

ЭНДОГЕННЫЕ РЕТРОВИРУСЫ СВИНЬИ: НАСКОЛЬКО ВЕЛИК РИСК ИНФЕКЦИИ ПРИ КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИИ?

Н.С. Юдин, Р.Б. Айтназаров, В.И. Ермолаев

Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: yudin@bionet.nsc.ru

В обзоре рассмотрены современные работы о биологии эндогенных ретровирусов свиньи. Обсуждаются данные о нуклеотидных последовательностях ретровирусов, их экспрессии и выделении зрелых вирионов. Подробно рассмотрены проблема тропизма эндогенных ретровирусов свиньи к клеткам человека и ретроспективные исследования на больных. Проведен критический анализ работ по межвидовому переносу эндогенных ретровирусов свиньи в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Обсуждены подходы для профилактики и лечения возможной инфекции у человека. На основании анализа литературы сделан вывод, что риск распространения инфекции от реципиентов ксенотрансплантатов на остальное население, по-видимому, чрезвычайно низок. Этот минимальный риск может быть снижен далее путем тщательного наблюдения и, вероятно, вакцинации контактирующих лиц, а также профилактическим применением антивирусных препаратов. Понижения существующего незначительного риска инфекции также можно добиться путем применения достижений биотехнологии для получения свиней, которые не обладают эндогенными ретровирусами, тропными к человеку.

Ключевые слова: эндогенные ретровирусы свиньи, ксенотрансплантация, свинья *Sus scrofa*.

Введение

Более 40 лет назад было обнаружено, что некоторые линии клеток свиньи выделяют вирусные частицы с морфологическими и иммунологическими свойствами ретровирусов типа C (Breese, 1970; Альтштейн и др., 1972). Аналогичные вирусные частицы были позднее выделены от свиней, больных лейкемией (Suzuka *et al.*, 1986). Согласно номенклатуре Международного комитета по таксономии вирусов, эти вирусы отнесены к отдельному семейству Retroviridae, подсемейству Orthoretrovirinae, роду Gammaretrovirus, виду Porcine type-C oncovirus (ICTV, 2011). Однако в литературе более распространено тривиальное название Porcine Endogenous Retrovirus (PERV). PERV являются составной частью ДНК герминативных клеток свиньи и могут размножаться в клетках человека. Эти открытия вызвали многочисленные исследования потенциальной опасности PERV при ксенотрансплантации, поскольку каждая клетка ксенотрансплантата свиньи может стать потенциальным источником троп-

ных к человеку ретровирусов, которые нельзя элиминировать путем содержания свиней в специфических свободных от патогена условиях или путем серии простых скрещиваний (см. обзоры Denner, 2008; Wilson, 2008; Ekser *et al.*, 2009; Scobie, Takeuchi, 2009; Klymiuk *et al.*, 2010; Meije *et al.*, 2010).

Молекулярно-генетическая характеристика PERV

Первые нуклеотидные последовательности PERV были получены при исследовании линий клеток свиньи PK15 и MPK (Patience *et al.*, 1997) и активированных мононуклеарных клеток периферической крови свиней (Wilson *et al.*, 1998). По структуре нуклеотидных последовательностей PERV подразделяют на 3 типа – А, В и С. Представители разных типов обнаруживают высокую гомологию в генах *gag* (group-specific-antigens) и *pol* (polymerase), но не совпадают по нуклеотидной последовательности в рецептор-связывающем домене гена *env* (envelope), кодирующего белок оболочки

вируса (Le Tissier *et al.*, 1997; Akiyoshi *et al.*, 1998; Takeuchi *et al.*, 1998). Эти несовпадения определяют другой круг хозяев вирусов, принадлежащих к разным типам.

Анализ ДНК PERV показал, что они содержат все структурные признаки способных к репликации ретровирусов (Akiyoshi *et al.*, 1998; Czauderna *et al.*, 2000; Tonjes *et al.*, 2000; Krach *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010a). Способность к репликации отличает эти «классические» PERV от других семейств гамма- и бета-ретровирусов, которые, вероятно, являются дефектными по репликации и поэтому не имеют большого значения для оценки риска, возникающего при трансплантации тканей свиньи (Ericsson *et al.*, 2001; Patience *et al.*, 2001). Было показано, что геном свиньи содержит не только дефектные провирусы, которым необходимо рекомбинировать, прежде чем они достигнут способности к производству полноценных вирионов, но также полноразмерные копии PERV (Rogel-Gaillard *et al.*, 1999; Tonjes *et al.*, 2000). Имеются работы по физическому картированию PERV на хромосомах свиньи путем флуоресцентной гибридизации *in situ* (Lee *et al.*, 2002; Jung *et al.*, 2010). В результате исследования домашних свиней пород крупная белая, ландрас и диких кабанов установлены ассоциации ретровируса PERV-A с локусами эритроцитарных антигенов *EAE*, *EAK*, *LPB* и полом животных, а также ретровируса PERV-B с локусами *aM*, *EAE* и *LPB* (Айтназаров и др., 2006). Причем у разных типов и пород свиней эти ассоциации могут присутствовать или отсутствовать. Статистический анализ встречаемости хромосом-носителей PERV-A, PERV-B и PERV-C показал, что у домашних свиней встречаемость хромосом-носителей PERV и гаплотипов, состоящих из двух и трех типов PERV, выше, чем у диких кабанов (Никитин и др., 2008).

Копии PERV в геномах свиней разных пород отличаются по нуклеотидному составу, экспрессии и способности кодировать инфекционный вирус. Считается, что геном свиньи может содержать от 6 до 10 способных к репликации провирусов, от 30 до 50 полноразмерных копий PERV и от 100 до 200 локусов, содержащих их частичную последовательность (Niebert, Tonjes, 2005). Исследование свиней крупной белой породы с целью оценки числа геномных

последовательностей, которые могут кодировать полноразмерные, способные к репликации провирусы, показало, что хромосомное распределение и число копий провирусов различаются у разных особей (Rogel-Gaillard *et al.*, 1999; Bosch *et al.*, 2000; Herring *et al.*, 2001a). Геномы PERV были также проанализированы у свиней пород вестран (Lee *et al.*, 2002; Niebert, Tonjes, 2003), дюрок, ландрас, йоркширской, беркширской и их гибридов (Jin *et al.*, 2000; Edamura *et al.*, 2004), свиней нескольких китайских пород (Jin *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010b), кабанов Западной Европы (Niebert, Tonjes, 2003). Как и в случае крупной белой породы, последовательности PERV у этих пород были разбросаны по геному, при этом отмечались межпородные и внутривидовые различия по числу копий, хромосомной локализации и наличию полноразмерных последовательностей.

Анализ PERV у пород домашних свиней показал, что, хотя PERV типов А и В преобладают в геномах всех исследованных пород, однако довольно часто встречаются животные, у которых отсутствуют PERV типа С (Bosch *et al.*, 2000; Никитин и др., 2008; Юдин и др., 2009; Айтназаров и др., 2010; Nikitin *et al.*, 2010). По встречаемости особей с хромосомами-носителями PERV разных классов и их сочетаний существуют различия между породами домашних свиней, между дикими кабанями и домашними свиньями, а также между дикими кабанями Восточной Европы и Средней Азии (Jin *et al.*, 2000; Никитин и др., 2008; Айтназаров и др., 2010).

Нуклеотидные последовательности генов, кодирующих белки PERV *gag*, *pol* и *env*, имеют высокое сходство с последовательностями соответствующих генов гамма-ретровирусов приматов, кошки и мыши (Akiyoshi *et al.*, 1998; Czauderna *et al.*, 2000; Tonjes *et al.*, 2000). Филогенетический анализ показал, что PERV наиболее близки вирусу лейкемии обезьян-гиббонов (GALV), эндогенному ретровирусу коалы (KoRV) (Hanger *et al.*, 2000) и индуцируемому эндогенному ретровирусу мыши (MDEV) (Miller *et al.*, 1996; Wolgamot *et al.*, 1998). PERV стали неотъемлемой частью генома вида *Sus scrofa*, очевидно, еще до возникновения рода *Sus*, о чем свидетельствует их присутствие у нескольких видов кистеуших свиней и бородавочников (Niebert, Tonjes, 2005).

По-видимому, PERV могут быть причиной изменений физиологических функций организма в ходе эволюции. Статистический анализ частот хромосом-носителей типов и сочетаний типов PERV показывает, что микроэволюционные процессы, связанные с частотой носительства PERV в популяциях диких и домашних форм свиней вида *S. scrofa*, имеют два основных вектора: различной интенсивности жиротложения и негативных изменений развития продуктивных признаков (Юдин и др., 2009; Nikitin *et al.*, 2010).

Экспрессия РНК и выделение вирионов PERV клетками свиньи

Экспрессия РНК PERV обнаружена в нескольких типах тканей, включая почки, легкие, кожу, печень, сердце и панкреатические островки (Le Tissier *et al.*, 1997; Patience *et al.*, 1997; Akiyoshi *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 1998a; van der Laan *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2010). Однако экспрессия вирусной РНК по ряду причин может не коррелировать с выделением инфекционных частиц. Например, большинство локусов PERV, присутствующих в геноме свиньи, вероятно, содержат мутации сдвига рамки считывания или преждевременные стоп-кодоны, что приводит к нарушению экспрессии одного или большего числа вирусных генов, делая этот локус неспособным к репликации. Эта возможность была показана на линии клеток свиньи ST-IOWA: хотя эта клеточная линия экспрессирует РНК как PERV-A, так и PERV-B, это не приводит к образованию инфекционных вирусных частиц (Patience *et al.*, 1997).

Для того чтобы исключить предположение о том, что способные к репликации PERV выделяются исключительно иммортализованными клеточными линиями свиньи (Patience *et al.*, 1997), были проведены эксперименты по исследованию продукции инфекционных PERV первичными клеточными культурами. Была продемонстрирована выработка вируса PERV при митогенной активации мононуклеарных клеток периферической крови мини-свиней (Wilson *et al.*, 1998). Отметим, что все эти вирусы возникли в результате рекомбинации между последовательностями гена *env* политропного типа PERV-A и экотропного типа PERV-C.

Способный к репликации клон PERV-A был выделен из ВАС-библиотеки, полученной от свиньи крупной белой породы (Rogel-Gaillard *et al.*, 1999; Tonjes *et al.*, 2000). Высвобождение инфекционных вирионов PERV даже в отсутствие митогенной активации наблюдали также на первичной культуре клеток эндотелия аорты, полученной от свиней пород крупная белая, ландрас, юкатанских и геттингенских мини-свиней (Martin *et al.*, 1998a). Исследование интенсивности продукции PERV в мононуклеарных клетках периферической крови, полученных от животных различных пород, выявило различия не только между породами, но также между животными внутри одной породы (Tacke *et al.*, 2000). По-видимому, инфекционные вирионы PERV также продуцируются клетками свиньи *in vivo*, поскольку способный к репликации вирус был выделен из плазмы крови животных (Takefman *et al.*, 2001). Более того, вирусная РНК и активность обратной транскриптазы были обнаружены в клинических препаратах фактора VIII свиньи, хотя авторы не смогли выделить из них инфекционный вирус (Takefman *et al.*, 2001).

Инфекционный титр PERV, полученных из клеток свиньи, чрезвычайно низок по сравнению с титрами других ретровирусов (Blusch *et al.*, 2002). Клетки свиньи способны активно сопротивляться инфекции PERV, например, с помощью белков индуцируемых цитидиновых деаминаз семейства APOBEC (Dorrschuck *et al.*, 2011) или белка тетерина (Mattiuzzo *et al.*, 2010). Белки семейства APOBEC играют большую роль во врожденном противовирусном иммунитете и способны индуцировать многочисленные мутации цитидина на уридин в ДНК провируса. Эти мутации нарушают экспрессию ретровируса, приводя к появлению нежизнеспособных вирионов. Искусственное заражение свиней рекомбинантами PERV A/C не приводило ни к интеграции провирусов в ДНК, ни к выработке соответствующих антител, что свидетельствует о трудности передачи ретровируса между животными (Kaulitz *et al.*, 2011b).

Пассирование в линиях клеток человека быстро приводит к существенному повышению инфекционного титра PERV. В случае PERV, выделяющихся из активированных мононуклеарных клеток периферической крови свиней,

это сопровождается отбором вируса, содержащего рекомбинантный ген *env*, состоящий из последовательностей PERV-A и PERV-C (Wilson *et al.*, 2000). Однако не ясно, может ли происходить такая рекомбинация *in vivo*. Если это будет показано, то способные к размножению вирусы, несмотря на чрезвычайно низкую частоту, возможно, смогут образовываться даже у животных, утративших все способные к репликации копии провирусов. Другим механизмом, отвечающим за повышение способности PERV к репликации, являются мутации в промоторных участках LTR (Czauderna *et al.*, 2000; Denner *et al.*, 2003).

Тропизм PERV к клеткам человека и ретроспективные исследования на реципиентах ксенотрансплантатов

Многие клетки человека экспрессируют рецепторы, специфичные для PERV типов А и В, в то время как рецепторы, специфичные для PERV-C, на них в большинстве случаев не обнаружены (Takeuchi *et al.*, 1998; Ericsson *et al.*, 2003; Marcucci *et al.*, 2009; Nakaya *et al.*, 2011a). Соответственно, политропные вирусы PERV-A и PERV-B способны инфицировать клетки человека, а экотропный вирус PERV-C инфицирует только клетки свиньи. Показано, что рекомбинанты PERV-A/C также способны инфицировать клетки человека, причем их провирусы способны интегрироваться *de novo* в геномы соматических (но не герминативных) клеток (Denner, 2008; Karlas *et al.*, 2010). Исследования с использованием вируса, полученного преимущественно из клеток свиньи линии PK15, показали возможность переноса PERV в некоторые линии клеток человека (Patience *et al.*, 1997; Takeuchi *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2000; Specke *et al.*, 2001). Однако многие клеточные линии, даже если они имеют рецепторы к PERV, не поддерживают развитие вирусной инфекции (Patience *et al.*, 1997; Takeuchi *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 2000; Mattiuzzo, Takeuchi, 2010).

Перенос эндогенных ретровирусов свиньи и, в некоторых случаях, даже их репликация были продемонстрированы для культур первичных эндотелиальных клеток, фибробластов и мезангиальных клеток человека (Blusch *et al.*, 2000;

Martin *et al.*, 2000). Эндотелиальные клетки представляют особый интерес, поскольку этот тип клеток является основным тканевым барьером для PERV. Работы по изучению инфицирования мононуклеарных клеток периферической крови человека дали весьма противоречивые результаты. Некоторые исследователи получили доказательства продуктивной инфекции PERV в этих клетках (Specke *et al.*, 2001), в то время как другие – не смогли зафиксировать репликацию вируса в них (Wilson *et al.*, 2000). Однако, поскольку ряд важных факторов, таких, как штамм вируса и методы, использованные для обнаружения его репликации, у этих авторов различались, для объяснения этого несоответствия необходимы дальнейшие исследования.

Иммунная система человека препятствует инфекции ксенозоонозных ретровирусов через разнообразные механизмы включая гуморальный и клеточный иммунитет, специфические и неспецифические иммунные реакции. Поскольку клетки человека и приматов Старого Света не экспрессируют альфа-1,3-галактозилтрансферазу, в результате постоянного контакта с микроорганизмами, несущими альфа-1,3-галактозу, у них в крови появляются высокие титры анти-gal-антител. Эти естественные антитела, по-видимому, также эффективно нейтрализуют гамма-ретровирусы включая PERV. Поскольку PERV, продуцируемые клетками свиньи, имеют альфа-галактозил-эпитопы, ассоциированные с оболочечным гликопротеином, в экспериментах *in vitro* они инактивировались белками комплемента сыворотки крови (Rother, Squinto, 1996; Takeuchi *et al.*, 1996; Reed *et al.*, 1997).

Все исследования, опубликованные до настоящего времени в отношении больных, которых лечили с использованием клеток, тканей или органов свиньи, не представили ни одного доказательства развития инфекции PERV у человека *in vivo* (Heneine *et al.*, 1998; Patience *et al.*, 1998; Paradis *et al.*, 1999; Dinsmore *et al.*, 2000; Levy *et al.*, 2000; Schumacher *et al.*, 2000; Herring *et al.*, 2001b; Di Nicuolo *et al.*, 2010; Mattiuzzo, Takeuchi, 2010; Valdes-Gonzalez *et al.*, 2010). Хотя полученные результаты являются весьма обнадеживающими, эти исследования имеют несколько недостатков. Во всех случаях единственным типом клеток, которые анализировали на присутствие PERV, были мононуклеарные

клетки периферической крови. Поскольку еще окончательно не установлено, экспрессируют ли клетки этого типа рецепторы для PERV и способны ли они к распространению инфекции (Wilson *et al.*, 1998; Specke *et al.*, 2001), то нельзя исключить, что репликация PERV происходила в другом типе клеток. В большинстве случаев время контакта пациента с клетками свиньи было весьма ограниченным. Ясно, что с увеличением времени выживания трансплантата вероятность переноса PERV будет также увеличиваться. В настоящее время наибольший срок ретроспективного исследования на больных, при лечении которых использовали печень свиньи, составляет около 9 лет (Di Nicuolo *et al.*, 2010). У реципиентов ксенотрансплантатов не анализировали вероятное снижение уровня белков комплемента крови в процессе лечения, которое должно усилить выживание вируса и повысить риск потенциальной инфекции PERV. Снижение титра естественных анти-gal-антител, которое должно способствовать выживанию PERV в крови, анализировали только у двух пациентов при кратковременной экстракорпоральной перфузии ксеногенной почки (Patience *et al.*, 1998).

Остается неясным, являются ли обнадеживающие до настоящего времени данные результатом реального отсутствия продукции вируса клетками свиньи или результатом эффективной иммунологической инактивации высвобождаемых вирусных частиц, например, посредством анти-gal-антител или белков комплемента. Поэтому потенциальная опасность переноса PERV при клинических манипуляциях сохраняется, что делает необходимым продолжение режима жесткого вирусологического контроля.

Исследование переноса PERV на животных

Клетки некоторых видов мелких животных включая мышь, крысу, кошку и норку экспрессируют рецепторы к PERV и в некоторых случаях чувствительны к инфицированию (Patience *et al.*, 1997; Takeuchi *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1998; Specke *et al.*, 2001). Поэтому мелких животных можно использовать в качестве модели для изучения факторов, влияющих на перенос PERV *in vivo*. Недостатком исследований на

мелких животных является то, что наиболее важный у человека барьер против инфекции PERV – узнавание иммунной системой альфа-галактозил-эпитопов у этих видов отсутствует. Поэтому только мыши Gal-KO, у которых нокаутирован ген альфа-1,3-галактозилтрансферазы, могут считаться наиболее адекватной моделью (Gock *et al.*, 2000). Однако, поскольку на мышах еще не разработаны схемы для иммуносупрессии, сравнимые со схемами для приматов, полная имитация условий клинической ксенотрансплантации на мелких животных остается труднодостижимой целью.

Например, незначительный уровень инфекции PERV отмечен после трансплантации островков поджелудочной железы мышам SCID (van der Laan *et al.*, 2000). Перенос PERV мышам SCID не является неожиданностью, поскольку было показано, что некоторые клеточные линии мыши чувствительны к инфекции PERV (Takeuchi *et al.*, 1998), а мыши SCID утратили как клеточный, так и гуморальный иммунитет. Более того, остается невыясненным, влияют ли на инфекцию PERV в этой модели эндогенные вирусы мыши. Критическим вопросом в оценке пригодности моделей остается определение того, могут ли PERV распространяться сами по себе или им необходимо псевдотипирование ксенотропными эндогенными ретровирусами видов-хозяев (Yang *et al.*, 2004). В последнем случае рассматриваемая модель может быть неприменимой к ксенотрансплантации у человека, поскольку эти вирусы могут отсутствовать в ДНК герминативных клеток человека.

Вопрос об адекватности использования приматов в качестве модели для изучения возможного инфицирования PERV человека остается спорным. Хотя в ряде экспериментов было показано, что приматы не восприимчивы к PERV (Patience *et al.*, 1997; Takeuchi *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 1999; Mattiuzzo, Takeuchi, 2010), тем не менее, в некоторых работах была показана возможность инфицирования PERV различных клеточных линий приматов *in vitro* (Blusch *et al.*, 2000; Specke *et al.*, 2001). Например, не было получено доказательство инфекции PERV у 15 бабуинов, подвергавшихся иммуносупрессорной терапии циклофосфамидом, через 2 года после трансплантации эндотелиальных клеток свиньи (Martin *et al.*, 1998b). 12 маргышек также были

исследованы после ксенотрансплантации почек, в плазме животных не обнаружили присутствия РНК PERV. Ксенотрансплантаты в этом случае выживали в течение 15 дней, экспозиция к вирусу, выделявшемуся клетками свиньи, была незначительной (Loss *et al.*, 2001).

Ключевой вопрос оценки значимости этих моделей заключается в относительной заражаемости клеток человека и приматов. Более того, интерпретация данных может быть вновь усложнена в связи с наличием псевдотипирования экотропными ретровирусами приматов, такими, как эндогенный ретровирус бабуина (BaEV). В результате необходимы более тщательные исследования клеточного тропизма и потенциального псевдотипирования, для того чтобы судить о пригодности приматов для исследования переноса PERV.

Подходы для профилактики и лечения возможной инфекции PERV у человека

Интактная иммунная система человека, вероятно, способна элиминировать инфекцию PERV, например, с участием белков APOBEC или тетерина (Mattiuzzo *et al.*, 2010; Dorrschuck *et al.*, 2011). Однако неизвестно, может ли инфекция PERV приводить к снижению врожденного противовирусного иммунитета пациентов с ксенотрансплантацией. Конечно, риск распространения вызванной PERV инфекции среди населения в настоящее время носит, скорее, гипотетический характер, поскольку все больные находятся под пристальным эпидемиологическим контролем. Однако эта ситуация может быстро измениться, как только ксенотрансплантация станет более рутинной процедурой. Например, такие вопросы, как согласие пациента на режим мониторинга, могут существенно повлиять на способность обнаружения ранних признаков инфекции PERV, если она возникнет. Поэтому для того чтобы исключить какой-либо риск инфекции PERV, желательно получить свиней, утративших все тропные к человеку PERV. Насколько реалистична такая возможность?

Экспрессия РНК PERV найдена практически у всех изученных пород домашних свиней. Однако секвенирование ДНК полного генома свиньи может помочь характеризовать и отбирать животных-доноров с пониженной инфек-

ционной способностью PERV (PGSP, 2011). Поскольку большинство копий PERV, вероятно, являются дефектными и только несколько полноразмерных копий вносят вклад в репликацию компетентных вирусов, экспрессия РНК в целом не должна коррелировать с выработкой инфекционных вирионов. Поэтому контроль за способными к репликации PERV может быть достигнут путем селекции или нокаутных технологий, после того как только будут идентифицированы эти критические локусы. Обнадешивает то, что уже разрабатываются высокоэффективные технологии, которые позволяют вмешиваться в работу единичных генов свиньи. Например, получены трансгенные свиньи с мутантным геном гентингтина, который является геном-кандидатом хорей Гентингтона (Uchida *et al.*, 2001) и геном зеленого флуоресцентного белка (Kurome *et al.*, 2008). Недавно была получена первичная культура эмбриональных фибробластов свиньи, экспрессирующая ген эндо-бета-галактозидазы С из бактерии *Clostridium perfringens* (Himaki *et al.*, 2010). В последние годы большие успехи достигнуты в повышении эффективности клонирования свиней путем переноса ядер соматических клеток в энуклеированные ооциты (Yamanaka *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Sugimura *et al.*, 2010). Однако элиминации нескольких функционирующих интактных копий PERV еще не достаточно для исключения выделения инфекционных PERV из-за потенциальной рекомбинации усеченных вариантов. Тем не менее удаление способных к репликации PERV из генома существенно снизит этот риск.

В дополнение к вышеперечисленным подходам можно ингибировать экспрессию и выделение PERV, используя другие методы, например генно-инженерные технологии с антисмысловыми РНК или ингибирующими антителами (Kaulitz *et al.*, 2011a; Nakaya *et al.*, 2011b). Однако маловероятно, что эти технологии будут в состоянии полностью предотвратить экспрессию вирусной РНК или нейтрализовать функцию вирусных белков. Если у пациента с ксенотрансплантатом возникнет инфекция, которая приведет к развитию заболевания, одним из средств ее лечения будет применение противовирусной лекарственной терапии. В настоящее время для того чтобы избежать появления

устойчивых к лекарствам линий ретровирусов, наиболее эффективно применение терапии, возмещающей на вирус несколькими путями, например, конкурентное использование нескольких ингибиторов обратной транскриптазы и протеаз. Существенная анти-PERV-активность была обнаружена для азидотимидина. Все другие ингибиторы, которые уже применяются для лечения человека, неэффективны против PERV (Qari *et al.*, 2001). Поскольку азидотимидин обладает рядом токсических побочных эффектов, в настоящее время неясно, может ли пациент с тяжелой иммуносупрессивной терапией выдержать дополнительную антиретровирусную терапию и будет ли оправдано использование таких препаратов для профилактического подавления вируса, который, как, возможно, будет доказано, является полностью апатогенным.

Для профилактики, вероятно, также следует использовать различные стратегии иммунизации. Активная вакцинация, вероятно, менее подходит для использования в ксенотрансплантации, поскольку реципиенты трансплантатов свиньи будут подвергаться продолжительной лекарственной иммуносупрессии, особенно эффективной в отношении В-клеток. Хотя возможно, что анти-PERV антитела могут быть индуцируемыми, вероятно, что их титры, несмотря на предыдущую вакцинацию, будут низкими. Более того, поскольку белки PERV, вероятно, экспрессируются в ксенотрансплантате, как активная, так и пассивная иммунологическая борьба с PERV будет вносить вклад в отторжение трансплантата и будет малоприменима.

Таким образом, наиболее перспективной является концепция использования свиней, которые не обладают PERV, тропными к человеку. Такие свиньи должны гарантировать снижение существующего незначительного риска инфекции PERV у реципиентов ксенотрансплантатов. Риск распространения «очеловеченных» PERV от инфицированных пациентов на тесно контактирующий с ними медперсонал и далее на общую популяцию, вероятно, чрезвычайно низок. Этот минимальный риск развития заболевания может быть далее снижен путем тщательного наблюдения и, вероятно, вакцинации контактирующих лиц, а также профилактическим применением антивирусных препаратов. По-

видимому, проблема потенциальной опасности PERV для человека будет успешно решена уже в ближайшие годы.

Литература

- Айтназаров Р.Б., Ермолаев В.И., Никитин С.В. и др. Ассоциации эндогенных ретровирусов разных типов с генетическими маркерами в популяциях домашних и диких свиней // Докл. РАСХН. 2006. № 4. С. 39–43.
- Айтназаров Р.Б., Никитин С.В., Князев С.П. и др. Распространение свинных эндогенных ретровирусов у разных форм *Sus scrofa* L. 1758 (Suidae, Mammalia) // Сиб. вестн. с.-х. науки. 2010. № 9. С. 49–54.
- Альтштейн А.Д., Герасина С.Ф., Захарова Л.Г. и др. Онкорнавирус типа С в культуре перевиваемых клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ) // Вопр. вирусологии. 1972. № 2. С. 222–226.
- Никитин С.В., Юдин Н.С., Князев С.П. и др. Оценка частоты хромосом, содержащих свинные эндогенные ретровирусы, в популяциях домашней свиньи и дикого кабана // Генетика. 2008. Т. 44. № 6. С. 789–797.
- Юдин Н.С., Айтназаров Р.Б., Князев С.П. и др. Дифференциация популяций диких и домашних свиней по частоте хромосом, содержащих эндогенные ретровирусы // Информ. вестник ВОГиС. 2009. Т. 13. № 4. С. 741–750.
- Akiyoshi D.E., Denaro M., Zhu H. *et al.* Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine // J. Virol. 1998. V. 72. N 5. P. 4503–4507.
- Blusch J.H., Patience C., Martin U. Pig endogenous retroviruses and xenotransplantation // Xenotransplantation. 2002. V. 9. N 4. P. 242–251.
- Blusch J.H., Patience C., Takeuchi Y. *et al.* Infection of nonhuman primate cells by pig endogenous retrovirus // J. Virol. 2000. V. 74. N 16. P. 7687–7690.
- Bosch S., Arnauld C., Jestin A. Study of full-length porcine endogenous retrovirus genomes with envelope gene polymorphism in a specific-pathogen-free Large White swine herd // J. Virol. 2000. V. 74. N 18. P. 8575–8581.
- Breese S.S. Virus-like particles occurring in cultures of stable pig kidney cell lines // Arch. Gesamte Virusforsch. 1970. V. 30. N 4. P. 401–404.
- Czaderka F., Fischer N., Boller K. *et al.* Establishment and characterization of molecular clones of porcine endogenous retroviruses replicating on human cells // J. Virol. 2000. V. 74. N 9. P. 4028–4038.
- Denner J. Recombinant porcine endogenous retroviruses (PERV-A/C): a new risk for xenotransplantation? // Arch. Virol. 2008. V. 153. N 8. P. 1421–1426.

- Denner J., Specke V., Thiesen U. *et al.* Genetic alterations of the long terminal repeat of an ecotropic porcine endogenous retrovirus during passage in human cells // *Virology*. 2003. V. 314. N 1. P. 125–133.
- Dinsmore J.H., Manhart C., Raineri R. *et al.* No evidence for infection of human cells with porcine endogenous retrovirus (PERV) after exposure to porcine fetal neuronal cells // *Transplantation*. 2000. V. 70. N 9. P. 1382–1389.
- Di Nicuolo G., D'Alessandro A., Andria B. *et al.* Long-term absence of porcine endogenous retrovirus infection in chronically immunosuppressed patients after treatment with the porcine cell-based Academic Medical Center bioartificial liver // *Xenotransplantation*. 2010. V. 17. N 6. P. 431–439.
- Dorrschuck E., Fischer N., Bravo I.G. *et al.* Restriction of porcine endogenous retrovirus by porcine APOBEC3 cytidine deaminases // *J. Virol.* 2011. V. 85. N 8. P. 3842–3857.
- Edamura K., Nasu K., Iwami Y. *et al.* Prevalence of porcine endogenous retrovirus in domestic pigs in Japan and its potential infection in dogs xenotransplanted with porcine pancreatic islet cells // *J. Vet. Med. Sci.* 2004. V. 66. N 2. P. 129–135.
- Ekser B., Rigotti P., Gridelli B., Cooper D.K. Xenotransplantation of solid organs in the pig-to-primate model // *Transpl. Immunol.* 2009. V. 21. N 2. P. 87–92.
- Ericsson T., Oldmixon B., Blomberg J. *et al.* Identification of novel porcine endogenous betaretrovirus sequences in miniature swine // *J. Virol.* 2001. V. 75. N 6. P. 2765–2770.
- Ericsson T.A., Takeuchi Y., Templin C. *et al.* Identification of receptors for pig endogenous retrovirus // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. N 11. P. 6759–6764.
- Gock H., Salvaris E., Murray-Segal L. *et al.* Hyperacute rejection of vascularized heart transplants in BALB/c Gal knockout mice // *Xenotransplantation*. 2000. V. 7. N 4. P. 237–246.
- Hanger J.J., Bromham L.D., McKee J.J. *et al.* The nucleotide sequence of koala (*Phascolarctos cinereus*) retrovirus: a novel type C endogenous virus related to Gibbon ape leukemia virus // *J. Virol.* 2000. V. 74. N 9. P. 4264–4272.
- Heneine W., Tibell A., Switzer W.M. *et al.* No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts // *Lancet*. 1998. V. 352. N 9129. P. 695–699.
- Herring C., Quinn G., Bower R. *et al.* Mapping full-length porcine endogenous retroviruses in a large white pig // *J. Virol.* 2001a. V. 75. N 24. P. 12252–12265.
- Herring C., Cunningham D.A., Whittam A.J. *et al.* Monitoring xenotransplant recipients for infection by PERV // *Clin. Biochem.* 2001b. V. 34. N 1. P. 23–27.
- Himaki T., Watanabe S., Chi H. *et al.* Production of genetically modified porcine blastocysts by somatic cell nuclear transfer: preliminary results toward production of xenograft-competent miniature pigs // *J. Reprod. Dev.* 2010. V. 56. N 6. P. 630–638.
- ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). 2011. Available at <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?bhcp=1>
- Jin H., Inoshima Y., Wu D. *et al.* Expression of porcine endogenous retrovirus in peripheral blood leucocytes ten different breeds // *Transplant. Infectious Disease*. 2000. V. 2. P. 11–14.
- Jung W.Y., Kim J.E., Jung K.C. *et al.* Comparison of PERV genomic locations between Asian and European pigs // *Anim. Genet.* 2010. V. 41. N 1. P. 89–92.
- Karlas A., Irgang M., Votteler J. *et al.* Characterization of a human cell-adapted porcine endogenous retrovirus PERV-A/C // *Ann. Transplant.* 2010. V. 15. N 2. P. 45–54.
- Kaulitz D., Fiebig U., Eschricht M. *et al.* Generation of neutralising antibodies against porcine endogenous retroviruses (PERVs) // *Virology*. 2011a. V. 411. N 1. P. 78–86.
- Kaulitz D., Mihica D., Plesker R. *et al.* Absence of infection in pigs inoculated with high-titre recombinant PERV-A/C // *Arch. Virol.* 2011b. V. 156. N 4. P. 707–710.
- Klymiuk N., Aigner B., Brem G., Wolf E. Genetic modification of pigs as organ donors for xenotransplantation // *Mol. Reprod. Dev.* 2010. V. 77. N 3. P. 209–221.
- Krach U., Fischer N., Czuderna F., Tonjes R.R. Comparison of replication-competent molecular clones of porcine endogenous retrovirus class A and class B derived from pig and human cells // *J. Virol.* 2001. V. 75. N 12. P. 5465–5472.
- Kurome M., Ishikawa T., Tomii R. *et al.* Production of transgenic and non-transgenic clones in miniature pigs by somatic cell nuclear transfer // *J. Reprod. Dev.* 2008. V. 54. N 3. P. 156–163.
- Le Tissier P., Stoye J.P., Takeuchi Y. *et al.* Two sets of human-tropic pig retrovirus // *Nature*. 1997. V. 389. N 6652. P. 681–682.
- Lee J.H., Webb G.C., Allen R.D., Moran C. Characterizing and mapping porcine endogenous retroviruses in Westran pigs // *J. Virol.* 2002. V. 76. N 11. P. 5548–5556.
- Lee S.L., Kang E.J., Maeng G.H. *et al.* Developmental ability of miniature pig embryos cloned with mesenchymal stem cells // *J. Reprod. Dev.* 2010. V. 56. N 2. P. 256–262.
- Levy M.F., Crippin J., Sutton S. *et al.* Liver allotransplantation after extracorporeal hepatic support with transgenic (hCD55/hCD59) porcine livers: clinical results and lack of pig-to-human transmission of the porcine endogenous retrovirus // *Transplantation*. 2000. V. 69. N 2. P. 272–280.

- Li Z., Ping Y., Shengfu L. *et al.* Phylogenetic relationship of porcine endogenous retrovirus (PERV) in Chinese pigs with some type C retrovirus // *Virus Res.* 2004. V. 105. N 2. P. 167–173.
- Li Y., Liu J., Dai J. *et al.* Production of cloned miniature pigs by enucleation using the spindle view system // *Reprod. Domest. Anim.* 2010. V. 45. N 4. P. 608–613.
- Loss M., Arends H., Winkler M. *et al.* Analysis of potential porcine endogenous retrovirus (PERV) transmission in a whole-organ xenotransplantation model without interfering microchimerism // *Transpl. Int.* 2001. V. 14. N 1. P. 31–37.
- Ma Y., Yang Y., Lv M. *et al.* Real-time quantitative polymerase chain reaction with SYBR green in detection for estimating copy numbers of porcine endogenous retrovirus from Chinese miniature pigs // *Transplant. Proc.* 2010. V. 42. N 5. P. 1949–1952.
- Marcucci K.T., Argaw T., Wilson C.A., Salomon D.R. Identification of two distinct structural regions in a human porcine endogenous retrovirus receptor, HuPAR2, contributing to function for viral entry // *Retrovirology.* 2009. V. 6. N 3. P. 1–15.
- Martin U., Kiessig V., Blusch J.H. *et al.* Expression of pig endogenous retrovirus by primary porcine endothelial cells and infection of human cells // *Lancet.* 1998a. V. 352. N 9129. P. 692–694.
- Martin U., Steinhoff G., Kiessig V. *et al.* Porcine endogenous retrovirus (PERV) was not transmitted from transplanted porcine endothelial cells to baboons *in vivo* // *Transpl. Int.* 1998b. V. 11. N 4. P. 247–251.
- Martin U., Steinhoff G., Kiessig V. *et al.* Porcine endogenous retrovirus is transmitted neither *in vivo* nor *in vitro* from porcine endothelial cells to baboons // *Transplant. Proc.* 1999. V. 31. N 1/2. P. 913–914.
- Martin U., Winkler M.E., Id M. *et al.* Productive infection of primary human endothelial cells by pig endogenous retrovirus (PERV) // *Xenotransplantation.* 2000. V. 7. N 2. P. 138–142.
- Mattiuzzo G., Ivols S., Takeuchi Y. Regulation of porcine endogenous retrovirus release by porcine and human tetherins // *J. Virol.* 2010. V. 84. N 5. P. 2618–2622.
- Mattiuzzo G., Takeuchi Y. Suboptimal porcine endogenous retrovirus infection in non-human primate cells: implication for preclinical xenotransplantation // *PLoS One.* 2010. V. 5. N 10. P. e13203.
- Meije Y., Tonjes R.R., Fishman J.A. Retroviral restriction factors and infectious risk in xenotransplantation // *Am. J. Transplant.* 2010. V. 10. N 7. P. 1511–1516.
- Miller A.D., Bonham L., Alfano J. *et al.* A novel murine retrovirus identified during testing for helper virus in human gene transfer trials // *J. Virol.* 1996. V. 70. N 3. P. 1804–1809.
- Nakaya Y., Shojima T., Yasuda J. *et al.* Epigenetic regulation on the 5'-proximal CpG island of human porcine endogenous retrovirus subgroup A receptor 2/GPR172B // *Microbes Infect.* 2011a. V. 13. N 1. P. 49–57.
- Nakaya Y., Hoshino S., Yasuda J., Miyazawa T. Mapping of a neutralizing epitope in the surface envelope protein of porcine endogenous retrovirus subgroup B // *J. Gen. Virol.* 2011b. V. 92. N 4. P. 940–944.
- Niebert M., Tonjes R.R. Analyses of prevalence and polymorphisms of six replication-competent and chromosomally assigned porcine endogenous retroviruses in individual pigs and pig subspecies // *Virology.* 2003. V. 313. N 2. P. 427–434.
- Niebert M., Tonjes R.R. Evolutionary spread and recombination of porcine endogenous retroviruses in suiformes // *J. Virology.* 2005. V. 79. N 1. P. 649–654.
- Nikitin S.V., Yudin N.S., Knyazev S.P. *et al.* Differentiation of wild boar and domestic pig populations based on the frequency of chromosomes carrying endogenous retroviruses // *Nat. Sci.* 2010. V. 2. N 6. P. 527–534.
- Paradis K., Langford G., Long Z. *et al.* Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue // *Science.* 1999. V. 285. N 5431. P. 1236–1241.
- Park S.J., Huh J.W., Kim D.S. *et al.* Analysis of the molecular and regulatory properties of active porcine endogenous retrovirus gamma-1 long terminal repeats in kidney tissues of the NIH-Miniature pig // *Mol. Cells.* 2010. V. 30. N 4. P. 319–325.
- Patience C., Patton G.S., Takeuchi Y. *et al.* No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extracorporeal connection to pig kidneys // *Lancet.* 1998. V. 352. N 9129. P. 699–701.
- Patience C., Switzer W.M., Takeuchi Y. *et al.* Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species // *J. Virol.* 2001. V. 75. N 6. P. 2771–2775.
- Patience C., Takeuchi Y., Weiss R.A. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs // *Nat. Med.* 1997. V. 3. N 3. P. 282–286.
- PGSP (Porcine Genome Sequencing Project). 2011. Available at http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_scrofa/
- Qari S.H., Magre S., Garcia-Lerma J.G. *et al.* Susceptibility of the porcine endogenous retrovirus to reverse transcriptase and protease inhibitors // *J. Virol.* 2001. V. 75. N 2. P. 1048–1053.
- Reed D.J., Lin X., Thomas T.D. *et al.* Alteration of glycosylation renders HIV sensitive to inactivation by normal human serum // *J. Immunol.* 1997. V. 159. N 9. P. 4356–4361.
- Rogel-Gaillard C., Bourgeaux N., Billault A. *et al.* Construction of a swine BAC library: application to the characterization and mapping of porcine type C endoviral elements // *Cytogenet. Cell Genet.* 1999. V. 85. N 3/4. P. 205–211.
- Rother R.P., Squinto S.P. The alpha-galactosyl epitope:

- a sugar coating that makes viruses and cells unpalatable // *Cell*. 1996. V. 86. N 2. P. 185–188.
- Schumacher J.M., Ellias S.A., Palmer E.P. *et al.* Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD // *Neurology*. 2000. V. 54. N 5. P. 1042–1050.
- Scobie L., Takeuchi Y. Porcine endogenous retrovirus and other viruses in xenotransplantation // *Curr. Opin. Organ Transplant*. 2009. V. 14. N 2. P. 175–179.
- Specke V., Tacke S.J., Boller K. *et al.* Porcine endogenous retroviruses: *in vitro* host range and attempts to establish small animal models // *J. Gen. Virol.* 2001. V. 82. N 4. P. 837–844.
- Sugimura S., Yamanaka K., Kawahara M. *et al.* Early metaphase II oocytes treated with dibutyl cyclic adenosine monophosphate provide suitable recipient cytoplasm for the production of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos // *Anim. Sci. J.* 2010. V. 81. N 1. P. 48–57.
- Suzuka I., Shimizu N., Sekiguchi K. *et al.* Molecular cloning of unintegrated closed circular DNA of porcine retrovirus // *FEBS Lett.* 1986. V. 198. N 2. P. 339–343.
- Tacke S.J., Bodusch K., Berg A., Denner J. Sensitive and specific immunological detection methods for porcine endogenous retroviruses applicable to experimental and clinical xenotransplantation // *Xenotransplantation*. 2001. V. 8. N 2. P. 125–135.
- Tacke S.J., Kurth R., Denner J. Porcine endogenous retroviruses inhibit human immune cell function: risk for xenotransplantation? // *Virology*. 2000. V. 268. N 1. P. 87–93.
- Takefman D.M., Wong S., Maudru T. *et al.* Detection and characterization of porcine endogenous retrovirus in porcine plasma and porcine factor VIII // *J. Virol.* 2001. V. 75. N 10. P. 4551–4557.
- Takeuchi Y., Porter C.D., Strahan K.M. *et al.* Sensitization of cells and retroviruses to human serum by (alpha 1-3) galactosyltransferase // *Nature*. 1996. V. 379. N 6560. P. 85–88.
- Takeuchi Y., Patience C., Magre S. *et al.* Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus // *J. Virol.* 1998. V. 72. N 12. P. 9986–9991.
- Tonjes R.R., Czauderna F., Fischer N. *et al.* Molecularly cloned porcine endogenous retroviruses replicate on human cells // *Transplant. Proc.* 2000. V. 32. N 5. P. 1158–1161.
- Uchida M., Shimatsu Y., Onoe K. *et al.* Production of transgenic miniature pigs by pronuclear microinjection // *Transgenic Res.* 2001. V. 10. N 6. P. 577–582.
- Valdes-Gonzalez R., Dorantes L.M., Bracho-Blanchet E. *et al.* No evidence of porcine endogenous retrovirus in patients with type 1 diabetes after long-term porcine islet xenotransplantation // *J. Med. Virol.* 2010. V. 82. N 2. P. 331–334.
- van der Laan L.J., Lockey C., Griffith B.C. *et al.* Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice // *Nature*. 2000. V. 407. N 6800. P. 90–94.
- Wilson C.A. Porcine endogenous retroviruses and xenotransplantation // *Cell. Mol. Life Sci.* 2008. V. 65. N 21. P. 3399–3412.
- Wilson C.A., Wong S., Muller J. *et al.* Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells // *J. Virol.* 1998. V. 72. N 4. P. 3082–3087.
- Wilson C.A., Wong S., VanBrocklin M., Federspiel M.J. Extended analysis of the *in vitro* tropism of porcine endogenous retrovirus // *J. Virol.* 2000. V. 74. N 1. P. 49–56.
- Wolgamot G., Bonham L., Miller A.D. Sequence analysis of *Mus dunni* endogenous virus reveals a hybrid VL30/gibbon ape leukemia virus-like structure and a distinct envelope // *J. Virol.* 1998. V. 72. N 9. P. 7459–7466.
- Yamanaka K., Sugimura S., Wakai T. *et al.* Acetylation level of histone H3 in early embryonic stages affects subsequent development of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos // *J. Reprod. Dev.* 2009. V. 55. N 6. P. 638–644.
- Yang Q., Liu F., Pan X.P. *et al.* Fluidized-bed bioartificial liver assist devices (BLADs) based on microencapsulated primary porcine hepatocytes have risk of porcine endogenous retroviruses transmission // *Hepatol. Int.* 2010. V. 4. N 4. P. 757–761.
- Yang Y.G., Wood J.C., Lan P. *et al.* Mouse retrovirus mediates porcine endogenous retrovirus transmission into human cells in long-term human-porcine chimeric mice // *J. Clin. Invest.* 2004. V. 114. N 5. P. 695–700.
- Zhang P., Yu P., Wang W. *et al.* Molecular characterization of long terminal repeat of porcine endogenous retroviruses in Chinese pigs // *Acta Virol.* 2010a. V. 54. N 3. P. 165–172.
- Zhang P., Yu P., Wang W. *et al.* An effective method for the quantitative detection of porcine endogenous retrovirus in pig tissues // *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2010b. V. 46. N 5. P. 408–410.

**PORCINE ENDOGENOUS RETROVIRUSES:
IS THE RISK OF TRANSMISSION IN XENOGRAFTING GREAT?**

N.S. Yudin, R.B. Aitnazarov, V.I. Ermolaev

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: yudin@bionet.nsc.ru

Summary

Recent studies on porcine endogenous retroviruses are reviewed. Nucleotide sequences of the viruses, their expression and isolation of mature virions are considered. The tropism of the viruses for human cells and retrospective studies of human patients are discussed in detail. A critical overview of works on transmission of porcine endogenous retroviruses between species *in vitro* and *vivo* is presented. Approaches to the prevention and treatment of the conjectured infection in humans are discussed. It is concluded from the data reported hitherto that the risk of infection transmission from xenograft recipients to the rest of the population is very low. This low risk can be further reduced by careful observation and, probably, vaccination of contacting persons, as well as by preventive administration of antiviral drugs. The insignificant risk of infection can also be reduced by application of biotechnological methods to the raise of pigs lacking endogenous retroviruses tropic for humans.

Key words: porcine endogenous retroviruses, PERV, xenografting.