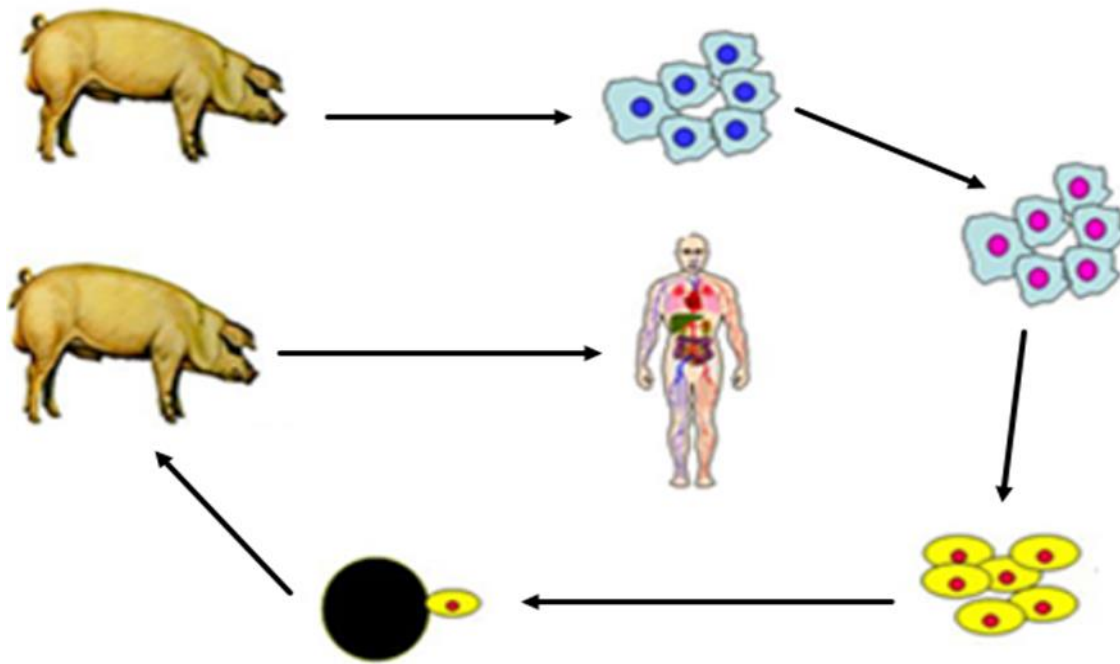


ΤΕΙ ΗΠΕΙΡΟΥ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ



ΞΕΝΟΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ – ΧΡΗΣΗ ΧΟΙΡΕΙΟΥ ΙΣΤΟΥ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΟ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΑΧΙΛΛΕΑΣ ΠΑΠΑΒΛΑΣΟΠΟΥΛΟΣ

Επιβλέπων: Μαριάννα Μπαρμπαγιάννη

Άρτα, Ιούνιος 2018

XENOTRANSPLANTATION – USE OF SWINE TISSUE TO HUMANS

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

1. Μπαρμπαγιάνη Μαριάννα
2. Γκούβα Ευαγγελία
3. Χατζηζήσης Λάμπρος

© Παπαβλασόπουλος Αχιλλέας, 2018.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Δήλωση μη λογοκλοπής

Δηλώνω υπεύθυνα και γνωρίζοντας τις κυρώσεις του Ν. 2121/1993 περί Πνευματικής Ιδιοκτησίας, ότι η παρούσα πτυχιακή εργασία είναι εξ ολοκλήρου αποτέλεσμα δικής μου ερευνητικής εργασίας, δεν αποτελεί προϊόν αντιγραφής ούτε προέρχεται από ανάθεση σε τρίτους. Όλες οι πηγές που χρησιμοποιήθηκαν (κάθε είδους, μορφής και προέλευσης) για τη συγγραφή της περιλαμβάνονται στη βιβλιογραφία.

Παπαβλασόπουλος Αχιλλέας

Υπογραφή

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστίσω την καθηγήτρια μου κ. Μαριάννα Μπαρμπαγιάννη για την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε με στόχο την συγγραφή της παρούσας πτυχιακής εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία περιγράφεται η διαδικασία της ξενομεταμόσχευσης που έχει ως στόχο την αύξηση του βιοτικού επιπέδου με την χρήση διαγονιδιακών ζώων. Οι αυξανόμενες συχνότητες εμφάνισης ανθρώπινων θανατηφόρων νοσημάτων σε αντιδιαστολή με τον αριθμό των ανθρώπων που είναι δωρητές οργάνων, τείνουν τους ερευνητές στην εύρεση λύσης-γεφύρωση του χάσματος μεταξύ των δοτών και των ανθρώπων που βρίσκονται στην λίστα αναμονής. Η χρήση των διαγονιδιακών ζώων και συγκεκριμένα των χοίρων έχει βοηθήσει αρκετά και στόχος της παρούσας εργασίας είναι η ανάδειξη του θέματος της ξενομεταμόσχευσης καθώς και η διαδικασία παραγωγής και εκτροφής των ζώων αυτών καθώς και η ανάδειξη των προβλημάτων της διαδικασίας αυτής αλλά και των λύσεων της με στόχο ο αναγνώστης να λάβει μια σφαιρική εικόνα της διαδικασίας αυτής, του τρόπου διεξαγωγής της καθώς και των κινδύνων που ελλοχεύουν πίσω από την ξενομεταμόσχευση.

ABSTRACT

This paper describes the process of xenotransplantation which aims to raise the standard of living using transgenic animals. The disproportionate increase of occurrence of human lethal disease compared to the number of organ donors necessitates the need for a solution to bridge the gap between donors and people on the waiting list. The use of transgenic animals, and in particular pigs, has aided in closing this gap. The aim of this work is to highlight all aspects of xenotransplantation, including the process and complications of rearing these animals. This paper encourages the reader to take a global view of xenotransplantation, how it has progressed, and the inherent dangers behind it.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
ABSTRACT.....	2
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	3
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	5
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	8
ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ.....	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	13
1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....	16
2 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ.....	23
3 Η ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ ΓΙΑ ΞΕΝΟΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ.....	25
3.1 Ο ΧΟΙΡΟΣ ΩΣ ΠΙΘΑΝΟΣ ΔΟΤΗΣ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΩΝ.....	25
3.2 Ο ΧΟΙΡΟΣ ΩΣ ANIMAL MODEL ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ.....	32
4. ΑΠΟΡΡΙΨΗ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ.....	33
4.1 Η ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ.....	35
4.1.1. Το σύστημα του συμπληρώματος.....	35
4.1.2. Τα συστατικά του συμπληρώματος.....	36
4.1.3. Οι οδοί ενεργοποίησης του συστήματος του συμπληρώματος.....	42
4.1.3.1 Η κλασσική οδός.....	43
4.1.3.2 Η εναλλακτική οδός.....	44
4.1.3.3 Η οδός των λεκτινών.....	44
4.1.3.4 Η λυτική οδός.....	45
4.1.4. Οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες του συμπληρώματος.....	46

4.1.5. Οι υποδοχείς του συμπληρώματος.....	47
4.1.6 Η λεκτινική οδός - Η πρωτεΐνη MBL.....	48
4.1.6.1 Δομή και λειτουργία των πρωτεϊνών MBL.....	48
4.1.6.2 Δομή των γονιδίων MBL.....	51
4.2. ΥΠΕΡΟΞΕΙΑ ΑΠΟΡΡΙΨΗ – HAR.....	53
4.3 ΟΞΕΙΑ ΑΓΓΕΙΑΚΗ ΑΠΟΡΡΙΨΗ – AVR.....	54
4.4 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΠΟΡΡΙΨΗ – CER.....	55
4.5 ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΡΡΙΨΗ – CHR.....	56
5. ΖΩΝΟΣΟΙ.....	57
5.1 Ο ΙΟΣ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Ε - HEV.....	60
5.2 Ο ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΓΑΛΟΪΟΣ ΤΟΥ ΧΟΙΡΟΥ ΚΑΙ ΑΛΛΟΙ ΕΡΠΗΤΟΪΟΙ.....	63
5.3 ΚΥΚΛΟΪΟΙ-CV.....	66
5.4 Ο ΧΟΙΡΕΙΟΣ ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ ΡΕΤΡΟΪΟΣ – PERV.....	69
6. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΚΑΙ ΞΕΝΟΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ.....	72
6.1 ΚΥΡΙΟΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΖΩΩΝ.....	75
6.2 ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ CRISPER.....	78
6.2.1 Ο μηχανισμός δράσης του συστήματος CRISPR.....	79
6.2.2 Βιοτεχνολογική χρήση & εφαρμογές της Cas9.....	80
6.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΓΙΑ ΕΠΙΤΥΧΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΧΟΙΡΙΩΝ ΙΣΤΩΝ.....	83
6.4 Η ΧΡΗΣΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΧΟΙΡΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ.....	86
6.5 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΤΡΟΠΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΠΑΝΤΗΣΗΣ.....	88
7. ΚΑΤΑΛΛΗΛΕΣ ΦΥΛΕΣ ΓΙΑ ΞΕΝΟΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ.....	93
7.1 Η ΦΥΛΗ GÖTTINGEN MINI PIG.....	97
7.2 Η ΦΥΛΗ AUCKLAND ISLAND PIG.....	105
8. ΗΘΟΛΟΓΙΑ.....	106
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	108

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Ομοιότητες νεφρικής λειτουργίας μεταξύ του χοίρου και του ανθρώπου.....	26
Πίνακας 2. Ομοιότητες CVS του ανθρώπου και του χοίρου.....	28
Πίνακας 3. Οι πρωτεΐνες του συστήματος του συμπληρώματος της κλασικής οδού.....	37
Πίνακας 4. Οι πρωτεΐνες του συστήματος του συμπληρώματος της εναλλακτικής οδού....	38
Πίνακας 5. Οι πρωτεΐνες του συστήματος του συμπληρώματος της λεκτινικής οδού.....	39
Πίνακας 6. Οι πρωτεΐνες του συστήματος του συμπληρώματος του MAC.....	40
Πίνακας 7. Οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες του συστήματος του συμπληρώματος.....	41
Πίνακας 8. Οι μικροοργανισμοί για τους οποίους ελέγχθηκε ο χοίρος του είδους Auckland island για την μεταμόσχευση κυττάρων.....	58
Πίνακας 9. Στρατηγικές για την αύξηση της μικροβιακής ασφάλειας.....	71
Πίνακας 10. Αναγραφή γονιδίων και η λειτουργία τους.....	89
Πίνακας 11. Η θερμοκρασία του χώρου ανάλογα την ηλικία.....	99
Πίνακας 12. Η ημερήσια ποσότητα τροφής.....	104

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Alexis Carrel.....	16
Εικόνα 2. Peter Medawar.....	17
Εικόνα 3. Dr Thomas Srarzl.....	18
Εικόνα 4. Keith Reemits.....	18
Εικόνα 5. Dr. James D. Hardy.....	18
Εικόνα 6. Christiaan Barnard.....	19
Εικόνα 7. Dr Thomas Srarzl.....	20
Εικόνα 8. Jeff Getty.....	20
Εικόνα 9. Michael Helyer.....	21
Εικόνα 10. Robert Pennington.....	21
Εικόνα 11. Πνεύμονας χοίρου.....	27
Εικόνα 12 : Καρδιά χοίρου.....	27
Εικόνα 13 : Χοιρομητέρα με τους απογόνους της.....	28
Εικόνα 14 : Χρήση χμαιρικών ζώων ως πύλη οργάνων με την χρήση των ανθρώπινων βλαστικών κυττάρων.....	30
Εικόνα 15 : class I και class II MHC.....	31
Εικόνα 16 : Ιστομορφολογία της εξέλιξης της απόρριψης καρδιακού μοσχεύματος.....	33
Εικόνα 17. Παθογένεση της απόρριψης του μοσχεύματος.....	34
Εικόνα 18 : Το σύστημα του συμπληρώματος.....	42
Εικόνα 19. Σχηματική απεικόνιση του μορίου C3.....	47
Εικόνα 20 : Σκίτσο αναπαράστασης της σύνδεσης των ζωνοσώων με τον άνθρωπο.....	57
Εικόνα 21. Ο ιός της Ηπατίτιδας E.....	60
Εικόνα 22. Σχηματική απεικόνιση του προγράμματος εξάλληψης του ιού HEV.....	62
Εικόνα 23. Μολυσμένα κύτταρα με CMV.....	63
Εικόνα 24. Υπατοκύτταρα μολυσμένα με CMV.....	64
Εικόνα 25. Μολυσμένα κύτταρα χοίρου με CV.....	66
Εικόνα 26. Σύγκριση υγιούς ζώου με ζώο που νοσεί από PMWS.....	67
Εικόνα 27. Νεκρό χοιρίδιο από PMWS.....	68

Εικόνα 28. Το γονιδίωμα του PERV.....	69
Εικόνα 29. Η α -1,3galactosyltransferase.....	72
Εικόνα 30. α -galactosyl.....	73
Εικόνα 31. $\text{Gal}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAcOR}$	73
Εικόνα 32. Ο κύκλος σχηματισμού της αGal	74
Εικόνα 33. Τρόποι παραγωγής διαγονιδιακών ζώων.....	77
Εικόνα 34. Ο γενετικός τύπος του συστήματος CRISPER.....	78
Εικόνα 35. Σχηματική απεικόνιση των περιοχών της Cas9.....	81
Εικόνα 36. Χοίρος της φυλής Pot-bellied pig.....	94
Εικόνα 37. Χοίρος της φυλής Choctaw Hog.....	94
Εικόνα 38. Χοίρος της φυλής Minnesota minipig.....	95
Εικόνα 39. Χοίρος της φυλής Kunekune.....	96
Εικόνα 40. Χοίρος της φυλής Göttingen mini pig.....	97
Εικόνα 41. Σχαρωτό πλαστικό δάπεδο.....	98
Εικόνα 42. Πιπίλα για χορήγηση νερού κατά ελεύθερη βούληση.....	98
Εικόνα 43. Πίτουρο βρώμης καρπός.....	99
Εικόνα 44. καρπός κριθαριού.....	100
Εικόνα 45. Καρπός σιταριού.....	100
Εικόνα 46. Σόγια.....	101
Εικόνα 47. Μελάσα.....	101
Εικόνα 48. Ηλιάνθος.....	102
Εικόνα 49. Πηγές βιταμινών.....	102
Εικόνα 50. Χοίρος φυλής Auckland Island.....	105

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1. Απεικόνιση, δωρητές οργάνων, πραγματοποιούμενες μεταμοσχεύσεις, λίστα αναμονής.....	23
Διάγραμμα 2. Φυσιολογική ανάπτυξη χοιριδίου σε βάρος σε σχέση με την ηλικία.....	103

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

Å : ångström

a-1,3-Gal : a-1 3-galactosyltransferase : α-1,3-γαλακτοσυλτρανσφεράση

a-1,3-GaTKO : alpha-1,3-galactosyltransferase knock out : α-1,3-γαλακτοσυλτρανσφεράση
knock out

ALL : Acute Lymphocytic Leukemia : Οξεία Λεμφογενής Λευχαιμία

AP : Alternative Pathway : Εναλλακτική οδός

AVR : Acute Vascular Rejection : οξεία αγγειακή απόρριψη

BTE : Basal Transcription Elements : Βασικά Στοιχεία Μεταγραφής

BM : Bone Marrow : Μυελός των Οστών

bp : Base Pair : Ζευγη Βασεων

BP : Binding Protein : Πρωτεΐνη Πρόσδεσης

BUN : Blood Urea Nitrogen : Συγκέντρωση Αζώτου Ουρίας Αίματος

CD : Clusters of Differentiation : Θραύσματα Διαφοροποίησης

CeR : Cellular Rejection : Κυτταρική Απόρριψη

ChAV : Chicken Anemia Virus : Ιική Αναιμία των Πουλερικών

ChR : Chronic Rejection : Χρόνια Απόρριψη

CML : Chronic Myeloid Leukemia : Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία

CNS : Central Nervous System : Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

CP : Classical Pathway : Κλασσική

CPB : Cardiopulmonary bypass : Καρδιοπνευμονική Παράκαμψη

CR : Complement Receptor : Υποδοχέας Συμπληρώματος

CRD : Carbohydrate-Recognition Domain : Υδατανθρακική περιοχή αναγνώρισης

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats : Συσταδοποιημένες, βραχείες, παλινδρομικές επαναλήψεις που διατάσσονται σε κανονικά διαστήματα

CRPs : Complement Regulatory Proteins : Πρωτεΐνες Ρύθμισης του Συμπληρώματος

CV : Circovirus : Κυκλοϊός

CVS : Cardiovascular system : Καρδιαγγειακό Σύστημα

DAF : Decay-Accelerating Factor : Συντελεστής επιτάχυνσης αποσύνθεσης

dCas9 : diversified Cas9 : Τροποποιημένη πρωτεΐνη Cas9

DIC : Disseminated Intravascular Coagulation : διάχυτη ενδαγγειακή πήξη

DPF : Designated Pathogen-Free : Οργανισμοί απελευθερωμένοι γενικά από παθογόνους μικροοργανισμούς

DR : Direct Repeats : Συντηρητικές Επαναλήψεις

EGF : Epidermal Growth Factor : Επιδερμικός Αυξητικός Παράγοντας

EndoGalC : Endo- β -Galactosidase C : ενδο- β -γαλακτοσιδάση C

ESc : Embryonic Stem cells : Εμβρυικά Βλαστικά Κύτταρα

Fas L : Fas ligand : συνδέτης Fas

GFP : Green Fluorescent Protein : Πράσινη Φθορίζουσα Πρωτεΐνη

GFR : Glomerular Filtration Rates : Επίπεδα Πλασματικής Κάθαρσης Κρεατινίνης

Gly : Glycine : Ομάδα τριπλέτας αμινοξέων (γλυκίνη)

GnT-I : beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase I : β -1,4-N-ακετυλογλυκοζαμιλτρανσφεράση I

hA20 : human A20 tumor necrosis factor- α : Ανθρώπινος παράγοντας νέκρωσης όγκων A20

HAR : Hyperacute Rejection : Υπεροξεία απόρριψη

HCMV : Human Cytomegalovirus : Ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός

hCTLA4-Ig : cytotoxic T lymphocyte-associated antigen : Αντιγόνο συσχετισμένο με την κυτοτοξικότητα των T λεμφοκυττάρων

HEV : Hepatitis E virus : Ιός της ηπατίτιδας E

HSCS : heat shock consensus sequence : Θέση αντίδρασης στην θερμική καταπόνηση

hHO-1 : human heme oxygenase-1 : Ανθρώπινη οξυγενάση της αίμης 1

HIV : Human Immunodeficiency Virus : Ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας

HLA : human leukocyte antigen : Ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα

HNH : Αυτοτελής δομική περιοχή με ενεργότητα νουκλεάσης

HR : Homologous Repair : Ομόλογος ανασυνδυασμός

hTM : human thrombomodulin : Ανθρώπινη θρομβομοντουλίνη

H-transferase : alpha-1,2-fucosyltransferase : α -1,2φουκοσυλτρανσφεράση

IBMIR : instant bloodmediated unflamatory reaction : Στιγμαία αντίδραση φλεγμονικών διαμεσολαβητών του αίματος

Ig : Immunoglobulin : Ανοσογλοβουλίνη

IL : Interleukin : Ιντερλευκίνη

LP : Lectin pathway : Οδός των λεκτινών

Ls : Leader sequence : Οδηγό ακολουθία

LTRs : Long terminal repeats : Ακραίες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες

MAC : Mebrane Attact Complex : Σύμπλοκο λύσεως της μεμβράνης

MASP

MBL : Mannose-Binding Lectin : Λεκτίνη συνδεδεμένη με μαννόζη

MCP : Mebrane Co-factor Protein : Πρωτεϊνικός μεμβρανικός παράγοντας

MCP : Membrane Cofactor Protein : Μεμβρανική πρωτεΐνη-μεσολαβητής

MHC : Major Histocompatibility Complex : Μείζον Σύστημα Ιστοσυμβατότητας

MI : microinjection : Μικροέγχυση

NHEJ : Non-Homologous End Joining : Μη ομόλογος ανασυνδυασμός

NKc : Natural Killer cell : Φυσικά Φονικά Κύτταρα

NT : Nuclear Transfer : Πυρηνική Μεταφορά

ORF : Open reading frames : Πλαίσια Αναγνώρισης

PAM : Protospacer Adjacent Motif

PCMV : Porcine Cytomegalovirus : Μεγαλοϊός του Χοιρου

PCR : Polymerase Chain Reaction : Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης

PCV : Porcine Circoviruses : Κυκλοϊός του Χοίρου

PD-L1 : Programmed Death Ligand : Προγραμματισμένος Κυτταρικός Θάνατος

Pecs : Porcine Endothelial Cells : Ενδοθηλιακά Κύτταρα Χοίρου

PERV : Porcine Endogenous Retrovirus : Χοίρειος Ενδογενής Ρετροϊός

PERV : Porcine Endogenous Retroviruses : Ενδογενής Ρετροϊός του Χοίρου

PLHV : Porcine Lymphotropic Herpes Viruses : Χοίρειος Λεμφοτρόπος Ερπητοϊός

PMWS : Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome : Σύνδρομο Απίσχυσης των Χοίρων
Μετά τον Απογαλακτισμό

RP : Recombinant Protein : Ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη

RuvC-I : Αυτοτελής δομική περιοχή με ενεργότητα νουκλεάσης

RV : rabies virus : Ιός της λύσσας

SCNT : Somatic Cell Nuclear Transfer : Πυρηνική μεταφορά στα σωματικά κύτταρα

SP : Surfactant Proteins : Επιφανειακές Πρωτεΐνες

SPF : Specific-Pathogen-Free : Οργανισμοί απελευθερωμένοι από συγκεκριμένους παθογόνους
μικροοργανισμούς

SRC : Short-Consensus Repeat : μικρές συναινετικές επαναλήψεις

Ss : Spacers : Μη συντηρητικές επαναλήψεις

TALENs : Transcription Activator-Like Effector Nucleases

TAs : Transgene Animals : Διαγονιδιακά Ζώα

TMA : Thrombotic Microangiopathy : Θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια

tracrRNA : trans-activating crRNA

TRAIL : tumor necrosis factor- α -related apoptosis-inducing ligand : Παράγοντας δέσμησης
νέκρωσης όγκου- α -σχετιζόμενου με αποπώση

UTR : Untranslated Region : Αμετάφραστες Περιοχές

Xaa : Θέση σε αλληλουχία

XNA : Xenoreactive Natural Antibodies : Ξενοδραστικών Φυσικών Αντισωμάτων

XTP : Xenotransplantation : Ξενομεταμόσχευση

Yaa : Θέση σε αλληλουχία

ZFN : Zinc finger nucleases : Νουκλεάση Zinc Finger

MAC : Membrane Attack Complex : Συμπλόκου λύσης της μεμβράνης

MACPF : Membrane Attack Complex/Perforin : Σύμπλεγμα μεμβανών ανοσίας

NHP : non human primates : Μη ανθρώπινα πρωτεύοντα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η προσέγγιση του θέματος της μεταμόσχευσης και συγκεκριμένα της μεταμόσχευσης ιστών χοίρου σε άνθρωπο με σκοπό την προβολή των δυνατοτήτων της ιατρικής και της βιοτεχνολογίας πάνω στον τομέα αυτό και την επίδραση της ζώο-τεχνολογίας και της σύγχρονης εκτροφής χοιριδίων-πειραματόζωων στην αναβάθμιση του βιοτικού επιπέδου και στην καταπολέμηση της τραγικής έλλειψης οργάνων με τελικό αποτέλεσμα τον θάνατο δεκάδων ανθρώπων.

Ποιο αναλυτικά ερευνώντας τα στατιστικά στοιχεία αποκαλύπτεται πως 122.621 άνθρωποι στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (USA) είναι στην λεγόμενη waiting list ή αλλιώς λίστα αναμονής και μόνο για 30.000 από αυτούς θα βρεθεί τελικά μόσχευμα. Υπολογίζεται λοιπόν πως 22 άνθρωποι ημερησίως χάνουν την ζωή τους λόγω έλλειψης συμβατού μοσχεύματος. Αυτά τα στατιστικά στοιχεία καθιστούν επιτακτική την ανάγκη για λύση του προβλήματος της έλλειψης οργάνων και η λύση αυτή σύμφωνα με τις τελευταίες μελέτες βρίσκεται στην λεγόμενη ξενομεταμόσχευση. Στην παρούσα εργασία λοιπόν θα αναλυθούν τα πλεονεκτήματα, τα μειονεκτήματα αλλά και οι δυνατότητες της ξενομεταμόσχευσης καθώς και η διαδικασία παραγωγής ζώων για αυτούς τους σκοπούς αλλά και οι κίνδυνοι που ελλοχεύουν από μία τέτοιου είδους χειρουργική επέμβαση ακόμα και αν αυτή δρα ως θεραπεία κατά τα τελευταία στάδια ανεπάρκειας κάποιων οργάνων.

Τι είναι όμως η μεταμόσχευση και η ξενομεταμόσχευση;

Η μεταμόσχευση ορίζεται ως μια χειρουργική διαδικασία κατά την οποία υγιή κύτταρα, ιστοί ή όργανα μεταφέρονται απο έναν εκλιπόντα ή ζωντανό δότη σε ένα χρονίως πάσχοντα ασθενή, με σκοπό την αποκατάσταση της λειτουργίας κάποιου οργάνου του, το οποίο βρίσκεται σε ανεπάρκεια και το μόσχευμα αφορά αποκλειστικά άτομα του ίδιου είδους, ενώ ξενομεταμόσχευση ορίζεται η χειρουργική μεταφορά – μεταμόσχευση κυττάρων, ιστών ή οργάνων απο ένα είδος (δότης) σε ένα άλλο είδος (δέκτης).

Τα όργανα που έχουν χρησιμοποιηθεί για μεταμόσχευση είναι οι νεφροί, η καρδιά, το ήπαρ, οι πνεύμονες, το πάγκρεας και τμήματα του λεπτού εντέρου ενώ οι ιστοί και τα κύτταρα που μπορούν να μεταμοσχευτούν είναι δέρμα, επιδερμίδα, οστά, χόνδροι, μύες, τένοντες,

σύνδεσμοι, περιτονίες, αγγεία, βαλβίδες της καρδιάς, κερατοειδής χιτώνας του οφθαλμού, σκληρός χιτώνας του οφθαλμού, εμβρυική μεμβράνη, χόριο, ενδοκρινείς ιστοί και ενδοκρινικά κύτταρα, νευρικά κύτταρα, αιμοποιητικά κύτταρα και άλλα. Όσον αφορά την ξενομεταμόσχευση, ορίζεται ως η διαδικασία κατά την οποία λαμβάνονται όργανα από ένα είδος ζώου και μεταμοσχεύονται σε ένα άλλο είδος ζώου. Τα όργανα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι πανομοιότυπα με αυτά της μεταμόσχευσης, ενώ οι ιστοί που χρησιμοποιούνται είναι συγκεκριμένοι και είναι τένοντες, σύνδεσμοι, αγγεία, βαλβίδες της καρδιάς, κερατοειδής χιτώνας του οφθαλμού, σκληρός χιτώνας του οφθαλμού και νευρικά κύτταρα.

Στον ιατρικό, επιστημονικό και ερευνητικό κλάδο η ιδέα της μεταμόσχευσης εμφανίστηκε αρκετά χρόνια πριν και συγκεκριμένα το 1954 όπου για πρώτη φορά πραγματοποιήθηκε μεταμόσχευση νεφρών, ενώ, όσον αφορά την ξενομεταμόσχευση το 1964 όπου πραγματοποιήθηκε η πρώτη μεταμόσχευση καρδιάς ενός χιμπαντζή σε άνθρωπο. Η επιβίωση των μοσχευμάτων στον οργανισμό των δεκτών ωστόσο δεν είχε μεγάλο προσδόκιμο ζωής λόγω της απόρριψής τους από τον οργανισμό και της ελλιπούς διαθεσιμότητας ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων, για την μείωση της ανοσολογικής απόκρισης του έναντι του μοσχεύματος. Με την πρόοδο βέβαια της επιστήμης αυτά τα ζητήματα βρήκαν λύση και πλέον η πιο κρίσιμη και περίπλοκη διαδικασία για την επιτυχή διεξαγωγή της ξενομεταμόσχευσης αναδεικνύεται η κατάλληλη εκτροφή ζώων και κατ' επέκταση παραγωγή οργάνων, κυττάρων και ιστών, κάτι που θα αναλυθεί περαιτέρω στο αντίστοιχο κεφάλαιο.

Στην εργασία επίσης θα αναλυθεί ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος δηλαδή η ικανότητα του οργανισμού να αναγνωρίζει οποιαδήποτε ξένη ουσία-αντιγόνο και να την καταστρέφει ενεργοποιώντας την κυτταρική και χυμική ανοσία. Μια διαδικασία που αποδεικνύεται βέβαια καταστροφική στην περίπτωση ύπαρξης ξενομοσχεύματος διότι προκαλεί απόρριψη του μοσχεύματος. Η απόρριψη αυτή του μοσχεύματος εκδηλώνεται με διάφορους τύπους όπως είναι η υπεροξεία, οξεία ή χρόνια απόρριψη με βάση το χρόνο εκδήλωσής της μετά την μεταμόσχευση.

Στην συνέχεια δίνεται η λύση αυτού του προβλήματος, όπου πραγματοποιείται με χρήση βιοτεχνολογικών διαδικασιών με στόχο την ελαχιστοποίηση των πρωτεϊνών και γονιδίων των χοίρων που οι άνθρωποι δεν έχουν αλλά και η προσθήκη στους χοίρους πρωτεϊνών και γονιδίων που έχουν φυσιολογικά οι άνθρωποι με την βοήθεια της γενετικής μηχανικής. Αυτό πλέον είναι εφικτό με την δημιουργία διαγονιδιακών ζώων όπου κατά συνέπεια θα δώσει λύση στο πρόβλημα

της διαθεσιμότητας οργάνων. Η τεχνική παραγωγής συγκεκριμένα διαγονιδιακών χοίρων θα αναλυθεί στο αντίστοιχο κεφάλαιο.

Τέλος παρατίθεται ένα κεφάλαιο συζήτησης περι ηθικής πάνω στην μεταμόσχευση και την ξενομεταμόσχευση, βάζοντας τον αναγνώστη σε μια διαδικασία σκέψης και προβληματισμού, για το αν τελικά είναι σωστό, να δημιουργούμε διαγονιδιακά ζώα ως πηγή μοσχευμάτων.

Όλα αυτά στην παρούσα εργασία θα αποκρυπτογραφηθούν με μία επιστημονική προσέγγιση της διαδικασίας αυτής κάθε αυτής αλλά και με μία φιλοσοφική σκοπιά για το που τελικά οδηγούμαστε σαν ανθρώπινο είδος και που τελικά θα οδηγήσει όλη αυτή η εξέλιξη και όλες αυτές οι δυνατότητες που μας προσφέρει η βιοτεχνολογία, η επιστήμη και η ιατρική.

1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Με την πάροδο των ετών, η βελτίωση του βιοτικού επιπέδου, η συνεχόμενη αύξηση των πληθυσμών και η πρόοδος της επιστήμης οδήγησε τους ερευνητές-ιατρούς στην αναζήτηση μιας εναλλακτικής μορφής μεταμόσχευσης με μια βαθυστόχαστη σκέψη φιλοδοξίας για κάτι διαφορετικό με μια πάντα αλτρουιστική φιλοσοφία.

Προσπάθειες για μεταμόσχευση ιστών ξεκίνησαν από το 1771 από τον Βρετανό ερευνητή J.Hunter. Το 1804 ο Baronio απέδειξε, μετά από πειραματική μελέτη, ότι η ελεύθερη δερματική αυτομεταμόσχευση σε πρόβατα θα μπορούσε να είναι επιτυχής. Ωστόσο επιτυχής μεταμόσχευση οργάνων πραγματοποιήθηκε στις αρχές του 19ου αιώνα.

Πιο συγκεκριμένα...



Εικόνα 1. Alexis Carrel

Ο Alexis Carrel στο Rockefeller Institute της New York το 1902 περιέγραψε πως μπορεί να γίνει αποκατάσταση της ροής του αίματος μετά τη συρραφή και την αναστόμωση των αγγείων και για αυτή του την περιγραφή – ανακάλυψη βραβεύθηκε με βραβείο Nobel το 1912. (Gisella Puga Yung, et al., 2017) Η πρωτότυπη αυτή ανακάλυψη του Carrel ωστόσο δεν μπόρεσε να εφαρμοστεί αρχικά στην πράξη καθώς οι πρώτες προσπάθειες μεταμόσχευσης οργάνων από χοίρους, αιγοπρόβατα και μαϊμούδες σε άνθρωπο αποτύγχαναν με τους ασθενείς να επιβιώνουν μόνο για λίγες ώρες ή μέρες μετά την μεταμόσχευση. Το 1944 ο Peter Medawar έδειξε πως η μεταμόσχευση αποτύγχανε λόγω της αντίδρασης του ανοσοποιητικού συστήματος.(Gisella Puga Yung, et al., 2017)

Το 1954 πραγματοποιήθηκε η πρώτη επιτυχημένη μεταμόσχευση οργάνων από άνθρωπο σε άνθρωπο και περιλάμβανε την μεταμόσχευση νεφρών μεταξύ μονοζυγοτικών διδύμων. (Gisella Puga Yung, et al., 2017)



Εικόνα 2. Peter Medawar

Το 1960 ο Peter Medawar βραβεύθηκε με το βραβείο Nobel για την ανακάλυψη του πως υπάρχει η δυνατότητα να αναπτυχθεί ανοσολογική ανοχή έναντι του μεταμοσχευμένου ιστού. (Gisella Puga Yung, et al., 2017)

Διάφοροι ερευνητές υποστήριζαν ότι ένα φάρμακο που ονομαζόταν 6-Mercaptopurine 6-MP μπορούσε να καθυστερήσει την απόρριψη του ιστού ή οργάνου που είχε μεταμοσχευθεί από 2 άτομα του ίδιου είδους. (Gisella Puga Yung, et al., 2017) Το φάρμακο αυτό ανακαλύφθηκε από τους Gertrude B. Elion και George H. Hitchings στο

Burroughs Wellcome της Tuckahoe στην Νέα Υόρκη και οι επιστήμονες αυτοί βραβεύτηκαν με Νόμπελ για την ανακάλυψη του φαρμάκου αυτού. (Fujita K, et al., 2007) Το 6-Mercaptopurine (6-MP) πλέον πουλιέται με το όνομα Purinethol και συνταγογραφείται σε άτομα που πάσχουν από καρκίνο και αυτοάνοσα νοσήματα (Fujita K, et al., 2007) καθώς και για την θεραπεία της Οξείας Λεμφοβλαστικής Λευχαιμίας (Acute Lymphocytic Leukemia - ALL), Χρόνιας Μυελογενής Λευχαιμίας (Chronic Myeloid Leukemia - CML), νόσος Crohn's και της Ελκώδους Κολίτιδας (Fujita K, et al., 2007).



Εικόνα 3. Dr Thomas Szarzl

Ο Dr. Thomas Szarzl στο Denver των ΗΠΑ μεταμόσχευσε νεφρά μπαμπούνου σε 6 ασθενείς και οι ασθενείς επιβίωσαν για 19-98 ημέρες. (Gisella Puga Yung, et al., 2017)



Εικόνα 4. Keith Reemits

Το 1963 μεταμοσχεύθηκαν νεφρά απο χιμπαντζή σε 13 ασθενείς απο τον Keith Reemits στο Tulane University της Louisiana και μόνο ένας ασθενής επιβίωσε για 9 μήνες(Gisella Puga Yung, et al., 2017)



Εικόνα 5. Dr. James D. Hardy

Το 1964 ο James Hardy στο πανεπιστήμιο του Mississippi αποπειράθηκε να πραγματοποιήσει την πρώτη μεταμόσχευση καρδιάς απο ζώο σε άνθρωπο αλλά δυστυχώς απέτυχε . (Gisella Puga Yung, et al., 2017)

Το 1974 έγινε η μεταμόσχευση ήπατος απο χιμπαντζή σε 3 παιδιά από την γιατρό Thomas Starzl στο Denver της Αμερικής (Starzl TE, et al., 1974) αλλά κανένα απο αυτά δεν επιβίωσε πάνω απο 2 εβδομάδες.(Gisella Puga Yung, et al., 2017)



Εικόνα 6. Christiaan Barnard

Το 1977 ο Christiaan Barnard στο Cape Town της Νότιας Αφρικής επιχείρησε την πραγματοποίηση ετεροτοπικής μεταμόσχευσης καρδιάς σε δύο ασθενείς οι οποίοι υποστηρίζονταν από μηχανήμα καρδιοπνευμονικής παράκαμψης (Cardiopulmonary bypass - CPB) έπειτα από ανεπιτυχή επέμβαση ανοιχτής καρδιάς. (Barnard C.N., et al., 1977) Στην περίπτωση του πρώτου ασθενή, έγινε μεταμόσχευση καρδιάς από μπαμπούινο βάρους 30kg σε μια γυναίκα ηλικίας 25 χρονών. Η καρδιά ωστόσο σταμάτησε να χτυπά έπειτα από 5 ½ ώρες και η αιτία θανάτου αποδόθηκε στην διαφορά μεγέθους μεταξύ του

δότη (χιμπαντζής) και λήπτη (άνθρωπος) και στα σημάδια υπεροξείας απόρριψης. (Rose AG, et al. 1991) (βλ. κεφ.4). Στην περίπτωση του δεύτερου ασθενή, όπου και αυτός βρισκόταν σε μηχανήμα CPB, ηλικίας 60 χρονών μεταμοσχεύθηκε καρδιά χιμπαντζή και ο θάνατός του επήλθε έπειτα από 4 ημέρες λόγω απόρριψης του μοσχεύματος. (Deschamps J-Y, et al., 2005) Το 1983 ο Robert Ersek στις Η.Π.Α. πρώτος επιχείρησε την μεταμόσχευση δέρματος χοίρου για την θεραπεία εγκυμάτων. (Ersek RA, et al., 1983) (Ersek RA, et al., 1984)

Το 1984 το γνωστό ως Baby Fae, ένα νεογέννητο μωρό που γεννήθηκε με καρδιακή ανεπάρκεια δέχτηκε μόσχευμα καρδιάς μπαμπούινου αλλά δυστυχώς δεν έζησε πάνω απο 20 ημέρες. (Gisella Puga Yung, et al., 2017) Η επέμβαση πραγματοποιήθηκε από τον Leonard L. Bailey στο πανεπιστήμιο της Loma Linda Medical Center. (Bailey, et al., 1985)



Εικόνα 7. Dr Thomas Starzl

Το 1992-1993 ο Dr Thomas Starzl μεταμόσχευσε ήπαρ μπαμπούνου σε 2 ασθενείς και ένας εκ των δυο επιβίωσε για 70 ημέρες με λιγιστές ενδείξεις απόρριψης του μοσχεύματος. (Gisella Puga Yung, et al., 2017)

Το 1995 ο Dr David White στο Cambridge του UK, δημιούργησε διαγονιδιακούς χοίρους, οι οποίοι είναι χοίροι στους οποίους εισήχθη ξένο γενετικό υλικό (Shaikh-Lesko, et al., 2015) και συγκεκριμένα ανθρώπινες πρωτεΐνες έτσι ώστε να αποτρέψει την απόρριψη του μοσχεύματος, είτε αυτό ήταν ιστός είτε όργανο, από το ανοσοποιητικό σύστημα. (Gisella Puga Yung, et al., 2017)



Εικόνα 8. Jeff Getty

Το 1995 έγινε η πρώτη μεταμόσχευση μυελού των οστών από μπαμπούνο στον άνθρωπο με σκοπό την θεραπεία του HIV, που είναι μια νόσος του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος που προκαλείται από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) (Sepkowitz K.A., et al., 2001). Πιο συγκεκριμένα, ο Jeff Getty, ασθενής προσβεβλημένος από τον ιό Human Immunodeficiency Virus (HIV) δέχτηκε μυελό των οστών από μπαμπούνο όπου φυσιολογικά έχει ανθεκτικότητα έναντι του ιού και τα συμπτώματά του υποχώρησαν αλλά τα κύτταρα άρχισαν να πεθαίνουν μετά από περίπου 2 εβδομάδες. (Gisella Puga

Yung, et al., 2017)

Στα μέσα του 1995 με 1997 σε μια πρώτη φάση, χορηγούμενη από την εταιρία Diacrin, ο Terrence Deacon μεταμόσχευσε ντοπαμινεργικές νευρικές κυτταρικές ομάδες, όπου είναι συλλογές νευρώνων του κεντρικού νευρικού συστήματος (Central Nervous System - CNS) οι

οποίες κυτταρικές δομές έχουν αποδειχθεί ιστοχημικά ότι περιέχουν νευροδιαβιβαστές ντοπαμίνης (Fuxe K, et al., 2007), στον εγκέφαλο 12 ασθενών όπου έπασχαν από την νόσο Parkinson και ένας ασθενής από αυτούς πέθανε 7 ½ μήνες αργότερα λόγω θανάτου των νευρικών κυττάρων. (Deacon T, et al., 1997) Επόμενες κλινικές δοκιμές πραγματοποιήθηκαν για την θεραπεία της νόσου Parkinson και Huntington (Fink JS, et al., 2000) αλλά τα αποτελέσματα ήταν απογοητευτικά.



Εικόνα 9. Michael Helyer



Εικόνα 10. Robert Pennington

Το 1996, μια εταιρία ονόματη Living Cell Technologies μεταμόσχευσε κύτταρα της νησίδας του Langerhans, στα οποία βρίσκονται τα β-κύτταρα που διεγείρονται και εκκρίνουν ινσουλίνη (Pour, et al., 2002), από χοίρο στον ασθενή Michael Helyer για την θεραπεία του διαβήτη τύπου 1 όπου και έπασχε. Η θεραπευτική αυτή προσέγγιση ήταν επιτυχής και ο ασθενής μείωσε σημαντικά τις χορηγήσεις ινσουλίνης.(Gisella Puga Yung, et al., 2017)

Επίσης, το 1997 χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ήπαρ χοίρου για δύλιση αίματος ανθρώπου. Πιο συγκεκριμένα, ο Robert Pennington στα 20 του χρόνια ανέπτυξε ηπατική ανεπάρκεια. Τότε κρατήθηκε στην ζωή με το να περνάει το αίμα του μέσα απο ήπαρ διαγονιδιακού χοίρου όπου είχε γενετικά τροποποιηθεί έτσι ώστε να μην αναγνωρίζεται ως ξένο απο το ανοσοποιητικό σύστημα. Αυτή η διαδικασία με επικεφαλή τον Dr. Marlon Levy γινόταν μέχρι να βρεθεί διαθέσιμο συμβατό μόσχευμα. Όταν όμως η παγκόσμια κοινωνία αντέδρασε έναντι της ξеноμεταμόσχευσης σταμάτησε και η θεραπευτική αυτή προσέγγιση (Gisella Puga Yung, et al., 2017). Το 1997, μάλιστα, έγινε παγκόσμια απαγόρευση της ξеноμεταμόσχευσης λόγω ανησυχίας για την διάδοση νόσων και μόλυνση των ανθρώπων που δέχονταν το μόσχευμα. Πιο συγκεκριμένα, οι ενδογενείς ρετροϊοί Porcine Endogenous Retro viruses (PERVs) είναι απομεινάρια των αρχαίων ιικών μολύνσεων που

βρίσκονται στο γονιδίωμα αν όχι όλων αλλά πολλών θηλαστικών ειδών. Το γεγονός όπου το γονιδίωμα των ιών αυτών βρίσκεται στο DNA των θηλαστικών εξηγεί την κάθετη μετάδοση του με κληρονομία των γονιδίων αυτών.(Vanderpool, et al., 1999) Για τον λόγο αυτό, τα επόμενα χρόνια 1997-1999 πραγματοποιήθηκαν πολλές ερευνητικές μελέτες όπου τελικά διέψευδαν την μόλυνση ανθρώπων από μοσχεύματα με ιούς PERV. (Gisella Puga Yung, et al., 2017) Έτσι, το 2000 έγινε άρση της απαγόρευσης της ξενομεταμόσχευσης έπειτα από αιτήσεις ασθενών για κλινικές δοκιμές. (Gisella Puga Yung, et al., 2017)

Από το 2007 έως 2011, η Ρωσία, η Νέα Ζηλανδία και η Αργεντινή πραγματοποίησαν κλινικές δοκιμές με χρήση κυττάρων από χοίρους για την αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου 1 και τα αποτελέσματα ήταν μόνο θετικά και έτσι ενέκριναν την θεραπευτική αυτή προσέγγιση. (Gisella Puga Yung, et al., 2017)

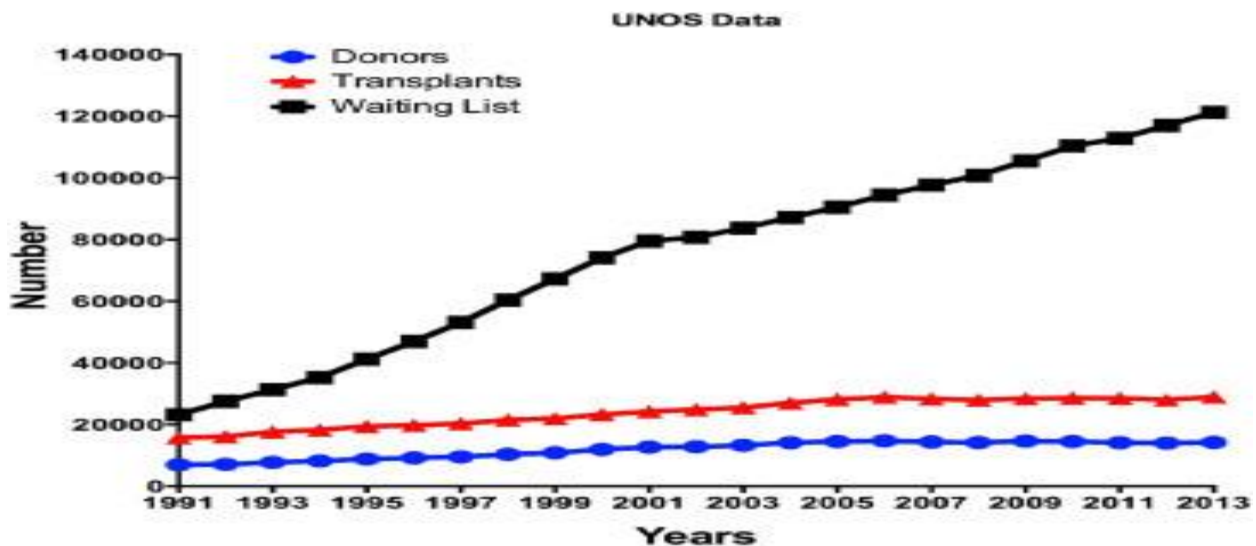
2. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Η μεταμόσχευση οργάνων αποτελεί μια καθιερωμένη θεραπευτική προσέγγιση για μια πλειάδα ασθενών που πάσχουν από διάφορες ασθένειες και συνήθως βρίσκονται στα τελευταία στάδια. Σήμερα με την εξέλιξη της επιστήμης και της ιατρικής και χάρη στην ανάπτυξη νέων χειρουργικών τεχνικών καθώς και η κατανόηση της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος έχουν συμβάλει στην αύξηση της βιοσημότητας των ασθενών έπειτα την αλλογενή μεταμόσχευση οργάνων.

Στις ΗΠΑ έχουν διεξαχθεί πάνω από 617.000 μεταμοσχεύσει συμπαγών οργάνων όπως νεφρών, ήπατος, παγκρέατος, εντέρου, καρδιάς και πνευμόνων από το 1988.

Ωστόσο περισσότερη προσοχή έχει στραφεί πάνω στην μεταμόσχευση του κερατοειδούς χιτώνα και μυελού των οστών.

Το μεγαλύτερο πρόβλημα όμως είναι το χάσμα μεταξύ του αριθμού των διαθέσιμων προς μεταμόσχευση οργάνων και τον αριθμό των ανθρώπων που βρίσκονται σε λίστα αναμονής περιμένοντας να βρεθεί συμβατός δότης.



Διάγραμμα 1. Διάγραμμα απεικόνισης, δωρητές οργάνων (μπλε), λίστα αναμονής (μαύρο)

Πηγή: U.S. Department of Health & Human Services

Λόγω του χάσματος αυτού, στις ΗΠΑ, κάθε μέρα 30 άνθρωποι πεθαίνουν ενώ βρίσκονται στην λίστα αναμονής ή αφαιρούνται από αυτήν διότι είναι πλέον πολύ άρρωστοι πλέον για μεταμόσχευση.

Επομένως καθίσταται αναγκαία η εύρεση λύσης του προβλήματος της διαθεσιμότητας οργάνων και η λύση του προβλήματος έστρεψε τους ερευνητές και επιστήμονες στην χρήση χοίρων με στόχο την γεφύρωση του χάσματος αυτού μεταξύ του αριθμού των διαθέσιμων προς μεταμόσχευση οργάνων και τον αριθμό των ανθρώπων που βρίσκονται σε λίστα αναμονής.

3. Η ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ ΓΙΑ ΞΕΝΟΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ

Μολονότι οι πιο επιτυχημένες κλινικές δοκιμές της ξενομεταμόσχευσης είχαν επιτευχθεί με την χρήση χιμπαντζή (*Lat. Pan troglodytes*) ως δότη, τα ζώα αυτά ήταν αδύνατον να παρέχουν μια πηγή ξενομοσχευμάτων διότι χαρακτηρίζονται ως ζώα υπο εξαφάνιση και θεωρείται προστατευόμενο είδος. Για τον λόγο αυτό πολλοί ερευνητές θεωρούσαν καταλληλότερο είδος τους μπαμπούνους (*Lat. Papio*). Ωστόσο, η μετάδοση μολυσματικών ασθενειών από τα ζώα αυτά στον άνθρωπο και τα διάφορα προβλήματα όπως μεγέθους, διαθεσιμότητας και ηθικών διλημμάτων καθιστούν τον μπαμπούνιο ως ένα πλέον ακατάλληλο είδος για την ικανοποίηση των προβλεπόμενων προδιαγραφών. (David H. Sachs, et al., 2001)

3.1 Ο ΧΟΙΡΟΣ ΩΣ ΠΙΘΑΝΟΣ ΔΟΤΗΣ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΩΝ

Πολλές έρευνες πλέον αναφέρουν τον χοίρο ως μια πηγή οργάνων για ξενομεταμόσχευση. Στα πλεονεκτήματα του χοίρου ως δότη μοσχευμάτων συγκαταλέγονται, η απεριόριστη διαθεσιμότητά του, τα κατάλληλα αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά του και η μεγάλη ομοιότητα της φυσιολογίας και ανατομίας του με τον άνθρωπο (Cooper, D. K. C., 1991).

Μέγεθος : Το βάρος των οικόσιτων χοίρων (*Lat. Sus domesticus*) μπορεί να κυμανθεί από 120-140kg, ωστόσο για ερευνητικούς σκοπούς και κυρίως ξενομεταμόσχευσης, προτείνεται η χρήση του Göttingen Minipig. Το είδος αυτό προέκυψε από την διασταύρωση 3^{ων} φυλών, της φυλής Minnesota minipig, της φυλής Vietnamese Potbelly και της φυλής Landrace με πρωτοβουλία του Πανεπιστημίου Göttingen της Γερμανίας, όπου και το δημιούργησε. Το βάρος του Göttingen Minipig κυμαίνεται από 34kg με 91kg, μέσο όρο ζωής 15 με 20 χρόνια και το μέγεθος των οργάνων του είναι συμβατό με το μέγεθος των οργάνων του ανθρώπου. (Bollen, et al., 1996) Σε αντίθεση με τον κοινό οικόσιτο χοίρο, το βάρος του οποίου μπορεί να φτάσει και τα 450 kg κρίνεται ακατάλληλος για δότης οργάνων έπειτα το πέρας του ενός ή δύο ετών λόγω μεγάλου μεγέθους των οργάνων. (David H. Sachs, et al., 2001)

Πολλά από τα όργανα του χοίρου έχουν αποδειχθεί πως έχουν μεγάλη ομοιότητα με αυτά του ανθρώπου όπως για παράδειγμα οι νεφροί, οι πνεύμονες, το πεπτικό αλλά και το

καρδιαγγειακό σύστημα. (Kirkman, et al. 1989) Πιο συγκεκριμένα, η φυσιολογία του πεπτικού συστήματος του χοίρου και ανθρώπου, είναι παρόμοια όσο αυτή αφορά την λειτουργία του στομάχου (μίξη της τροφής με πεψίνη και υδροχλωρικό οξύ) του ήπατος (φιλτράρισμα του αίματος και παραγωγή και αποθήκευση γλυκόζης), της χοληδόχου κύστης (που παράγει την χολή η οποία διασπά την τροφή με αποτέλεσμα τα θρεπτικά στοιχεία να μπορούν να απορροφηθούν εύκολα) και παγκρέατος (παράγει ινσουλίνη καθώς και ένζυμα που συμμετέχουν στην απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών από το λεπτό έντερο), καθώς και οι ανάγκες σε βιταμίνες και αμινοξέα. (Kirkman, et al., 1989)

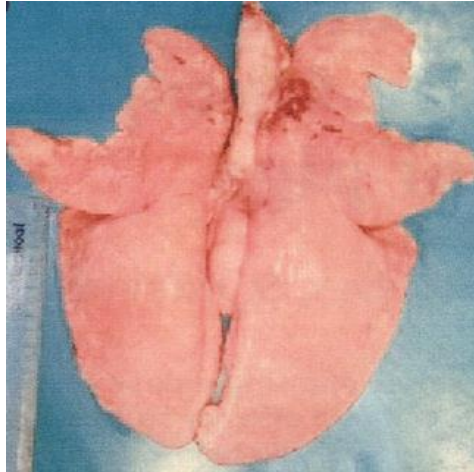
Επιπρόσθετα, το μέγεθος και η μικροσκοπική δομή των νεφρών του χοίρου σε σχέση με του ανθρώπου έχουν αρκετές ομοιότητες. Λειτουργικά, έχουν ίδια συγκέντρωση αζώτου ουρίας αίματος (Blood Urea Nitrogen-BUN), κρεατίνης και ηλεκτρολύτες καθώς και παρόμοια αιματική ροή και όμοια επίπεδα πλασματικής κάθαρσης κρεατινίνης (Glomerular Filtration Rates) (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Ομοιότητες νεφρικής λειτουργίας μεταξύ του χοίρου και του ανθρώπου

Πηγή : Kirkman, R. L. (1989). In “Xenograft 25” (M. A. Hardy, Ed.), p. 125)

Παράμετροι	Άνθρωπος	Χοίρος
Μέγιστη συγκέντρωση (mOsm/l)	1160	1080
Μέγιστη ουρία/επίπεδα πλάσματος (plasma osmol. ratio)	4.0	3.3
πλασματικής κάθαρσης κρεατινίνης (GFR) (ml/min/g)	130	126-175
Ολική αιματική ροή (RBF) (ml/min/g)	4	3.0-4.4

Φυσιολογία αναπνευστικού συστήματος: Ιστολογικά και λειτουργικά οι πνεύμονες του χοίρου είναι ίδιοι με αυτούς του ανθρώπου. Ωστόσο υπάρχει πολύ λίγη βιβλιογραφία σχετικά με την χρήση πνευμόνων ως ξενομοσχεύματα από χοίρους. (David H. Sachs, et al., 2001)



Εικόνα 11. Πνεύμονας χοίρου

Πηγή : A. Dawson, et al., 2002

Φυσιολογία καρδιαγγειακού συστήματος: Το καρδιαγγειακό σύστημα (Cardiovascular system - CVS) του χοίρου είναι παρόμοιο με αυτό του ανθρώπου και πολλοί λειτουργικοί παράμετροι είναι όμοιοι (πίνακας χ). ο χοίρος έχει χρησιμοποιηθεί πάρα πολύ και για πολλά χρόνια ως 'μοντέλο' για έρευνα πάνω στο CVS (M. Michael Swindle, et al., 2008)



Εικόνα 12. Καρδιά χοίρου

Πίνακας 2. Ομοιότητες CVS του ανθρώπου και του χοίρου. Πηγή: Cooper, D. K. C. et al, (1991) In “Xenotransplantation” (D. K. C. Cooper et al., Eds.), p. 481

Παράμετροι	Άνθρωπος	Χοίρος
Cardiac output ($1 \text{ min}^{-1} \text{ m}^{-2}$)	2,5-3,5	2,0-2,5
Right atrial pressure (mmHg)	0-8	1-9
Right ventricular pressure	15-30	24-30
Pulmonary arterial pressure	15-30	11-24
Left ventricular pressure	100-140	116
Aortic pressure	70-105	114-126

Αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά : Όπως και ο κοινός οικόσιτος χοίρος έτσι και ο Göttingen Minipig έχει πολύ καλά αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά για την παραγωγή δοτών. Πιο αναλυτικά, ο αριθμός απογόνων κυμαίνεται από 4 έως 10, με αναπαραγωγική ωριμότητα σε ηλικία 5 μηνών, διάρκεια κυοφορίας 114 ημερών και αναπαραγωγικό κύκλο κάθε 3 εβδομάδες. Για τον λόγο αυτό είναι δυνατή η παραγωγή μονοζυγοτικών ζώων σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα. (Sachs, et al., 1976) (Sachs, et al., 1992)

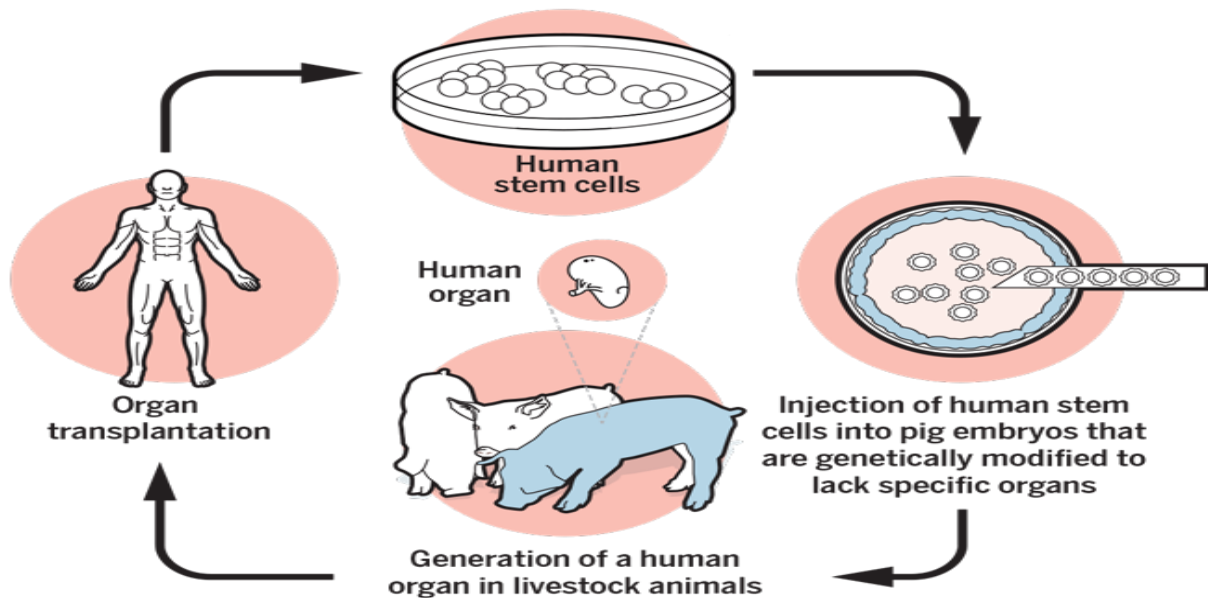


Εικόνα 13. Χοιρομητέρα με τους απογόνους της.

Γενετική τροποποίηση : Λόγο αυτών των αναπαραγωγικών χαρακτηριστικών που αναφέρθηκαν παραπάνω, είναι θεωρητικά δυνατόν να ενσωματωθεί οποιοσδήποτε αριθμός

γονιδίων στην γαμετική σειρά του χοίρου (Cozzi, et al., 2000) ώστε τα γονίδια αυτά να μεταβιβαστούν στους απογόνους. Αφου αναπτυχθούν τα έμβρυα, στην συνέχεια, εμφυτεύονται σε θετές μητέρες, οι οποίες τα κυοφορούν.. Σε ένα μικρό ποσοστό (περίπου 10%) το ξένο DNA ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του γονιμοποιημένου ωαρίου. Έτσι γεννιούνται ορισμένα ζώα, τα οποία ονομάζονται διαγονιδιακά και φέρουν σε όλα τους τα κύτταρα το εξωγενές DNA και κατά συνέπεια το μεταβιβάζουν στους απογόνους τους όπως κάθε γονίδιο τους. (Geoffrey M. Cooper, et al., 2009)

Μια ιδιαίτερη κατηγορία κυττάρων είναι τα Εμβρυικά Βλαστικά Κύτταρα (Embryonic Stem cells – ES), όπου παρέχουν έναν εναλλακτικό τρόπο για την εισαγωγή εξωγενών γονιδίων σε ζώα όπως και στον χοίρο. Τα κύτταρα ES απομονώνονται από πρώιμα έμβρυα και είναι δυνατόν να διατηρηθούν σε καλλιέργεια και να επανεισαχθούν σε πρώιμα έμβρυα με αποτέλεσμα να ενσωματώνονται σε αυτά και να συμμετέχουν φυσιολογικά στην ανάπτυξη τους. Επομένως μπορούμε να εισάγουμε ένα τμήμα DNA σε μια καλλιέργεια κυττάρων ES, να επιλέξουμε με την βοήθεια ενός δείκτη επιλογής αυτά που ενσωμάτωσαν στο γονιδίωμα τους το εξωγενές DNA και να τα επανεισάγουμε σε νεαρά έμβρυα. Από τα έμβρυα αυτά θα προκύψουν οργανισμοί στους οποίους ορισμένα κύτταρα θα προέρχονται από τα κύτταρα του εμβρύου ενώ τα άλλα θα προέρχονται από τα κύτταρα ES που φέρουν το εξωγενές DNA. Τέτοια ζώα που αποτελούνται από δυο τύπους κυττάρων αναφέρονται ως χιμαιρικά. Σε ορισμένα από τα χιμαιρικά ζώα, τα κύτταρα ES συμμετέχουν και στον σχηματισμό της γαμετικής σειράς, με αποτέλεσμα ένα ποσοστό των απογόνων τους να κληρονομεί το γονιδίωμα των κυττάρων ES με το εξωγενές γονίδιο. (Geoffrey M. Cooper, et al., 2009)



Εικόνα 14. Χρήση χμιαρικών ζώων ως πηγή οργάνων με την χρήση των ανθρώπινων βλαστικών κυττάρων

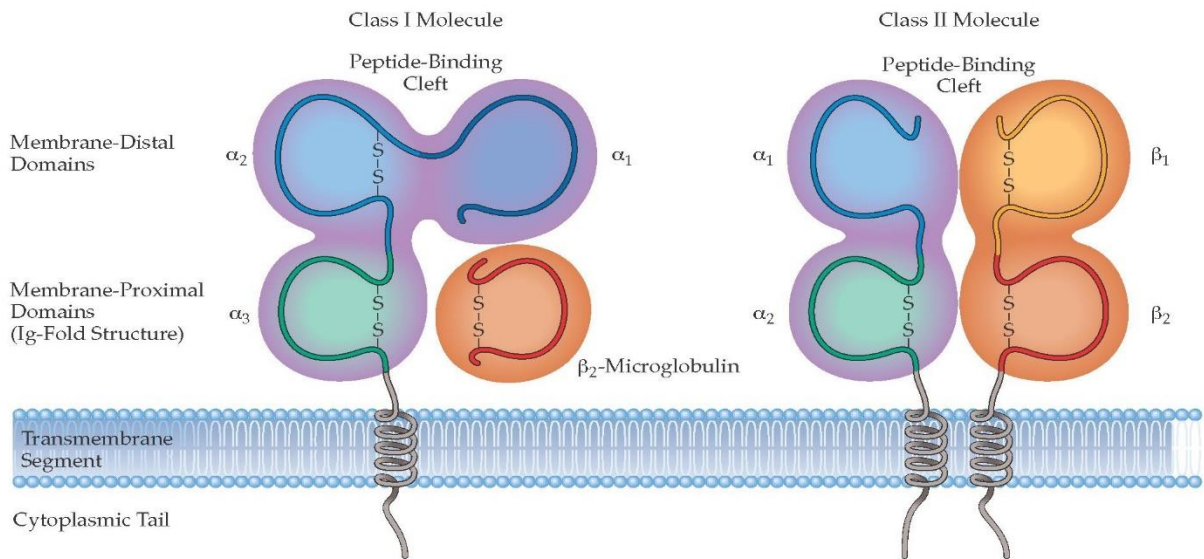
Πηγή: Waninahi (2016) Human-animal chimera models. creating animals with human organs.

Επίσης πολύ σημαντική είναι η καταστολή της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με την εισαγωγή αντισημαίνοντων νουκλεϊκών οξέων σε καλλιεργούμενα κύτταρα. Τα αντισημαίνοντα νουκλεϊκά οξέα είναι μονόκλινα μόρια DNA ή RNA, συμπληρωματικό με το mRNA του γονιδίου-στόχου και εισάγεται στα κύτταρα και υβριδίζεται με το συμπληρωματικό του mRNA, παρεμποδίζοντας τελικά την έκφρασή του. (Geoffrey M. Cooper, et al., 2009)

Ένα επίσης σημαντικό κομμάτι της γενετικής τροποποίησης είναι η καταστολή της πρωτεϊνικής λειτουργίας, καταστολή δηλαδή πρωτεϊνών, που παράγονται στον χοίρο και όχι στον άνθρωπο ή το αντίστροφο, η οποία καταστολή πραγματοποιείται μέσω της εισαγωγής στο κύτταρο, με μικροένεση, αντισωμάτων τα οποία προσδένονται στην πρωτεΐνη και καταστέλλουν την ενεργότητά της. (Geoffrey M. Cooper, et al., 2009)

Αντιγόνα ιστοσυμβατότητας : Το Μείζων Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC) είναι πρωτεΐνες που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων και αναγνωρίζουν και προσδένονται με ξένα προς τον οργανισμό μόρια, δηλαδή

αντιγόνα και μέσω βιοχημικών αντιδράσεων ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα. (Janeway CA Jr, et al., 2001)



Εικόνα 15. class I και class II MHC

Πηγή : Tankeshwar Acharya, 2017, Difference between MHC Class I and MHC class II Proteins,

Κατά την ξеноμεταμόσχευση, ακόμα και με την μεταμόσχευση, κάτι τέτοιο θα ήταν καταστροφικό διότι ο οργανισμός του λήπτη θα αναγνωρίσει το ξένο προς αυτόν μόριο-ιστό-όργανο και θα στραφεί εναντίον του με αποτέλεσμα να προκαλέσει απόρριψη του μοσχεύματος (βλ. κεφ. 4)

3.2 Ο ΧΟΙΡΟΣ ΩΣ ANIMAL MODEL ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ

Όλα τα παραπάνω που αναφέρθηκαν στην υποενότητα 3.1 αποδεικνύουν περίτρανα τον λόγο που στην ιατρική ο χοίρος χρησιμοποιείται ως πειραματόζωο (animal model) σε σχέση με άλλα ζώα. Ωστόσο ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα της χρήσης του χοίρου ως animal model ήταν μια έρευνα του Center for Development of Advanced Medical Technology (CDAMTec), το 2008 όπου ο χοίρος είχε χρησιμοποιηθεί με στόχο γενικά την χειρουργική εκπαίδευση και πρό-κλινική άσκηση σε ακαδημαϊκούς ερευνητές.

Πιο συγκεκριμένα, όσο αφορά την χρήση του οικόσιτου χοίρου στην έρευνα αυτή, είχαν χρησιμοποιηθεί ζώα μέγιστου βάρους 100kg και διαφόρων φυλών όπως Landrace, Large White, Duroc και Göttingen Minipig. Η έρευνα αυτή είχε ως στόχο την μελέτη των διαφορών στις μεταβολικές διεργασίες του ήπατος του χοίρου σε σχέση με τον άνθρωπο. (Kobayashi, et al., 2012)

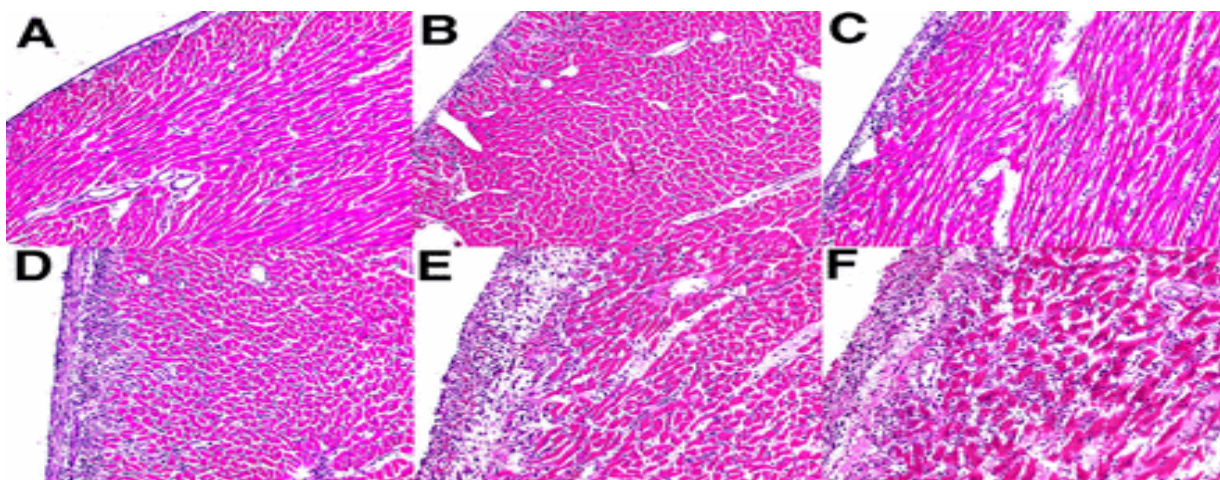
Η χρήση του Göttingen Minipig ήταν πιο εύκολη και πιο αρμοστή στην ιατρική έρευνα του CDAMTec σε σχέση με τον οικόσιτο χοίρο όπου το μέσο βάρος του ενήλικα ήταν 40 – 50 kg όπου το βάρος αυτό αντιστοιχεί σε έναν ανήλικο οικόσιτο χοίρο. Η έρευνα χωρίζονταν σε δύο μέρη όπου το ένα αφορούσε την μελέτη της ανάπλασης του ήπατος έπειτα από 80% ηπατεκτομή και το άλλο μέρος αφορούσε την γενική έρευνα πάνω στα γενετικά τροποποιημένα Göttingen Minipig όπου γενικά έχουν αναπτυχθεί πολλές τεχνικές γενετικής τροποποίησης, παραδείγματος χάρι η τεχνική κλωνοποίησης σωματικών κυττάρων. (Kobayashi, et al., 2012)

4. ΑΠΟΡΡΙΨΗ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ

Η απόρριψη του μοσχεύματος είναι η διαδικασία κατά την οποία το ανοσοποιητικό σύστημα απορρίπτει το όργανο - ιστό που δέχτηκε και το καταστρέφει. (Frohn C, et al. 2012) Η απόρριψη αυτή πραγματοποιείται από το ανοσοποιητικό σύστημα του δέκτη, όπου καταστρέφει τον ιστό (Frohn C. et al., 2001) και σε ορισμένες περιπτώσεις αυτό μπορεί να οδηγήσει στην καταστροφή του μοσχεύματος αλλά και στον θάνατο του ασθενή. (Dooldeniya M. D., et al., 2003)

Υπάρχουν διάφοροι τύποι απόρριψης του μοσχεύματος όπως (Dooldeniya, M. D. et al. 2003):

- a. Υπεροξεία απόρριψη (Hyperacute Rejection - HAR)
- b. Οξεία αγγειακή απόρριψη (Acute Vascular Rejection - AVR)
- c. Κυτταρική απόρριψη (Cellular Rejection - CeR)
- d. Χρόνια απόρριψη (Chronic Rejection - ChR)



Εικόνα 16. Ιστομορφολογία της εξέλιξης της απόρριψης καρδιακού μοσχεύματος

Πηγή : Yijen L. Wu, Qing Ye, Kazuya Sato, Lesley M. Foley, T. Kevin Hitchens and Chien Ho (2009) Noninvasive Evaluation of Cardiac Allograft Rejection by Cellular and Functional Cardiac Magnetic Resonance 2:11

Αναλυτικότερα, η απόρριψη του μοσχεύματος ξεκινά με την πρόσδεση στο μόσχευμα αντιγόνων από τον δέκτη. Η πρόσδεση αυτή ενεργοποιεί το συμπλήρωμα με αποτέλεσμα να

προκαλείται καταστροφή του μοσχεύματος (Εικόνα 18). (Platt JL, et al., 1991) Η ανακάλυψη αυτή, της μοριακής πορείας της απόρριψης του μοσχεύματος, οδήγησε στην ανάπτυξη διάφορων μεθόδων μοριακής γενετικής με αποτέλεσμα τα όργανα να δείχνουν ανοχή στην διαδικασία της απόρριψης. (Jefiq L. Platt et al., 1996)



Εικόνα 17. Παθογένεση της απόρριψης του μοσχεύματος

Πηγή : Platt JL, Fischel RJ, Matas AJ, et al, 1991, Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate model. Transplantation 52:214

4.1 Η ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ

4.1.1. Το σύστημα του συμπληρώματος

Το σύστημα του συμπληρώματος αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο της φυσικής ανοσίας ενώ πρόσφατες μελέτες έδειξαν τον σημαντικό του ρόλο κατά την ενεργοποίηση της προσαρμοστικής ανοσίας. (Mastellos, D. et al., 2002) Αποτελείται από 35 περίπου διαλυτές και μεμβρανικές πρωτεΐνες που εκφράζονται κυρίως, από ηπατοκύτταρα αλλά και μονοκύτταρα, ιστικά μακροφάγα και επιθηλιακά κύτταρα του γαστρεντερικού, νευρικού και ουροποιητικού συστήματος.

Το σύστημα του συμπληρώματος επιτελεί τρεις βασικές λειτουργίες:

1. Συμμετέχει στην άμυνα εναντίον των λοιμώξεων.
 - a. Μέσω οψωνινοποίησης αντιγόνων και ανοσοσυμπλεγμάτων που προωθεί την φαγοκυττάρωσή τους. Η διαδικασία μεσολαβείται από υποδοχείς του συστήματος στην επιφάνεια των φαγοκυττάρων.
 - b. Μέσω χημειοταξίας και ενεργοποίησης των λευκοκυττάρων
 - c. Μέσω λύσεως βακτηρίων και κυττάρων.
2. Αποτελεί κομβικό σημείο μεταξύ φυσικής και προσαρμοστικής ανοσίας.
 - a. Ενισχύοντας την ανοσοβιολογική απάντηση μέσω αντισωμάτων.
 - b. Ενισχύοντας την ανοσοβιολογική μνήμη
 - c. Ρυθμίζοντας τους μηχανισμούς της προσαρμοστικής ανοσίας μέσω της δέσμευσης πρωτεϊνών του σε ειδικούς υποδοχείς της επιφάνειας των λεμφοκυττάρων και των θυλακοειδών δενδριτικών κυττάρων.
3. Προωθεί την εναπόθεση άχρηστου υλικού.
 - a. Συμμετέχοντας στην απόσυρση ανοσοσυμπλεγμάτων από τους ιστούς μετά το πέρας της ανοσοβιολογικής απόκρισης.
 - b. Συμμετέχοντας στην απομάκρυνση αποπτωτικών κυττάρων. (Carroll, M. C. et al., 1998) (Sahu, A. et al., 2001)

4.1.2 Τα συστατικά του συμπληρώματος

Οι πρωτεΐνες (διαλυτές και μεμβρανικές) που αποτελούν το σύστημα του συμπληρώματος, στα θηλαστικά, εκφράζονται κυρίως από ηπατοκύτταρα, αλλά και από μονοκύτταρα, ιστικά μακροφάγα και επιθηλιακά κύτταρα του γαστρεντερικού, νευρικού και ουροποιητικού συστήματος. Η σύνθεση από τα μονοκύτταρα αυξάνεται σημαντικά σε περιοχές φλεγμονής. Οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες του συστήματος παράγονται αρχικά σε ανενεργή, πρόδρομη μορφή και δρουν, είτε ως ένζυμα είτε ως υποδοχείς, μετά την ενεργοποίησή τους από άλλα μόρια. Η κατάτμηση ενός συστατικού του συστήματος από το αντίστοιχό του ένζυμο απομακρύνει ένα μικρό θραύσμα και το υπόλοιπο μόριο αντιδρά με άλλα συστατικά του συστήματος σχηματίζοντας ενεργά σύμπλοκα. Κάποια από αυτά, με την σειρά τους, θα δράσουν ως ένζυμα διαδοχικών αντιδράσεων. Συνολικά, η ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος περιλαμβάνει έναν ενζυματικό καταρράκτη, στον οποίο το προϊόν της διάσπασης ενός προενζύμου αποτελεί το ένζυμο-καταλύτη της επόμενης αντίδρασης. (Loos M., 1985) Τα μικρότερα τμήματα που απομακρύνονται συνήθως δρουν ως αναφυλατοξίνες, συμμετέχοντας έτσι στην φλεγμονώδη αντίδραση.

Παρακάτω παρουσιάζονται όλες οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην διαδικασία των αντιδράσεων του συμπληρώματος καθώς και οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες που συντονίζουν την δράση του συστήματος. Κάθε συστατικό χαρακτηρίζεται από ένα όνομα ή έναν αριθμό C1 έως C9. Τα θραύσματα που προκύπτουν από την διάσπαση ενός συστατικού ονομάζονται με μικρά γράμματα: α για τα μικρότερα και β για τα μεγαλύτερα.

Πίνακας 3. Οι πρωτεΐνες του συστήματος του συμπληρώματος της κλασικής οδού.

Κλασσική οδός		
Πρόδρομο μόριο	Ενεργό θραύσμα	Λειτουργία
C1(q,r,s)	C1q	Δεσμεύεται σε συμπλέγματα αντιγόνου-αντισώματος Ενεργοποιεί το C1r
	C1r	Καταλύει την διάσπαση και ενεργοποίηση του C1s
	C1s	Καταλύει την διάσπαση των C2 και C4,
	C2a	Καταλύει την διάσπαση των C3 και C5, αφού ενωθεί με το C4b (λειτουργία κομβερτάσης)
C2	C2b	Άγνωστη
C3	C3a	Αναφυλατοξίνη-συμμετέχει στην φλεγμονώδη αντίδραση
	C3b	Δεσμεύεται στο C5 μετά την κατάτμηση από το C2b. Προσκολλάται στις κυτταρικές επιφάνειες και προάγει την οψωνινοποίηση και την ενεργοποίηση της κλασικής οδού.
C4	C4a	Αναφυλατοξίνη-συμμετέχει στην φλεγμονώδη αντίδραση.
	C4b	Δεσμεύεται στο C2 μετά την διάσπαση από το C1s. Προσκολλάται στις κυτταρικές επιφάνειες και προάγει την οψωνινοποίηση. Μετά την δέσμευσή του με το C2a καταλύει την διάσπαση των C3 και C5 (λειτουργία κομβερτάσης)

Πίνακας 4. Οι πρωτεΐνες του συστήματος του συμπληρώματος της εναλλακτικής οδού.

Εναλλακτική οδός		
Πρόδρομο μόριο	Ενεργό θραύσμα	Λειτουργία
C3	C3a	Αναφυλατοξίνη- συμμετέχει στην φλεγμονώδη αντίδραση
	C3b	Προσκολλάται στις κυτταρικές επιφάνειες και προάγει την οψωνινοποίηση και την ενεργοποίηση της εναλλακτικής οδού
Παράγοντας B	Bf	Δεσμεύεται στις κυτταρικές επιφάνειες μέσω του C3b. Διασπάται από τον παράγοντα D.
	Bfa	Άγνωστη
	Bfb	Μορφή που σταθεροποιείται από την προπερδίνη και μαζί με το C3b ενεργοποιούν τα C3 και C5 (λειτουργία κομβερτάσης).
Παράγοντας D	-	Διασπά τον παράγοντα B μετά την δέσμευσή του στο C3b

Πίνακας 5. Οι πρωτεΐνες του συστήματος του συμπληρώματος της λεκτινικής οδού.

Λεκτινική οδός.	
Πρωτεΐνη	Λειτουργία
MBL	Δεσμεύεται σε υδατάνθρακες μικροβιακών κυττάρων και μαζί με τις MASPs καταλύει την διάσπαση των C2 και C4.
MASP1	Δεσμεύεται στην MBL και καταλύει την διάσπαση του C2. Καταλύει απ' ευθείας την διάσπαση του C3.
MASP2	Δεσμεύεται στην MBL και καταλύει την διάσπαση του C2. Καταλύει την διάσπαση του C4.
MASP3	Αδιευκρίνιστη.

Πίνακας 6. Οι πρωτεΐνες του συστήματος του συμπληρώματος του MAC.

Τελικό σύμπλοκο λύσης της μεμβράνης (MAC).		
Πρωτεΐνη		Λειτουργία
C5	C5a	Αναφυλατοξίνη- συμμετέχει στην φλεγμονώδη αντίδραση.
	C5b	Ξεκινά την συγκρότηση του συμπλέγματος λύσεως της μεμβράνης (MAC).
C6		Δεσμεύεται στο C5b και αποτελεί υποδοχέα του C7.
C7		Δεσμεύεται στο C5b6, εισέρχεται στην μεμβράνη και αποτελεί υποδοχέα του C8.
C8		Δεσμεύεται στο C5b67, ενεργοποιεί τον πολυμερισμό του C9.
C9		Πολυμερίζεται γύρω από το C5b678 και σχηματίζει κανάλια που προκαλούν την λύση του κυττάρου.

Πίνακας 7. Οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες του συστήματος του συμπληρώματος.

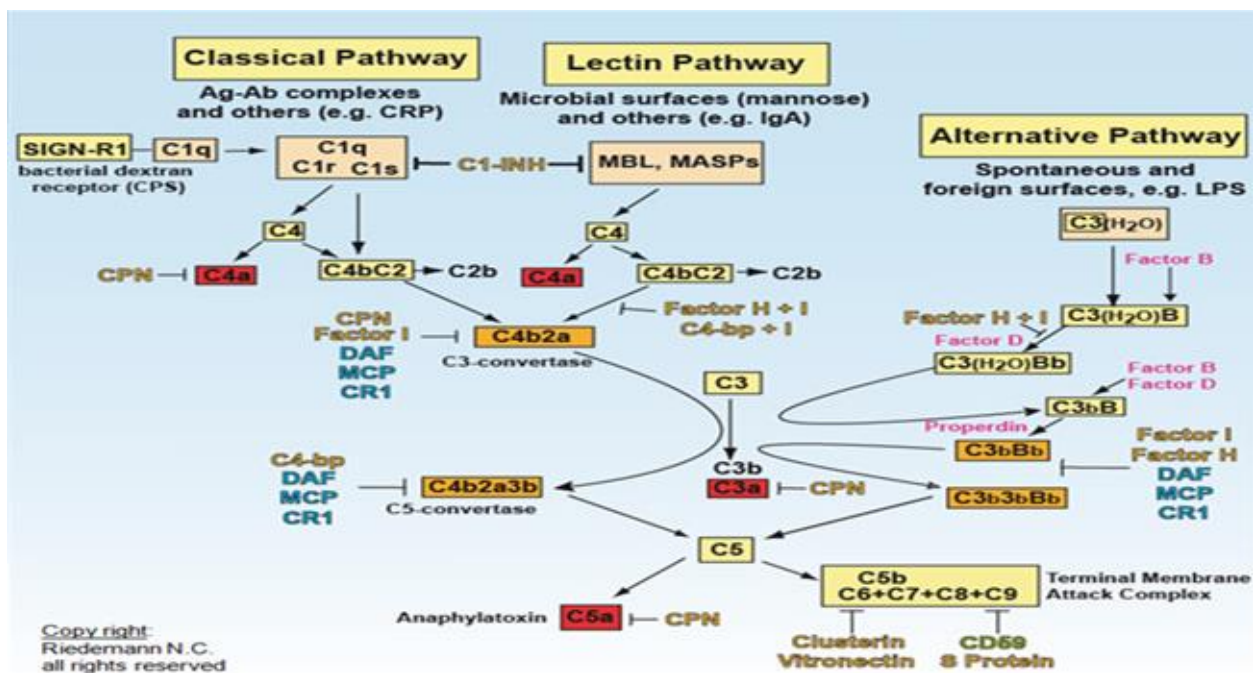
Ρυθμιστικές πρωτεΐνες.	
Πρωτεΐνη	Λειτουργία
C1 INH	Απενεργοποιεί τα C1r και C1s.
C4bp	Αποτελεί συμπαράγοντα του παράγοντα I στην κατάτμηση του C4b. Αποσταθεροποιεί την κομβερτάση C3/C5 της κλασικής οδού.
MCP	Αποτελεί συμπαράγοντα του παράγοντα I στην κατάτμηση του C4b. Αποσταθεροποιεί την εναλλακτική οδό.
Προπερδίνη	Δεσμεύει και σταθεροποιεί στην μεμβράνη το σύμπλεγμα C3bBb.
Παράγοντας I	Κατατέμνει τα C3b/ C4 παρουσία συμπαράγοντα
Παράγοντας H	Αποτελεί συμπαράγοντα του παράγοντα I στην κατάτμηση του C3b. Αποσταθεροποιεί την κομβερτάση C3/C5 της εναλλακτικής οδού.
DAF	Επιταχύνει την αποδόμηση της C3/C5 κομβερτασης
CR1	Λειτουργούν ως υποδοχείς για το C3b/C5b, ανασταλτικός ρόλος όμοιος των MCP και DAF.
CD59	Αναστέλλει την συγκρότηση του MAC στα κύτταρα του ξενιστή.
Βιτρονεκτίνη	Αναστέλλει το MAC
Κλαστερίνη	Αναστέλλει το MAC
Απενεργοποιητές αναφυλατοξινών	Απενεργοποιούν τα C3a, C5a, C4a

4.1.3. Οι οδοί ενεργοποίησης του συστήματος του συμπληρώματος

Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος μπορεί να επιτευχθεί μέσω τριών οδών:

- Κλασσική (Classical Pathway - CP)
- Εναλλακτική (Alternative Pathway - AP)
- Οδό των λεκτινών (Lectin pathway - LP)

Και οι τρεις οδοί οδηγούν στην ενεργοποίηση της λυτικής οδού (lytic pathway) και το σχηματισμό του τελικού συμπλόκου λύσης της μεμβράνης (MAC), υπεύθυνου για την λύση των παθογόνων μικροοργανισμών.



Εικόνα 18. Το σύστημα του συμπληρώματος

Πηγή : Sacks SH, Chowdhury P, Zhou W. 2003, Role of the complement system in rejection. Curr Opin Immunol. 15:487.

4.1.3.1 Η κλασσική οδός

Η κλασσική οδός, (Classical Pathway) (Εικ. ---) το πρώτο μονοπάτι που μελετήθηκε, πυροδοτείται μέσω σχηματισμού διαλυτών συμπλεγμάτων αντιγόνου–αντισώματος ή με την σύνδεση αντισώματος στην επιφάνεια ενός βακτηριακού κυττάρου (Mollnes, T.E., et al., 2002) (Merino, S., et al., 1998) Μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί από πρωτεΐνες, όπως η C-reactive protein, ή ακόμη και απευθείας από κάποιους ιούς, βακτήρια και κύτταρα μολυσμένα από ιούς. (Claire, et al., 2002) (Lawson P., et al., 2002) (Ohtani K., 1999) Οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτή την οδό ονομάζονται με βάση την σειρά ανακάλυψής τους και όχι με την σειρά που ενεργοποιούνται στην οδό.

Το πρώτο συστατικό του συμπληρώματος (C1) είναι ένα Ca^{2+} -εξαρτώμενο πρωτεϊνικό σύμπλοκο, αποτελούμενο από το C1q και από δύο μόρια από καθένα από τα C1r και C1s . Η ενεργοποίηση της οδού ξεκινά όταν, δεσμευμένες σε επιφάνειες μικροοργανισμών ανοσοσφαιρίνες IgM ή IgG δεσμεύουν το C1q, γεγονός που οδηγεί τελικά στην ενεργοποίηση του C1s, της σερινοπρωτεάσης που αποκόπτεται από το σύμπλοκο.

Η ενεργοποιημένη πρωτεάση C1s αρχικά καταλύει την διάσπαση του C4 σε C4a και C4b (που δεσμεύεται ομοιοπολικά στην επιφάνεια των κυττάρων μέσω μιας ελεύθερης θειοεστερικής ομάδας) και κατόπιν την διάσπαση του C2 σε C2a και C2b. Η διάσπαση του C2 από την σερινοπρωτεάση C1s, γίνεται μετά την πρόσδεση του C2 στο C4b. Ένα μόνο μόριο C1s μπορεί να καταλύσει την διάσπαση πολλών μορίων C4. Το ενζυμικό σύμπλοκο C4bC2a, που αποτελεί πια την κομβερτάση του C3, καταλύει την διάσπαση του τρίτου συστατικού του συμπληρώματος (C3) σε C3a και C3b.

Το τρίτο συστατικό του συμπληρώματος (C3) είναι μία από τις πρωτεΐνες που υπάρχει σε μεγάλη συγκέντρωση (1mg/ml) στον ορό και παίζει ένα κυρίαρχο ρόλο στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος.

Τα C4b και C3b δεσμεύονται στην επιφάνεια των κυττάρων με ομοιοπολικό δεσμό μεταξύ μιας δικής τους θειοεστερικής ομάδας και μιας υδροξυλομάδας ή μιας αμινομάδας στην επιφάνεια του κυττάρου. Μετά την δέσμευσή του, το C3b λειτουργεί σαν οψωνίνη (π.χ. προωθεί την φαγοκυττάρωση με την δέσμευσή του σε ειδικούς υποδοχείς της επιφάνειας των φαγοκυττάρων) αλλά και μπορεί να ενωθεί με το σύμπλοκο C4bC2a δημιουργώντας την κομβερτάση του C5. Η κομβερτάση του C5 καταλύει την διάσπαση του C5 σε δύο θραύσματα, τα C5a και C5b. Το μικρότερο θραύσμα C5a είναι μία αναφυλατοξίνη που συμμετέχει στην φλεγμονή προσελκύοντας

φαγοκύτταρα στο σημείο της μόλυνσης. Το μεγαλύτερο θραύσμα C5b ενώνεται με το, ήδη δεσμευμένο στην επιφάνεια των μικροοργανισμών C3b, και επιτρέπει την έναρξη της αυτοσυγκρότησης του συμπλέγματος λύσεως της μεμβράνης (Membrane Attack Complex, MAC) από τα C6, C7, C8, C9 που δεσμεύονται διαδοχικά. Η σύνθεση του συμπλέγματος οδηγεί στον σχηματισμό καναλιών ή πόρων στην επιφάνεια των μικροοργανισμών, που οδηγεί τελικά στην λύση τους. (Claire, et al., 2002) (Fujita T., 2002)

4.1.3.2 Η εναλλακτική οδός

Σε αντίθεση με την κλασική οδό, η εναλλακτική οδός (Alternative Pathway) ενεργοποιείται άμεσα από ιούς, βακτήρια, μύκητες ή ακόμη και καρκινικά κύτταρα ενώ είναι ανεξάρτητη των αντισωμάτων. Η ενεργοποίηση πραγματοποιείται όταν το θραύσμα C3b, που έχει προκύψει από την διάσπαση του C3, δεσμεύεται σε υδροξυλομάδες ή αμινομάδες υδατανθράκων ή πρωτεϊνών στην επιφάνεια των μικροβίων.

Ο παράγοντας B (Factor B), μια πρωτεΐνη ομόλογη του C2, δεσμεύεται στο προσκολλημένο C3b και ενεργοποιείται από μια άλλη σερινοπρωτεάση του πλάσματος, τον παράγοντα D.

Ο παράγοντας D (Factor D) καταλύει την διάσπαση του B στα θραύσματα Bb και Ba. Το σύμπλοκο C3bBb που προκύπτει δρα ως κομβερτάση του C3 για την εναλλακτική οδό και σταθεροποιείται από μια γλυκοπρωτεΐνη του ορού, την προπερδίνη. Ένα μόριο C3- κομβερτάσης καταλύει την διάσπαση πολλών μορίων C3 ενώ μετατρέπεται σε C5- κομβερτάση με την προσθήκη ενός ακόμη μορίου C3b (C3bBbC3b). Η διάσπαση του C5 από την αντίστοιχη κομβερτάση οδηγεί στον σχηματισμό MAC και στην λύση του κυττάρου. (Claire, et al., 2002) (Fujita T., 2002)

4.1.3.3 Η οδός των λεκτινών

Η οδός των λεκτινών (lectin pathway) ομοιάζει με την κλασική οδό ενεργοποίησης αλλά διαφοροποιείται από αυτήν στον τρόπο με την οποία γίνεται η ενεργοποίησή της. Αντί, η ενεργοποίηση να γίνει από συμπλέγματα αντιγόνου-αντισώματος, η οδός αυτή ξεκινά με την δέσμευση ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου, που αποτελείται από την Mannose-Binding Lectin (MBL) και τις σερινοπρωτεάσες MASP-1 και MASP-2 (Mannose-Binding Lectin Associated

Proteases 1 and 2), σε υδατάνθρακες της επιφάνειας των βακτηρίων. Με αυτό τον τρόπο η ενεργοποίηση του συμπληρώματος γίνεται από τους ίδιους τους μικροοργανισμούς και είναι ανεξάρτητη των μηχανισμών της προσαρμοστικής ανοσίας. Η δέσμευση της MBL στους υδατάνθρακες (συνήθως μαννόζες) της επιφάνειας των βακτηρίων ενεργοποιεί τις πρωτεάσες, οι οποίες καταλύουν την διάσπαση των συστατικών C2 και C4 του συμπληρώματος. Τα θραύσματα C2a και C4b σχηματίζουν την κομβερτάση του C3 (C4bC2a), η οποία επάγει την διάσπαση του C3 στα θραύσματα C3a και C3b. (Claire, et al. 2002) Η δέσμευση του θραύσματος C3b στην C3-κομβερτάση, οδηγεί στον σχηματισμό της κομβερτάσης του C5, η οποία καταλύει την διάσπαση του C5. Η λεκτινική οδός, όπως και οι δύο προηγούμενες, οδηγεί στον σχηματισμό του MAC και στην λύση των βακτηρίων. (Claire, et al., 2002) (Fujita T., 2002)

4.1.3.4 Η λυτική οδός

Η λυτική οδός (lytic pathway) αποτελεί την κοινή κατάληξη και των τριών οδών ενεργοποίησης του συστήματος του συμπληρώματος.

Τα συστατικά του συμπληρώματος C5b έως και C9 συγκροτούν το σύμπλοκο λύσης της μεμβράνης (Membrane Attack Complex - MAC). Ο σχηματισμός του ξεκινά με την δέσμευση του μορίου C5b, στο, ήδη δεσμευμένο στην επιφάνεια του αντιγόνου, C3b. Αποτέλεσμα της δέσμευσης αυτής είναι η έκθεση της θέσεως του C5 στην οποία θα δεσμευτεί το μόριο C6. Η διαδοχική δέσμευση του C7, του C8 και πολλαπλών μορίων C9 στο σύμπλεγμα C5b-C6 καταλήγει στο σχηματισμό του συμπλόκου MAC, το οποίο εισέρχεται στην μεμβράνη και προκαλεί λύση του κυττάρου. (Claire, et al., 2002) Τα μόρια C6 έως C9 έχουν προέλθει από ένα κοινό, προγονικό μόριο και ομοιάζουν δομικά με την περφορίνη, μια λυτική πρωτεΐνη των φυσικών «κυττάρων-φονιάδων» και των T-κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων. (Podack, et al., 1989)

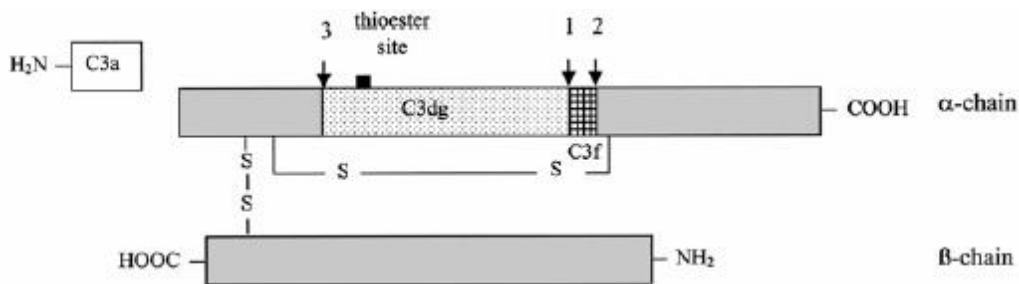
Στον άνθρωπο, τα συστατικά αυτά φέρουν κοινά δομικά μοτίβα, όπως περιοχές θρομβοσπονδίνης, υποδοχέα λιποπρωτεϊνών και EGF περιοχές (Epidermal Growth Factor precursor domain) και την χαρακτηριστική περιοχή MACPF (MAC perforin) . (Hobart, et al., 1995)

4.1.4. Οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες του συμπληρώματος

Η λειτουργία του συμπληρώματος δεν είναι ειδική γι' αυτό είναι πολύ σημαντική η προστασία των κυττάρων του ίδιου οργανισμού από την δράση του. Τα θηλαστικά διαθέτουν ένα μεγάλο αριθμό ρυθμιστικών πρωτεϊνών που ελέγχουν την έκταση της ενεργοποίησης του συμπληρώματος μέσω:

- a. Κατακερματισμού των c3b και c4b σε θραύσματα που δεν μπορούν να συμμετάσχουν στις αντιδράσεις του συμπληρώματος.
- b. Απενεργοποίησης των c3-κομβερτασών.
- c. Αναστολής της συγκρότησης του συμπλόκου λύσης της μεμβράνης.
- d. Απενεργοποίησης των C3a και C5a αναφυλατοξινών.

Είναι γνωστό πως, πολλά από τα θραύσματα στα οποία διασπώνται τα C3 και C4, όπως τα iC3b και C3dg, αναγνωρίζονται από τους υποδοχείς του συμπληρώματος και παίρνουν μέρος σε εξειδικευμένες βιολογικές δραστηριότητες. Η διάσπαση του C3b σε iC3b, C3c και C3dg πραγματοποιείται από τον παράγοντα I του πλάσματος, παρουσία κατάλληλου συμπαραγόντα. Ανάλογα με το είδος της διάσπασης αυτός ο συμπαραγόντας μπορεί να είναι ο παράγοντας H, η πρωτεΐνη MCP (Membrane Co-factor Protein - MCP) ή ο υποδοχέας 1 του συμπληρώματος (CR1). Στην εικόνα - διακρίνονται οι τρεις θέσεις διάσπασης του C3 από τον παράγοντα I. Ο παράγοντας I, παρουσία της πρωτεΐνης C4bp (C4 binding protein - C4bp), μπορεί επίσης να καταλύσει την διάσπαση του C4. Όλοι οι ρυθμιστικοί συμπαραγόντες χαρακτηρίζονται κύρια από την ύπαρξη SRCs. Οι SRCs (Short-Consensus Repeat - SRC) είναι τυχαίες δομικές επαναλήψεις αποτελούμενες από 60 αμινοξέα που βρίσκονται στις περισσότερες πρωτεΐνες του πλάσματος, καθώς και στις ρυθμιστικές πρωτεΐνες του συμπληρώματος (Reid, K. B. et al., 1989)



Εικόνα 19. Σχηματική απεικόνιση του μορίου C3. Κατάτμηση του μορίου από την κομβερτάση του C3 απελευθερώνει το θραύσμα C3. Κατάτμηση του μορίου από τον παράγοντα I και συμπαραγόντες (στις δύο θέσεις που δείχνονται με τα βέλη 1 και 2) οδηγεί στην απομάκρυνση του τμήματος C3f και ενώ το θραύσμα που απομένει ονομάζεται iC3b. Περαιτέρω κατάτμηση του iC3b από τον παράγοντα I στην θέση 3 απελευθερώνει τα θραύσματα C3dg και C3c.

Οι C3-κομβερτάσες C4bC2a και C3bBb μπορούν να απενεργοποιηθούν από την πρωτεΐνη DAF (decay-accelerating factor), μια γλυκοπρωτεΐνη της μεμβράνης που υπάρχει κυρίως στα κύτταρα του αίματος. Η συγκρότηση του συμπλόκου MAC μπορεί να διακοπεί από την πρωτεΐνη S και την κλαστερίνη (clusterin), οι οποίες παρεμποδίζουν την δέσμευση του συμπλέγματος C5b-7 στην μεμβράνη των κυττάρων. Η μεμβρανική πρωτεΐνη CD59, που υπάρχει σε ένα μεγάλο αριθμό κυτταρικών τύπων, αναστέλλει την δέσμευση του C9 στο C8 και κατ' επέκταση στην συγκρότηση του συμπλόκου MAC. Τέλος, είναι γνωστό πως η καρβοξυπεπτιδάση N του ορού αδρανοποιεί τις αναφυλατοξίνες C3a και C5a απομακρύνοντας την αργινίνη του καρβοξυτελικού άκρου και παρεμποδίζουν την επέκταση της φλεγμονής. (Claire, et al., 2002)

4.1.5 Οι υποδοχείς του συμπληρώματος

Πολλά από τα θραύσματα που προκύπτουν από την διάσπαση του C3 (Εικ. 19), είναι γνωστό πως αποτελούν στόχους διαφόρων υποδοχέων. Πολλοί υποδοχείς του συστήματος του συμπληρώματος έχουν ταυτοποιηθεί στα θηλαστικά. Αυτοί οι υποδοχείς διαφέρουν στην ικανότητά τους να δεσμεύουν τα διαφορετικά θραύσματα του C3. Ο ανθρώπινος υποδοχέας 1 του συμπληρώματος (CR1 ή CD35), που υπάρχει σε λευκοκύτταρα και ερυθροκύτταρα, δεσμεύει επιλεκτικά τα C3b και iC3b, ενώ ο υποδοχέας 2 (CR2 ή CD21), που υπάρχει σε λεμφοκύτταρα

και θυλακοειδή δενδριτικά κύτταρα, κυρίως δεσμεύει τα iC3b και C3dg. Και οι δύο υποδοχείς συνίστανται από SCRs και είναι, μεταξύ άλλων, ρυθμιστές των μηχανισμών της προσαρμοστικής ανοσίας. (Carroll, et al., 1998) Ένας υποδοχέας του C1q έχει ταυτοποιηθεί σε ανθρώπινα αιμοπετάλια, μονοκύτταρα και μακροφάγα, ενώ πιστεύεται πως εμπλέκεται στην ρύθμιση της φαγοκυττάρωσης (Neoromano, et al., 1999) και στην απομάκρυνση των ανοσοσυμπλεγμάτων (Nash, et al., 2001)

Στα θηλαστικά έχουν βρεθεί υποδοχείς αναφυλοτοξινών σε πολλούς κυτταρικούς τύπους. Η δέσμευση των C3a και C5a στους υποδοχείς C3aR και C5aR επάγει αντιδράσεις φλεγμονής, όπως η έκκριση ισταμίνης από τα μαστοκύτταρα, η σύσπαση των λείων μυϊκών κυττάρων και η αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων (Wetsel, et al., 1995) (Erdei, et al., 1997)

4.1.6 Η λεκτινική οδός - Η πρωτεΐνη MBL .

4.1.6.1 Δομή και λειτουργία των πρωτεϊνών MBL

Η πρωτεΐνη MBL είναι λεκτίνη του πλάσματος και μέλος της οικογένειας των κολλεκτινών (Collectins) . Οι κολλεκτίνες είναι πρωτεΐνες που διαθέτουν ταυτόχρονα περιοχές λεκτινών και κολλαγόνου. Η λειτουργία των κολλεκτινών φαίνεται να σχετίζεται ισχυρά με την φυσική ανοσία.

Εκτός από την MBL στην ίδια οικογένεια ανήκουν οι δύο mucosal-associated proteins, surfactant proteins A και D (SP-A και SP-D) (Lawson P., et al., 2000), η πρωτεΐνη του ήπατος CL1 (Ohtani K., 1999) και οι πρωτεΐνες conglutinin και CL-43 (Loveless RW, et al., 1995) του πλάσματος των βοοειδών.

Όλες οι πρωτεΐνες της οικογένειας εμφανίζουν ομοιότητες στην δομή και αποτελούνται από διαφορετικό αριθμό υπομονάδων. Κάθε υπομονάδα συνίσταται από τρεις όμοιες πολυπεπτιδικές αλυσίδες ενωμένες στην βάση τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Παρατηρήσεις με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχουν δείξει την ύπαρξη ολιγομερών που αποτελούνται από 3-6 υπομονάδες (Lu J. H. et al., 1990) και πρόσφατες έρευνες συσχετίζουν το κάθε είδος ολιγομερών με διαφορετικό βιολογικό ρόλο.

Κάθε μία από τις τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, που συγκροτούν μία υπομονάδα, χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη συγκεκριμένων δομικών περιοχών:

- Μίας αμινοτελικής περιοχής, 18-25 καταλοίπων αμινοξέων που περιλαμβάνει 2-3 συντηρημένες κυστεΐνες. Οι κυστεΐνες αυτές συμμετέχουν στο σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών που βοηθούν τόσο στην συγκρότηση υπομονάδων από τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, όσο και στην σύνδεση των υπομονάδων μεταξύ τους.
- Μίας περιοχής που δομικά ομοιάζει με το κολλαγόνο (collagen-like Region), η οποία αποτελείται από 18-21 επαναλήψεις της τριπλέτας Gly-Xaa-Yaa. Στα διάφορα μόρια MBL παρατηρείται μία διακοπή μεταξύ της 6^{ης}-9^{ης} επανάληψης. Αυτή η διακοπή αντιστοιχεί στην περιοχή σύνδεσης των εξωνίων 1 και 2 και προκαλείται από την έλλειψη ενός αμινοξέος. Η συνέπεια αυτής της έλλειψης είναι μία στρέβλωση της τριτοταγούς δομής των υπομονάδων, που τις απομακρύνει από τον «στυρήνα» του μορίου.
- Μίας περιοχής σύνδεσης με δομή α-έλικας (α-helical coiled coil neck region ή trimerization domain) που περιλαμβάνει 34 περίπου αμινοξέα, που κωδικοποιούνται από το εξώνιο 3 και 10 περίπου αμινοξέα που κωδικοποιούνται από το εξώνιο 4. Η δομή α-έλικας σχηματίζεται από επτά επαναλήψεις υδροφοβικών αμινοξέων, μεταξύ των οποίων παρεμβαίνουν υδρόφιλα αμινοξέα και αποτελεί πιθανόν την θέση έναρξης για τον σχηματισμό της δευτεροταγούς δομής.
- Μίας καρβοξυτελικής περιοχή, μήκους περίπου 115 καταλοίπων αμινοξέων, μέσω της οποίας πραγματοποιείται η αναγνώριση των υδατανθράκων (C23 type Carbohydrate-Recognition Domain- CRD) (Holmskov U, et al., 1994). Κοινό σημείο όλων των λεκτινών που φέρουν μια C-type CRD είναι η απαίτηση παρουσίας Ca²⁺ κατά την δέσμευση υδατανθράκων.

Η σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας των C-type CRDs πολλών και διαφορετικών λεκτινών έδειξε την παρουσία 14 συντηρημένων καταλοίπων αμινοξέων και 18 άλλων που εμφανίζουν τον ίδιο χαρακτήρα. Τέσσερις συντηρημένες κυστεΐνες σχετίζονται με το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών, οι οποίοι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ικανότητα δέσμευσης της περιοχής σε υδατάνθρακες. (Oka S, et al., 1987)

Η πρωτεΐνη MBL δεσμεύεται σε υδατανθρακικές δομές της επιφανείας των

μικροοργανισμών (βακτηρίων, μυκήτων, ιών και παρασιτικών πρωτοζώων) επάγοντας την καταστροφή τους είτε μέσω της ενεργοποίησης του συμπληρώματος, (με ενεργοποίηση της λεκτινικής οδού και σχηματισμό του τελικού συμπλόκου λύσης της μεμβράνης) είτε μέσω φαγοκυττάρωσης (έχει δειχθεί πως η πρωτεΐνη μπορεί να δράσει και ως οψωνίνη) (Turner M. W., 1998). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ικανότητα, μέσω MBL, της διάκρισης των «οικείων» από τις «ξένες» για τον οργανισμό υδατανθρακικές δομές. Η ικανότητα αυτή οφείλεται τόσο στην εξειδίκευση των CRD περιοχών όσο και στην ύπαρξη πολλών τέτοιων περιοχών στο μόριο. Η δέσμευση της CRD είναι ειδική για συγκεκριμένο είδος υδατάνθρακα και ασβέστιο-εξαρτώμενη. Η MBL αναγνωρίζει γλυκάνες, λιποφωσφογλυκάνες και γλυκο-ινοσιλ-φωσφολιπίδια που φέρουν μαννόζη, γλυκόζη, φουκόζη ή N-ακετυλογλυκοζαμίνη ως τελικές εξόζες. (Turner MW., 1996) Χαρακτηριστικό γνώρισμα αυτών των εξοζών είναι η συμμετρική διευθέτηση των 3- , 4- υδροξυλομάδων που φέρουν.

Αυτού του είδους η αναγνώριση συνήθως χαρακτηρίζεται με τον όρο «αναγνώριση μικροδομής» (micropattern recognition) (Hoffmann JA, et al. 1999) Ένα τυπικό μόριο με το οποίο συνδέεται *in vivo* η MBL εμφανίζει ένα τέτοιο αριθμό μικροδομών ή επαναλαμβανόμενων θέσεων δέσμευσης που επιτρέπουν δέσμευση υψηλής συγγένειας μέσω των πολλαπλών CRDs του μορίου. Η τρισδιάστατη δομή των τριμερών CRDs στα μόρια MBL του ανθρώπου και του αρουραίου δείχνει πως οι υδατάνδρακες-στόχοι πρέπει να απέχουν 45-50Å μεταξύ των θέσεων δέσμευσης για να επιτυγχάνεται δέσμευση υψηλής συγγένειας. (Hoffmann JA, et al., 1999) Με αυτόν τον τρόπο, η πρωτεΐνη MBL είναι απολύτως ικανή να αναγνωρίσει μικροβιακές επιφάνειες με υψηλή συγκέντρωση μαννόζης και / ή N-ακετυλοζαμίνης, όπως τις επιφάνειες των *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* (στελέχη K12 και B), *Salmonella typhimurium* και *Neisseria gonorrhoeae* (Turner MW., 1998) (Devyatyarova-Johnson M, et al., 2000).

Σε αντίθεση με τις μικροβιακές επιφάνειες, οι μικροδομές που χαρακτηρίζουν τις, περιορισμένες σε ποσότητα, γλυκοπρωτεΐνες του ανθρώπου και, κατ' επέκταση, τις γλυκοπρωτεΐνες των ανωτέρων ζώων δεν εμφανίζουν κατάλληλο επαναλαμβανόμενο πρότυπο στην μεμβράνη. Αξιοσημείωτο είναι πως οι υδατανθρακικές δομές των πρωτεϊνών των θηλαστικών συνήθως καταλήγουν σε σιαλικό οξύ, το οποίο δεν αναγνωρίζεται από την MBL και προστατεύει έτσι τα υπόλοιπα σάκχαρα. Από την άλλη μεριά, κακοήθεις μετασχηματισμοί και ιικές μολύνσεις τροποποιούν τις δομές των ολιγοσακχαριτών στην επιφάνεια των κυττάρων και έτσι κάποια καρκινικά κύτταρα (Fugita T, et al., 1995) όπως ακριβώς και οι ιικές επιφάνειες

(Saifuddin M, et al., 2000) (Malhotra R, et al., 1994) (Kase T, et al., 1999) φαίνεται να αναγνωρίζονται από την MBL.

4.1.6.2 Δομή των γονιδίων MBL

Μέχρι σήμερα έχουν μελετηθεί επαρκώς τα γονίδια που κωδικοποιούν για την πρωτεΐνη MBL του ανθρώπου και τις πρωτεΐνες MBL-A και MBL-C του ποντικού και του αρουραίου. (Sastry K, et al., 1989) (Taylor ME, et al., 1989) (Sastry R, et al., 1995) (Drickamer, et al., 1987) (Arai T, et al., 1993) (Ezekowitz RA, et al., 1988)

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την ανθρώπινη πρωτεΐνη MBL περιλαμβάνει 4 εξώνια και εδράζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 10. (Sastry K, et al. 1989) Το εξώνιο 1 δίνει γενετική πληροφορία για το τμήμα της πρωτεΐνης που αντιστοιχεί στο πεπτιδίο έκκρισης, την πλούσια σε κυστεΐνες αμινοτελική περιοχή, και ένα μέρος της περιοχής με δομή κολλαγόνου. Το υπόλοιπο μέρος της περιοχής αυτής κωδικοποιείται από το εξώνιο 2. Η περιοχή σύνδεσης (neck region) κωδικοποιείται από το εξώνιο 3, ενώ η περιοχή δέσμευσης των υδατανθράκων (C-type Carbohydrate Recognition Domain) κωδικοποιείται από το εξώνιο 4.

Η περιοχή του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου, εκτός από τα βασικά στοιχεία μεταγραφής (BSS basal transcription elements), (TATAA box στην θέση -38bp και CAAT box στη θέση -79bp), περιέχει τρία γλυκοκορτικοειδή στοιχεία αντίδρασης, (στις θέσεις - 736bp, - 656bp, -245bp), μία θέση αντίδρασης στην θερμική καταπόνηση (HSCS heat shock consensus sequence) (στη θέση -592bp) καθώς και μία αλληλουχία που εμφανίζει υψηλή ομολογία με την αλληλουχία που κωδικοποιεί για την amyloid A πρωτεΐνη του ορού. (Sastry K, et al., 1989) (Taylor ME, et al., 1989) Τα στοιχεία glucocorticoid responsive πιθανόν συμμετέχουν στην αύξηση της έκφρασης της MBL κατά την διάρκεια της οξείας αντίδρασης σε μολύνσεις, καθώς η αυξημένη απελευθέρωση των γλυκοκορτικοειδών από την δράση της αδρεναλίνης αποτελεί ένα σημαντικό τμήμα της αντίδρασης του οργανισμού στο stress. Στην *Drosophilla*, τα στοιχεία heat stress μεσολαβούν στην αναστολή της μεταγραφής των heat stress γονιδίων. Στον άνθρωπο ένα παρόμοιο στοιχείο έχει ταυτοποιηθεί στην 5' περιοχή της C-reactive protein, η οποία είναι γνωστή σαν πρωτεΐνη που παίρνει μέρος στην οξεία αντίδραση σε μολύνσεις.

Λειτουργική ανάλυση των περιοχών του υποκινητή του γονιδίου της ανθρώπινης MBL αποκαλύπτουν την ύπαρξη χαρακτηριστικών στοιχείων που είναι υπεύθυνα για την οξεία αντίδραση. Τμήματα DNA μεταξύ των θέσεων -4 και +166 του γονιδίου φαίνονται ικανά να

δεσμεύσουν νέες, μη ταυτοποιημένες πρωτεΐνες όταν η έκφραση του γονιδίου επάγεται με IL-6.
(Arai T, et al., 1993)

4.2 Υπεροξεία απόρριψη - HAR

Η υπεροξεία απόρριψη του μοσχεύματος γίνεται μερικά λεπτά έπειτα το πέρας της ξενομεταμόσχευσης και πραγματοποιείται έπειτα από την πρόσδεση των ξενοδραστικών φυσικών αντισωμάτων - XNAs (Xenoreactive Natural Antibodies - XNA) στο ενδοθήλιο του λήπτη προκαλώντας ενεργοποίηση του συμπληρώματος του ανθρώπου με αποτέλεσμα να προκαλείται καταστροφή του ενδοθηλίου, φλεγμονή, θρόμβωση και τέλος νέκρωση του μοσχεύματος.

Τα ξενοδραστικά φυσικά αντισώματα στα οποία επάγονται οι ανοσοσφαιρίνες IgM, IgG και IgA έχουν στόχο την σύνδεση με ένα ένζυμο που ονομάζεται Galactose-alpha-1,3-galactose γνωστό και ως α-Gal το οποίο παράγεται από την α-γαλακτοζυλοτρανσφεράση (α-galactosyl transferase). (Candinas, D. et al., 2000) Πολλά μη πρωτεύοντα περιέχουν το ένζυμο αυτό όπου παρουσιάζεται στο επιθήλιο με αποτέλεσμα να γίνεται αντιληπτό σαν ξένο αντιγόνο από τα πρωτεύοντα, τα οποία έχουν έλλειψη του ενζύμου αυτού. Στην ξενομεταμόσχευση από ένα όργανο χοίρου σε άνθρωπο τα XNAs αναγνωρίζουν τις γλυκοπρωτεΐνες της οικογένειας των ιντεγκρινών του χοίρου και η αναγνώριση αυτή έχει ως τελικό αποτέλεσμα την

- καταστροφή των ενδοθηλιακών κυττάρων,
- αποκοκκίωση των αιμοπεταλίων,
- φλεγμονή,
- θρόμβωση του μοσχεύματος,
- εναπόθεση ινώδους,
- αιμορραγία,
- νέκρωση μοσχεύματος

4.3 Οξεία αγγειακή απόρριψη - AVR

Ο τύπος αυτός της απόρριψης εμφανίζεται σε ασύμφωνα μοσχεύματα, μη συμβατά, μέσα σε διάστημα 2 με 3 ημέρες, εφόσον δεν εμφανιστεί υπεροξεία απόρριψη. Η διαδικασία της οξείας αγγειακής απόρριψης (AVR) είναι πολύ πιο περίπλοκη από την υπεροξεία απόρριψη (HAR) ωστόσο δεν είναι πλήρως κατανοητός ο μηχανισμός δράσης της. Η AVR απαιτεί την de novo πρωτεϊνοσύνθεση η οποία καθορίζεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα του μοσχεύματος και τα αντισώματα, μακροφάγα και αιμοπετάλια του λήπτη. (Candinas, D. et al., 2000).

Η απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος σε αυτού του είδους την απόρριψη χαρακτηρίζεται από φλεγμονώδη διήθηση των μακροφάγων και των Natural Killer cell, σε ελευθερη μετάφραση “φυσικά φονικά κύτταρα”, ενδοαγγειακή θρόμβωση και νέκρωση των τοιχωμάτων των αιμοφόρων αγγείων. (Candinas, D. et al., 2000)

4.4 Κυτταρική απόρριψη - CeR

Η κυτταρική απόρριψη βασίζεται στην κυτταρική ανοσία και πραγματοποιείται από:

- Natural Killer cell “φυσικά φονικά κύτταρα” - τα οποία συσσωρεύονται στο μόσχευμα και προκαλούν βλάβη σε αυτό και
- Από τα T-λεμφοκύτταρα - τα οποία ενεργοποιούνται από μόρια του μείζον συστήματος ιστοσυμβατότητας

Η αναγνώριση του μοσχεύματος ως ξένο μπορεί να γίνει είτε άμεσα είτε έμμεσα.

- Η άμεση ξενοαναγνώριση ξεκινάει όταν τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του μοσχεύματος παρουσιάζουν πεπτίδια στα CD4+ T κύτταρα του λήπτη, με αποτέλεσμα να παράγεται ιντερλευκίνη 2 (Interleukin 2 - IL 2).
- Η έμμεση ξενοαναγνώριση περιλαμβάνει την παρουσίαση των αντιγόνων του μοσχεύματος από τα αντιγονοπαρουσιαστικά στα CD4+ T κύτταρα του δέκτη, επίσης τα ξενοαντιγόνα είναι δυνατόν να παρουσιάζονται από τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας στα CD8+ T κύτταρα του λήπτη. (Dooldeniya, M. D. et al., 2003) (Abbas, A., et al., 2005)

4.5 Χρόνια απόρριψη - ChR

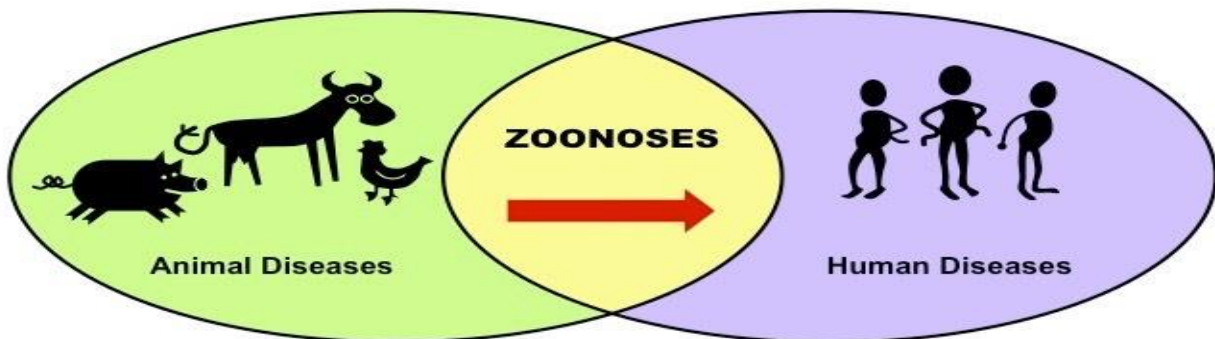
Η ChR είναι μια βραδεία και προοδευτική απόρριψη και συνήθως εμφανίζεται σε μοσχεύματα τα οποία δεν εμφανίζουν σημάδια υπεροξείας ή οξείας αγγειακής απόρριψης. Στην επιστημονική κοινότητα η χρόνια απόρριψη δεν έχει αποσαφηνιστεί ο τρόπος λειτουργίας της ωστόσο το μόνο σίγουρο είναι ότι δεν εμπλέκονται τα ΧΝAs και το συμπλήρωμα. (Candinas, D. et al., 2000)

Ωστόσο τα λεμφοκύτταρα τα οποία ενεργοποιούνται από τα αντιγόνα του ξενομοσχεύματος είναι αυτά που ενοχοποιούνται για την χρόνια απόρριψη λόγω του ότι προσελκύουν τα μακροφάγα τα οποία εκκρίνουν παράγοντες ανάπτυξης λείων μυϊκών ινών στα αιμοφόρα αγγεία του μοσχεύματος με αποτέλεσμα να αναπτύσσονται και να συσσωρεύονται μυϊκά κύτταρα στα αιμοφόρα αγγεία που οδηγούν στην σκλήρυνση των αιμοφόρων αγγείων του μοσχεύματος οδηγώντας τελικά στην νέκρωσή του. (Abbas, A., et al., 2005)

Κάθε μορφής ωστόσο απόρριψη είτε υπεροξεία, είτε οξεία αγγειακή, είτε κυτταρική, είτε χρόνια απόρριψη μπορεί να αποφευχθεί ή να μειωθεί με τον προσδιορισμό των μοριακών ομοιοτήτων μεταξύ του δότη και του λήπτη καθώς και με χορήγηση ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων έπειτα της μεταμόσχευσης. (Frohn, C., et al., 2001)

5. ΖΩΟΝΟΣΟΙ

Η ξενομεταμόσχευση με την χρήση χοίρειων κυττάρων, ιστών και οργάνων πρέπει να ξεπεράσει τρία εμπόδια πριν ξεκινήσει η ασφαλή εφαρμογή της σε κλινικό επίπεδο. Αυτά είναι η ανοσολογική απόρριψη, οι φυσιολογικές ασυμβατότητες και η μετάδοση μολυσματικών παραγόντων. Η “μικροβιολογική ασφάλεια” της ξενομεταμόσχευσης είναι ένας σημαντικός παράγοντας για την ασφαλή διεξαγωγή της πράξης αυτής, ωστόσο μπορεί να χειριστεί εύκολα. Πολλοί μολυσματικοί παράγοντες έχουν μεταδοθεί ακόμα και σε μεταμοσχεύσεις μεταξύ ανθρώπων. Αυτοί είναι ο ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός (Human Cytomegalovirus - HCMV), ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (Human Immunodeficiency Virus-1 - HIV-1) και ο ιός της λύσσας (Rabies Virus - RV) (J.A. Fishman, M.A. et al., 2012)



Εικόνα 20. Σκίτσο αναπαράστασης της σύνδεσης των ζωνοσόων με τον άνθρωπο

Όπως όλα τα ζώα έτσι και οι χοίροι φέρουν μικροοργανισμούς στο πεπτικό σύστημα, στο δέρμα τους και γι αυτό τα κύτταρα, οι ιστοί και τα όργανα που θα χρησιμοποιηθούν στην ξενομεταμόσχευση θα πρέπει να είναι άσηπτα δηλαδή ο αριθμός των μικροοργανισμών που εμφανίζονται στον ιστό θα πρέπει να είναι μηδενικός. (H.J. Schuurman, 2009)

Οι ζωνοσόοι αναφέρονται σε μικροοργανισμούς οι οποίοι όχι μόνο μπορούν να μολύνουν τον φυσικό τους ξενιστή αλλά να προκαλέσουν και ασθένεια. Ωστόσο είναι δύσκολο να οριστούν και να ταξινομηθούν οι μικροοργανισμοί που είναι παθογόνοι και μη-παθογόνοι για τον άνθρωπο ως δέκτη. Επιπλέον όταν ένας μικροοργανισμός είναι παθογόνος για τον χοίρο αυτό δεν σημαίνει ότι είναι παθογόνος και για τον άνθρωπο και αντίστροφα. Η πιθανότητα μόλυνσης είναι συγκριτικά υψηλότερη όταν στον δότη έχει χορηγηθεί ανοσοκατασταλτική αγωγή για την αποφυγή της απόρριψης. Ωστόσο δεν είναι ακόμα σαφές το ποιοί μικροοργανισμοί είναι αυτοί

που θα πρέπει να ελεγχθούν για την αποφυγή μολύνσεων.

Ο χοίρος του είδους Auckland island όπου είχε χρησιμοποιηθεί για την πρώτη κλινική δοκιμή που πραγματοποιήθηκε από μια εταιρία ονόματη New Zealand company LCT ελέγχονταν συχνά για περίπου 10 βακτήρια, 15 ιούς και τοξοπλάσματα όπως φαίνεται στο Πίνακα X. (S. Wynyard, et al., 2014) Οι χοίροι Göttingen Minipig οι οποίοι έχουν χρησιμοποιηθεί για τις περισσότερες βιοϊατρικές έρευνες έχουν ελεγχθεί για 27 βακτήρια 16 ιούς 3 μύκητες 4 παράσιτα καθώς και για τον ιό PERV (M. Semaan, et al., 2013) Τον ιό της ηπατίτιδας E καθώς και για 89 μικροοργανισμούς (V.A. Morozov, et al., 2015)

Πίνακας 8. Οι μικροοργανισμοί για τους οποίους ελέγχθηκε ο χοίρος του είδους Auckland island για την μεταμόσχευση κυττάρων

Πηγή: S. Wynyard, et al (2014).

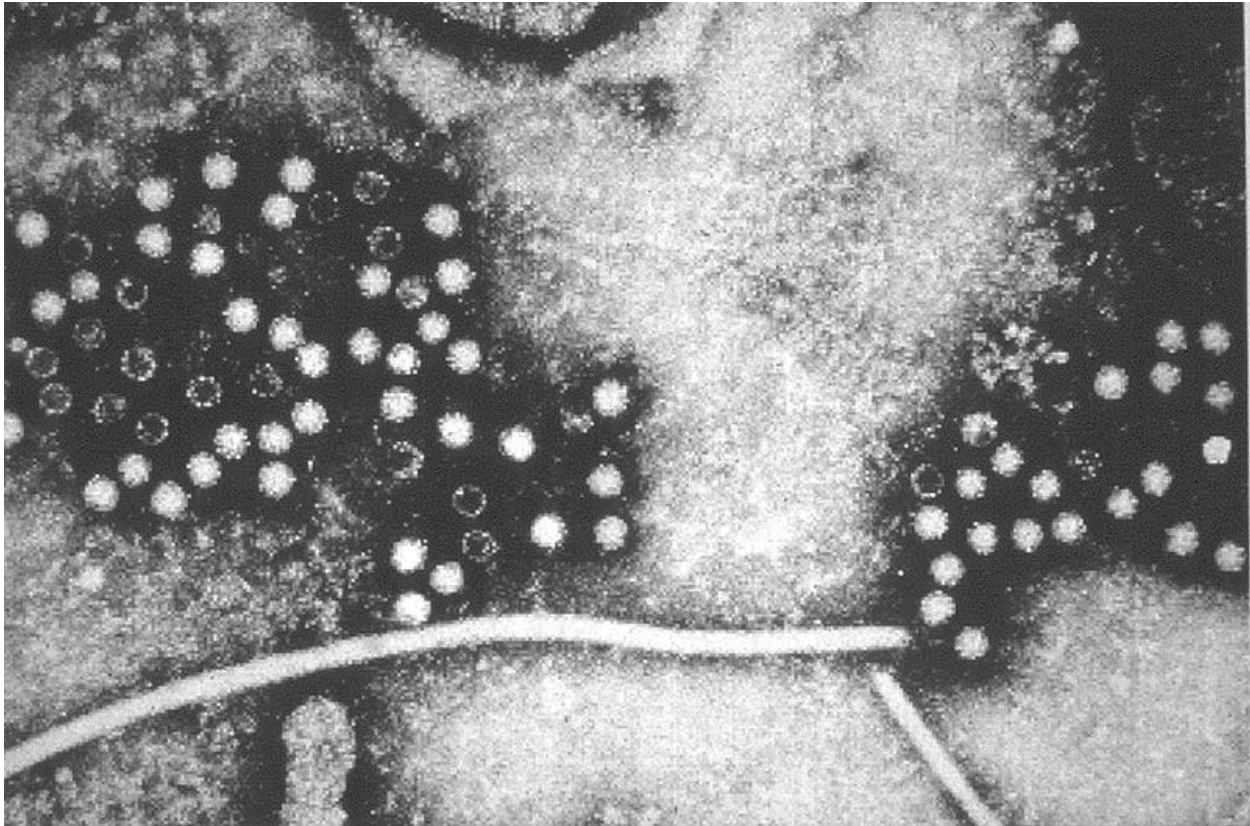
Bacteria	
Leptospira tarassovi	
Leptospira hardjo	
Leptospira pomona	
Mycoplasma	
hyopneumoniae	
Campylobacter	
Isospora	
Cryptosporidium	
E. coli K88	
Yersinia	
Viruses	
PCMV	Porcine cytomegalovirus
PCV1	PCV1, porcine circovirus type 1
PCV2	PCV2, porcine circovirus type 2
PLHV2	Porcine lymphotropic herpesvirus type 2
HEV	Hepatitis E virus
ReoV	Reovirus (all types)
RotaV A-C	Rotavirus A, rotavirus B and rotavirus C
PEVB	Porcine enterovirus B
PHEV	Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus
PTV	Porcine teschovirus
BVD	Bovine virus diarrhea
AujD	Aujesky's disease
PPV	Porcine parvovirus
PRRSV	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus
EMCV	Encephalomyocarditis virus
Protozoa	
Toxoplasma	

Γενικά οι περισσότεροι μικροοργανισμοί των χοίρων οι οποίοι χρησιμοποιούνται για ξενομεταμόσχευση μπορούν να εξαλειφθούν με την ανατροφή ζώων specified pathogen free (spf) ή designated pathogen-free (dpf). ο όρος Specific-pathogen-free (SPF) χαρακτηρίζει τα ζώα εργαστηρίου τα οποία είναι απαλλαγμένα από συγκεκριμένους μικροοργανισμούς. (Sellon RK, et al. 1998) ενώ ο όρος designated pathogen-free (dpf) χαρακτηρίζει τα ζώα τα οποία χαρακτηρίζονται ως απαλλαγμένα γενικά από παθογόνους μικροοργανισμούς. (Sellon RK, et al. 1998)

Ωστόσο σήμερα τα είδη των μικροοργανισμών τα οποία ενοχοποιούνται και ελέγχονται είναι ο ιός της ηπατίτιδας E (Hepatitis E virus - HEV), ο μεγαλοϊός του χοίρου (Porcine Cytomegalovirus - PCMV), ο κυκλοϊός του χοίρου (Porcine Circoviruses - PCV), ο χοίρειος λεμφοτρόπος ερπητοϊός (Porcine Lymphotropic Herpes Viruses - PLHV), και ο ενδογενής ρετροϊός του χοίρου (Porcine Endogenous Retroviruses - PERV).

5.1 Ο ΙΟΣ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Ε - HEV

Ο ιός της ηπατίτιδας Ε (Hepatitis E virus – HEV) στις περισσότερες περιπτώσεις προκαλεί αυτοπεριορισμένη ηπατίτιδα στους ανθρώπους. Ενώ οι γενότυποι gt1 και gt2 βρίσκονται στους ανθρώπους και μεταδίδονται μέσω του μολυσμένου νερού προκαλώντας αυξημένη θνησιμότητα κατά την κυοφορία, ο gt3 και gt4 είναι γενότυποι οι οποίοι βρίσκονται στους χοίρους αλλά δεν προκαλούν κάποια ασθένεια στους χοίρους ωστόσο μπορούν να μολύνουν τους ανθρώπους και να προκαλέσουν κάποιο είδος ζωνόσου. (X.J. Meng, 2010) Γεγονός που υποδεικνύει ότι μόνο τα στελέχη gt3/4 θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν ως κίνδυνοι κατά την ξενομεταμόσχευση και όχι τα gt1/2.



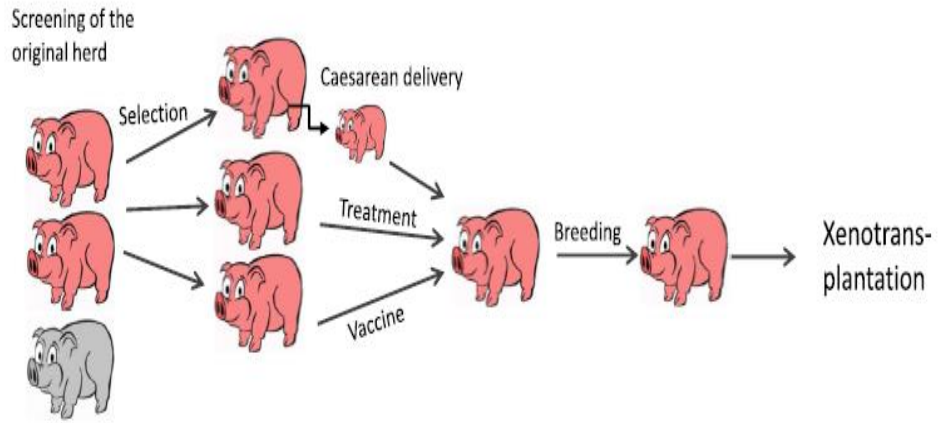
Εικόνα 21. Ο ιός της Ηπατίτιδας Ε

Πηγή : Centers for Disease Control and Prevention

Συνήθως οι HEV gt3/4 μεταδίδονται από μολυσμένο κρέας ή από άμεση επαφή με το ζώο. Ωστόσο οι επιστήμονες με την χρήση ευαίσθητων μεθόδων που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης PCR μπόρεσαν να προσδιορίσουν τον γενότυπο του ιού ωστόσο η

εύρεση του HEV και η εξάλειψή του από τον χοίρο δεν είναι εύκολη διότι ο ιός είναι ετερόζυγος δηλαδή περιέχει 10 υποτύπους εκ των οποίων μόνο οι 3 υπάρχουν στο χοίρο κάτι που κάνει δύσκολη την δημιουργία real-time PCR και επίσης το ιικό φορτίο είναι πολύ μικρό κάτι που κάνει δύσκολη την ανίχνευσή του από την PCR, αν και οι HEV gt3/4 είναι ευρέως καταναμημένοι στους χοίρους ωστόσο σε διαγονιδιακούς χοίρους που προορίζονται για ξενομεταμόσχευση δεν είναι καλά μελετημένοι. Σε αντίθεση, μη διαγονιδιακοί χοίροι της φυλής Auckland island έχουν μελετηθεί λεπτομερώς όσον αναφορά τον ιό καθώς έχουν πραγματοποιηθεί κλινικές δοκιμές με επιτυχία. (S. Wynyard, et al., 2014) Αν και ο HEV βρίσκεται πιο συχνά σε χοίρους της φυλής New Zealand, οι χοίροι της φυλής Auckland island έχουν συγκριτικά μειωμένη ποσότητα του ιού (O. Garkavenko, et al., 2004) Μια άλλη καλά μελετημένη φυλή είναι η φυλή Göttingen.

Τα ζώα αυτά όπως έχει αναφερθεί έχουν χρησιμοποιηθεί κατά κόρων για βιοιατρικές δοκιμές παρόλα αυτά σε πειράματα ζώων τα οποία είχαν γεννηθεί με καισαρική τομή, ανιχνεύθηκε σε όλα ο ιός HEV (S.A. Busby, et al. 2013) Σε άλλη έρευνα με την χρήση real-time PCR μπόρεσαν να ανιχνευθούν αντισώματα έναντι του HEV. (V.A. Morozov, et al., 20015) Με αποτέλεσμα να καταδεικνύεται η μετάδοση του ιού μέσω του πλακούντα. Η παρατήρηση αυτή εξήγησε τον λόγο που ακόμα και σε ζώα τα οποία είχαν γεννηθεί με καισαρική τομή είχαν τον ιό. Για την εξάλειψη του ιού από τα ζώα μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια επιλεκτική διαδικασία ζώων όπως φαίνεται στην εικόνα 22. (J. Denner, 2015) Η εφαρμογή της επιλεκτικής αυτής διαδικασίας περιλαμβάνει την χρήση real-time PCR για την ανίχνευση του ιού, αν και με την χρήση της τεχνικής αυτής δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι για τον αν τα ζώα έχουν 100% HEV και για τον λόγο αυτό ενδείκνυται η χρήση ribavirin που εμποδίζει την σύνθεση του ιικού RNA. (Y. Kim, et al., 2013) Μια άλλη μέθοδος περιλαμβάνει εμβολιασμό και συγκεκριμένα χρήση εμβολίου με ανασυνδιασμένο θραύσμα ORF-2 για τον HEV gt1 (T. Wu, et al., 2012) και για τον HEV gt3 (B.J. Sanford, et al., 2012)

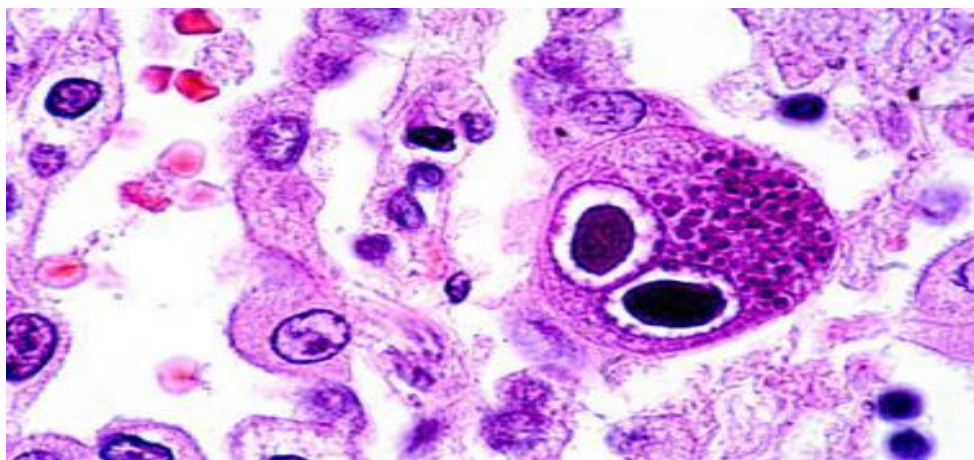


Εικόνα 22. Σχηματική απεικόνιση του προγράμματος εξάλειψης του ιού HEV

Πηγή : J. Denner, 2015

5.2 Ο ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΓΑΛΟΪΟΣ ΤΟΥ ΧΟΪΡΟΥ ΚΑΙ ΑΛΛΟΙ ΕΡΠΗΤΟΪΟΙ

Όπως ο ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός (Human Cytomegalovirus - HCMV) προκαλεί οξείες απορρίψεις στα μοσχεύματα, (J.A. Fishman, 2013) (P. Ramanan, et al., 2013) έτσι και ο κυτταρομεγαλοϊός του χοίρου (Porcine cytomegalovirus - PCMV) είναι ένας ιός που χρήζει άμεσης προσοχής στην ξενομεταμόσχευση. Ο PCMV είναι ένας ενδημικός ιός των χοίρων και μπορεί να προκαλέσει σοβαρή λοίμωξη (N. Edington, et al., 1999) Ωστόσο μπορεί να παραμείνει ανενεργός στα ζώα αλλά αν περάσει στον άνθρωπο μπορεί να ενεργοποιηθεί και να προκαλέσει σοβαρή βλάβη. (J.A. Fishman, 2013)

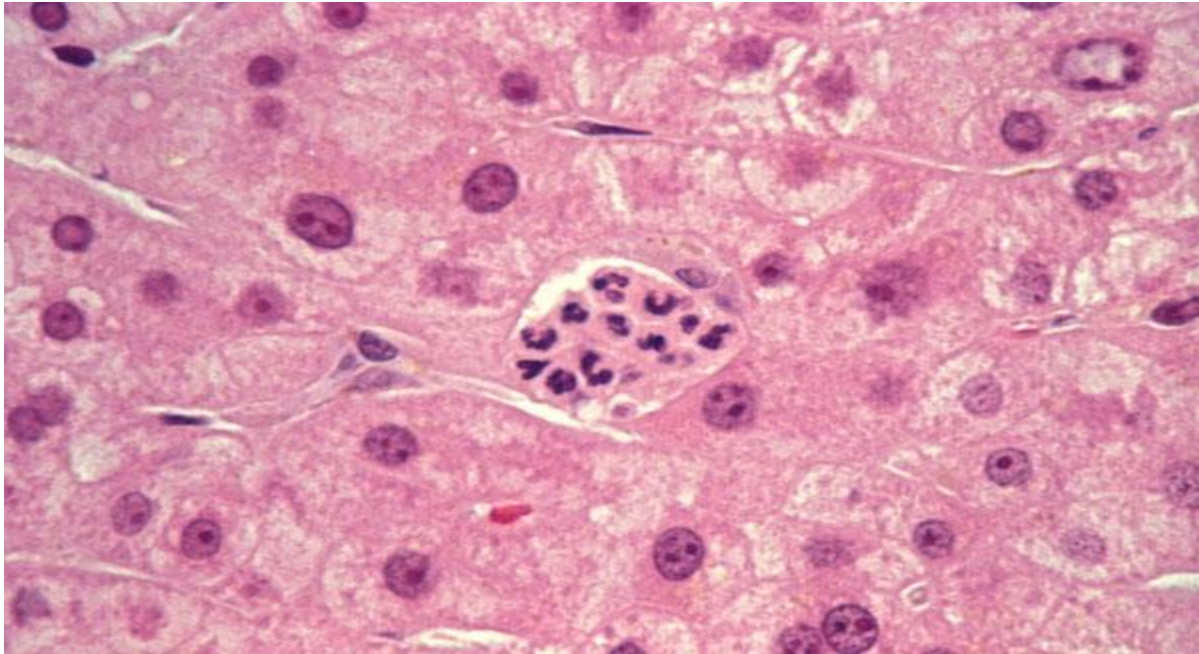


Εικόνα 23. Μολυσμένα κύτταρα με CMV

Πηγή : Kauser Akhter, MD 2018 Cytomegalovirus (CMV)

Ωστόσο τα κύτταρα του χοίρου μπορούν να μολυνθούν από τον HCMV γεγονός που δείχνει ότι μετά την ξενομεταμόσχευση τα κύτταρα του χοίρου μπορεί να μολυνθούν αν ο άνθρωπος είναι HCMV+ καθώς και τα κύτταρα του ανθρώπου μπορούν να μολυνθούν από τον PCMV (J.L. Whitteker, et al., 2008) Η είσοδος του HCMV στα ενδοθηλιακά κύτταρα του χοίρου εξαρτάται από την κυτταρική προέλευση του ιού καθώς και από το ιϊκό στέλεχος. (A. Taveira, et al., 2014) Για παράδειγμα, όταν ο PCMV μεταδόθηκε μέσω μοσχεύματος χοίρου σε μπαμπουίνου, ο CMV του μπαμπουίνου ενεργοποιήθηκε προκαλώντας πήξη του αίματος και ο PCMV

πολλαπλασιάζονταν στο μόσχευμα προκαλώντας νέκρωση του μοσχεύματος (M.G. Michaels, et al. 2001) (N.J. Mueller, et al., 2002) Όταν ο μπαμπούνος δέχτηκε μόσχευμα νεφρών από μολυσμένο με PCMV χοίρο, το μόσχευμα άντεξε για 14 ημέρες σε σχέση με όργανα από μη μολυσμένα ζώα του άντεχαν για 48-53 ημέρες. (K. Yamada, et al., 2014)



Εικόνα 24. Υπατοκύτταρα μολυσμένα με CMV

Πηγή : Abul Ala Syed Rifat Mannan, (2017), Liver and intrahepatic bile ducts – nontumor Viral hepatitis Cytomegalovirus hepatitis (CMV)

Όταν τα CD55 κύτταρα, τα οποία συμβάλλουν στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος, από διαγονιδιακό χοίρο της φυλής Large White αναλύθηκαν, βρέθηκε ότι όλα τα ζώα ήταν PCMV⁺ αλλά κάτω από spf ή dpf συνθήκες τα ζώα ήταν PCMV⁻ γεγονός που δείχνει ότι είναι δυνατή η επιλογή PCMV⁻ ζώων κάτω από spf ή dpf συνθήκες. (N.J. Mueller, et al., 2004)

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η παρουσία του PCMV στους χοίρους μπορεί να εξαλειφθεί κάτω από συνθήκες dpf ή spf. (K. Yamada, M. Tasaki, et al., 2014) (N.J. Mueller, et al., 2004)

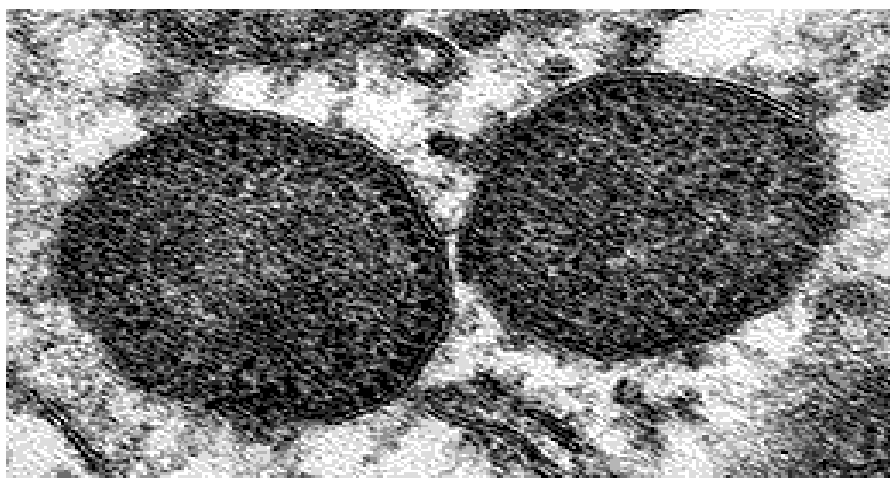
Ωστόσο για την πλήρη ασφάλεια των μοσχευμάτων θα πρέπει να χορηγούνται αντιϊκά φάρμακα όπως Ganciclovir, Cidofovir, Foscarnet, Acyclovir, Valaciclovir, ή Valganciclovir (J. Denner 2017)

Ο χοίρειος λεμφοτρόπος ερπητοϊός (Porcine lymphotropic herpesvirus - PLHV) 1, 2, και 3 είναι πολύ συχνός ιός που εμφανίζεται στους χοίρους, ωστόσο η σημασία και ο ρόλος του στην ξενομεταμόσχευση δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. (K. Doucette, et al., 2007) Φυλογενετικές αναλύσεις του ιού δείχνουν ότι και οι 3 υποτύποι του ιού είναι σχεδόν ίδιοι ωστόσο ο PLHV-3 διαφέρει σε σύγκριση με τον PLHV-1 και PLHV-2 (B. Chmielewicz, et al., 2003) ενώ ο τρόπος μετάδοσης του ιού δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως (A.W. Tucker, et al., 2003).

5.3 ΚΥΚΛΟΪΟΙ-CV

Οι κυκλοϊοί (circoviruses - CV) είναι μικροί ιοί οι οποίοι αντιγράφονται αυτόνομα στα κύτταρα των θηλαστικών (A. Mankertz, et al., 2004).

Περιέχουν μονόκλωνο κυκλικό DNA και είναι οι μικρότεροι σε μέγεθος παθογόνοι DNA ιοί με διάμετρο περίπου 17nm και γονιδίωμα περίπου 1.0800 με 2.000bp (bp = ζεύγη βάσεων) . Οι ιοί αυτοί περιέχονται σε χοίρους αλλά και σε άλλα ζώα όπως κοτόπουλα προκαλώντας ιική αναιμία των πουλερικών (chicken anemia virus, ChAV) καθώς και σε περιστέρια. (Marlier, D. et al., 2006) (Chae, C 2012) Ο ιός στοχεύει τον λεμφικό ιστό και προκαλεί ανοσοκαταστολή του ξενιστή.



Εικόνα 25. Μολυσμένα κύτταρα χοίρου με CV

Πηγή : Joacuin Segales (2008) Etiology: porcine circovirus type 2 (PCV2) where is "agent X"?

Ο χοίρειος Circoviruse 1 (PCV1) δεν έχει συνδεθεί με κάποια ασθένεια ακόμα, ωστόσο ο PCV2 συνδέεται με ένα σύνδρομο απίσχνασης των χοίρων μετά τον απογαλακτισμό (Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome - PMWS), μια πολυπαραγοντική ασθένεια των χοίρων (P.D. Burbelo, et al., 2013) Αυτό σημαίνει ότι η εμφάνιση της ασθένειας εκτός από την ύπαρξη του ιού, συνδέεται και με άλλους παράγοντες όπως το ανοσοποιητικό σύστημα καθώς και τη γενετική προδιάθεση (P.D. Burbelo, et al., 2013)

Τα κλινικά συμπτώματα του PMWS είναι το αδυνάτισμα των ζώων, αναπνευστικές δυσκολίες, οίδημα των λεμφαδένων, διάρροια και κατάρπωση του ανοσοποιητικού συστήματος

ωστόσο οι άνθρωποι μπορεί να προσλάβουν τον ιό από μολυσμένα τρόφιμα που προέρχονται από ζώα.



Εικόνα 26. Σύγκριση υγιούς ζώου (επάνω) με ζώο που νοσεί (κάτω) από PMWS.

Πηγή : Lorenzo Fraile, PCV2 vaccines: Efficacy and clinical application, (2013)



Εικόνα 27. Νεκρό χοιρίδιο από PMWS

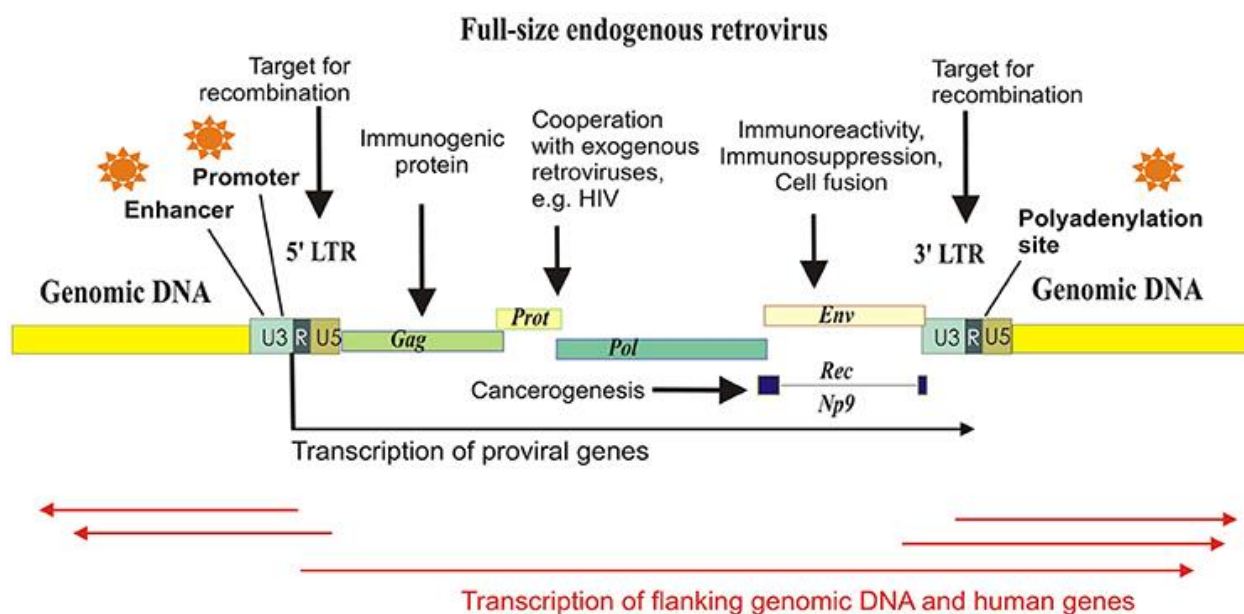
Πηγή : ThePigSite.com

Ορολογικές έρευνες δείχνουν ότι ο ιός δεν πολλαπλασιάζεται στον ανθρώπινο οργανισμό. (J. Segales, et al., 2005) Επίσης σε άλλες έρευνες με την χρήση κυτταρικών γραμμών ανθρώπου μολυσμένα με τον ιό δεν έδειξαν καμία αλλαγή (π.χ. κυτταροφαγία). (K. Hattermann, et al., 2004)

5.4 Ο ΧΟΙΡΕΙΟΣ ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ ΡΕΤΡΟΪΟΣ - PERV

Πολλές έρευνες αναφέρουν ότι ο χοίρειος ενδογενής ρετροϊός (Αγγλ. Porcine Endogenous Retrovirus – PERV) στο γονιδίωμα του χοίρου μπορεί να είναι ένας παράγοντας κινδύνου κατά την ξενομεταμόσχευση.

Οι PERV αποτελούνται από λειτουργικά γονίδια και αμετάφραστες περιοχές (untranslated region - UTR). Συγκεκριμένα, μερικοί PERVs αποτελούνται από τα λειτουργικά γονίδια gag, pol, και env και από επαναλήψεις αυτών στην αρχή και στο τέλος κάθε γονιδίου (Blusch, J.H., et al., 2002).



Εικόνα 28. Το γονιδίωμα του PERV

Πηγή : Anton A. Buzdin, Vladimir Prassolov and Andrew V. Garazha (2017). Friends-Enemies: Endogenous Retroviruses Are Major Transcriptional Regulators of Human DNA

Οι PERV έχει αναφερθεί ότι απελευθερώνουν ιικά σωματίδια από τις κυτταρικές γραμμές των νεφρών και αυτά κατά την ξενομεταμόσχευση μπορεί να μολύνουν τα ανθρώπινα κύτταρα (εμβρυικά κύτταρα νεφρού). (Czuderna, F., et al., 2000) (Le Tissier, et al., 1997). Martin, U., et al., 1998) (Patience, C., et al., 1997) Τα ιικά αυτά σωματίδια επίσης περιέχουν υπολείμματα γαλακτοσουλ-α-1,3-γαλακτόζη κάτι που όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω μπορεί να προκαλέσει ανοσολογική απόρριψη. (Phelps, C.J., et al., 2003) (Platt, J.L. 2000). Οι PERV έχουν ταξινομηθεί

ως β-ρετροϊοί και γ-ρετροϊοί. Οι γ-ρετροϊοί αποτελούνται από 10 υποομάδες. (Klymiuk, N., et al., 2002) (Patience, C., et al., 2001) Μεταξύ των 10 αυτών υποομάδων μόνο η γ-1 οικογένεια είναι ικανή να αντιγραφεί ως ένας ενεργός προϊός. Επομένως στα όργανα των χοίρων που προορίζονται για ξενομεταμόσχευση θα πρέπει να ελέγχονται για την ύπαρξη PERV της οικογένειας γ-1 και αν υπάρχει στο γονιδίωμα, καθώς έχει αναφερθεί ότι οι περισσότεροι PERV είναι ενσωματωμένοι στο γονιδίωμα, θα πρέπει να αφαιρεθούν με την χρήση βιοτεχνολογικών μεθόδων (Takeuchi, Y., et al., 1998)

Οι γ-1 ρετροϊοί χωρίζονται σε 3 υποοικογένειες τις PERV-A, -B και -C. Ο διαχωρισμός αυτός γίνεται με βάση της διαφορές στην αλληλουχία του γονιδίου env (Magre, S., et al., 2003) Οι PERV-A και -B είναι ικανοί να μολύνουν και τις ανθρώπινες αλλά και τις χοίριες κυτταρικές γραμμές ενώ ο PERV-C δεν μπορεί να αντιγραφεί στα ανθρώπινα κύτταρα ωστόσο μπορεί να μολύνει τα χοίρια. (Huh, J.W., et al., 2009) (Takeuchi, Y., et al., 1998)

Όταν βρέθηκε ότι οι PERV μπορούν να μολύνουν ανθρώπινες κυτταρικές γραμμές, πολλές στρατηγικές αναπτύχθηκαν για τον έλεγχο της ενεργότητας του ιού. Αυτές περιλάμβαναν την εξάλειψη των προϊικών περιοχών που περιλάμβαναν αντιγραφικούς παράγοντες του PERV από το χοίρειο γονιδίωμα (Clark, K.J., et al., 2007) την επιλογή χοίρων που παρήγαγαν χαμηλά ποσοστά του ιού (Karlas, A., et al., 2004) (Oldmixon, B.A., et al., 2002) και την ανάπτυξη αντικού εμβολίου και αντικής θεραπείας. (Dieckhoff, B., et al., 2008) (Karlas, A., et al., 2004)

Οι U3, R, και U5 LTR περιοχές δείχνουν να παίζουν σημαντικό ρόλο στην μεταγραφική διαδικασία του ιού. (Maksakova, I.A., et al., 2005) Συγκεκριμένα η U3 περιοχή παίζει τον ρόλο του εκκινητή της μεταγραφής του PERV. (Huh, J.W., et al., 2009) (Krach, U., et al., 2001) (Wilson, C.A., et al., 2003) Επομένως εφόσον η έκφραση του PERV ρυθμίζεται από τις LTRs περιοχές, η επιγενετική τροποποίηση τους μπορεί να είναι μια μέθοδος ρύθμισης της μεταγραφικής διαδικασίας. (Ooi, L., et al., 2008)

Πίνακας 9. Στρατηγικές για την αύξηση της μικροβιακής ασφάλειας

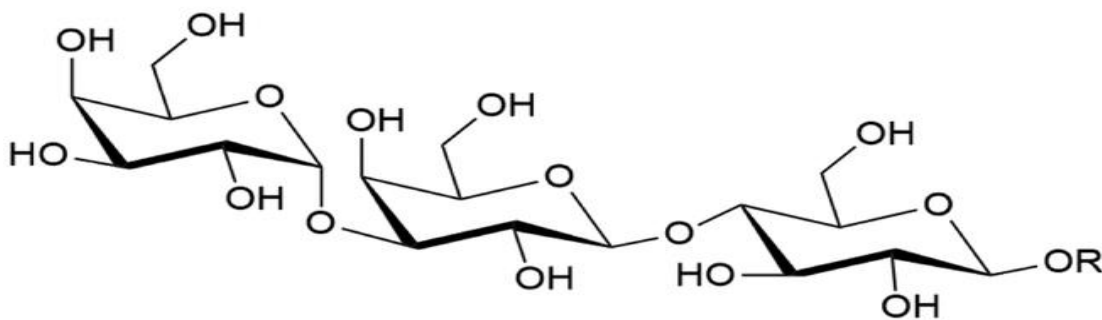
Μέθοδος	Αποτέλεσμα	Πηγή
Παραγωγή ζώων που είναι ελεύθερα από συγκεκριμένους παθογόνους μικροοργανισμούς	Τα ζώα που παράγονται είναι απελευθερωμένα από αυτούς τους μικροοργανισμούς	(Schuurman H.J., 2009) (Denner J, et al., 2009) (Hering BJ, et al., 2009)
Επιλογή χοίρων με μικρή έκφραση του PERV-A και του PERV-B καθώς και απουσία του PERVC από το γονιδίωμα	Προτρέπει τον ανασχηματισμό του PERV-A/C, εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα και πιθανότητα να μην απελευθερώνονται καν σωματίδια του ιού	(Kaulitz D, et al., 2011) (Kaulitz D, et al., 2013)
Παρέμβαση στο RNA του PERV	Χαμηλά επίπεδα έκφρασης και πιθανότητα να μην απελευθερώνονται καν σωματίδια του ιού	(Karlas A, et al., 2004) (Dieckhoff B, et al., 2008) (Ramsoondar J, et al., 2009) (Semaan M, et al., 2012)
Zinc finger nucleases (ZFN)	Μπορεί να αφαιρέσει τον PERV απο το γονιδίωμα	(Semaan M, et al., 2013)
Εμβολιασμοί	Εμποδίζει την μετάδοση του PERV	(Fiebig U, et al., 2003) (Kaulitz D, et al., 2011) (Waechter A, et al., 2014) (Waechter A, et al., 2013) (Denner J, et al., 2012)
Αντι-ρετροϊκά φάρμακα	Απαλλαγή του ζώου από την νόσο	(Stephan O, et al., 2001) (Powell SK, et al., 2000)

6. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΚΑΙ ΞΕΝΟΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ

Το αυξημένο προσδόκιμο ζωής των ανθρώπων έχει οδηγήσει στην αύξηση του αριθμού των ασθενών που πάσχουν από χρόνιες ασθένειες ή εμφανίζουν ανεπάρκεια οργάνων, επιπροσθέτως, η δυσλειτουργία οργάνων μπορεί να εμφανιστεί σε νεογέννητα και κατά την διάρκεια της βρεφικής ηλικίας. Η ανάγκη επομένως για μεταμόσχευση οργάνων όπως καρδιά, νεφρά, ήπαρ και λοιπά έχει ήδη ξεπεράσει κατά πολύ τον αριθμό των διαθέσιμων δοτών (βλέπε κεφ. 2) και η ανάπτυξη της ξενομεταμόσχευσης θα μπορούσε να αποτελέσει λύση του προβλήματος αυτού.

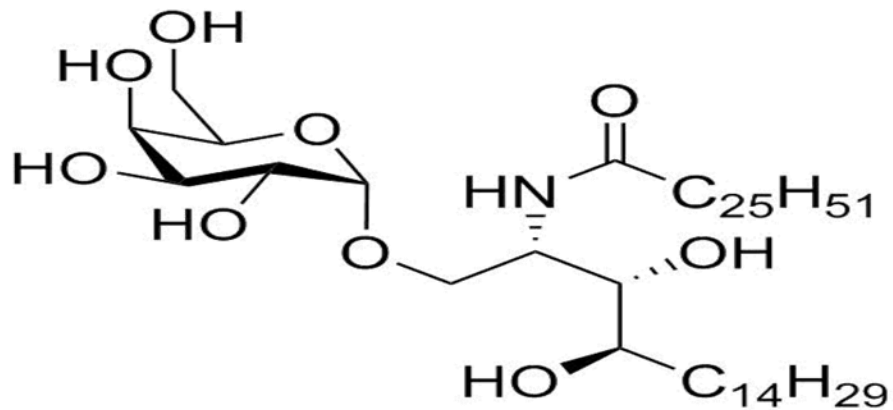
Ωστόσο, το πιο σημαντικό εμπόδιο στην ξενομεταμόσχευση είναι η ανοσολογική απόρριψη του μοσχεύματος (Yang YG, et al., 2007) (Le Bas-Bernardet S, et al., 2008) (d'Apice AJ, et al., 2009) και συγκεκριμένα η χυμική απόρριψη, η οποία εμφανίζεται σε δυο μορφές. Η πρώτη είναι η οξεία απόρριψη (Hyperacute rejection - HAR), η οποία πραγματοποιείται πολύ γρήγορα, μέσα σε λεπτά ή ώρες μετά την ξενομεταμόσχευση και η δεύτερη μορφή είναι η χρόνια απόρριψη η οποία εμφανίζεται εβδομάδες, μήνες ή και χρόνια μετά τη ξενομεταμόσχευση.

Ωστόσο και οι 2 αυτοί τύποι απόρριξης εμφανίζουν συγκεκριμένα κοινά χαρακτηριστικά, και οι δύο είναι αποτέλεσμα της πρόσδεσης των φυσικών ξενοαντιγόνων (Xenoantibodies - XNAs) στο επίτοπο Gal α -1,3-Gal β -1,4-GlcNAC-R (aGal), που υπάρχει στο ενδοθήλιο του δότη. (Yang H, et al., 2007)



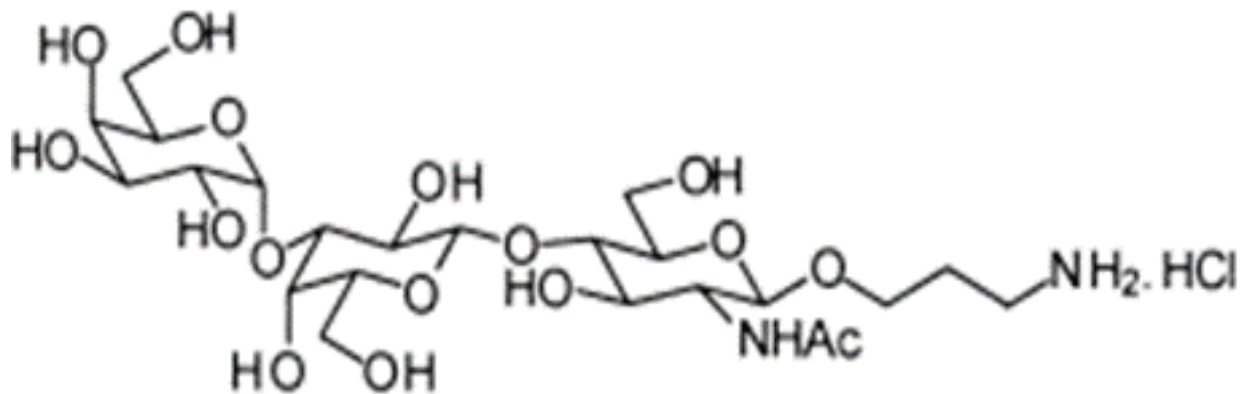
Εικόνα 29. Η α -1,3galactosyltransferase

Πηγή : Kensaku Anraku, et al (2017).



Εικόνα 30. α -galactosyl

Πηγή : Carreño, L. J., et al., (2016)

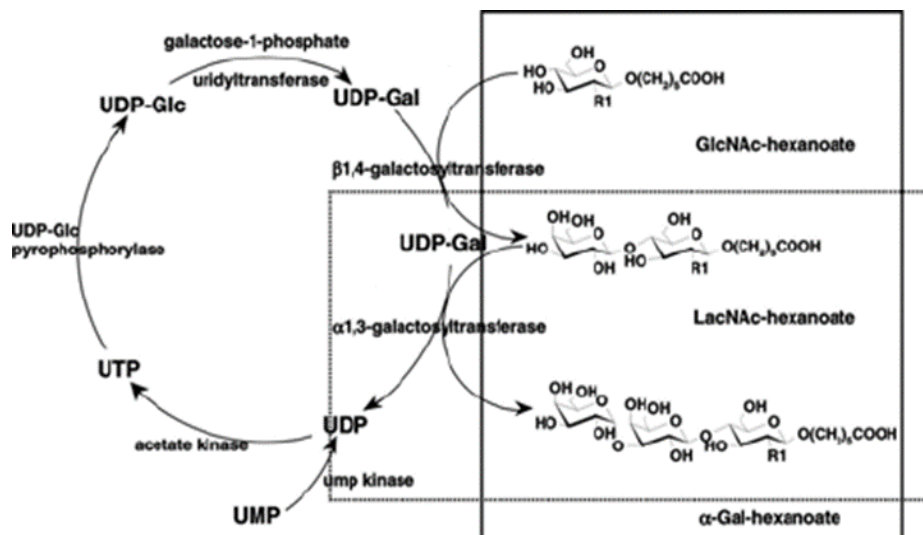


Εικόνα 31. $\text{Gal}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAcOR}$

Πηγή : Stephen Hanessian, et al (2001)

Πιο συγκεκριμένα η $\alpha(1 \rightarrow 3)$ Galactosyltransferase είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό του επίτοπου α -galactosyl το οποίο δίνει α -Gal(1 \rightarrow 3)- β -Gal-OR. Η αλληλεπίδραση του επίτοπου α -Gal (αντιγόνο Galili) στην επιφάνεια των κυττάρων του ζώου (ενδοθυλιακά κύτταρα χοίρου) με τα anti-galactosyl αντισώματα του ανθρώπου έχει ως αποτέλεσμα την οξεία απόρριψη του μοσχεύματος. (Schanbacher, F.L., et al., 1970) Και την ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση του συμπληρώματος οδηγώντας σε εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα κυτταροτοξικότητα

(Complement-Dependent Cytotoxicity-CDC), ενδοθηλιακή βλάβη, οίδημα του ιστού, αιμορραγία, εναπόθεση ινώδους και μικροαγγειακή θρόμβωση. Η aGal εκφράζεται σε όλα τα θηλαστικά εκτός των ανθρώπων και δημιουργείται από την $\alpha 1,3$ -galactosyltransferase (GalT) η οποία δεν υπάρχει στους ανθρώπους.



Εικόνα 32. Ο κύκλος σχηματισμού της aGal

Πηγή : KS Jang, et al., (2008)

Τα επίτοπα παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του ανοσοβιολογικού συστήματος και είναι περιοχές που υπάρχουν σε οτιδήποτε μπορεί να δράσει ως αντιγόνο και αναγνωρίζονται από τα αντισώματα, τα Τ κύτταρα και Β κύτταρα με στόχο την ενεργοποίηση του ανοσοβιολογικού συστήματος για την 'θανάτωση' του αντιγόνου δηλαδή μια διαδικασία που ονομάζεται φαγοκυττάρωση.

6.1 ΚΥΡΙΟΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΖΩΩΝ

Διαγονιδιακά ζώα ορίζονται τα ζώα στα οποία έχει γίνει εσκεμμένη μετατροπή του γονιδιώματος με την εισαγωγή ξένου DNA στα ζώα χρησιμοποιώντας τεχνολογίες ανασυνδιασμένου DNA, με αποτέλεσμα τα ζώα να φέρνουν δυο διαφορετικά DNA. (Javier Guillen 2012)

Οι διαγονιδιακοί χοίροι είναι ζώα πολλά υποσχόμενα για δότες οργάνων για ξενομεταμόσχευση λόγω του ότι οι χοίροι με τους ανθρώπους μοιράζονται πολλά ανατομικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά (βλέπε κεφ. 3). Το πιο ουσιαστικό εμπόδιο όμως της ξενομεταμόσχευσης μεταξύ χοίρου και ανθρώπου είναι η απόρριψη του μοσχεύματος από την διαδοχική δράση του ανοσοποιητικού μηχανισμού προκαλώντας υπεροξεία απόρριψη (Hyperacute Rejection – HR ή HAR) οξεία αγγειακή απόρριψη (Acute Vascular Rejection - AVR), κυτταρική απόρριψη (Cellular Rejection - CeR), χρόνια απόρριψη (Chronic Rejection - ChR) (βλέπε κεφ. 4)

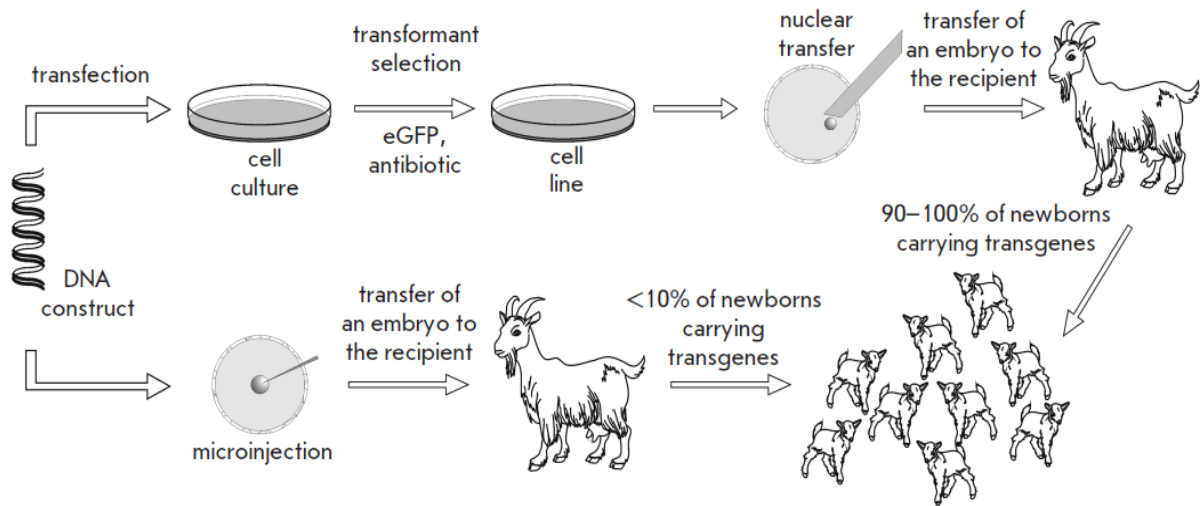
Η ανάπτυξη τεχνικών για την γενετική τροποποίηση των χοίρων μπορεί να διευκολύνει την προσαρμογή τους στο να γίνουν δότες μοσχευμάτων. Οι γενετικώς τροποποιημένοι χοίροι οι οποίοι στερούνται την παραγωγή του επίτοπου alpha-1,3-Gal, το οποίο είναι το μείζον αντιγόνο που ενεργοποιεί την οξεία απόρριψη στην διαδικασία της ξενομεταμόσχευσης, είναι η βάση για μεταγενέστερη γενετική τροποποίηση η οποία θα μπορεί να απενεργοποιήσει άλλους μηχανισμούς απόρριψης καθώς και διάφορες ασυμβατότητες μεταξύ του μηχανισμού πήξης του αίματος του χοίρου και των πρωτευνόντων, όπως την έκφραση των ανθρώπινων ρυθμιστικών πρωτεϊνών , των μεμβρανικών πρωτεϊνών CD39, του ενδοθηλιακού υποδοχέα της πρωτεΐνης C (EPCR) ,της οξυγενάσης της αίμης 1, της θρομβομοντουλίνης, του TFPI-2 (human Tissue Factor Pathway Inhibitor-2), καθώς και ρυθμιστές του συστήματος της κυτταρικής ανοσίας όπως ο ανθρώπινος παράγοντας νέκρωσης όγκων TNF-α, Beta 2μικρογλοβουλίνη και CTLA-4Ig. Επιπλέον διάφορες τεχνικές γενετικής τροποποίησης έχουν αναπτυχθεί για τον έλεγχο και ελαχιστοποίηση της μόλυνσης από ενδογενείς ρετροϊούς των χοίρων.

Η σύγχρονη μέθοδος, για την απόκτηση ζώων που περιέχουν ανασυνδιασμένα γονίδια και παράγουν ανασυνδιασμένες πρωτεΐνες (Recombinant Proteins - RP) και τις περνούν στους απογόνους τους, περιλαμβάνει την μικροέγχυση (MI) DNA απευθείας στον προπυρήνα γονιμοποιημένου ωαρίου και την πυρηνική μεταφορά σωματικών κυττάρων (Somatic Cell Nuclear Transfer SCNT). Η πιο γνωστή ωστόσο μέθοδος σήμερα είναι η MI DNA σε αρσενικό

προπυρήνα. (Kues W.A., et al., 2011) Κατά την είσοδο του γραμμικού DNA στον πυρήνα, το DNA είναι ικανό να ενσωματωθεί στο γονιδίωμα των κυτταρικών γραμμών. (Goldman I.L., et al., 2004) Το DNA συνήθως ενσωματώνεται σε γονιδίωμα όπου δεν μπορεί να γίνει μεταγραφή και σε ετεροχρωματίνη. Η τεχνική αυτή αρχικά εφαρμόστηκε σε ποντίκια και έπειτα σε παραγωγικά ζώα. Ωστόσο πλέον η τεχνική MI είναι η κύρια τεχνική για την παραγωγή TAs ζώων όπως ποντίκια, κουνέλια και χοίρους.

Το 1997, έγινε κλωνοποίηση ενός προβάτου με πυρηνική μεταφορά (Nuclear Transfer - NT) σωματικών κυττάρων μαστικού αδένος σε ωοκύτταρο. (Wilmut I., et al., 1997) Το επίτευγμα αυτό άνοιξε τον δρόμο για την πιθανή ανάπτυξη τεχνικών για την παραγωγή διαγονιδιακών ζώων, με επιμόλυνση σωματικών κυττάρων και επιλογή κλώνων που ενσωματώνονται στο γονιδίωμα. Στην συνέχεια, ο πυρήνας του σωματικού κυττάρου εισάγεται στο ωοκύτταρο όπου αυτό μετά εισάγεται σε θετές μητέρες. Με την τεχνική αυτή πλέον παράγονται τα περισσότερα παραγωγικά ζώα. (Kues W.A., et al., 2011) Ωστόσο τα επιμολυσμένα κύτταρα επιλέγονται με γονίδια δείκτες τα οποία έχουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά και επίσης σημαίνονται με φθορίζουσες πρωτεΐνες όπως η Green Fluorescent Protein (eGFP) που λειτουργεί ως ένας επιπρόσθετος παράγοντας επιλογής. (Yang P., et al., 2008)

Οι δυσμενείς επιδράσεις της NT τεχνικής περιλαμβάνουν και την χαμηλή επιβίωση των ζώων *in utero* καθώς και την μη καλή υγεία των νεογέννητων ζώων (Kues W.A., et al., 2011) Γεγονός που αποδίδεται στην μειωμένη έκφραση αρκετών γονιδίων απαραίτητων για την σωστή εξέλιξη της εμβρυογένεσης.



Εικόνα 33. Τρόποι παραγωγής διαγονιδιακών ζώων. Πυρηνική μεταφορά (επάνω), μικροέγχυση (κάτω)

Μια άλλη μέθοδος για την λήψη ΤΑs ζώων είναι η χρήση φορέων βασισμένα σε κινητά γενετικά στοιχεία τα οποία ενσωματώνονται στο γονιδίωμα με την βοήθεια τρανσποζάσης, (Kues W.A., et al., 2011) δηλαδή ενός ενζύμου που προσδένεται σε επαναληπτικές αλληλουχίες που βρίσκονται εκατέρωθεν του μεταφερόμενου γονιδίου και καταλύει την εκτομή του τρανσποζονίου και την επακόλουθη ενσωμάτωση του στο γονιδίωμα του κυττάρου. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την τρανσποζάση και το διαγονίδιο που υπόκειται στην δράση του τρανσποζονίου συγχωνεύονται στο ζυγωτό. Η αντίδραση αυτή που καταλύεται από την τρανσποζάση έχει ως αποτέλεσμα την ενσωμάτωση ενός αντίγραφου του διαγονιδίου στο γονιδίωμα του ζώου. Η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή παραγωγικών ζώων (χοίροι). (Garrels W., et al., 2011) Το ποσοστό αποτελεσματικότητας της μεθόδου αυτής ανέρχεται στο 50% καθώς σημαντικό ρόλο παίζει ο τύπος του τρανσποζονίου, το μήκος του διαγονιδίου και η συγκέντρωση του DNA στο σημείο της μικροέγχυσης. (Garrels W., et al., 2011)

6.2 ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ CRISPER

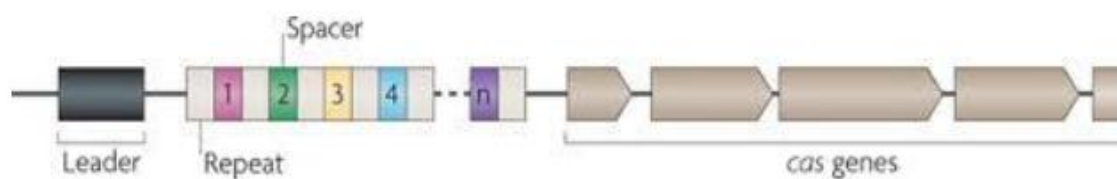
Η λέξη CRISPR προκύπτει από τα αρχικά των λέξεων Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats. Πρόκειται για ένα σύστημα που παρουσιάζεται τόσο σε προκαρυωτικούς οργανισμούς όσο και σε Αρχαία και αποτελεί έναν τρόπο άμυνας των οργανισμών αυτών ενάντια στην εισβολή ξένου νουκλεϊκού οξέος το οποίο προέρχεται από κατώτερες δομικά και λειτουργικά μονάδες, δηλαδή κατά κύριο λόγο από βακτηριοφάγους και πλασμίδια. (Barrangou R., 2015) Αποτελεί δηλαδή κατά κάποιο τρόπο το σύστημα «προσαρμοστικής ειδικής ανοσίας των προκαρυωτικών οργανισμών». Για να ενεργοποιηθεί το σύστημα αυτό θα πρέπει να έχει προηγηθεί μια πρώτη μόλυνση από το ίδιο νουκλεϊκό οξύ.

Το CRISPR αποτελεί επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, που είναι είτε συνεχόμενες, είτε διαχωρίζονται από ενδιάμεσες περιοχές DNA. Ο γενετικός τύπος του CRISPR διακρίνεται σε 3 περιοχές.

A) Την οδηγό ακολουθία (leader sequence - ls) η οποία αποτελείται από 200-350 ζεύγη βάσεων και είναι πλούσια στο δινουκλεοτίδιο AT.

B) Τις συντηρητικές επαναλήψεις (directrepeats - dr) και μη συντηρητικές επαναλήψεις (spacers - Ss) οι οποίες, συντηρητικές επαναλήψεις, αποτελούν αλληλουχίες μήκους 21-47 ζευγών βάσεων και διαχωρίζονται μεταξύ τους από μη συντηρητικές επαναλήψεις παρόμοιου μήκους.

Γ) Την οικογένεια των γονιδίων Cas (CRISPRassociated) τα οποία βρίσκονται μετά τις συντηρητικές και μη συντηρητικές επαναλήψεις. Ωστόσο ο ακριβής αριθμός των γονιδίων αυτών δεν είναι γνωστός και ποικίλει από οργανισμό σε οργανισμό.



Nature Reviews | Genetics

Εικόνα 34. Ο γενετικός τύπος του συστήματος CRISPER

Πηγή : Nature

Οι πρωτεΐνες Cas μπορούν να διακριθούν σε 2 κύριες ομάδες:

- Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τις βασικότερες Cas και συναντάται σε πολλούς τύπους συστημάτων CRISPR. Οι πρωτεΐνες Cas1 και Cas2 συναντώνται και στους 3 τύπους CRISPR. Οι Cas3, Cas9 και Cas10 είναι ειδικές η καθεμία για έναν τύπο CRISPR. Συγκεκριμένα, η Cas3 αποτελεί την πρωτεΐνη που χαρακτηρίζει το CRISPR τύπου I, η Cas9 το CRISPR τύπου II και η Cas10 το CRISPR τύπου III.
- Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τις Cas που συναντώνται σε ένα μόνο συγκεκριμένο υπότυπο CRISPR. Για παράδειγμα, οι πρωτεΐνες Cse και Csyare χαρακτηρίζουν αποκλειστικά τους υποτύπους I-E και I-F αντίστοιχα.

6.2.1 Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ CRISPR

Ο μηχανισμός δράσης του συστήματος CRISPR αποτελείται από 3 φάσεις:

- 1) Ενσωμάτωση των spacers στο γενετικό τόπο του CRISPR,
- 2) Δημιουργία του crRNA και
- 3) Σύνδεση crRNA και Cas πρωτεϊνών στο εισβάλλον νουκλεϊκό οξύ και αποικοδόμησή του

1) Ενσωμάτωση των spacers στο γενετικό τόπο του CRISPR: Οι αλληλουχίες στο ξένο γενετικό υλικό από τις οποίες προήλθαν οι μη συντηρητικές αλληλουχίες του CRISPR(spacers) ονομάζονται protospacers.

Κατά την πρώτη επαφή του οργανισμού με κάποιο εισβάλλον γενετικό υλικό, οι νέοι spacers εισάγονται κάθε φορά αμέσως μετά την οδηγό ακολουθία (leader) με τη βοήθεια μεταθετών στοιχείων. Στη φάση αυτή είναι απαραίτητη η παρουσία των πρωτεϊνών Cas1 και Cas2. Πριν γίνει αυτή η εισαγωγή η κοντινότερη συντηρητική αλληλουχία στην οδηγό διπλασιάζεται. Μαζί με το νέο spacer εισάγεται και ένα μικρό συντηρητικό τμήμα του PAM (protospacer adjacent motif), το οποίο πλέον θα αποτελεί το ένα άκρο της κοντινότερης συντηρητικής αλληλουχίας στην οδηγό. Το PAM είναι ουσιαστικά το τμήμα που επιτρέπει τη διάκριση του ξένου από το εαυτό γενετικό υλικό. Σε επόμενη επαφή του οργανισμού με ξένο γενετικό υλικό, ο spacer που είχε εισαχθεί με βάση αυτό το γενετικό υλικό ενεργοποιεί το CRISPR για να εισαγάγει πολλούς spacers στο

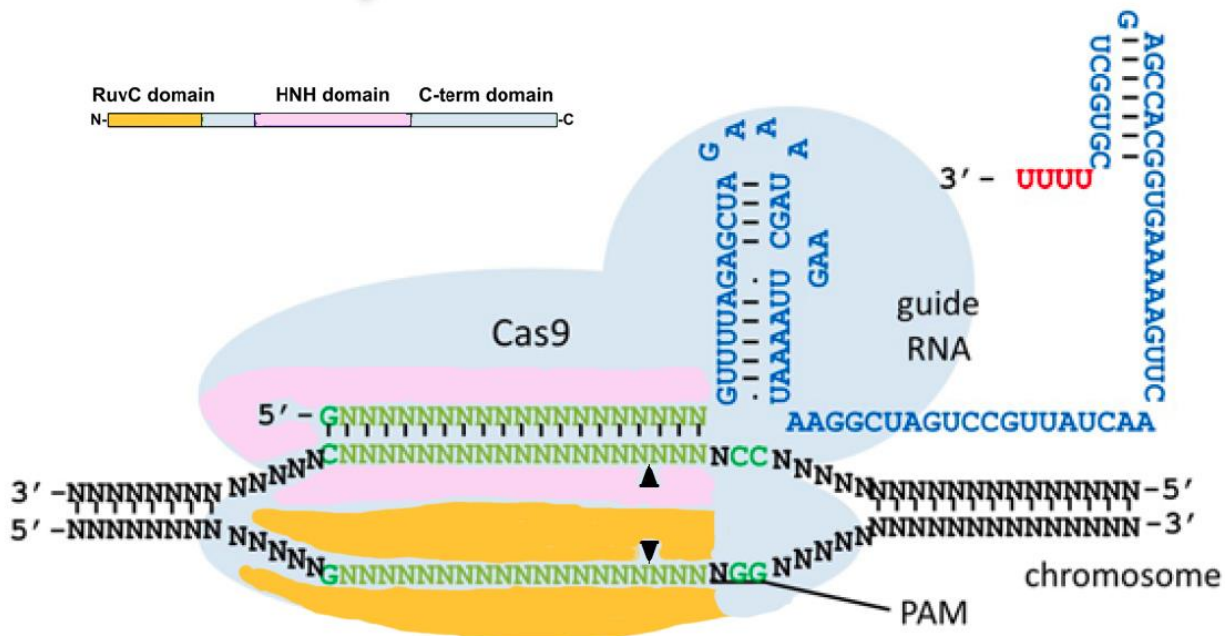
σύστημα, προερχόμενους από την ίδια αλυσίδα του ξένου γενετικού υλικού από την οποία προήλθε και ο spacer από την πρώτη επαφή. Στη φάση αυτή είναι απαραίτητη η παρουσία των Cas1, Cas2, Cascade, Cas3 (για το CRISPR τύπου I) και του crRNA που ταιριάζει με το εισβάλλον στοιχείο. Ο μεγάλος αριθμός των spacers εξασφαλίζει αποτελεσματικότερη άμυνα του οργανισμού έναντι του εισβολέα.

2) και 3) Δημιουργία του crRNA, σύνδεση crRNA και Cas πρωτεϊνών στο εισβάλλον νουκλεϊκό οξύ και αποικοδόμησή του : Στη φάση αυτή το σύστημα CRISPR μεταγράφεται σε pre-crRNA κι έπειτα ωριμάζει σε crRNA. Στη συνέχεια με τη βοήθεια διαφόρων πρωτεϊνών αντιμετωπίζει το εισβάλλον γενετικό υλικό. Εδώ παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στους 3 διαφορετικούς τύπους CRISPR.

CRISPR τύπου II: Στα συστήματα αυτού του τύπου είναι απαραίτητη η ύπαρξη ενός trans-κωδικοποιούμενου μεταγράφου για την ωρίμανση του pre-crRNA. Το μετάγραφο αυτό ονομάζεται trans-activating crRNA (tracrRNA). Το tracrRNA περιέχει μια περιοχή 25 ζευγών βάσεων που παρουσιάζει σχεδόν απόλυτη συμπληρωματικότητα με τις συντηρητικές επαναλήψεις του pre-crRNA. Οι επαναλήψεις αυτές δεν εμφανίζουν δομή φουρκέτας όπως στο CRISPR τύπου I. Εκτός από το tracrRNA, για την ωρίμανση του pre-crRNA σε crRNA απαιτείται η πρωτεΐνη Cas9 και μια RNAάση III του ξενιστή. Η Cas9 εκτός από την ωρίμανση του pre-crRNA συμμετέχει στην αναγνώριση και καταστροφή του εισβολέα μαζί με το υβριδικό μόριο crRNAtracrRNA (δημιουργεί σύμπλοκο μαζί του). Το PAM του ξένου γενετικού υλικού παίζει σημαντικό ρόλο στην τελευταία διαδικασία.

6.2.2 ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗ ΧΡΗΣΗ & ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ CAS9

Η Cas9 φαίνεται να αποτελεί εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο όχι μόνο για επιθυμητή επεξεργασία προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων, αλλά και για στοχευμένη καταστολή ή ενεργοποίηση της μεταγραφής επιθυμητών γονιδίων. Έχει βρεθεί επίσης ότι η Cas9 μπορεί να στοχεύει και να τροποποιεί RNA.



Εικόνα 35. Σχηματική απεικόνιση των περιοχών της Cas9

Πηγή : David O'brochta 2016 A DNA-Guided Gene Editing System 1:3

Για να μπορέσει βέβαια η Cas9 να επιτελέσει τη δράση της θα πρέπει να κατασκευαστούν τεχνητά τόσο το crRNA, όσο και το tracrRNA που είναι απαραίτητα για τη σωστή δομή και λειτουργία της. Στοιχεία όπως το sgRNA έχουν καταστήσει λειτουργική την Cas9 και εκτός του φυσιολογικού περιβάλλοντος δράσης της. Σε περιπτώσεις που δεν επιθυμούμε την τροποποίηση ή καταστροφή του νουκλεϊκού οξέος-στόχου, πρόκληση μεταλλαγών τόσο στην RuvC-I όσο και στην HNH (αυτοτελείς δομικές περιοχές με ενεργότητα νουκλεάσης) περιοχή της Cas9 καταστρέφουν τη δράση ενδονουκλεάσης της. Αυτή η τροποποιημένη πρωτεΐνη ονομάζεται dCas9. Η dCas9 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ελέγξει το ρυθμό μεταγραφής επιθυμητών γονιδίων παρεμποδίζοντας την πρόσδεση της RNA πολυμεράσης σε αυτά.

Μέχρι στιγμής έχει γίνει δυνατή η επεξεργασία γονιδιωμάτων σε βακτηριακά κύτταρα, ζύμες, φυτά, νηματώδεις σκώληκες, μύγες όπως η *Drosophila*, *zebrafish*, τρωκτικά και ανθρώπινα κύτταρα (τόσο εμβρυικά βλαστοκύτταρα, όσο και μετασηματισμένες κυτταρικές σειρές).

Χάρη στις ιδιότητές της η Cas9 ανήκει πλέον επάξια στην οικογένεια των νουκλεασών που επεξεργάζονται γονιδιώματα. Στην οικογένεια αυτή ανήκουν οι Zinc Finger Nucleases (ZFNs)

και οι Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs). Αυτές οι ενδονουκλεάσες επάγουν τοποειδικά σπασίματα και στις 2 αλυσίδες του DNA-στόχου, των οποίων η επιδιόρθωση γίνεται είτε με ομόλογο γενετικό ανασυνδυασμό (Homologous Repair - HR) είτε με μη ομόλογο γενετικό ανασυνδυασμό (Non-Homologous End Joining - NHEJ). Έτσι μπορούν σε σημαντικό βαθμό να επιτευχθούν στοχευμένες μεταλλαγές ή χρωμοσωμικές ανακατατάξεις.

Βέβαια, ο καθαρισμός των ZFNs και TALENs είναι πολύ πιο χρονοβόρα και επίπονη διαδικασία από τον καθαρισμό της Cas9, γεγονός που προσδίδει στην Cas9 σημαντικό πλεονέκτημα έναντι των άλλων νουκλεασών. Από την άλλη οι ZFNs και TALENs λειτουργούν σαν διμερή, γεγονός που αυξάνει την ειδικότητά τους ενώ η Cas9 σαν λειτουργεί σαν μονομερές.

6.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΓΙΑ ΕΠΙΤΥΧΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΧΟΙΡΙΩΝ ΙΣΤΩΝ

Μια από τις μεθόδους για την αποφυγή της οξείας απόρριψης στην διαδικασία της ξενομεταμόσχευσης, είναι η παραγωγή χοίρων που δεν εκφράζουν το μείζον ξενοαντιγόνο α Gal. Το μεγάλο αυτό βήμα για την πιθανή κλινική εφαρμογή της ξενομεταμόσχευσης, έχει γίνει τα τελευταία χρόνια με την παραγωγή χοίρων στους οποίους τα 2 GalT γονίδια είναι απενεργοποιημένα. Έτσι η ξενομεταμόσχευση καρδιάς και νεφρών από ομόλογους GalT knockout (GalT-KO) χοίρους σε μη ανθρώπινα πρωτεύοντα έχει πραγματοποιηθεί με χορηγία όμως ανοσοκατασταλτικής αγωγής. Παρά το γεγονός ότι τα GalT-KO όργανα δεν απορρίπτονται με οξεία μορφή, χρειάζονται ισχυρές ανοσοκατασταλτικές αγωγές σε σχέση με την κλινική μεταμόσχευση με στόχο την επιβίωση των ξενομοσχευμάτων πάνω από μερικές εβδομάδες. Σε όλες όμως τις περιπτώσεις η οξεία απόρριψη μπορεί να αποφευχθεί σε μη ανοσοκατεσταλμένα ζώα και τα όργανα να φτάσουν ακόμα και τις 179 ημέρες για την καρδιά και 83 ημέρες για τα νεφρά. (Cooper DK, et al., 2007) (Tai HC, et al., 2007) Σε άλλες έρευνες στις οποίες είχαν χορηγηθεί χαμηλές δόσεις ανοσοκατασταλτικών, τα ξενομοσχευματα νεφρών δέχτηκαν απόρριψη σε 8 με 16 ημέρες και αυτό προκλήθηκε από την χυμική απάντηση έναντι των anti-non- α Gal σε συνδυασμό με την ενεργοποίηση του συμπληρώματος οδηγώντας σε εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα κυτταροτοξικότητα ενάντια των GalT-KO κυττάρων (Yang H, et al., 2007)

Για τον έλεγχο της έκφρασης της α Gal, μια τεχνική ήταν η δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών για την ενδο- β -γαλακτοσιδάση C (Endo- β -Galactosidase C - EndoGalC), ένζυμο το οποίο είναι ικανό να αφαιρεί υπολείμματα α Gal, με προπυρηνική μικροέγχυση. Το ποντίκι που παράχθηκε έδειξε δραματική μείωση (από 40% για το πάγκρεας και 90% για την καρδιά, νεφρά και πνεύμονες) αλλά όχι εξαφάνιση του επίτοπου α Gal. (Watanabe S, et al., 2008) Αν και η παραγωγή διαγονιδιακών EndoGalC ζώων δείχνει να είναι μια καλή προσέγγιση για την ξενομεταμόσχευση, η συστηματική έκφραση του EndoGalC στα ποντίκια προκάλεσε πρόωρο θάνατο, κάτι που μπορεί να είναι αποτέλεσμα της χρήσης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Με μια παρόμοια τεχνική ο Matsunami και οι συνεργάτες του το 2006 απομόνωσαν από χοίρους το γονίδιο N-ακετυλογλυκοζαμιλτρανσφεράση I [N-acetylglucosaminyltransferase I (GnT-I)] που κωδικοποιεί ένζυμο υπεύθυνα για την ενζυμική βιοσύνθεση σακχάρων. Μετά την στοχευμένη μετάλλαξη δυο σημείων του γονιδίου GnT-I, τα pigGnT-I(123) και pigGnT-I(320), εισήχθη σε

φυσιολογικά ενδοθηλιακά κύτταρα χοίρου (Porcine Endothelial Cells - pECs) με στόχο να βρεθεί ποια γενετική μετάλλαξη του γονιδίου GpT-I μπορεί να αλλάξει την αντιγονικότητα των συνδεδεμένων N σακχάρων σε σχέση με αυτά του ανθρώπινου ορού. Η έκφραση του γονιδίου pigGpT-I(320) στα pECs είχε ως αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων της aGal και μια μείωση της τάξης του 30-40% της CDC γεγονός που δείχνει ότι είναι δυνατή η ‘μεταποίηση’ των υδατανθρακικών δομών των κυττάρων του χοίρου με στόχο την αλλαγή της αντιγονικότητας. (Matsunami K, et al., 2006)

Μια άλλη μέθοδος για τον έλεγχο της έκφρασης της aGal είναι η διαγραφή ή η απενεργοποίηση του GaT γονιδίου. (Milland J, et al., 2006) (Porubsky S, et al., 2007)

Για τον προσδιορισμό του πιο αποτελεσματικού και ασφαλή τρόπου για την παραγωγή GaT^{-/-} (GaT^{-/-} = χοίροι στους οποίους δεν εκφράζεται η GaT) χοίρων ο Nottel και οι συνεργάτες του το 2007 σύγκριναν την πυρηνική μεταφορά στα σωματικά κύτταρα (Somatic Cell Nuclear Transfer – SCNT) και την φυσική μέθοδο. Στην φυσική μέθοδο, ετερόζυγα GaT^{+/-}-KO θηλυκά ζώα ζευγάρωσαν επιτυχώς με άγριας φυλής αρσενικούς χοίρους για την απόκτηση ομόζυγων GaT-KO ζώων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το απενεργοποιημένο GaT γονίδιο δεν επηρέασε την επιβίωση τους *in utero* και τα GaT-KO έδωσαν φυσιολογικού βάρους και μεγέθους ζώα γεγονός που καταδεικνύει πως η aGal δεν παίζει ρόλο στην φυσιολογική αναπαραγωγή και ανάπτυξη των ζώων. Στην SCNT μέθοδο, πάρθηκαν καλλιέργειες από εμβρυικούς ινοβλάστες από 25ημερών ομόζυγο GaT-KO έμβρυο έπειτα από την διασταύρωση ενός αρσενικού και ενός θηλυκού GaT^{+/-} χοίρου. Μετά την κυτταρική σύντηξη των πυρήνων από ομόζυγα GaT-KO έμβρυα με απύρηντα χοίρια ωοκύτταρα, SCNT GaT^{-/-} έμβρυα μεταφέρθηκαν σε 5 μητέρες. Μια αυτών έμεινε έγκυος και είχε λιγότερα από 4 βιώσιμα χοιρίδια. Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι η παραγωγή GaT^{-/-} χοίρων με SCNT είναι εφικτή. Επιπλέον, η φυσική αναπαραγωγή ελαχιστοποιεί οποιαδήποτε προβλήματα συγγένειας, ενώ η SCNT επιτρέπει επιπλέον την ευκολότερη και ταχύτερη εισαγωγή πολλαπλών διαγονιδίων. (Nottle M.B., et al., 2007)

Αν και η οξεία απόρριψη δεν εμφανίζονταν από GaT^{-/-} δότες, η χρόνια απόρριψη εμφανίζονταν σε μπαμπουίνους λήπτες νεφρικού μοσχεύματος από χοίρους GaT-KO. Η απόρριψη αυτή σχετίζεται με την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και με διαταραχές της πήξης του αίματος, όπως θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια (Thrombotic Microangiopathy - TMA) και διάχυτη ενδαγγειακή πήξη (Disseminated Intravascular Coagulation - DIC). Για να χαρακτηριστούν καλύτερα οι δυο αυτές διαταραχές, TMA και DIC, και για την εκτίμηση του

μεγέθους των δυσλειτουργιών αυτών καθώς και τα αίτια της πήξης του αίματος έπειτα της ξеноμεταμόσχευσης, οι Ezzelarab και οι συνεργάτες του το 2006 ερεύνησαν το "πηκτικό προφίλ" μπαμπούνων που δέχονταν καρδιά από GalT-KO χοίρους σε σύγκριση με υγιείς μπαμπούνους στους οποίους το πηκτικό προφίλ ήταν ίδιο με του ανθρώπου. Ωστόσο οξεία απόρριψη εμφανίστηκε σε ζώα που λάμβαναν θεραπεία με χορήγηση ηπαρίνης, αντιθρομβωτικό, μέσα σε 8 με 12 ημέρες με κλινική εικόνα DIC. (Ezzelarab M, et al., 2006)

6.4 Η ΧΡΗΣΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΧΟΙΡΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ

Μια μέθοδος για την μείωση της οξείας χυμικής απόρριψης κατά την ξενομεταμόσχευση από χοίρο σε πρωτεύον είναι η αναστολή της ενεργοποίησης του συμπληρώματος. Τα τελευταία 10 χρόνια πολλές γενιές διαγονιδιακών χοίρων δημιουργήθηκαν για την παραγωγή ανθρώπινων πρωτεϊνών ρύθμισης του συμπληρώματος (Complement Regulatory Proteins - CRPs). Έχουν παραχθεί πρωτεΐνες όπως η CD35 όπου είναι ένας υποδοχέας συμπληρώματος τύπου 1 (Complement Receptor type 1 - CR1), η CD46 μεμβρανική πρωτεΐνη-μεσολαβητής (Membrane Cofactor Protein - MCP), η CD55- συντελεστής επιτάχυνσης αποσύνθεσης (Decay-Accelerating Factor - DAF) και CD59 (αναστολέας δημιουργίας του C5b-9 που δρα καταστρέφοντας την κυτταρική μεμβράνη).

Ο Deppenmeier και οι συνεργάτες του το 2006 ανέλυσαν την παθομορφολογική βλάβη σε όργανα και ιστούς από διαγονιδιακούς χοίρους στους οποίους εκφραζόταν η ανθρώπινη πρωτεΐνη CD59 - hCD59 σε σύγκριση με μη διαγονιδιακούς χοίρους για την συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Οι διαγονιδιακοί αυτοί χοίροι παράχθηκαν με ΜΙ ξένου DNA σε προπυρήνα. Ωστόσο εμφανίστηκαν υψηλά επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου σε όργανα και ιστούς των ζώων, όμως δεν αναφέρεται κάτι σχετικά με κάποια παθολογικά ευρήματα που να σχετίζονται με την έκφραση του hCD59 οδηγώντας έτσι τους ερευνητές στο αποτέλεσμα ότι η τεχνική αυτή της εισαγωγής, της πρωτεΐνης hCD59, δεν επιφέρει παθομορφολογικές βλάβες στους χοίρους και επομένως είναι κατάλληλη για βιοιατρική εφαρμογή. (Deppenmeier S, et al., 2006)

Στην πνευμονική ξενομεταμόσχευση, η αναστολή του συμπληρώματος από τις CRPs δείχνει να είναι ανεπαρκείς. Σε έρευνα οι Poling και οι συνεργάτες του το 2006 μελέτησαν το *ex vivo* μοντέλο διάχυσης του ανθρώπινου αίματος σε διαγονιδιακό πνεύμονα χοίρου για τις πρωτεΐνες hCD55 και hCD59 με στόχο την διερεύνηση της πιθανότητας εμφάνισης απόρριψης (κυρίως οξείας απόρριψης) ή κάποιας πνευμονικής δυσλειτουργίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως δεν υπήρχε κάποια σοβαρή δυσλειτουργία που να προκλήθηκε από την hCD55, ωστόσο εμφανίστηκε ιστοπαθολογική εικόνα οξείας απόρριψης. (Poling J, et al., 2006)

Ο Wu και οι συνεργάτες του το 2007 ερεύνησαν την πορεία ενεργοποίησης της πήξης του αίματος στην παθογένεση της οξείας απόρριψης σε μπαμπούινο που δέχτηκε μόσχευμα καρδιάς από διαγονιδιακό για hDAF και hMCP χοίρο. Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής έδειξαν πως η πήξη του αίματος, που συνεπάγεται την οξεία απόρριψη, ήταν η αιτία της απόρριψης του

μοσχευματος από τον διαγονιδικό χοίρο. (Wu G, et al., 2007) Ο Liu και οι συνεργάτες του το 2007 ερεύνησαν *in vitro* σχέση μεταξύ της έκφρασης του hDAF και την αναστολή της κυτοτοξικότητας του ανθρώπινου ορού. Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pCAGGS στο οποίο εισήγαγαν έναν ενισχυτή κυτταρομεγαλοϊού - έναν υποκινητή b-actin και το γονίδιο hDAF και στην συνέχεια το πλασμίδιο εισάχθηκε σε ινοβλάστη χοίρου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αυξημένη έκφραση της hDAF βοηθούσε την αποφυγή της οξείας απόρριψης. (Liu D., et al., 2007)

6.5 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΤΡΟΠΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΠΑΝΤΗΣΗΣ

Πολλές έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί για την ανάλυση του αιμοποιητικού χμαιορισμού που επιτυγχάνεται με την χρήση μυελού των οστών (Bone Marrow - BM) που εκφράζει την aGal μέσω της μεταγωγής με φορείς λεντοϊών και είναι ικανός να αναστείλει την anti-aGal XNA απάντηση και να επάγει την συμβατότητα σε ξενομόσχευμα ή την αναστολή της anti-aGal XNA. (Fischer-Lougheed JY, et al., 2007)

Συγκεκριμένα οι Mitsuhashi και οι συνεργάτες του το 2006 χρησιμοποίησαν έναν φορέα λεντοϊών του γονιδίου GaIT και το μετέφεραν από GaIT-KO κουνέλι και το μεταμόσχευσαν σε BM-κύτταρα μυελού των οστών ποντικού. Μετά την μεταμόσχευση το ποντίκι είχε ανοσοποιηθεί με ερυθρά αιμοσφαίρια κουνελιού. Το αποτέλεσμα ήταν να μην ενεργοποιηθούν αντισώματα στο ποντίκι GaIT. (Mitsuhashi N, et al., 2006) Οι Fischer-Lougheed και οι συνεργάτες του το 2007 αναπαρήγαγαν το πείραμα αυτό σε χιμπαντζήδες (Rhesus Macaques). Συγκεκριμένα, οι χιμπαντζήδες ανοσοποιήθηκαν με κύτταρα μυελού των οστών χοίρου στα οποία εισήχθησε αντισώμα anti-aGal IgM. Στις έρευνες αυτές, οι ερευνητές απέδειξαν ότι ο τύπος αυτός της γονιδιακής θεραπείας είναι ικανός να αναστείλει την παραγωγή anti-aGal αντισωμάτων και στο ποντίκι αλλά και στον Rhesus Macaques γεγονός που υποδεικνύει ότι η ανοχή που επιτυγχάνεται με την μεταμόσχευση β κυττάρων μπορεί να επιτευχθεί και σε μη ανθρώπινα πρωτεύοντα (NHP). (Fischer-Lougheed JY, et al., 2007)

Η πρωτεΐνη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου 1, (Programmed Death Ligand-1 - PD-L1) εκφράζεται από τα T κύτταρα, B κύτταρα, δενδριτικά κύτταρα και τα μακροφάγα. Η PD-L1 είναι ένας δέκτης κυρίως της ενεργοποίησης των T κυττάρων και προάγει την επιβίωση του ξενομοσχεύματος προκαλώντας μακροχρόνια επιβίωση του μοσχεύματος. Για την αξιολόγηση του ρόλου της οι Jeon και οι συνεργάτες του το 2007 κλωνοποίησαν την χοίρεια PD-L1 και χαρακτήρισαν την λειτουργία της απέναντι στον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων CD4 T-κυττάρων με την διέγερση τους από κύτταρα χοίρου μολυσμένα με PD-L1. Η *in vitro* λειτουργική ανάλυση έδειξε ότι η χοίρεια PD-L1 ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων CD4 T-κυττάρων προκαλώντας επαγωγή της απόπτωσης των T-κυττάρων. Επομένως, παίζει ρυθμιστικό ρόλο στην κυτταρική απάντηση του λήπτη και βελτιώνει την επιβίωση του ξενομοσχεύματος στην διαδικασία της ξενομεταμόσχευσης. (Jeon DH, et al., 2007)

Πίνακας 10. Αναγραφή γονιδίων και η λειτουργία τους.

Γονίδιο	Επίδραση	Πηγές
1,3 Gal (alpha-1,3-galactosyltransferase) knock out (GalTKO)	Μείωση έκφρασης της Gal α -1,3-Gal (Gal), μείωση της υπεροξείας απόρριψης	(Phelps CJ, et al., 2003) (Diamond LE, et al., 2001)
hCD46 (hMCP, human membrane cofactor)	Ρύθμιση του ανθρώπινου συμπληρώματος	(Diamond LE, et al., 2001) (Langford GA, et al., 2001)
hCD46+GalTKO	Ρύθμιση του ανθρώπινου συμπληρώματος + μείωση έκφρασης της Gal	(Hara H, et al., 2011)
hCD55 (hDAF, human decay accelerating factor)	Ρύθμιση του ανθρώπινου συμπληρώματος	(Cozzi E, et al., 1995) (Rosengard AM, et al., 1995)
hCD55+endo-betagalactosidase C	Ρύθμιση του ανθρώπινου συμπληρώματος + μείωση έκφρασης της Gal	(Yazaki S, et al., 2009)
hCD55+endo-betagalactosidase C	Ρύθμιση του ανθρώπινου συμπληρώματος + μείωση έκφρασης της Gal	(Yazaki S, et al., 2009)
hCD59	Ρύθμιση του ανθρώπινου συμπληρώματος	(Diamond LE, et al., 1996) (Fodor WL, et al., 1994) (Niemann H, et al., 2001)
hCD55+hCD59	Ρύθμιση του ανθρώπινου συμπληρώματος	(Byrne G, et al., 1996) (Chen RH, et al., 1999)
hCD46+hCD55+hCD59	Ρύθμιση του ανθρώπινου συμπληρώματος	(Cowan PJ, et al., 2000) (Cowan PJ, et al., 2003) (Zhou CY, et al., 2005)
H-transferase (alpha-1,2-fucosyltransferase)	Μείωση έκφρασης της Gal	(Costa C, et al., 1999)

Πίνακας 10.1. Αναγραφή γονιδίων και η λειτουργία τους.

Γονίδιο	Επίδραση	Πηγές
hCD59+H-transferase (alpha-1,2- fucosyltransferase)	Ρύθμιση του ανθρώπινου συμπληρώματος + μείωση έκφρασης της Gal	(Costa C, et al., 2002)
hCTLA4-Ig (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen)	Αναστέλει την ενεργοποίηση των T-κυττάρων	(Phelps CJ, et al., 2009)
hTM (human thrombomodulin)	Ενεργοποιεί την ανθρώπινη αντιπηκτική πρωτεΐνη C	(Petersen B, et al., 2009)
hA20 (humanA20, tumor necrosis factor-alpha inducible gene)	συμβάλλει στον έλεγχο της οξείας αγγειακής απόρριψης	(Oropeza M, et al., 2009)
HLA-E/ (human leukocyte antigen-E)+human beta2- microglobulin	Προστατεύει ενάντια στην κυτταροτοξικότητα	(Weiss EH, et al., 2009)
TRAIL (tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand)	Μειώνει την οξεία κυτταρική απόρριψη	(Klose R, et al., 2005)
GnT-III (beta-d-mannoside beta-1,4- Nacetylglucosaminyltransfer ase III)	Μειώνει την αντιγονικότητα των ανθρώπινων αντισωμάτων	(Miyagawa S, et al., 2001)

Πίνακας 10.2. Αναγραφή γονιδίων και η λειτουργία τους.

Γονίδιο	Επίδραση	Πηγές
hHO-1 (human heme oxygenase-1)	Συμβάλλει στην αντιαπόπτωση	(Petersen B, et al., 2010)
Fas ligand (Fas L)	Συμβάλλει στην αντιαπόπτωση	(Choi KM, et al., 2010)
GaITKO+CD55+CD59	Έλεγχος της IBMIR κατα την μεταμόσχευση νεογνικών T κυττάρων.	(Hawthorne WJ, et al., 2014)
GaITKO+CD55+CD59+Htransferase	Μειώνει την ξеноαντιγονική απάντηση σε Τα κύτταρα διαγονιδιακού ζώου	(Chen Y, et al., 2014)
GaITKO+H-transferase	Μειώνει την έκφραση του αντιγόνου alpha Gal	(Zeyland J, et al., 2014)
Soluble TNFRI-Fc-hHO	Προστατεύει ενάντια στην οξειδωση και στην φλεγμονώδη αντίδραση	(Park SJ, et al., 2014)
Optimized hTM	Προάγει την αντιμετώπιση της πήξης του αίματος στην ξеноμεταμόσχευση χοίρου- πρωτεύοντος	(Wuensch A, et al., 2014)

Πίνακας 10.3. Αναγραφή γονιδίων και η λειτουργία τους.

Γονίδιο	Επίδραση	Πηγές
GaTKO+CD46	Μειώνει την <i>in vitro</i> ανθρώπινη αντι-χοίρια κυτταρική απάντηση	(Li J, et al., 2013)
HLA-E	Καταστολή της CDC	(Maeda A, et al., 2013)
CD55 CD59+H-transferase genes	Προστασία κατά της κυττόλυσης προκλυνόμενη από τον ορό	(Jeong YH, et al., 2013)

7. ΚΑΤΑΛΛΗΛΕΣ ΦΥΛΕΣ ΓΙΑ ΞΕΝΟΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ

Ο όρος αρχικά 'mini pig' είναι ένας όρος πλέον κοινά αποδεκτός από την επιστημονική κοινότητα και χρησιμοποιείται για να περιγράψει την διαφορά μεταξύ των μεγάλωσμων και των μικρόσωμων φυλών όπως είναι οι φυλές Göttingen mini pig, Pot-bellied pig, Choctaw Hog, Minnesota minipig και Kunekune καθώς και φυλές που προκύπτουν από την διασταύρωση αυτών. Ωστόσο στα πλαίσια της ξενομεταμόσχευσης η χρήση των mini pig αφορά μόνο τον Göttingen mini pig καθώς πάνω σε αυτών έχουν γίνει τα περισσότερα πειράματα που αναφέρονται στις βιβλιογραφίες. Παρόλα αυτά η χρήση των mini pig γίνεται λόγω των εμφανών χαρακτηριστικών τους όπου είναι σε γενικές γραμμές τα μικρά αυτιά, μικρό ρύγχος, κοντά πόδια, χαμηλό λαιμό και μικρή ουρά και ζυγίζουν σε μέσο όρο 34kg - 91kg.

Ο χοίρος της φυλής Pot-bellied pig προέρχεται από το βιετνάμ και είναι μια μικρόσωμη σχετικά φυλή και χρώματος μαύρο και κατατάσσεται ως άγρια φυλή. Ωστόσο η μείωση του αριθμού των ζώων αυτών οδήγησε στην προστασία του από οργανώσεις ως είδος υπο εξαφάνιση το 2010 και εκτοτε προστατεύεται ως είδος υπο εξαφάνιση ωστόσο αναφέρεται ότι ο αριθμός του πλέον έχει ανακάμψει και μερικά ζώα έχουν μεταφερθεί στον καναδά για χρήση κυρίως πάνω σε βιοιατρικά πειράματα. (Nguyen, et al., 2004)



Εικόνα 36. Χοίρος της φυλής Pot-bellied pig

Πηγή : American Mini-pig Association

Ο χοίρος της φυλής Choctaw Hog χαρακτηρίζεται ως αμερικάνικη φυλή αν και οι ρίζες του προέρχονται από την Ισπανία. Έχει χρώμα μαύρο και η σωματική του διάπλαση είναι σχετικά μικρή σε σχέση με άλλες φυλές με μέσο βάρος ενήλικου χοίρου τα 54 kg (120 pounds) (Sponenberg, D.P., 1992)



Εικόνα 37. Χοίρος της φυλής Choctaw Hog

Πηγή : Salute The Pig

Ο χοίρος της φυλής Minnesota minipig προέρχεται από την Αμερική και είναι σχετικά μικρόσωμη φυλή σε χρώματα άσπρο με μαύρα στίγματα και μαύρο. Χαρακτηρίζεται ως ζώο κυρίως εργαστηρίου και αποτελεί μια ενδιάμεση φυλή για την παραγωγή του Göttingen mini pig.



Εικόνα 38. Χοίρος της φυλής Minnesota minipig

Πηγή : Brand-aue

Ο χοίρος της φυλής Kunekune προέρχεται από την Νέα Ζηλανδία και χαρακτηρίζεται ως οικόσιτος χοίρος. Φαινοτυπικά έχει μακρύ σχετικά τρίχωμα με κοντά πόδια και μικρή σωματική διάπλαση με διάφορα χρώματα τριχώματος όπως μαύρο άσπρο μπεζ και καφέ και το μέσο βάρος του κυμαίνεται από 60 έως 200kg.

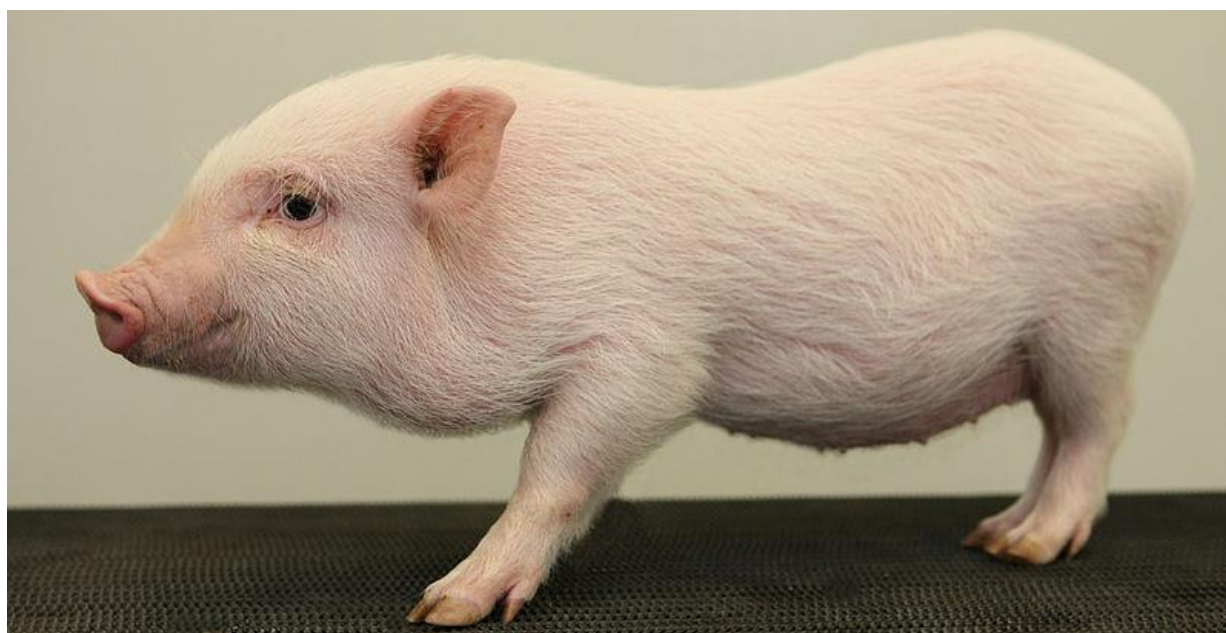


Εικόνα 39. Χοίρος της φυλής Kunekune

Πηγή : Telegraph

7.1 Η ΦΥΛΗ GÖTTINGEN MINI PIG

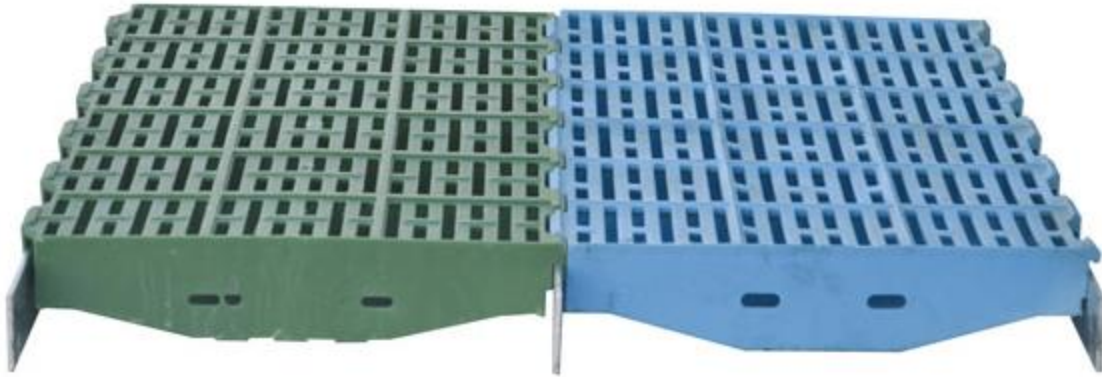
Η φυλή Göttingen minipig χαρακτηρίζεται για το μικρό της μέγεθος και για την γενική καλή κατάσταση υγείας του. Ο χοίρος αυτός αναπτύχθηκε το 1960 στο Institute of Animal Breeding and Genetics στο Πανεπιστήμιο του Göttingen, της Γερμανίας μέσω διασταυρώσεων από τις φυλές Minnesota minipig, Vietnamese Potbelly Pig και German Landrace pig η φυλή αυτή είναι ιδιαίτερα επιθυμητή για χρήση των χοίρων ως κατοικίδια ωστόσο η ανάπτυξη της φυλής αυτής ήταν καθαρά για βιοιατρική χρήση και είναι μια από τις μικρότερες σωματικά φυλές στον κόσμο.



Εικόνα 40. Χοίρος της φυλής Göttingen mini pig

Για τον σταλισμό του Λόγο του Göttingen mini pig λόγω του υψηλού προτύπου υγείας του Göttingen, δεν πρέπει να σταβλίζονται με άλλες φυλές ζώων ή να έρχεται σε επαφή με άλλα ζώα ή σε άμεση επαφή με ανθρώπους.

Το πάτωμα του στάβλου μπορεί αν είναι ένα στερεό σκυρόδεμα με ελαφρώς τραχιά επιφάνεια για ασφαλή βάδιση των ζώων ή μπορεί να συνδυάζεται και με σχαρωτό δάπεδο. Μολονότι το σχαρωτό πάτωμα παρέχει έναν καλό και εύκολο καθαρισμό του χώρου ωστόσο δεν παρέχει καλή μόνωση με αποτέλεσμα να απαιτείται μια υψηλότερη θερμοκρασία του στάβλου. Επίσης, λόγω του μικρού μεγέθους του ζώου, το διάστημα των σχισμών του δαπέδου θα πρέπει να είναι περίπου 12mm και το πάχος της μπάρας 10mm. (P. J. A. Bollen et al., 2000)



Εικόνα 41. Σχαρωτό πλαστικό δάπεδο

Για την χορήγηση νερού θα πρέπει να υπάρχουν ποτίστρες που χορηγούν νερό κατά ελεύθερη βούληση του ζώου. Το ύψος της ποτίστρας θα πρέπει να είναι στο ύψος του βραχίονα έτσι ώστε να χρειάζεται τα ζώα απλά να σηκώσουν το κεφάλι για να πιούν νερό. Επίσης το ύψος θα πρέπει να ρυθμίζεται μια με δύο φορές τον μήνα καθώς τα ζώα αναπτύσσονται (P. J. A. Bollen et al., 2000)



Εικόνα 42. Πιπίλα για χορήγηση νερού κατά ελεύθερη βούληση

Η θερμοκρασία του χώρου θα πρέπει να ελέγχεται σε ύψος όχι πάνω από 30cm και αυτή θα πρέπει να διαμορφώνεται ως εξής.

Πίνακας 11. Η θερμοκρασία του χώρου ανάλογα την ηλικία

Πηγή : P. J. A. Bollen et al., 2000

Ηλικία (σε μήνες)	Θερμοκρασία (σε °C)
<2 μηνών	28
1–2 μηνών	26
3–6 μηνών	22–24
>6 μηνών	20–22

Η διατροφή των χοίρων αυτών περιέχει πίτουρο βρώμης, κριθάρι, σιτάρι, σόγια, μελάσα, εκχυλίσματα από ηλίανθο και βιταμίνες. Ωστόσο τα θηλυκά ζώα έχουν περιορισμένη διατροφή για την ρύθμιση της ανάπτυξής τους σε αντίθεση με τα αρσενικά, αλλά σημαντικός παράγοντας καθορισμού της ποσότητας του φαγητού που θα καταναλώσουν τα ζώα είναι η ηλικία, το βάρος, το φύλο, η κατάσταση της υγείας, η δραστηριότητα τους, η θερμοκρασία του χώρου και η ταχύτητα του αέρα (περίπου 0.3 m/sec). (P. J. A. Bollen et al., 2000)



Εικόνα 43. Πίτουρο βρώμης καρπός



Εικόνα 44. Καρπός κριθαριού



Εικόνα 45. Καρπός σιταριού



Εικόνα 46. Σόγια



Εικόνα 47. Μελάσα

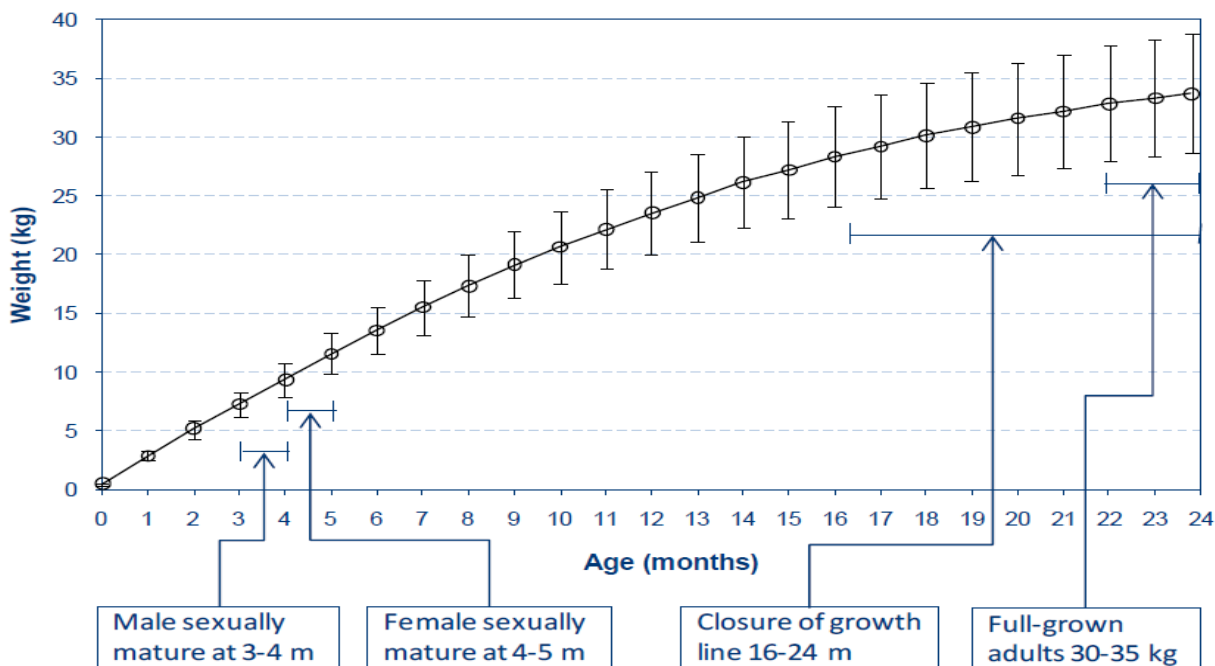


Εικόνα 48. Ηλιάνθος



Εικόνα 49. Πηγές βιταμινών

Παρα ταύτα λόγω της διάθεσης των χοίρων αυτών για βιοιατρική χρήση πρέπει να βρίσκονται στα πλαίσια ενός μέσου όρου βάρους. Παρακάτω φαίνεται η φυσιολογική ανάπτυξη (σε βάρος) των ζώων ανάλογα με την ηλικία.



Διάγραμμα 1. Φυσιολογική ανάπτυξη χοιριδίου σε βάρος σε σχέση με την ηλικία

Πηγή : P. J. A. Bollen et al., 2000

Οι χοίροι θα πρέπει να παίρνουν περίπου 0.5kg/εβδομάδα από την ηλικία των 1 μηνών ως των 12 μηνών και πάνω από 12 μηνών θα πρέπει να παίρνουν 0.25kg/εβδομάδα και στην ηλικία των 24 μηνών να φτάνουν τα 35kg.

Η ποσότητα της τροφής, υπολογίζεται με βάση της καμπύλης ανάπτυξης του ζώου σε αναλογία με το βάρος θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη για την σωστή ανάπτυξη του ζώου ανάλογα την ηλικία του. Ωστόσο η οποιαδήποτε απόκλιση από την καμπύλη αυτή, η διατροφή θα πρέπει να μειώνεται ή να αυξάνεται σε ποσοστό +/- 20 - 40% εωσότου το βάρος να έρθει στο κατάλληλο επίπεδο που ορίζεται από τον πίνακα ανάπτυξης. Τα ζώα μικρότερα από 7 μηνών θα πρέπει να λαμβάνουν το φαγητό τους σε 2 δόσεις ανα ημέρα ενώ τα ζώα μεγαλύτερα των 7 μηνών μπορούν να τάζονται σε μία δόση την ημέρα. (P. J. A. Bollen et al., 2000)

Πίνακας 12. Η ημερήσια ποσότητα τροφής.

Πηγή : P. J. A. Bollen et al., 2000

Ηλικία (μήνες)	Βάρος (kg)	Αρσενικά (g)	Θηλυκά (g)
2-4	5-9	240	220
4-6	9-13	240-300	220-280
6-8	13-17	300-340	280-320
8-10	17-21	340-380	320-360
10-12	21-25	380-420	360-400

Όσο αφορά τα στοιχεία αναπαραγωγής του ζώου, οι χοιρομητέρες γεννούν περίπου 6 με 8 χοιρίδια και η διάρκεια εγκυμοσύνης είναι 3 μήνες, 3 εβδομάδες και 3 ημέρες δηλαδή περίπου 114-116 ημέρες. Τα χοιρίδια μέχρι την ηλικία των 6 εβδομάδων θηλάζονται και στην ηλικία των 1 μηνών (κατά προσέγγιση) μπορούν να αρχίσουν την κατανάλωση της στερεάς τροφής και κατά την ηλικία των 6 μηνών απογαλακτίζονται και μπορούν να στερωθούν.

Η γενετήσια ωριμότητα των ζώων αυτών είναι στην ηλικία των 3 μηνών για τα αρσενικά ενώ τα θηλυκά είναι γενετήσια ώριμα κατά την ηλικία 4-5 μηνών. Ο οίστρος εμφανίζεται κάθε 3 εβδομάδες και διαρκεί περίπου 3 ημέρες.

7.2 Η ΦΥΛΗ AUCKLAND ISLAND PIG

Η φυλή Auckland Island ήταν μια άγρια φυλή χοίρου η οποία πλέον έχει εξημερωθεί και βρίσκεται στο Auckland Island της Νέας Ζηλανδίας.



Εικόνα 50. Χοίρος φυλής Auckland Island

Πηγή : Elissa Wolfson., (2013) Four-Legged Islet Factories: The Pigs of Auckland Island

Η φυσική εμφάνιση και το μέγεθος του ζώου είναι ίδιο με τις άγριες φυλές που υπάρχουν στο κυρίως νησί της Νέας Ζηλανδίας. (Challies, C.N. 1975) Έχουν παχύ τρίχωμα συνήθως χρώματος μαύρου, καφέ ή άσπρο, μακρύ κεφάλι και μουσούδα, ίσιες ουρές και μέγεθος μικρό με μέσο βάρος ενός κάπρου να είναι 41.7kg (92 lb) και της σύας 37.3kg (82 lb). (Challies, C.N. 1975) Οι χοίροι αυτοί χαρακτηρίζονται ως pathogen-free δηλαδή ως χοίροι χωρίς ιούς ή παθογόνους μικροοργανισμούς, κάτι που τους κάνει ιδανικούς για την χρήση τους στην ξενομεταμόσχευση. Ωστόσο περεταίρω πληροφορίες για την χρήση του χοίρου στην ξενομεταμόσχευση πέρα της χρήσης του από την εταιρεία LCT η οποία μεταμόσχευσε κύτταρα της νησίδας του Langerhans σε ασθενή για την θεραπεία του διαβήτη τύπου 1 (βλέπε κεφ. 1) δεν έχει καταγραφεί.

8. ΗΘΟΛΟΓΙΑ

Είναι κοινά αποδεκτό ότι η χρήση των ζώων και ιδικά των θηλαστικών, που προορίζονται για πυγή οργάνων, υποβάλλονται σε πόνο και στρες. Ωστόσο υπάρχουν και ομάδες ανθρώπων που υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχει λόγος να λαμβάνεται υπόψη η ηθική των ζώων αυτών και ο πόνος και το στρες που ενδεχομένως βιώνουν δεν πρέπει να “ζυγίζετε” με τον πόνο των ανθρώπων. (Singer P., 1995)

Όμως το βασικό ερώτημα που γεννιέται είναι το αν “η παραγωγή διαγονιδιακών ζώων ως πηγή για ξενομοσχεύματα είναι σωστή;”

Οι πιο πρόσφατες επιστημονικές πρόοδοι στο θέμα της ξενομεταμόσχευση στοχεύουν στην δημιουργία διαγονιδιακών χοίρων ως την πιο σωστή λύση για την δημιουργία κατάλληλων ζώων – οργάνων – ιστών για την χρήση τους από τον άνθρωπο με αποτέλεσμα στους διαγονιδιακούς αυτούς χοίρους να έχουν προστεθεί γονίδια ανθρώπων και να έχουν αφαιρεθεί γονίδια του χοίρου, με στόχο την μείωση του κινδύνου της απόρριψης από τον λήπτη του οργάνου ή ιστού (βλέπε κεφ. απορριψη).

Η γενετική τροποποίηση επομένως των χοίρων θα μπορούσε να είναι ένας καθοριστικός παράγοντας για την επιτυχία της ξενομεταμόσχευσης.

Ωστόσο στο θέμα της δημιουργίας διαγονιδιακών ζώων γεννιούνται επιχειρήματα κατά της διαδικασίας αυτής, όπως:

- Η γενετική τροποποίηση παρεμβαίνει στην φύση
- Προβαίνει στην αλλαγή της φύσης των ζώων
- Διαστρεβλώνει τα είδη των ζώων

Όμως υπάρχουν και τα επιχειρήματα που υποστηρίζουν την δημιουργία διαγονιδιακών ζώων, όπως:

- Η γενετική τροποποίηση πραγματοποιείται σε μικρή κλίμακα (μικρό αριθμό ζώων) και με συγκεκριμένη διαδικασία
- Με την γενετική τροποποίηση είναι δυνατή η απαλοιφή γενετικών ασθενειών

Ωστόσο υπάρχουν και άλλα ερωτήματα και ανησυχίες που αναπτύσσονται πάνω στην δημιουργία γενετικά τροποποιημένων χοίρων όπως το ότι ανάλογα με την τεχνική που θα επιλεγεί για την πραγματοποίηση της γενετικής τροποποίησης, και της δημιουργίας διαγονιδιακών ζώων (βλέπε κεφ. Γ.Μ.) τα χοιρίδια που θα γεννηθούν δεν είναι σίγουρο ότι όλα θα περιέχουν την επιθυμητή γενετική τροποποίηση επομένως τα μη κατάλληλα ζώα θα οδηγούνται σε θανάτωση διότι δεν μπορούν ούτε να απελευθερωθούν στην φύση και επίσης δεν είναι δυνατή η εισαγωγή τους στην τροφική αλυσίδα (κατανάλωση κρέατος). Επίσης ο οργανισμός Canadian Council on Animal Care αναφέρει ότι η δημιουργία γενετικών τροποποιημένων ζώων προκαλεί στρες και είναι μια επίπονη διαδικασία για τα ζώα. (Griffin G., 1997) (Bärbel Hüsing, 2000)

Η ξενομεταμόσχευση, τελικά, είναι μια αμφιλεγόμενη διαδικασία από όταν πρωτοξεκίνησε η εφαρμογή της σε πειραματικό επίπεδο. Πολλές ομάδες υποστηρίζουν τα δικαιώματα των ζώων και είναι κάθετες και εντελώς αντίθετες στην ιδέα της ξενομεταμόσχευσης και στην ιδέα του να θανατώνονται ζώα με σκοπό την χρήση των οργάνων τους για τον άνθρωπο. Ωστόσο καμία από τις “μεγάλες” θρησκείες δεν είναι ενάντια στην γενετική τροποποίηση των χοίρων για ξενομεταμόσχευση (Rothblatt Martine, 2004)

Τέλος, η ξενομεταμόσχευση χαρακτηρίζεται ως μια αμφιλεγόμενη διαδικασία που σε μερικούς μπορεί να είναι αρεστή και σε μερικούς όχι. Η άποψή μου ωστόσο επι του θέματος είναι καθαρά θετική διότι τα πλεονεκτήματα που έχει η χρήση των χοίρων, με την εξέλιξη της επιστήμης και με την βελτίωση των τεχνικών για την ασφαλέστερη παραγωγή και χρήση διαγονιδιακών οργάνων είναι πολύ περισσότερα από τα μειονεκτήματα που πολλοί αναφέρουν και υποστηρίζουν.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- A.DAWSON, R. E. HARVEY, S. J. THEVASAGAYAM, J. SHERINGTON, A. R. PETERS (2002) Studies of the field efficacy and safety of a single-dose *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine for pigs 151(18):535-538
- A.W. Tucker, F. McNeilly, B. Meehan, et al., (2003). Methods for the exclusion of circoviruses and gammaherpesviruses from pigs, *Xenotransplantation* 10: 343–348
- Abbas, A., Lichtman, A. (2005) *Cellular and Molecular Immunology*, 5th ed., 81:330–333, 381, 386.
- Arai T, Tabona P & Summerfield JA. (1993). Human mannose-binding protein gene is regulated by interleukins, dexamethasone and heat shock. 86:575-82.
- B. Chmielewicz, M. Goltz, T. Franz, et al., (2003) A novel porcine gammaherpesvirus, *Virology* 308:317-329
- B.J. Sanford, T. Opriessnig, S.P. Kenney, et al., (2012) Assessment of the crossprotective capability of recombinant capsid proteins derived from pig, rat, and avian hepatitis E viruses (HEV) against challenge with a genotype 3 HEV in pigs. 30:6249-6255.
- Bailey, Leonard; Nehlsen-Cannarella SL; Concepcion W; Jolley WB. (1985). "Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate". 254:3321–9.
- Bärbel Hüsing (2000). *Therapeutic Products Programme, Health Canada, Scientific Issues Raised by Xenotransplantation* 14:7-8
- Barnard CN, Wolpowitz A, Losman JG. (1977) Heterotopiccardiac transplantation with a xenograft for assistance of the left heart in cardiogenic shock after cardiopulmonarybypass. *S Afr Med J* 52: 1035.
- Barrangou R (2015). "The roles of CRISPR-Cas systems in adaptive immunity and beyond". *Current Opinion in Immunology*. 32: 36–41.
- Blusch, J.H., Patience, C., and Martin, U. (2002). Pig endogenous retroviruses and xenotransplantation. *Xenotransplantation* 9:242-251
- Bollen, PJA & Ellegaard, L.(1996). *Developments in Breeding Göttingen Minipigs*. 1119:1129.
- Bollen, PJA & Ellegaard, L.(1996). *Developments in Breeding Göttingen Minipigs*. In: Tumbleson & Schook (eds.) *Advances in Swine in Biomedical Research*. New York: Plenum Press
- Byrne G, McCurry K, Martin M, Platt J, Logan J (1996) Development and analysis of transgenic pigs expressing the human complement regulatory protein CD59 and DAF. 28: 759.
- Candinas, D.; Adams, D. H. (2000). "Xenotransplantation:Postponed by a millennium?". 93 (2): 63–66.

- Carreño, L. J., Saavedra-Ávila, N. A., Porcelli, S. A. *Clin. & Trans.* (2016) α -Galactosyl Ceramide 5:e69
- Carroll, M. C. & Prodeus, A. P. (1998). Linkages of innate and adaptive immunity. *Current Opinions in Immunology* 10:36–0.
- Carroll, M. C. (1998). The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity 16:545–68..
- Chae, C (2012). "Porcine circovirus type 2 and its associated diseases in Korea". 164 (1–2): 107–13
- Challies, C.N. (1975). "Feral Pigs (*Sus scrofa*) on Auckland Island: Status, and Effects on Vegetation and Nesting Sea Birds". 2 (4): 479–490.
- Charles A Janeway, Jr, Paul Travers, Mark Walport, and Mark J Shlomchik. (2001) *The Immune System in Health and Disease* 10:8153
- Chen RH, Naficy S, Logan JS, Diamond LE, Adams DH (1999) Hearts from transgenic pigs constructed with CD59/DAF genomic clones demonstrate improved survival in primates. 6: 194-200.
- Chen Y, Stewart JM, Gunthart M, Hawthorne WJ, Salvaris EJ, et al. (2014) Xenoantibody response to porcine islet-cell transplantation using GTKO, CD55, CD59, and fucosyltransferase multiple transgenic donors. *Xenotransplantation* 21: 244-253.
- Choi KM, Jin DI, Hong SP, Yeon Yoo J, Hyun S, et al. (2010) Production of transgenic cloned miniature pigs with membrane-bound human Fas ligand (FasL) by somatic cell nuclear transfer. 83: 701.
- Claire, M., Holland, H. & Lambris J.D.(2002). Complement system in teleosts. 12:399-420.
- Clark, K.J., Carlson, D.F., Foster, L.K., Kong, B.W., Foster, D.N., and Fahrenkrug, S.C. (2007). Enzymatic engineering of the porcine genome with transposons and recombinases. 7:42.,
- Cooper DK, Dorling A, Pierson III RN, Rees M, Seebach J, Yazer M., et al. (2007) Alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs for xenotransplantation: where do we go from here? *Transplantation* 84:1–7.
- Cooper, D. K. C., Ye, Y., Rolf, L. L., and Zuhdi, N. (1991). The pig as potential organ donor for man. 481:500
- Costa C, Zhao L, Burton WV, Bondioli K R, Williams BL, et al. (1999) Expression of the human alpha-1,2-fucosyltransferase in transgenic pigs modifies the cell surface carbohydrate phenotype and confers resistance to human serum-mediated cytotoxicity. 13: 1762-1773.
- Costa C, Zhao L, Burton WV, Rosas C, Bondioli KR, et al. (2002) Transgenic pigs designed to express human CD59 and H-transferase to avoid humoral xenograft rejection. 9: 45-57.

- Cowan PJ, Aminian A, Barlow H, Brown AA, Chen CG, et al. (2000) Renal xenografts from triple-transgenic pigs are not hyperacutely rejected but cause coagulopathy in non-immunosuppressed baboons. 69: 2504-2515.
- Cowan PJ, Shinkel TA, Fiscaro N, Godwin JW, Bernabéu C, et al. (2003) Targeting gene expression to endothelium in transgenic animals: a comparison of the human ICAM-2, PECAM-1 and endoglin promoters. 10:223-231.
- Cozzi E, White DJ (1995) The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. 1: 964-966.
- Cozzi, E., Masroor, S., Soin, B., Vial, C., and White, D. J. (2000) Progress in xenotransplantation. 13-18
- Czuderna, F., Fischer, N., Boller, K., Kurth, R., and Tönjes, R.R. (2000). Establishment and characterization of molecular clones of porcine endogenous retroviruses replicating on human cells. 74:4028-4038
- d'Apice AJ, Cowan PJ. 2009. Xenotransplantation: The next generation of engineered animals. *Transpl Immunol* 21:111-115.
- David H. Sachs, Megan Sykes, Simon C. Robson, and David K. C. Cooper (2001) *Xenotransplantation* 79:129
- Deacon T, Schumacher J, Dinsmore J et al. (1997) Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. 3:350
- Denner J, Mihica D, Kaulitz D, Schmidt CM (2012) Increased titers of neutralizing antibodies after immunization with both envelope proteins of the porcine endogenous retroviruses (PERVs). 9: 260.
- Denner J, Schuurman HJ, Patience C (2009) The International Xenotransplantation Association consensus statement on conditions for undertaking clinical trials of porcine islet products in type 1 diabetes--chapter 5: Strategies to prevent transmission of porcine endogenous retroviruses. *Xenotransplantation* 16: 239-248.
- Denner. (2017) Xenotransplantation and porcine cytomegalovirus (PCMV). *Xenotransplantation*, 14:171
- Deppenmeier S, Bock O, Mengel M, Niemann H, Kues W, Lemme E et al. (2006) Health status of transgenic pigs expressing the human complement regulatory protein CD59. *Xenotransplantation* 13: 345-356.
- Deschamps JY1, Roux FA, Sai P, Gouin E, (2005) History of xenotransplantation 12:91-109.
- Devyatyarova-Johnson M, Rees I, Robertson B, Turner M, Klein N & Jack D. (2000). The lipopolysaccharide structures of *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Neisseria gonorrhoeae* determine the attachment of human mannose-binding lectin to intact organisms. 68:3894-99.

- Diamond LE, McCurry KR, Martin MJ, McClellan SB, Oldham ER, et al. (1996) Characterization of transgenic pigs expressing functionally active human CD59 on cardiac endothelium. 61: 1241-1249.
- Diamond LE, Quinn CM, Martin MJ, Lawson J, Platt JL, et al. (2001) A human CD46 transgenic pig model system for the study of discordant xenotransplantation. 71: 132-142.
- Dieckhoff B, Petersen B, Kues WA, Kurth R, Niemann H, et al. (2008) Knockdown of porcine endogenous retrovirus (PERV) expression by PERV-specific shRNA in transgenic pigs. 15(1):36-45
- Dieckhoff, B., Petersen, B., Kues, W.A., Kurth, R., Niemann, H., and Denner, J. (2008). Knockdown of porcine endogenous retrovirus (PERV) expression by PERV-specific shRNA in transgenic pigs. *Xenotransplantation* 15:36-45.
- Dooleniya, M. D.; Warrens, A. N. (2003) "Xenotransplantation: Where are we today?". 96 (3): 111-117.
- Dooleniya, M. D.; Warrens, A. N. (2003). "Xenotransplantation: Where are we today?". 96 (3): 111-117
- Drickamer K & McCreary V. (1987). Exon structure of a mannose-binding protein gene reflects its evolutionary relationship to the asialoglycoprotein receptor and non fibrillar collagens. 262:2582-89
- Erdei, A., Kerekes, K. & Pecht, I. (1997). Role of C3a and C5a in the activation of mast cells. *Experimental and Clinical Immunogenetics* 14:16-18
- Ersek RA, Denton DR. (1983) Silver-impregnated porcine xenograft for damaged or missing skin. *Contemp Surg.* 23:83.
- Ersek RA, Denton DR. 1984; Silver-impregnated porcine xenografts for treatment of meshed autografts. *Ann Plast Surg* 13:482.
- Ezekowitz RA, Day LE & Herman GA. (1988). A human mannose-binding protein is an acute phase reactant that shares sequence homology with other vertebrate lectins. 1034:46.
- Ezzelarab M, Cortese-Hassett A, Cooper DK, Yazer MH. (2006) Extended coagulation profiles of healthy baboons and of baboons rejecting GT-KO pig heart grafts. *Xenotransplantation* 13: 522-528.
- Fiebig U, Stephan O, Kurth R, Denner J (2003) Neutralizing antibodies against conserved domains of p15E of porcine endogenous retroviruses: basis for a vaccine for xenotransplantation? 307: 406-413.
- Fink JS, Schumacher JM, Elias SL et al. (2000) Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. *Cell Transplant*; 9:273

- Fischer-Lougheed JY, Tarantal AF, Shulkin I, Mitsuhashi N, Kohn DB, Lee CC et al. (2007) Gene therapy to inhibit xenoantibody production using lentiviral vectors in non-human primates. *Gene Therapy* 14:49–57
- Fischer-Lougheed JY, Tarantal AF, Shulkin I, Mitsuhashi N, Kohn DB, Lee CC et al. (2007) Gene therapy to inhibit xenoantibody production using lentiviral vectors in non-human primates. *Gene Therapy* 14: 49–57.
- Fodor WL, Williams BL, Matis LA, Madri JA, Rollins SA, et al. (1994) Expression of a functional human complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogeneic hyperacute organ rejection. *Transplantation* 91: 11153-11157.
- Frohn, C; Fricke, L; Puchta, JC; Kirchner, H (2001). “The effect of HLA-C matching on acute renal transplant rejection.”. *Nephrology, dialysis, transplantation*. 16 (2): 355–60.
- Frohn, C; Fricke, L; Puchta, JC; Kirchner, H (2001). “The effect of HLA-C matching on acute renal transplant rejection.”. *Nephrology, dialysis, transplantation* 16 (2): 355–60.
- Fugita T, Taira S, Kodama N, Matsushita M & Fugita T. (1995). Mannose-binding protein recognizes glioma cells :in vitro analysis of complement activation on glioma cells via the lectin pathway. *Journal of Cellular Biochemistry* 86:187-92
- Fujita K, Sasaki Y, (2007) "Pharmacogenomics in drug-metabolizing enzymes catalyzing anticancer drugs for personalized cancer chemotherapy"., *Journal of Pharmacology and Therapeutics* 8: 554–62.
- Fujita T. (2002). Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Journal of Cellular Biochemistry* 2:346-53
- Fuxe K, Dahlstrom A, Hoistad M, Marcellino D, Jansson A, Rivera A, az-Cabiale Z, Jacobsen K, Tinner-Staines B, Hagman B, Leo G, Staines W, Guidolin D, Kehr J, Genedani S, Belluardo N, Agnati LF. (2007) From the Golgi-Cajal mapping to the transmitter-based characterization of the neuronal networks leading to two modes of brain communication: wiring and volume transmission. *Journal of Cellular Biochemistry* 55:17–54
- Garrels W., Mátés L., Holler S., Dalda A., Taylor U., Petersen B., Niemann H., Izsvák Z., Ivics Z., Kues W.A. (2011). Germline Transgenic Pigs by Sleeping Beauty Transposition in Porcine Zygotes and Targeted Integration in the Pig Genome *PLoS ONE* 6:e23573.
- Geoffrey M. Cooper, Robert E. Hausman 2009 *The cell a molecular approach* 5th edition
- Gisella Puga Yung, Mårten K. J. Schneider, and Jörg D. Seebach1, (2017) *Journal of Immunology Research* Review Article The Role of NK Cells in Pig-to-Human Xenotransplantation 19 page
- Goldman I.L., Kadullin S.G., Razin S.V. (2004) Transgenic animals in medicine: integration and expression of foreign genes, theoretical and applied aspects. *Journal of Cellular Biochemistry* 10:274–285.
- Griffin G, Dansereau M, Gauthier C. (1997), Canadian Council on Animal Care, Guidelines on Transgenic Animals. *Journal of Cellular Biochemistry* 14:715–20

- H.J. Schuurman, (2009) Conditions for undertaking clinical trials of porcine islet products in type 1 diabetes chapter 2, *Xenotransplantation* 16:215e222.
- Hara H, Koike N, Long C, Piluek J, Roh DS, et al. (2011) Initial in vitro investigation of the human immune response to corneal cells from genetically engineered pigs. *52*: 5278-5286.
- Hawthorne WJ, Salvaris EJ, Phillips P, Hawkes J, Liuwantara D, et al. (2014) Control of IBMIR in neonatal porcine islet xenotransplantation in baboons. *14*(6):1300-9
- Hering BJ, Cooper DK, Cozzi E, Schuurman HJ, Korbitt GS, et al. (2009) The International Xenotransplantation Association consensus statement on conditions for undertaking clinical trials of porcine islet products in type 1 diabetes-- executive summary. *Xenotransplantation* 16: 196-202.
- Hobart, M. J., Fernie, B. A. & DiScipio, R. G. (1995). Structure of the human C7 gene and comparison with C6, C8A, C8B, and C9 genes. *154*:5188–94.
- Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA & Ezekowitz RAB. (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284:1313-18..
- Holmskov U, Malhotra R, Sim RB & Jensenius JC. (1994).Collectins collagenous C-type lectins of the innate immune defence system. *15*:67-74
- Huh, J.W., Kim, D.S., Ha, H.S., Ahn, K., Chang, K.T., Cho, B.W., and Kim, H.S. (2009). Identification and molecular characterization of PERV gamma1 long terminal repeats. *27*:119-123.
- Huh, J.W., Kim, D.S., Ha, H.S., Ahn, K., Chang, K.T., Cho, B.W., and Kim, H.S. (2009). Identification and molecular characterization of PERV gamma1 long terminal repeats. *27*:119-123
- J. Denner, (2015)Xenotransplantation and hepatitis E virus, *Xenotransplantation* 22(3):167-73
- J. Segales, G.M. Allan, M. Domingo, (2005) Porcine circovirus diseases, *6* (2):119e142.
- J.A. Fishman, M.A. Greenwald, P.A. Grossi,2002 Transmission of infection with human allografts: essential considerations in donor screening. *55*:720e727.
- J.A. Fishman, Overview: cytomegalovirus and the herpesviruses in transplantation, (2013) *3*:1-8
- J.L. Whitteker, A.K. Dudani, E.S. Tackaberry, (2008) Human fibroblasts are permissive for porcine cytomegalovirus in vitro, *Transplantation* 86 (1):155e162.
- Javier Guillen (2012) FELASA Guidelines and Recommendations *51*(3): 311–321.
- Jefiq L. Platt and John S. Logan (1996) *Transplantation Reviews* 2:10
- Jeon DH, Oh K, Oh BC, Nam DH, Kim CH, Park HB et al. (2007) Porcine PD-L1: cloning, characterization, and implications during xenotransplantation. *Xenotransplantation* 14:236–242

- Jeong YH, Park CH, Jang GH, Jeong YI, Hwang IS, et al. (2013) Production of multiple transgenic Yucatan miniature pigs expressing human complement regulatory factors, human CD55, CD59, and Htransferase genes. 8(5):e63241
- K. Doucette, F.J. Dor, R.A. Wilkinson, et al., (2007). Gene expression of porcine lymphotropic herpesvirus-1 in miniature swine with posttransplant lymphoproliferative disorder, *Transplantation* 83(1):87–90.
- K. Hattermann, C. Roedner, C. Schmitt, et al., (2004) Infection studies on human cell lines with porcine circovirus type 1 and porcine circovirus type 2, *Xenotransplantation* 11 (3):284e294.
- K. Yamada, M. Tasaki, M. Sekijima, et al., (2014) Porcine cytomegalovirus infection is associated with early rejection of kidney grafts in a pig to baboon xenotransplantation model, *Transplantation* 98:411e418.
- K. Yamada, M. Tasaki, M. Sekijima, et al., (2014) Porcine cytomegalovirus infection is associated with early rejection of kidney grafts in a pig to baboon xenotransplantation model, *Transplantation* 98:411e418.
- Karlas A, Kurth R, Denner J (2004) Inhibition of porcine endogenous retroviruses by RNA interference: increasing the safety of xenotransplantation. 325: 18-23.
- Karlas, A., Kurth, R., and Denner, J. (2004). Inhibition of porcine endogenous retroviruses by RNA interference: increasing the safety of xenotransplantation. 325:18-23.
- Kase T, Suzuki Y, Kawai T, Sakamoto T, Ohtani K, Eda S, Maeda A, Okuno Y, Kurimura T & Wakamiya N. (1999). Human mannan-binding lectin inhibits the infection of influenza A virus without complement. 3:385-92.
- Kaulitz D, Fiebig U, Eschricht M, Wurzbacher C, Kurth R, et al. (2011) Generation of neutralising antibodies against porcine endogenous retroviruses (PERVs). 411(1):78-86
- Kaulitz D, Mihica D, Adlhoch C, Semaan M, Denner J (2013) Improved pig donor screening including newly identified variants of porcine endogenous retrovirus-C (PERV-C). 158(2):341-8
- Kaulitz D, Mihica D, Dorna J, Costa MR, Petersen B, et al. (2011) Development of sensitive methods for detection of porcine endogenous retrovirus-C (PERV-C) in the genome of pigs. 175(1):60-5
- Kensaku Anraku,ab Shun Sato,ac Nicholas T. Jacob,a Lisa M. Eubanks,a Beverly A. Ellisa and Kim D. Janda (2017) The design and synthesis of an α -Gal trisaccharide epitope that provides a highly specific anti-Gal immune response 15(14): 2979–2992.
- Kirkman, R. L. (1989). Of swine and men: organ physiology in different species. 16:125
- Klose R, Kemter E, Bedke T, Bittmann I, Kelsner B, et al. (2005) Expression of biologically active human TRAIL in transgenic pigs. 80(2):222-30
- Klymiuk, N., Müller, M., Brem, G., and Aigner, B. (2002). Characterization of porcine endogenous retrovirus gamma pro-pol nucleotide sequences. 76:11738-11743.

- Kobayashi et al., (2012) The pig as a model for translational research: overview of porcine animal models at Jichi Medical University. *Transplantation Research* 1:8.
- Krach, U., Fischer, N., Czauderna, F., and Tönjes, R.R. (2001). Comparison of replication-competent molecular clones of porcine endogenous retrovirus class A and class B derived from pig and human cells. *75:5465-5472*.
- KS Jang, WJ Chung, HK Kim, YG Kim, YS Lee, BG Kim (2008) Selective removal of anti- α -Gal antibodies from human serum by using synthetic α -Gal epitope on a core-shell type resin *13 (4):445-452*
- Kues W.A., Niemann H. (2011) Advances in farm animal transgenesis. *102(2):146-56*
- Langford GA, Galbraith D, Whittam AJ, McEwan P, Fernández-Suárez XM, et al. (2001) In vivo analysis of porcine endogenous retrovirus expression in transgenic pigs. *72: 1996-2000*
- Lawson P & Reid K.B.M.(2000).The roles of surfactant proteins A and D in innate immunity. *173:66-78*
- Le Bas-Bernardet S, Anegón I, Blancho G. (2008) Progress and prospects: Genetic engineering in xenotransplantation. *Gene Ther* 15:1247–1256.
- Le Tissier, P., Stoye, J.P., Takeuchi, Y., Patience, C., and Weiss, R.A. (1997). Two sets of human-tropic pig retrovirus. *389:681-682*.
- Li J, Andreyev O, Chen M, Marco M, Iwase H, et al. (2013) Human T cells upregulate CD69 after coculture with xenogeneic genetically modified pig mesenchymal stromal cells. *285(1-2):23-30*
- Liu D, Kobayashi T, Onishi A, Furusawa T, Iwamoto M, Suzuki S et al. (2007) Relation between human decay-accelerating factor (hDAF) expression in pig cells and inhibition of human serum anti-pig cytotoxicity: value of highly expressed hDAF for xenotransplantation. *Xenotransplantation* 14: 67–73.
- Loos, M. (1985). The complement system: activation and control. *7:18*
- Loveless RW, Holmskov U & Feizi T.(1995). Collectin-43 is a serum lectin with a distinct pattern of carbohydrate recognition. *4:651-59*
- Lu JH, Thiel S, Wiedemann H, Timpl R & Reid KB. (1990). Binding of the pentamer/hexamer forms of mannan-binding protein to zymosan activates the proenzyme C1r2c1s2 complex, of the classical pathway of complement, without involvement of C1q. *144:2287-94*
- M. Michael Swindle, Alison C. Smith (2008) Swine in Biomedical Research *233:239*
- M. Semaan, A. Rotem, U. Barkai, et al., (2013) Screening pigs for xenotransplantation: prevalence and expression of porcine endogenous retroviruses in Gottingen minipigs, *Xenotransplantation* *20:148e156*.
- M.G. Michaels, F.J. Jenkins, K. ST George, et al., (2001) Detection of infectious baboon cytomegalovirus after baboon-to-human liver xenotransplantation, *J. Virol.* *75:2825e2828*.

- Maeda A, Kawamura T, Ueno T, Usui N, Eguchi H, et al. (2013) The suppression of inflammatory macrophage-mediated cytotoxicity and proinflammatory cytokine production by transgenic expression of HLAE. 29: 76-81.
- Magre, S., Takeuchi, Y., and Bartosch, B. (2003). Xenotransplantation and pig endogenous retroviruses. 13:311-329.
- Maksakova, I.A., and Mager, D.L. (2005). Transcriptional regulation of early transposon elements, an active family of mouse long terminal repeat retrotransposons. 79:13865-13874
- Malhotra R, Haurum JS, Thiel S & Sim RB. (1994). Binding of human collectins (SP-A and MBP) to influenza virus. 304:455-61.
- Mankertz, R. Caliskan, K. Hattermann, et al., (2004). Molecular biology of Porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication, Vet. Microbiol. 98(2):81-8
- Marlier, D; Vindevogel, H (2006). "Viral infections in pigeons". 172 (1): 40–51
- Martin, U., Kiessig, V., Blusch, J.H., Haverich, A., von der Helm, K., Herden, T., and Steinhoff, G. (1998). Expression of pig endogenous retrovirus by primary porcine endothelial cells and infection of human cells. 352:692-694.
- Martine Rothblatt (2004) Your Life or Mine
- Mastellos, D. & Lambris, J.D (2002). Complement : more than a “guard” against invading pathogens? Trends in Immunology, 23(10):485- 91.
- Matsunami K, Miyagawa S, Nakagawa K, Otsuka H, Shirakura R. (2006) Molecular cloning of pigGnT-I and I.2: an application to xenotransplantation. 343:677–683.
- Merino, S., Nogueras, M. M., Aguilar, A., Rubires, X., Alberti, S., Benedi, V. J. & Tomas, J. M. (1998). Activation of the complement classical pathway (C1q binding) by mesophilic *Aeromonas hydrophila* outer membrane protein. 66:3825–31.
- Milland J, Christiansen D, Lazarus BD, Taylor SG, Xing PX, Sandrin MS. (2006) The molecular basis for galalpha(1,3)gal expression in animals with a deletion of the alpha1,3galactosyltransferase gene. J Immunol 176: 2448–2454.
- Mitsubishi N, Fischer-Lougheed J, Shulkin I, Kleihauer A, Kohn DB, Weinberg KI et al. (2006) Tolerance induction by lentiviral gene therapy with a nonmyeloablative regimen. 107: 2286–2293
- Miyagawa S, Murakami H, Takahagi Y, Nakai R, Yamada M, et al. (2001) Remodeling of the major pig xenoantigen by Nacetylglucosaminyltransferase III in transgenic pig. 276(42):39310-9
- Mollnes, T.E., Song W.C. & Lambris J.D. (2002). Complement in inflammatory tissue damage and disease. Trend in Immunology, 23 (2):61-64..
- N. Edington, B.E. Straw, S.D. Allaire, W.L. Mengeling, D.J. (1999). Taylor Porcine cytomegalovirus 75:2825

- N.J. Mueller, J.A. Fishman, (2004). Herpesvirus infections in xenotransplantation: pathogenesis and approaches, *Xenotransplantation* 11(6):486-90.
- N.J. Mueller, R.N. Barth, S. Yamamoto, et al., (2002) Activation of cytomegalovirus in pig-to-primate organ xenotransplantation, *76:4734e4740* .
- Nash, J. T., Taylor, P. R., Botto, M., Norsworthy, P. J., Davies, K. A. & Walport, M. J. (2001). Immune complex processing in C1q-deficient mice. *123:196–202*.
- National Committee (February 2004) "Feral Breeds Policy Statement" (<http://RareBreeds.co.nz/feralbreeds.html>). Rare Breeds New Z. Christchurch, NZ: Rare Breeds Conservation Society of New Zealand.
- Neopmuceno, R. R., Ruiz, S., Park, M. & Tenner, A. J. (1999). C1qRp is a heavily O-glycosylated cell surface protein involved in the regulation of phagocytic activity. *162:3583–89*.
- Nguyen, Thuy Thi Dieu (2004). Genetic diversity and distances of Vietnamese and European pig breeds analysed with microsatellite loci. *10: 383*
- Niemann H, Verhoeyen E, Wonigeit K, Lorenz R, Hecker J, et al. (2001) Cytomegalovirus early promoter induced expression of hCD59 in porcine organs provides protection against hyperacute rejection. *Transplantation* 72: 1898-1906.
- Nottle MB, Beebe LF, Harrison SJ, McIlfatrick SM, Ashman RJ, O'Connell PJ et al. (2007) Production of homozygous alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by breeding and somatic cell nuclear transfer. *Xenotransplantation* 14: 339–344.
- O. Garkavenko, M. Muzina, Z. Muzina, et al., (2004) Monitoring for potentially xenozoonotic viruses in New Zealand pigs, *J. Med. Virol.* 72:338-344.
- Ohtani K. (1999) Molecular cloning of a novel human collectin from liver (CL-L1). *274:13681-89*
- Oka S, Itoh n, Kawasaki T & Yamashina I. (1987). Primary structure of rat liver mannan-binding protein deduced from its cDNA sequence. *101:135-44*
- Oldmixon, B.A., Wood, J.C., Ericsson, T.A., Wilson, C.A., White-Scharf, M.E., Andersson, G., Greenstein, J.L., Schuurman, H.J., and Patience, C. (2002). Porcine endogenous retrovirus transmission characteristics of an inbred herd of miniature swine. *76:3045-3048*
- Ooi, L., and Wood, I.C. (2008). Regulation of gene expression in the nervous system. *414:327-341*.
- OPTN e Organ Procurement and Transplantation Network. <http://optn.transplant.hrsa.gov>. Πρόσβαση 4 Φεβρουαρίου 2018
- Oropeza M, Petersen B, Carnwath JW, Lucas-Hahn A, Lemme E, et al. (2009) Transgenic expression of the human A20 gene in cloned pigs provides protection against apoptotic and inflammatory stimuli. *16: 522-534*

- P. J. A. Bollen, A. K. Hansen and H. J. Rasmussen (2000) *The Laboratory Swine*, 70:989–998
- P. Ramanan, R.R. Razonable, (2013). Cytomegalovirus infections in solid organ transplantation 56:1018-29
- P.D. Burbelo, J.A. Ragheb, A. Kapoor, et al., (2013) The serological evidence in humans supports a negligible risk of zoonotic infection from porcine circovirus type 2, 41(6):430e434.
- Park SJ, Cho B, Koo OJ, Kim H, Kang JT, et al. (2014) Production and characterization of soluble human TNFRI-Fc and human HO-1(HMOX1) transgenic pigs by using the F2A peptide. 23: 407-419.
- Patience, C., Switzer, W.M., Takeuchi, Y., Griffiths, D.J., Goward, M.E., Heneine, W., Stoye, J.P., and Weiss, R.A. (2001). Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species. 75:2771-2775.
- Patience, C., Takeuchi, Y., and Weiss, R.A. (1997). Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. 3:282-286.
- Peter Singer (1995) *Animal Liberation* Second edition
- Petersen B, Lucas-Hahn A, Lemme E, et al. (2010) Generation and characterization of pigs transgenic for human hemeoxygenase-1 (hHO-1). *Xenotransplantation* 17: 102-103.
- Petersen B, Ramackers W, Tiede A, Lucas-Hahn A, Herrmann D, et al. (2009) Pigs transgenic for human thrombomodulin have elevated production of activated protein C. 16: 486-495.
- Phelps CJ, Ball SF, Vaught TD, Vance AM, Mendicino M, et al. (2009) Production and characterization of transgenic pigs expressing porcine CTLA4-Ig. 16(6):477-85.
- S. Wynyard, D. Nathu, O. Garkavenko, et al., (2014) Microbiological safety of the first clinical pig islet xenotransplantation trial in New Zealand, *Xenotransplantation* 21 309e323.
- Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, Boone J, Wells KD, et al. (2003) Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. 299: 411-414
- Phelps, C.J., Koike, C., Vaught, T.D., Boone, J., Wells, K.D., Chen, S.H., Ball, S., Specht, S.M., Polejaeva, I.A., Monahan, J.A., et al. (2003). Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* 299, 411-414.
- Platt JL, Fischel RJ, Matas AJ, et al: (1991) Immunopathology hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate model. *Transplantation*, 52:214
- Platt, J.L. (2000). Xenotransplantation. New risks, new gains. 27:29-30.
- Podack, E. R., Olsen, K. J., Lowrey, D. M. & Lichtenheld, M. (1989). Structure and function of perforin. 11:17.
- Poling J, Oezkur M, Kogge K, Mengel M, Niemann H, Winkler M et al. (2006) Hyperacute rejection in ex vivo-perfused porcine lungs transgenic for human complement regulatory proteins. *Transpl Int* 19: 225–232.

- Porubsky S, Speak AO, Luckow B, Cerundolo V, Platt FM, Grone HJ. (2007) Normal development and function of invariant natural killer T cells in mice with isoglobotrihexosylceramide (iGb3) deficiency. *104*: 5977–5982.
- Pour, Parviz M.; Standop, Jens; Batra, Surinder K. (2002). "Are islet cells the gatekeepers of the pancreas?". *Pancreatology*. 2 (5):440–448
- Powell SK, Gates ME, Langford G, Gu ML, Lockey C, et al. (2000) Antiretroviral agents inhibit infection of human cells by porcine endogenous retroviruses. *44*(12):3432-3.
- Ramsoondar J, Vaught T, Ball S, Mendicino M, Monahan J, et al. (2009) Production of transgenic pigs that express porcine endogenous retrovirus small interfering RNAs. *16*(3):164-80
- Reid, K. B. & Day, A. J. (1989). Structure-function relationships of the complement components. *10*:177–80.
- Rose AG, Cooper DK, Human PA et al. (1991) Histopathology of hyperacute rejection of the heart: experimental and clinical observations in allografts and xenografts. *J HeartLung Transplant* 10: 223.
- Rosengard AM, Cary N, Horsley J, Belcher C, Langford GA, et al. (1995) Endothelial expression of human decay accelerating factor in transgenic pig tissue: a potential approach for human complement inactivation in discordant xenografts. *27*: 326-327.
- S. Wynyard, D. Nathu, O. Garkavenko, et al., (2014) Microbiological safety of the first clinical pig islet xenotransplantation trial in New Zealand, *Xenotransplantation* 21:309e323.
- S.A. Busby, C. Crossan, J. Godwin, et al., (2013) Suggestions for the diagnosis and elimination of hepatitis E virus in pigs used for xenotransplantation, *Xenotransplantation* 20:188e192
- Sachs, D. H. (1992) MHC homozygous miniature swine In “Swine as Models in Biomedical Research” 264–270
- Sachs, D. H., Leight, G., Cone, J., Schwarz, S., Stuart, L., and Rosenberg, S. (1976). Transplantation in miniature swine. I. Fixation of the major histocompatibility complex. 559–567
- Sahu, A. & Lambris, J. D. (2001). Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. 35:8.
- Saifuddin M, Hart ML, Gewurz H, Zhang Y & Spear GT. (2000). Interaction of mannose-binding lectin with primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. *4*:949-55
- Sastry K, Herman GA, Day L, Deignan, Bruns G, Morton CC & Ezekowitz RA. (1989). The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10. *170*:1175-89.
- Sastry K, Herman GA, Day L, Deignan, Bruns G, Morton CC & Ezekowitz RA. (1989). The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10. *170*:1175-89.

- Sastry R, Wang JS, Brown DC, Ezekowitz RAB, Tauber AI & Sastry KN. (1995). Characterization of murine mannose-binding protein genes *mb11* and *mb12* reveals features common to other collectin genes. 6:103-10
- Schanbacher, F.L., and Ebner, K.E., (1970). Galactosyltransferase acceptor specificity of the lactose synthetase A protein. 245:5057
- Schuurman HJ (2009) The International Xenotransplantation Association consensus statement on conditions for undertaking clinical trials of porcine islet products in type 1 diabetes--chapter 2: Source pigs. *Xenotransplantation* 16:215-222.
- Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, Dieleman LA, Grenther W, Balish E, Rennick DM, Sartor RB (1998). "Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice". *Infection and Immunity*. 66 (11): 5224–5231.
- Semaan M, Kaulitz D, Petersen B, Niemann H, Denner J (2012) Longterm effects of PERV-specific RNA interference in transgenic pigs. 19(2):112-21
- Semaan M, Rotem A, Barkai U, Bornstein S, Denner J (2013) Screening pigs for xenotransplantation: prevalence and expression of porcine endogenous retroviruses in Göttingen minipigs. 20: 148–156
- Sepkowitz KA (2001). «AIDS—the first 20 years». 344 (23): 1764–72.
- Shaikh-Lesko, Rina (2015). "Parasite's Genes Persist in Host Genomes". *The Scientist*. Retrieved 1-4-2018
- Sponenberg, D.P. (1992). "Colonial Spanish Sheep, Goats, Hogs, and Asses in the United States". 41:415–419.
- Starzl TE, Ishikawa M, Putnam CW, et al, (1974) Progress in and deterrents to orthotopic liver transplantation, with special reference to survival, resistance to hyperacute rejection, and biliary duct reconstruction. *Transplant Proc.*, 6:129.
- Stephan O, Schwendemann J, Specke V, Tacke SJ, Boller K, et al. (2001) Porcine endogenous retroviruses (PERVs): generation of specific antibodies, development of an immunoperoxidase assay (IPA) and inhibition by AZT. *Xenotransplantation* 8: 310-316.
- Stephen Hanessian, Oscar M Saavedra, Vincent Mascitti, Wolfgang, Marterer, Reinhold Oehrlein Ching-Pong Mak (2001) Practical syntheses of B disaccharide and linear B type 2 trisaccharide—non-primate epitope markers recognized by human anti- α -Gal antibodies causing hyperacute rejection of xenotransplants 57:3267-3280
- T. Wu, S.W. Li, J. Zhang, et al., (2012) Hepatitis E vaccine development: a 14 year odyssey, *Hum. Vaccin. Immunother.* 8:823-827.
- Tai HC, Ezzelarab M, Hara H, Ayares D, Cooper DK. (2007) Progress in xenotransplantation following the introduction of gene-knockout technology. 20: 107–117.

- Takeuchi, Y., Patience, C., Magre, S., Weiss, R.A., Banerjee, P.T., Le Tissier, P., and Stoye, J.P. (1998). Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus. *J. Virol.* 72:9986-9991.
- Taveira, N. Ponroy, N.J. Mueller, et al., (2014).Entry of human cytomegalovirus into porcine endothelial cells depends on both the cellular vascular origin and the viral strain, *Xenotransplantation* 21(4):324-40
- Taylor ME, Brickell PM, Craig Rk & Summerfield JA. (1989). Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannose-binding protein. *262:763-71.*
- The New Zealand Kunekune Association. "Miniature" kunekune pigs". The New Zealand Kunekune Association.
- Therapeutic Products Programme, Health Canada, Proposed Canadian Standards for Xenotransplantation, Draft 14:7-8
- Turner MW. (1996) Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *17:532-40.*
- Turner MW. (1998) Mannose-binding lectin (MBL) in health and disease. *199:327-39.* .
- UNOS - United Network for Organ Sharing (UNOS). <http://www.unos.org> Πρόσβαση 4 Φεβρουαρίου 2018
- V.A. Morozov, A.V. Morozov, A. Rotem, et al., (2015) Extended microbiological characterization of Gottingen minipigs in the context of xenotransplantation: vertical transmission of hepatitis E virus. *10:e0139893*
- Vanderpool, H. Y. (1999). "Xenotransplantation: Progress and promise". *319 (7220): 1311.*
- Waechter A, Denner J (2014) Novel neutralising antibodies targeting the N-terminal helical region of the transmembrane envelope protein p15E of the porcine endogenous retrovirus (PERV). *58: 9-19.*
- Waechter A, Eschricht M, Denner J (2013) Neutralization of porcine endogenous retrovirus by antibodies against the membrane-proximal external region of the transmembrane envelope protein. *J Gen Virol* 94:643-651.
- Watanabe S, Misawa M, Matsuzaki T, Sakurai T, Muramatsu T, Yokomine TA et al. (2008) Production and characterization of transgenic mice systemically expressing endo-beta-galactosidase C. *Glycobiology* 18: 9–19.
- Weiss EH, Lilienfeld BG, Müller S, Müller E, Herbach N, et al. (2009) HLA-E/human beta2-microglobulin transgenic pigs: protection against xenogeneic human anti-pig natural killer cell cytotoxicity. *Transplantation* 87: 35-43.
- Wetsel, R. A. (1995). Structure, function and cellular expression of complement anaphylatoxin receptors. *7:48–53.*

- Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H., (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. 385:810–813.
- Wilson, C.A., Laeeq, S., Ritzhaupt, A., Colon-Moran, W., and Yoshimura, F.K. (2003). Sequence analysis of porcine endogenous retrovirus long terminal repeats and identification of transcriptional regulatory regions. 77:142-149.
- Wu G, Pfeiffer S, Schroder C, Zhang T, Nguyen BN, Kelishadi S et al. (2007) Coagulation cascade activation triggers early failure of pig hearts expressing human complement regulatory genes. *Xenotransplantation* 14: 34–47.
- Wuensch A, Baehr A, Bongoni AK, Kemter E, Blutke A, et al. (2014) Regulatory sequences of the porcine THBD gene facilitate endothelial-specific expression of bioactive human thrombomodulin in single- and multitransgenic pigs. *Transplantation* 97: 138-147.
- X.J. Meng, (2010) Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk, *Vet. Microbiol.* 140:256-265.
- Y. Kim, C. Lee, (2013) Ribavirin efficiently suppresses porcine nidovirus replication, 171:44e53.
- Yang H, Zhong R. (2007) The role of anti-non-Gal antibodies in xenograft rejection in a pig-to-baboon kidney transplantation model. *Xenotransplantation* 14:184–186..
- Yang P., Wang J., Gong G., Sun X., Zhang R., Du Z., Liu Y., Li R., Ding F., Tang B., et al. (2008) Cattle Mammary Bioreactor Generated by a Novel Procedure of Transgenic Cloning for Large-Scale Production of Functional Human Lactoferrin, 3:3453.
- Yang YG, Sykes M. 2007. *Xenotransplantation: Current status and a perspective on the future.* 7:519–531.
- Yazaki S, Iwamoto M, Onishi A, Miwa Y, Suzuki S, et al. (2009) Successful cross-breeding of cloned pigs expressing endo-beta-galactosidase C and human decay accelerating factor. 16: 511-521.
- Zeyland J, Woniak A, Gawrońska B, Juzwa W, Jura J, et al. (2014) Double Transgenic Pigs with Combined Expression of Human α 1,2-Fucosyltransferase and α -Galactosidase Designed to Avoid Hyperacute Xenograft Rejection. 14(6):1300-9
- Zhou CY, McInnes E, Copeman L, Langford GA, Parsons N, et al. (2005) Transgenic pigs expressing human CD59, in combination with human membrane cofactor protein and human decay-accelerating factor. *Xenotransplantation* 12: 142-148.