 20: 511–522.
6. Calne RY, Davis DR, Pena JR. Hepatic allografts and xenografts in primates. *Lancet* 1970; 1: 103–106.
7. Wolf P, Meyer C, Budjema K. The pig as a model in liver transplantation. *Vet Res*. 1997; 28: 217–222.
8. Kanai N, Platt J. Xenotransplantation of the liver. *Clin Liver Dis*. 2000; 4: 731–746.
9. Sundback CA, Vacanti JP. Alternative to liver transplantation: from hepatocyte transplantation to tissue-engineered organs. *Gastroenterology* 2000; 118: 438–442.
10. Starzl TE, Tzakis A, Fung JJ. Prospects of clinical xenotransplantation. *Transplantation Proceedings* 1994; 26: 1082–1088.
11. Taniguchi S, Cooper DKC. Clinical xenotransplantation: past present and future. *Am R Coll Surg Engl*. 1997; 79: 13–19.
12. Sharma A, Okabe JF, Birch P, Platt JL, Logan JS. Reduction in the level of gal(alpha 1,3)gal in transgenic mice and pigs by the expression of an alpha (1,2)fucosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1996; 93: 7190–7195.
13. Starzl E, Murase N, Demetris A, Trucco M, Fung J. The mystique of hepatic tolerogenicity. *Seminars in Liver Disease* 2000; 20: 497–510.
14. Hara H, Gridelli B, Lin YJ, Marcos A, Cooper DK. Liver xenografts for the treatment of acute liver failure: clinical and exper-

Conclusions

1. The performed transgenesis proposed in this experiment does not have influence on the immune response within the transplanted liver in the pig-to-pig model of orthotopic liver transplantation. However, in the model of porcine liver perfusion with human blood, it reveals a limited influence on immune reaction, depending on the presence of xenoantibodies.
2. The documented possibility of immune response modification as a result of performed transgenesis is driving further research concerning the usage of transgenic liver in transplantology. At present, however, the shortage of research precludes one from using this kind of organ in transplantology in humans.

imental experience and remaining immunologic barriers. *Liver Transpl*. 2008; 14: 425–434.

15. Hara H, Campanile N, Tai HC *et al*. An in vitro model of pig liver xenotransplantation — pig complement is associated with reduced lysis of wild-type and genetically modified pig cells. *Xenotransplantation* 2010; 17: 370–378.
16. Calne RY, Davis DR, Pena JR. Hepatic allografts and xenografts in primates. *Lancet* 1970; 1: 103–106.
17. Winkler M, Schlitt HJ. Ksenotransplantation der Leber. *Zentralbl Chir*. 1999; 124: 621–627.
18. Burlak C, Paris LL, Chihara RK *et al*. The fate of human platelets perfused through the pig liver: implications for xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2010; 17: 350–361.
19. Poncelet AJ, Denis D, Gianello P. Cellular xenotransplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2009; 14: 168–174.
20. Strom S, Fisher R. Hepatocyte transplantation: new possibilities for therapy. *Gastroenterology* 2003; 124: 568–571.
21. te Velde AA, Flendrig LM, Ladiges NCJJ, Chamuleau RAFM. Possible immunological problem of bioartificial liver support. *Int J Artif Organs* 1997; 20: 418–421.
22. Stockmann HB, Hiemstra CA, Marquet RL, Ijzermans JN. Extracorporeal perfusion for the treatment of acute liver failure. *Ann Surg*. 2000; 23: 460–470.
23. Borneman R, Smith MD, Gerlach JC. Consideration of potential immunological problems in the application of xenogenic hybrid liver support. *Int J Artif Organs* 1996; 19: 655–663.
24. Hammer C. Immunosuppression in Xenotransplantation. *Transplantation Proceedings* 1996; 28: 6: 3017–3020.

Adres do korespondencji (Address for correspondence):

Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Ziąja
Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyń
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
ul. Ziołowa 45/47, 40–635 Katowice

Praca wpłynęła do Redakcji: 11.01.2011 r.