

ADRIANNA SZPRYNCA, ANNA PILISZEK, EMILIA BAGNICKA

ROZWÓJ BADAŃ W DZIEDZINIE BIOINŻYNIERII I BIOTECHNOLOGII

Streszczenie

Wprowadzenie. Nauka rozwija się od niepamiętnych czasów. W wyniku ciekawości, obserwacji, czy chęci poprawy poziomu życia przez wieki tworzono i tworzy się różne techniki i metody wykorzystywane w każdej dziedzinie nauki. Dzięki temu możliwy był rozwój biotechnologii, a następnie bioinżynierii. Zmiany w przemyśle rozpoczynają się od prac laboratoryjnych. W artykule przedstawione zostały najbardziej istotne i najczęściej stosowane metody i techniki wykorzystywane w laboratoriach, historia ich powstania oraz ich zastosowania obecnie i potencjalne użytkowanie w przyszłości. Techniki te dotyczą różnych sfer życia i polegają na ingerencji w życie zwierząt, jak krzyżowanie czy transformacje genetyczne, bądź na manipulacjach prowadzonych na pozyskanym od nich materiale.

Wyniki i wnioski. Dzięki badaniom na zwierzętach możliwa jest poprawa jakości ludzkiego życia, zwłaszcza osób chorych. Jednak należy pamiętać, że zwierzęta to również istoty czujące i nie można ich nadmiernie eksploatować. Należy zapewnić im odpowiednie warunki bytowania pozwalające na zapewnienie dobrostanu. Opracowanie i wdrażanie nowych regulacji prawnych i zasad 3R, a także rozwój nowoczesnych technik hodowli komórkowych i tkankowych pozwala obecnie na ograniczenie wykorzystania inwazyjnych procedur w badaniach na zwierzętach. Nie sposób wymienić i opisać wszystkie istotne metody i techniki, które są aktualnie lub będą w przyszłości praktykowane i rozwijane. Nauka ma jeszcze przed sobą wiele do odkrycia, opracowania i zaoferowania praktyce.

Słowa kluczowe: *in vitro*, GMO, biotechnologia, bioinżynieria, modyfikacje genetyczne

Wprowadzenie

Bioinżynieria to intensywnie rozwijająca się dziedzina biotechnologii, zajmująca się rozwiązywaniem problemów oraz poprawą jakości większości sfer dzisiejszego życia, nie tylko człowieka, ale i zwierząt. Wykorzystuje ona zarówno metody analityczne, molekularne, instrumentalne, komputerowe, jak i inżynierię genetyczną przy użyciu materiału jakim są żywe organizmy i systemy biologiczne [9]. Korzysta się nie tylko i wyłącznie z zasobów jakimi są tkanki i narządy zwierząt i roślin, ale także

z obserwacji ich behawioru czy analizowania budowy anatomicznej. Wykorzystuje się również prostsze organizmy, przeważnie mikroorganizmy, takie jak bakterie czy grzyby. Modyfikacje genetyczne zarówno roślin, jak i zwierząt, są dokonywane od tysięcy lat poprzez zabiegi hodowlane (rozmnażanie osobników/organizmów o cechach pożądanym, a eliminacja tych o nieodpowiednim fenotypie). Stosowane są również inne modyfikacje, jak indukowana mutageneza, polegająca na celowym uszkodzeniu DNA, w celu wywołania konkretnych efektów, np. usunięciu zasad azotowych czy spowodowaniu pęknięć między danymi fragmentami nici. Metody biotechnologiczne towarzyszą człowiekowi od wieków – począwszy od produkcji sera, piwa czy chleba. Proces tworzenia organizmów modyfikowanych genetycznie (ang. *Genetically Modified Organisms* - GMO) jednak przyspieszył, odkąd modyfikacje te prowadzone są w laboratoriach.

Początki w biotechnologii

Jak wspomniano, metody bioinżynierii są wykorzystywane przez człowieka od tysięcy lat, ale obecnie to coraz bardziej popularna i intensywnie rozwijająca się dziedzina biotechnologii, zajmująca się rozwiązywaniem problemów oraz poprawą jakości w większości sfer dzisiejszego życia człowieka i zwierząt.

Jednym z pierwszych produktów otrzymywanych dzięki intuicyjnemu wykorzystaniu metod biotechnologicznych jest ser. Był on już prawdopodobnie produkowany we wczesnym neolicie, a najstarsze archeologiczne znaleziska w Polsce pochodzą z terenu dzisiejszych Kujaw (okres datowany na 5300 ÷ 4900 lat p.n.e.). Produkowano wtedy ser przy pomocy sit, wyglądem przypominających dzisiaj używane [38]. W 1860 roku odkryto związek między drożdżami a powstawaniem etanolu i dwutlenku węgla. Proces przekształcania cukru w te związki nazwany został fermentacją. Fermentacja była jednak wykorzystywana już w starożytności jako skuteczna metoda zachowania jakości i trwałości napojów i żywności [52]. Według odkryć archeologicznych pierwsze fermentowane napoje produkowano w neolicie (ok. 7000 lat p.n.e.) w Chinach, głównie z ryżu [37] oraz w Mezopotamii i starożytnym Egipcie (ok. 5400 ÷ 5000 r. p.n.e.), najczęściej z owoców (wino), słoju zbożowego (piwo) oraz miodu (miód pitny) [36]. Chleb to również jeden z najstarszych produktów spożywczych. Ziarna pszenicy odnajdywano w ludzkich osadach datowanych na 8000 lat p.n.e., zaś bochenki, bułki i zakwas chlebowy zostały zidentyfikowane przez archeologów w starożytnym Egipcie [49]. Modyfikacje składu chleba przez tysiące lat pozwoliły na przetrwanie tego pokarmu do dzisiaj, dzięki czemu obecnie jest on podstawą diety europejskiej, pozostając również popularnym pokarmem w innych częściach świata.

Rozwój nauk biologicznych

Zainteresowanie biotechnologią rośnie systematycznie od XVII w., czyli od czasów wielkich odkryć naukowych, a później rozwoju techniki. Wielkim przełomem dla nauk biologicznych i samego tworzenia się biotechnologii, którą dziś znamy, były przede wszystkim wszelakie dokonania w aspekcie poznania anatomii człowieka i zwierząt, czy badanie struktur komórkowych [43]. Zainteresowanie budową ludzkiego ciała „od środka” miało swój początek, tak jak wszystko, od zwierząt. Ze względu na to, że zwierzęta przez bardzo długi czas były traktowane jako stworzenia nierozumne, gorsze od człowieka, a często też uważano, że nie odczuwają bólu czy strachu, były wykorzystywane do wszelkich prac, wyręczając człowieka. Często jednak traktowane były bez szacunku. Na zwierzętach prowadzono liczne badania medyczne, sprawdzając np. szkodliwość różnych substancji, czy wykonując wiwisekcję (sekcja za życia). Wykorzystywano także ich zwłoki. Sekcje zwierząt są prowadzone od bardzo dawna w procesie edukacji [3]. Jednym ze znanych uczonych, wykonujących sekcję zwłok zwierząt w procesie nauczania, był belgijski lekarz Andreas Vesalius, który w ten sposób przygotowywał studentów medycyny do pracy [1].

W czasie wielkich odkryć naukowych trwał również intensywny rozwój techniki. Jednym z ważniejszych, w aspekcie biotechnologii, był rozwój prac nad soczewkami do okularów, co pozwoliło na skonstruowanie pierwszego teleskopu i prymitywnego mikroskopu przez Galileusza (1564 - 1642 r.) ok. 1610 roku. Rzeczywistymi wynalazcami mikroskopu są jednak Zacharias Janssen (1580 - 1632 r.) oraz jego ojciec, Hans Janssen (koniec XVI wieku), a sposób użytkowania i jego budowę opisał Robert Hooke (1635 - 1703 r.). Natomiast mikroskop badawczy został skonstruowany przez Antoniego Leeuwenhoeka (1632 ÷ 1723 r.), z możliwością powiększenia obiektu do 240 razy. Dzięki temu opisał on m.in. systemy kanalików w kościach, prążkowanie mięśni, plemniki oraz drobne stworzenia w kropli wody [3].

Największym przełomem w rozwoju nauki o podłożu molekularnym było najprawdopodobniej odkrycie struktury DNA [64] przez Jamesa Watsona (ur. 1928 r.), Francisca Cricka (1916 - 2004 r.), Maurice Wilkina (1916-2004 r.) i Rosalind Franklin (1920 - 1958 r.) w 1953 roku oraz w dalszej kolejności zasad azotowych w 1961 roku [63] i opracowanie metod sekwencjonowania DNA przez zespoły Waltera Gilberta (ur. 1932 r.) i Fredericka Sangera (1918 - 2013 r.) od 1968 r. [50]. Pozwoliło to na wprowadzanie modyfikacji w materiale genetycznym na różną skalę, opracowanie terapii genowych, a także rozwój badań potwierdzających lub wykluczających obecność takiego materiału na miejscach zbrodni (kryminalistyka), czy w identyfikacji rodzicielstwa [21]. Były to przełomowe badania, dzięki którym można poznać sekwencje genów kodujących poszczególne białka oraz zidentyfikować mutacje w całym genomie. Pozwala to na lepszą diagnostykę i wybór sposobu leczenia pacjentów dotkniętych różnymi chorobami o podłożu genetycznym. Opracowano techniki umożliwiające re-

kombinację DNA poprzez bezpośrednią modyfikację materiału genetycznego pojedynczego organizmu i tym samym wprowadzenia zmian w całej populacji, np. w celu uodpornienia na daną chorobę całego gatunku. Techniki te są nazywane inżynierią genetyczną.

Transformacje genetyczne

Transgeneza, wynaleziona po rekombinacji DNA, umożliwia transformację genetyczną wybranych gatunków roślin poprzez wprowadzanie do nich genów z innych roślin i organizmów. Wśród cytrusów uzyskano wiele udanych transformacji, wprowadzając do genomu roślin geny antybiotykowe i reporterowe, przyspieszające ich dojrzewanie oraz geny zwiększające odporność na choroby i poprawiające jakość owoców. Transgeniczne grejpfruty i słodkie pomarańcze są odporne na *Xanthomonas citri* ssp. *citri* (Gram-ujemne proteobakterie w kształcie pałeczek), powodujące raka tych roślin. Uzyskano to dzięki wprowadzeniu do tych roślin genu *AtNPR1* (gen rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*)), kodującego receptor natriuretyczny peptydu A (ang. *arabidopsis natriuretic peptide receptor A*) lub jego homologa *CtNHI* (gen cytrusowy kodujący natriuretyczny receptor peptydowy 1 – ang. *citrus gene coding NPR1 - Natriuretic Peptide Receptor 1*), pochodzących z pomarańczy olbrzymiej (*Citrus maxima*) [58]. Liście tytoniu wykazują specyficzną odporność na zakażenia mozaikowym wirusem lucerny (AMV – ang. *Alfalfa mosaic virus*) po wprowadzeniu do nich wektorów składających się z chimerycznych genów enzymu fosfotransferazy neomycyny II (NPTII – ang. *neomycin phosphotransferase II enzyme*) oraz białek płaszczka wirusa AMV, będących pod kontrolą promotora 19S (CaMV – ang. *Cauliflower mosaic virus*), pochodzących od glebowych bakterii Gram-ujemnych (*Agrobacterium tumefaciens* – pałeczkowata, fitopatogeniczna bakteria z rodziny *Rhizobiaceae*) [27]. Pojawił się również pomysł, aby do genomu rzodkiewnika pospolitego włączyć gen bakterii produkujących witaminę B12 (z rodzaju *Propionibacterium*) oraz gen człowieka odpowiedzialny za produkcję glikoproteiny wytwarzanej w jelitach, będącej nośnikiem witaminy B12, tzw. *Intrinsic Factor*. Wytworzenie syntetyzowanego w ten sposób białka miało zostać spożytkowane do produkcji preparatów mających na celu zapobieganie niedoborowi tej witaminy. Wniosek o zatwierdzenie tej modyfikacji został złożony do Europejskiego Urzędu Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) [32, 66], jednak od daty złożenia w 2008 r. nie pojawiła się żadna informacja o postępach w jego weryfikacji.

U zwierząt wprowadzanie jakichkolwiek zmian w genomie, nawet w celu uodpornienia ich lub usunięcia z populacji danej choroby, wiąże się z krytyką społeczeństwa na temat etyki tego działania, a także bezpieczeństwa pochodzących od tych zwierząt produktów przeznaczonych do konsumpcji. Jednak podejmowane były próby eliminacji chorób niektórych zwierząt. Przykładem mogą być brojlery. Badana była

zależność między wprowadzeniem cDNA, pochodzącego z konserwatywnej końcowej sekwencji 3' i 5' (dokładniej struktury "spinki do włosów") genomu wirusa grypy typu A (IAV – ang. *influenza A virus*), atakującego w większości ptaki, a zakażeniem przez wirusa ptasiej grypy (HPAI – ang. *Highly Pathogenic Avian Influenza*). Niestety, brojlery były podatne na zakażenie wirusem, a śmiertelność wśród nich była zbliżona do obserwowanej wśród nietransgenicznych kurczaków. Jednakże wykazano, iż wirus z tak zmodyfikowanych zwierząt był przenoszony w mniejszym stopniu na inne zwierzęta [33]. Niestety modyfikacje genetyczne nie mogą być skutecznym sposobem przeciwdziałania chorobom o podłożu wieloczynnikowym. W chowie bydła jedną z chorób powodujących znaczne straty ekonomiczne jest zapalenie wymienia (łac. *mastitis*). Ze względu na liczbę wywołujących ją czynników etiologicznych oraz niską dziedziczność odporności na tę chorobę (jedynie ok. 10 % to wpływ czynników genetycznych) aktualnie nie jest możliwe przeciwdziałanie jakkolwiek techniką inżynierii genetycznej.

Postęp biotechnologii możliwy jest m.in. dzięki rozwojowi technik transgenezy. Jedno z istotnych wyzwań stanowi opracowanie metod wprowadzania obcego materiału genetycznego do komórek. W przypadku komórek zwierzęcych (w tym ludzkich), dominują techniki mikromanipulacyjne, w tym metoda mikroiniekcji. Od początku lat 80. starano się uzyskać swoistą i powtarzalną technikę w zakresie transgenezy. Zespoły: Richarda D. Palmitera (ur. 1942 r.), a wcześniej Johna Williama Gordona (praca opublikowana w 1980 r.) [23] stosowały metodę mikroiniekcji, czyli iniekcji (zastrzyk) dokomórkowej pod mikroskopem, polegającej na wprowadzeniu egzogenego DNA do przedjądrza zygoty. Techniki transgenezy poprzez mikroiniekcję podlegają ciąglemu ulepszaniu i dotychczas pozwoliły na otrzymanie transgenicznych zwierząt różnych gatunków, jak króliki, świnię, bydło, owce i kozy, u których uzyskano ekspresję różnych genów z wprowadzonego DNA, kodujących m.in. hormon wzrostu czy też białko zielonej fluorescencji (GFP) [19, 28].

Metody inżynierii genetycznej

Inżynieria genetyczna pozwala na identyfikację, replikację, modyfikację, czy też transfer materiału genetycznego komórek, tkanek, jak również całych organizmów w przypadku bakterii [41]. Głównie wykorzystuje się bezpośrednią manipulację DNA, ukierunkowaną na ekspresję poszczególnych genów, wykorzystując przy tym np. transdukcję przy użyciu zmodyfikowanych wirusów (m.in. retrowirusów) w celu przeniesienia danego fragmentu kodującego wybrany gen do komórki gospodarza. Polega to więc np. na rozpoznawaniu specyficznych fragmentów DNA do selekcji w celu zwiększenia efektywności metod hodowli, opierających się na informacji fenotypowej [29, 30]. Również na jej podstawie dobierać będzie można odpowiednio terapię genową do leczenia chorób o podłożu genetycznym (głównie u ludzi), jak np. mukowiscy-

doza, poprzez zastępowanie u niemowląt lub jeszcze w życiu prenatalnym nieprawidłowych kopii genów prawidłowymi. Natomiast w celu wykrycia miejsc w genomie, w których zmiany są odpowiedzialne za wywołanie danej choroby oraz modelowania takich chorób – wywołania konkretnej choroby u zwierzęcia lub w komórkach/tkankach w celu zbadania mechanizmu jej działania [4] czy też odkrywania funkcji określonych miejsc, wykorzystywane są zmodyfikowane genetycznie zwierzęta, przede wszystkim myszy, szczury i inne zwierzęta laboratoryjne [41]. Ich modyfikacja polega najczęściej na wyłączeniu działania jednego lub kilku wybranych genów (tzw. technika “*knock-out*”) w celu wywołania badanej choroby. Przykładem choroby, której leczenie podejmuje się w oparciu o wyniki uzyskane z wykorzystaniem inżynierii, jest stwardnienie zanikowe boczne (ALS – ang. *amyotrophic lateral sclerosis*). ALS to śmiertelna choroba, dotycząca zaburzeń ośrodkowego układu nerwowego, głównie oddziałująca na układ ruchu. Przyjmuje się, że około 20 % przypadków, związanych z uwarunkowaniami genetycznymi, jest spowodowane mutacją w genie kodującym dysmutazę ponadtlenkową - *SOD1* (ang. *superoxide dismutase 1*) i usytuowanym w chromosomie 21. Wśród opracowywanych metod leczenia ALS aktualnie wykorzystuje się podawanie pacjentom ASO, czyli antysensownych oligonukleotydów (jednoniciowych fragmentów kwasu nukleinowego) o długości 13 ÷ 25 nukleotydów, selektywnie wiążących się i oddziałujących z mRNA, wpływając na przebieg translacji oraz adenowirusy z insulinopodobnym czynnikiem wzrostu (IGF), a także wykorzystując metodę CRISPR/Cas. Adenowirusy są uznawane za przyszłość leczenia rzadkich schorzeń ze względu na ich wysoką skuteczność w transdukcji (wprowadzanie genów przez bakteriofagi) neuronów. Badana była również skuteczność leczenia endonukleazą Cas9, związaną z regularnie rozstawionymi, krótkimi powtórzeniami palindromowymi, czyli fragmentami sekwencji DNA, w których nić wiodąca i komplementarna są identyczne w tym samym kierunku (CRISPR). Ekspresja genu kodującego białko SOD1 u myszy była zakłócona przy użyciu adenowirusów jako wektorów ekspresyjnych krótki Cas9, pochodzący z *S. aureus* oraz jednokierunkowego RNA skierowanego do drugiego eksonu *SOD1*. Spowodowało to wydłużenie życia chorych myszy o 30 dni, jednak u ludzi wywołało negatywne skutki [7].

Dzięki inżynierii genetycznej tworzone są także biblioteki DNA. Pozwalają one na zachowanie genomów i genów wybranych gatunków, w tym zagrożonych wyginięciem. W przypadku krótkich fragmentów DNA istotne jest ich oczyszczenie, zaś większe fragmenty (powyżej 40 kbp) ulegają degradacji. Stąd używa się do tego celu unieruchomionych komórek, protoplastów czy jąder komórkowych zawieszonych w blockach żelu agarozowego. Żel pozwala na utworzenie sieci przestrzennej, zabezpieczającej DNA przed uszkodzeniem oraz umożliwia dyfuzję odczynników. Unieruchomione komórki są poddawane kolejno hydrolizie poprzez trawienie proteinazą K w obecności sarkozyli. DNA zostaje uwolniony i jest poddawany częściowej hydroli-

zie enzymami restrykcyjnymi. Przed wprowadzeniem do wektorów, fragmenty DNA są poddane selekcji ze względu na wielkość przez rozdział elektroforetyczny w pulsacyjnym polu elektrycznym. U roślin dodatkowym utrudnieniem przy pobieraniu materiału genetycznego do utworzenia bibliotek jest specyfika ściany komórkowej, której budowa znacznie różni się od budowy błony komórkowej komórek zwierzęcych. Sposoby na tworzenie bibliotek DNA w ich przypadku to niepełna hydroliza enzymatyczna, czyli wcześniejsze przerwanie hydrolizy restrykcyjnej prowadzące do wstrzymania przecięcia wszystkich sekwencji rozpoznawanych przez enzym [65].

Warto przybliżyć wspomnianą już metodę, posiadającą duży potencjał w leczeniu chorób uwarunkowanych genetycznie, czyli CRISPR/Cas9. Jest to metoda edycji genów potencjalnie umożliwiająca precyzyjne przeprowadzanie modyfikacji genetycznych *in vivo*, w tym wprowadzanie napraw w zmienionych (najczęściej dziedziczonych w tym patologicznych) częściach genomu. System ten został odkryty u bakterii *E. coli* na przełomie XX i XXI w. U bakterii służy on ochronie przed wirusami poprzez proces usuwania wprowadzonego przez wirusa materiału genetycznego do genomu bakteryjnego przez jego wycięcie i naprawę zmienionych fragmentów. Skrót CRISPR oznacza zgrupowane, regularnie rozmieszczone powtórzenia palindromiczne (ang. *Clustered regularly interspaced palindromic repeats*). CRISPR rozpoznaje takie miejsca, natomiast białko Cas9, z rodziny Cas, jako endonukleaza przecina obie nici DNA, w tym przypadku plazmidu bakteryjnego. Naprawa DNA odbywa się na dwa sposoby. Pierwszy to łączenie niehomologicznych końców, co najczęściej prowadzi do losowej insercji/delecji DNA. Drugi to naprawa ukierunkowana na homologię, gdzie homologiczny fragment DNA jest wykorzystywany jako matryca do naprawy, co umożliwia precyzyjną edycję genomu, nawet na poziomie pojedynczej pary zasad. W laboratoriach metodę CRISPR/Cas9 wykorzystuje się najczęściej do generowania modeli komórkowych i zwierzęcych oraz do obrazowania genomu, a w przyszłości prawdopodobnie do terapii genowych, leczenia chorób zakaźnych, związanych z włączaniem się do genomu innego materiału genetycznego, np. wirusowego jak w przypadku HIV oraz leczenia zmienionych chorobowo komórek, takich jak komórki nowotworowe. Metoda daje dużo możliwości, w tym naprawę błędów DNA w obrębie genomu oraz naprawę takich obszarów w zarodkach zwierzęcych, w przyszłości również i ludzkich [48].

Inżynieria genetyczna umożliwia posługiwanie się wieloma złożonymi technikami laboratoryjnymi, a jej ciągły rozwój pozwoli na duże zmiany w medycynie. W dalszym ciągu trwają prace nad wykorzystywaniem zwierząt transgenicznych jako bioreaktorów. Badania są skupione przede wszystkim na zwierzętach gospodarskich, na co dzień użytkowanych mlecznie (krowy i kozy). Odpowiednio zmodyfikowane organizmy mają możliwość wydzielania wraz z mlekiem specyficznych białek ludzkich, np. hormonów takich jak insulina, co daje możliwość ułatwienia terapii w przypadku licznych chorób [62]. Laktoferyna jest już wytwarzana przez transgeniczne krowy w cyklu

produkcyjnym dla firmy Pharming. Białko jest pozyskiwane z mleka, a następnie odpowiednio oczyszczane. Innym przykładem jest synteza erytropoetyny przez transgeniczne świnię (900 IU/ml) oraz nietransgeniczne kozy (2mg/ml) [60].

Innymi przykładami możliwości zastosowania tych technik w przyszłości jest wykorzystanie zwierząt do ksenotransplantacji oraz zmiana częstotliwości występowania konkretnych alleli u zwierząt gospodarskich. Transplantacje z wykorzystaniem narządów zwierząt to trudny temat badań. Stworzenie populacji zwierząt, z których byłaby możliwość przeszczepu narządów ludziom zrewolucjonizowałoby tę dziedzinę, zważywszy, że niewielu jest dawców. Jest to spowodowane faktem, iż w Polsce w dalszym ciągu, mimo zezwoleń prawnych, lekarze pytają o zgodę na pobranie narządów najbliższych zmarłego, ci natomiast najczęściej nie wyrażają jej. Często dlatego, że wiąże się to z podjęciem decyzji o odłączeniu pacjenta od urządzeń podtrzymujących funkcjonowanie organizmu. Badania na temat transplantologii narządów pobranych od zwierząt prowadzone są głównie na świniami, ze względu na ich anatomiczne i fizjologiczne podobieństwo do człowieka. Główny problem, nad którym wciąż trwają prace badawcze, to pokonanie bariery immunologicznej. Mimo ok. 95 % zbieżności genomu świńskiego z ludzkim i stosowania leków immunosupresyjnych, w dalszym ciągu dochodzi do odrzucania przeszczepów przez główny układ zgodności tkankowej [24, 59].

W 2022 roku, mimo wszystko dokonano pierwszego udanego przeszczepu serca genetycznie zmodyfikowanej świni 57-letniemu Amerykaninowi, w Uniwersyteckim Szpitalu w Maryland w Baltimore (USA). Jego serce nie było już w stanie prawidłowo funkcjonować. Celem przeszczepu było umożliwienie przedłużenia czasu oczekiwania na odpowiedniego, ludzkiego dawcę serca. Niestety pacjent zmarł po dwóch miesiącach, ale można uznać, że cel został osiągnięty, gdyż serce świni funkcjonowało dobrze i nie było oznak ostrego odrzucenia narządu. W przypadku innego pacjenta ten czas mógłby okazać się wystarczający. Przyczyną niepowodzenia mogła być obecność cytomegalowirusa świń (PCMV), który jest wirusem różyczki świńskiej (PRV), którego wysokie miano zanotowano u pacjenta pomimo podawania leków przeciwwirusowych po zaobserwowaniu w 20. dniu od przeszczepu objawów zarażenia [47]. We wrześniu 2023 roku ten sam zespół chirurgów dokonał przeszczepu drugiemu pacjentowi, który cierpiał na nieuleczalną chorobę serca i inne schorzenia, unikając błędów poprzedniego zabiegu. Jego stan zdrowia nie kwalifikował go do programu transplantacyjnego, w których wykorzystywane są narządy dawców ludzkich. Niestety, pacjent zmarł po ponad pięciu tygodniach od operacji. Przez pierwszy miesiąc wszczepiony narząd pracował prawidłowo, jednak później symptomy wykazywały na odrzucenie [71].

Prace nad uzyskaniem świń, z których tkanki byłyby możliwe do wykorzystania w ksenotransplantacji, są prowadzone od lat 90. XX w. Badania polegają na usunięciu

z tkanki mięśniowej serca cukru – oligosacharydu α -Gal, nieobecnego w ludzkim organizmie. U człowieka występują ksenoreaktywne przeciwciała reagujące na obecny na powierzchni świńskich komórek antygen GAL. Jest to uzyskiwane na dwa sposoby. Pierwszy to wyeliminowanie z genomu genu α 1,3-galaktozylotransferazy (*GT-KO*, *KO* od ang. *knock-out*, odnoszącego się do usunięcia genu), którego produkt syntetyzuje ten cukier, zaś drugi to wprowadzenie genetycznych modyfikacji w postaci indukcji ludzkich białek regulujących (wyłączających) ekspresję genu *GT*. W tkance mięśnia sercowego, wykorzystanego do przeprowadzenia omawianej transplantacji, cukier ten nie był syntetyzowany dzięki usunięciu genu *GT* z genomu świni [53].

W Polsce pionierem transplantologii był prof. Zbigniew Religa (1938 - 2009 r.), który dokonał w 1985 roku pierwszej udanej transplantacji serca od zmarłego pacjenta oraz pierwszego równoczesnego przeszczepu serca i płuca. Zaproponował również hodowle świń transgenicznych w Polsce, aby inni pacjenci przeżyli więcej niż pół godziny z przeszczepionym sercem pochodzenia zwierzęcego (świńskiego) [5, 69].

Opisane przez Smorąga i wsp. [55] modyfikacje genomu świni umożliwiające ksenotransplantacje to przede wszystkim wprowadzenie do genomów świń ludzkich genów regulujących system dopełniacza (czyli czynników CD46, CD55 oraz CD59), modyfikowanie białek komórkowych u dawcy (zwierzęcia) oraz wyłączenie syntezy cukru Gal. To ostatnie, według autorów, jest możliwe poprzez inaktywację genu syntetyzującego białko α -Gal (α -1,3-galaktozylotransferazy) lub modyfikację antygenów powierzchniowych. Ludzkie geny wprowadzone do transgenicznych świń są niezbędne do uniknięcia nadostrej odpowiedzi immunologicznej ludzkiego organizmu. Można to uzyskać poprzez mikroiniekcję DNA i metody alternatywne, takie jak transfekcja zmodyfikowanymi, świńskimi plemnikami, czyli uprzednim przygotowaniu plemników pozbawionych genu *α -Gal* i następnym zapłodnieniu komórki jajowej. W Polsce transgeniczne świny służą dotychczas głównie jako dawcy do prac nad biotechnologicznymi zastawkami sercowymi oraz do tworzenia opatrunków, tzn. skóry wykorzystywanej dla pacjentów z silnymi poparzeniami. Obecnie prowadzone są hodowle zarówno skóry, jak i tkanki chrzęstnej.

Z biotechnologią i bioinżynierią wiąże się również zwiększanie w populacji frekwencji alleli związanych z korzystnymi dla hodowcy cechami zwierząt gospodarskich poprzez odpowiedni dobór par do kojarzeń. Tego typu prace są prowadzone już od wieków w większości, jeśli nie we wszystkich populacjach zwierząt gospodarskich, zwłaszcza w krajach rozwiniętych. Wprowadzona w ostatnim czasie w wielu populacjach bydła mlecznego i niektórych populacjach kóz mlecznych, świń czy roślin, a nawet owadów selekcja genomowa, wykorzystująca najnowsze techniki z zakresu genetyki molekularnej, znacznie przyspiesza postęp hodowlany i utrwalanie korzystnych wariantów genów. Jednak opracowywane są nowe metody sztucznego zwiększania częstotliwości występowania takich alleli przy wykorzystaniu inżynierii genetycz-

nej. Dane allele byłyby powielane poza organizmem zwierzęcia, czyli „w szkle” (łac. *in vitro*), a następnie włączane w genom zwierzęcia, bądź zwiększano by lub eliminowano ekspresję poszczególnych genów w celu zwiększenia odporności na choroby i wydajności zwierząt utrzymywanych w gospodarstwach [41].

Hodowle komórkowe i tkankowe

Coraz większy sprzeciw społeczeństwa budzi wykorzystywanie zwierząt dla jakichkolwiek ludzkich korzyści. Stąd bioinżynieria proponuje również nowe rozwiązania opierające się o zdobytą dotychczas wiedzę. Najlepszą alternatywą dla badań prowadzonych na zwierzętach są hodowle tkankowe (inżynieria tkankowa). Już dziś wiele laboratoriów jest w stanie wytworzyć całą tkankę lub nawet narządy z pojedynczych komórek. Muszą być one jednak utrzymywane w odpowiednich warunkach wzrostu, w idealnie dobranym środowisku. Przy ich spełnieniu naukowcy będą w stanie wyprowadzić organy do przeszczepów (w przypadku skóry jako narządu i tkanki chrzęstnej już jest to możliwe) [10]. Dodatkową zaletą jest możliwość wykorzystania do hodowli własnych komórek pacjenta, dla którego dane tkanki czy organy mają być przeznaczone. W tym celu wykorzystywane są zdolności regeneracyjne somatycznych komórek macierzystych, pobieranych ze szpiku kostnego. Alternatywnie wykorzystuje się również indukowane, pluripotentjalne komórki (komórki różnicujące się) macierzyste pobierane ze skóry lub krwi, przeprogramowując je do stanu pierwotnego (embrionalnego). Każdy z rodzajów tych komórek wykorzystuje się następnie do różnicowania w dowolny typ komórek danej tkanki, bądź do diagnostyki chorób, w tym nowotworów [35].

Organizmy modyfikowane genetycznie

Opisane wcześniej metody czy techniki, przyczyniły się także do rozwoju produktów spożywczych pochodzenia zwierzęcego, o zmienionych i polepszonych właściwościach. Jednak tworzenie organizmów modyfikowanych genetycznie oraz wykorzystanie zwierząt do badań i doświadczeń laboratoryjnych to jedno z najbardziej kontrowersyjnych aspektów rozwoju bioinżynierii.

Początkowo próbowano wprowadzać na rynek konsumencki produkty GMO, w tym również zwierzęta modyfikowane genetycznie, z których produkty miały mieć lepszy skład od tych uzyskiwanych naturalnie, np. większą zawartość konkretnych białek w mięsie, tym samym mięso miało być „smaczniejsze” przez zwiększenie m.in. jego kruchości. Pierwsze GMO powstały w drugiej połowie XX w., będąc nieodłącznym elementem niektórych z gałęzi przemysłu jak rolnictwo, przemysł spożywczy, farmakologia oraz medycyna. Pierwszą zmodyfikowanym genetycznie organizmem była oporna na kanamycynę bakteria *E. coli* (1973 r.), pierwszą rośliną - tytoń (1983 r.), natomiast pierwszym zwierzęciem - mysz (1974 r.).

Organizmy modyfikuje się przy pomocy technik inżynierii genetycznej, w tym z wykorzystaniem klonowania. Do ich powstania wykorzystuje się ekstrakcję genu z jednego organizmu i wszczepianie go do innego. Mogą być to modyfikacje tylko w obrębie organizmu (jego genomu), bez wprowadzania do niego materiału innego, bądź wprowadzenie danych fragmentów, jak geny z organizmu obcego (organizm transgeniczny). Wykorzystanie organizmów modyfikowanych genetycznie regulują odpowiednie akty prawne wprowadzone w większości krajów, zwłaszcza krajów wysoko rozwiniętych, w tym w całej Unii Europejskiej. Na całym świecie w rolnictwie używane są odmiany zmodyfikowanych roślin, o zwiększonej odporności na herbicydy, takich jak kukurydza, soja i rzepak [45]. Ponadto w przypadku kukurydzy transgenicznej MON810 uzyskano odporność na omacnicę prosowiankę (*Ostrinia nubilalis*) poprzez wprowadzenie do rośliny białka CryA1(b) z bakterii *Bacillus thuringensis ssp. kurtsaki*, które jest toksyczne dla tego owada [11]. Różne gatunki roślin są wykorzystywane również do produkcji substancji czynnych, np. antygenów wirusa zapalenia wątroby typu B syntetyzowanych przez liście sałaty lub tytoń czy marchew – do produkcji szczepionek na malarię, grypę, wściekliznę, czy żółtaczkę typu B [34, 45]. Wprowadzanie takich zmian może wiązać się jednak z pewnym ryzykiem zagrożenia dla zdrowia konsumentów, zwłaszcza w początkowych fazach uprawy takich roślin, związanych przede wszystkim ze wzrostem alergenicności, problemami immunologicznymi czy odpornością na antybiotyki [31], dlatego też jest wielu przeciwników modyfikowanych produktów.

Szybki postęp nauki w tej dziedzinie wiąże się ze zwiększoną krytyką społeczeństwa. Już od 2000 roku ponad 50 % ludności Polski była przeciwna produkcji transgenicznych zwierząt i roślin, pomimo że większość roślin jest przeznaczona na pasze dla zwierząt. W 2017 roku aż 70 % Polaków było przeciwnych tworzeniu i wykorzystaniu GMO. Największym poparciem cieszyła się natomiast produkcja GMO wykorzystywanych do produkcji leków (90 % w 2016 r.). W innych krajach europejskich sytuacja wyglądała podobnie. Obawy wynikają najczęściej z przeświadczenia, że takie przemiany doprowadzą do oporności patogenów na antybiotyki, wzrostu zachorowań na alergię, nowotwory czy zaburzeń hormonalnych, a co za tym idzie, zaburzeń płodności (fitoestrogeny soi). Istnieje również obawa powstania „super chwastu”, przedostania się zmodyfikowanego genomu do środowiska naturalnego (pyłek kwiatów), czy niszczenia pożytecznych owadów (wyginięcie niemal 90 % rodzin pszczoł w Kanadzie). Dlatego też wszelkie organizmy transgeniczne są weryfikowane już na etapie tworzenia w laboratorium [18, 45], a jak wspomniano, wykorzystanie GMO jest obwarowane szeregiem przepisów prawnych.

Jednym ze zwierząt zmodyfikowanych genetycznie, które zostało wprowadzone do sprzedaży jako produkt konsumencki dla ludzi jest *Salmo salar* (łosoś atlantycki) – AquaAdvantage (AquaBounty Technologies, Maynard, MA) zatwierdzony w 2015 roku

przez Amerykańską Agencję Żywności i Leków (FDA; *Food and Drug Administration*). Modyfikacja polegała na zastąpieniu genu regulującego hormon wzrostu tego zwierzęcia genem pochodzącym od czawyczy (*Oncorhynchus tshawytscha*) z sekwencją promotorową od węgorzycy amerykańskiej (*Zoarces americanus*), co pozwoliło na przyspieszenie wzrostu i przyrostu masy w ciągu każdego roku *Salmo salar* około dwukrotnie [15, 44]. FDA zatwierdziło również do spożycia oraz potencjalnych zastosowań terapeutycznych świnie GalSafe [16]. Świnie te są wolne od cukru α -gal obecnego na powierzchni komórek zwykłych świń. Cukier ten powoduje u osób z zespołem α -gal (ang. AGS; *alpha-gal syndrome*) reakcje alergiczne na czerwone mięso, w którym jest on obecny (np. wołowinie, wieprzowinie czy jagnięcinie) [17]. Jednak produkty GMO pochodzenia zwierzęcego są do tej pory oficjalnie dopuszczone do konsumpcji w Ameryce i Kanadzie.

Obecnie coraz więcej osób staje się zwolennikami diety wyłączonej z jadłospisu mięso oraz inne produkty pochodzenia zwierzęcego. Głównym powodem jest niechęć ludzi do przyczyniania się do śmierci lub cierpienia zwierząt oraz negatywnego wpływu na środowisko m.in. poprzez zwiększanie śladu węglowego. Jednak wiele z takich osób konsumowało mięso i inne produkty zwierzęce w dzieciństwie i pomimo wycofania ich z diety poszukują produktów o podobnych walorach smakowych. W odpowiedzi na te potrzeby powstają liczne roślinne zamienniki mięsa (np. kotlety sojowe), mające przypominać w smaku produkty pochodzenia zwierzęcego oraz dostarczać podobnych składników odżywczych. W laboratoriach trwają natomiast prace nad uzyskaniem „sztucznego mięsa”, czyli mięsa, a dokładniej tkanki mięśniowej, która otrzymywana będzie z pojedynczych komórek tej tkanki (miocytów) lub z komórek macierzystych pobranych od zwierząt gospodarskich, w tym drobiu, a następnie namnożonych w warunkach *in vitro*, uzupełnione komórkami tłuszczowymi (adipocytami) oraz tkanką łączną (fibroblasty) i naczyniami krwionośnymi. Jest to jednak skomplikowany proces, a główne problemy są związane ze współpracą tych wszystkich układów. Adipocyty mają odwzorować smak mięsa, ale kolejnym problemem jest kolor. Mięśnie uzyskiwane *in vitro* są żółte ze względu na zahamowaną ekspresję mioglobiny w warunkach tlenowych. Wprowadzenie witamin również będzie niezbędnym procesem przy produkcji sztucznego mięsa [68].

Od kilkunastu lat trwają intensywne prace laboratoryjne nad uzyskaniem mięsa komórkowego i już kilka firm na świecie, w tym w Polsce, przygotowuje się do wprowadzenia takiego mięsa na rynek. „Burger *in vitro*” zadebiutował na konferencji w Londynie w 2013 roku. Mięso przygotowywane było przez kilka tygodni w laboratorium przez holenderski zespół Marka J. Posta [46] i skonsumowane, a produkcja 142 g została wyceniona na ok. 250 tys. euro [20]. Pierwszym krajem, który wydał oficjalną zgodę na sprzedaż mięsa komórkowego był Singapur – stało się to już w 2020 roku. Drugim krajem są Stany Zjednoczone. Produkty dwóch amerykańskich firm

otrzymały właśnie oficjalną zgodę na sprzedaż mięsa kurczaka hodowanego komórkowo w Stanach Zjednoczonych. Również w Polsce działa już firma, która pracuje nad rozwojem rolnictwa komórkowego [67]. Produkcja i wprowadzanie na rynek mięsa pochodzącego z hodowli komórkowych w Unii Europejskiej regulowane jest przez rozporządzenie UE 2015/2283 w sprawie nowej żywności [56]. Dotychczas technologia ta do wyprodukowania takiej samej ilości „mięsa” wymagała dłuższego czasu i była dużo bardziej kosztowna niż klasyczna jego produkcja, jednak wraz z postępem prac koszt uległ już znacznej redukcji – z 250 tys. do kilkunastu USD [67].

Techniki *in vitro*

Technika zapłodnienia *in vitro* powstała zarówno dzięki pracom w zakresie inżynierii genetycznej, jak i dzięki rozwojowi innych dziedzin bioinżynierii, w tym hodowli komórkowej. Połączenie metod tych dziedzin, technik i sprzętu oraz odpowiedni skład i dobór pożywek dla komórek jajowych i zarodków, pozwoliły na doskonalenie zwierząt poprzez przekazywanie pożądanых cech i łączenie ich w celu uzyskiwania zwierząt najbardziej wydajnych w zakresie danej cechy. Rozwój technik kriokonserwacji oocytów, zarodków i nasienia pozwala zarówno na zachowanie materiału genetycznego cennych ras lub ginących gatunków, jak i na zachowanie płodności m.in. osobom narażonym na szkodliwe efekty uboczne radio- i chemioterapii [42]. Pozwoliło to również na zmianę podejścia do nauki wśród ludzi, gdyż zapłodnienie *in vitro* umożliwia wielu parom, które z jakiegoś powodu nie mogą mieć potomstwa, na doprowadzenie do powstania zygoty i wprowadzenie jej do organizmu kobiety, w którym dalej rozwija się ona naturalnie.

Pierwszym istotnym elementem zapłodnienia *in vitro* jest pobranie komórek jajowych i doprowadzenie do uzyskania przez nie pełnej dojrzałości jądrowej oraz cytoplazmatycznej (odblokowanie oocytu II rzędu, metafazy II mejozy) poza organizmem matki. Umożliwiają to odpowiednio dobrane składniki wzbogacające do pożywek opartych najczęściej na cielej surowicy płodowej (FCS – ang. *Fetal Calf Serum*), m.in. płyn pęcherzykowy (FF - ang. *Follicular Fluid*) oraz hormony gonadotropowe, w tym luteinizujący (LH), hormon folikulotropowy (FSH) czy czynniki wzrostu. Należy zaznaczyć, iż pożywki i metody dojrzewania oocytów zwierzęcych i ludzkich oraz hodowli zarodków *in vitro* podlegają ciągłym zmianom i ulepszeniom [13]. Zapłodnienie jest przeprowadzane w małej kropli odpowiednio przygotowanej pożywki, poprzez umieszczenie w niej dojrzałych oocytów oraz plemników [6]. Możliwości zapładniające nasienia sprawdza się przede wszystkim przy pomocy metody *swim-up*, określającej zdolność migracji plemników. Zdolność zapłodnienia zostaje w tej metodzie potwierdzona w momencie, w którym plemniki są zdolne podpłynąć w górne partie pożywki (czyli płyną w górę, ang. *swim up*) [57]. Do oczyszczenia nasienia i wyodrębnienia plemników zdolnych do zapłodnienia wykorzystuje się także, powszechnie stosowaną

i u ludzi, metodę wirowania w gradiencie gęstości Percollu (narzędzia do rozdzielania komórek w zależności od ich wielkości). Pozwala ona na oddzielenie od siebie frakcji najbardziej ruchliwych plemników od tej zawierającej gamety o obniżonej ruchliwości oraz zmienionej morfologii i innych komórek somatycznych [6]. Kolejnym istotnym elementem jest kapacytacja plemników za pomocą odpowiednich pożywek. Jest to jeden z najistotniejszych procesów, konieczny do osiągnięcia przez plemniki gotowości do penetracji komórki jajowej oraz komórek wzgórka i osłonki przejrzystej.

Zapłodnienie *in vitro* jest często wspomagane technikami mikromanipulacyjnymi polegającymi na bezpośrednim, mikrochirurgicznym wprowadzeniu plemnika do wnętrza komórki jajowej (ICSI – ang. *Intra Cytoplasmic Sperm Injection*). Przed przystąpieniem do ICSI, oocyt oczyszcza się z komórek wzgórka jajonośnego i wieńca promienistego (dekoronizacja) oocytów przy pomocy procesów enzymatycznych, stosując hialuronidazę i mechanicznie (przy pomocy pipety). Komórki jajowe w stadium metafazy II to jedyne oocyty poddawane mikromanipulacji. Oczyszczone komórki umieszcza się pojedynczo w mikrokroplach medium hodowlanego na szalce Petriego, obok kropli z wcześniej przygotowanym nasieniem. Całość zostaje przykryta warstwą oleju mineralnego. Wybrane plemniki o prawidłowej morfologii i ruchu unieruchamia się i następnie wprowadza do wnętrza pipety iniekcyjnej. Unieruchomiona pipetą przytrzymującą komórkę jajową jest ustawiana ciałkiem kierunkowym prostopadle do pipety podtrzymującej. Na koniec dochodzi do przerwania ciągłości osłonki przejrzystej przez pipetę iniekcyjną, potem błony komórkowej oocytu i wprowadza się pojedynczy, wyselekcjonowany plemnik do cytoplazmy komórki jajowej [6]. Technika ICSI pozwala na zapłodnienie zarówno z użyciem świeżego, jak i uprzednio zamrożonego nasienia.

Rozwój technik mikromanipulacyjnych umożliwił także opracowanie metod klonowania somatycznego, pozwalających na uzyskanie identycznych genetycznie kopii zwierząt. Pierwszym sklonowanym (w 1958 roku) zwierzęciem był płaz – płatana szponiasta (*Xenopus laevis*) [25, 26], za co John Gurdon otrzymał w 2012 roku nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny. Niemal 40 lat później uzyskano pierwszego sklonowanego ssaka - owcę Dolly [8], a po niej także klony wielu innych gatunków ssaków, m.in. myszy, świni czy małpy [39]. Najczęściej stosowaną techniką klonowania somatycznego jest przeniesienie jądra komórki somatycznej (SCNT – ang. *Somatic Cell Nuclear Transfer*). W tej technice komórkę jajową – biorcę – pozbawia się materiału genetycznego (przedjądrza), a następnie mikrochirurgicznie (za pomocą szklanej mikropipety) wprowadza się na jej miejsce materiał genetyczny (komórkę somatyczną) dawcy. Klonowanie somatyczne jest metodą o niskiej wydajności (około 2 %), może być jednak stosowane w celu uzyskiwania identycznych genetycznie kopii osobników o cennych lub unikatowych cechach, na przykład ras czy gatunków zagro-

zonych [40], zwierząt transgenicznych, a nawet osobników o szczególnie pożądanym cechach użytkowych [54].

Klonowanie ludzi w celach reprodukcyjnych nie jest stosowane i jest obecnie prawnie zabronione w 70 krajach. Klonowanie terapeutyczne, to znaczy mające na celu uzyskanie nie urodzonych osobników, ale komórek czy organów, jest przedmiotem debat. Zastosowanie tej techniki pozwoliłoby na przykład na uzyskanie tkanek do przeszczepu identycznych genetycznie z pacjentem, niwelując ryzyko odrzucenia przeszczepu, jednak koszt tak spersonalizowanej procedury byłby bardzo wysoki. W wielu krajach, w tym w Polsce, stosowanie klonowania terapeutycznego w przypadku ludzi jest także zabronione ze względów etycznych.

Zasady 3R i związane z nimi rozwiązania

Wiele technik *in vitro* jest już komercyjnie wykorzystywanych w laboratoriach. Tkanki oraz organoidy (miniaturowe modele organów otrzymane *in vitro*) [70] uzyskane w hodowlach *in vitro* można wykorzystywać również jako zamiennik dla zwierząt w badaniach laboratoryjnych, np. do testów toksykologicznych. Jest to jedna z zasad prowadzenia badań laboratoryjnych zawartych w tzw. zasadach 3R. Te zaś zawierają się w jednolitej platformie prawnej w postaci dyrektywy 2010/63 [14] ustanowionej przez Parlament Europejski we wszystkich krajach należących do Unii Europejskiej [51]. W Polsce zasady te wprowadzono ustawą o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych i edukacyjnych z dnia 27 maja 2015 roku [61]. Zasady 3R to skrót od trzech istotnych praw odnoszących się do słów “zastąpienie” (ang. *replacement*), “ograniczenie” (ang. *reduction*) oraz “udoskonalenie” (ang. *refinement*). Każde z nich kieruje się do konkretnych działań na rzecz prowadzenia badań laboratoryjnych w bardziej etyczny i akceptowalny przez społeczeństwo sposób.

“Zastąpienie” to zastosowanie metod pozwalających zastąpić zwierzęta w badaniach lub testach, w których są wykorzystywane. Coraz częściej daje to możliwość całkowitej eliminacji zwierząt z doświadczeń, przynajmniej na pierwszych etapach badań, jeśli nie wszystkich. Zastąpienie może się odbywać przez wykorzystanie hodowli tkankowych lub komórkowych, embrionów kręgowców nieobjętych ochroną prawną lub zwierząt bezkręgowych (np. muszka owocowa, robaki czy śluzowce) oraz, jeśli to możliwe, użycie modeli matematycznych lub komputerowych. Testowanie substancji drażniących lub składników leków oraz badania nad komórkami hematopoetycznymi prowadzi się aktualnie przy użyciu hodowli komórkowych [12]. Hodowle tkankowe wykorzystywane są w różnego rodzaju modelach narządów (np. “organów na chipach”, ang. *organ on chips*), m.in. w kardiologii i w badaniach nad patomechanizmem astmy, jak również w badaniach przerzutów nowotworów złośliwych. Natomiast za pomocą programów komputerowych można ustalić, jak dostosować testowany ligand (lek) do receptora (konkretnego rodzaju komórek w narządach lub występujących

na powierzchni komórek nowotworowych) i w ostatniej fazie badań sprawdzić to w badaniach na zwierzętach, ograniczając ich liczbę [51]. Odnosi się to do “ograniczenia”, czyli postępowania w celu zredukowania liczby zwierząt wykorzystywanych w badaniach z uzyskaniem porównywalnych wyników do tych, jakie zostałyby uzyskane przy ich wykorzystaniu. Inne metodystosowane do ograniczenia wykorzystania zwierząt w badaniach to przede wszystkim dzielenie się wynikami doświadczeń między zespołami badawczymi, jak również dokładne analizy statystyczne oraz ulepszanie projektów doświadczalnych przez wykorzystanie innych technik, np. obrazowania, pozwalających na długotrwałą obserwację wybranej populacji zwierząt i opieranie się na zdobytej do tej pory wiedzy naukowej. Ostatnia z trzech zasad 3R to “udoskonalenie” wiążące się z minimalizacją bólu, cierpienia, możliwych urazów oraz stresu, związanych z badaniami. Odnosi się więc ona do całkowitego polepszenia dobrostanu zwierząt, łącznie ze sposobem ich utrzymania przed doświadczeniem, w jego trakcie i po nim. W tym celu przystosowuje się zwierzęta już od urodzenia do pewnych procedur (jak ważenie czy pobieranie krwi), urozmaica środowisko, w którym są utrzymywane, różnego rodzaju elementami do zabawy czy kryjówkami oraz stosuje odpowiednie anestetyki i środki przeciwbólne [51].

Inżynieria tkankowa jest z pewnością przyszłością medycyny, nie tylko ze względów etycznych, ale również przez złożoność układów i funkcji narządów. Jednak nie należy zapominać, że organizmy, mimo podobieństw, różnią się od siebie i nie w każdym doświadczeniu można zastąpić model zwierzęcy hodowlami tkankowymi i komórkowymi. Niektóre doświadczenia wymagają wykorzystania zwierząt we wstępnej bądź późniejszej fazie eksperymentów. Jednak prawdopodobnie rozwój nauki zaowocuje z czasem całkowitą rezygnacją z ich wykorzystywania w eksperymentach naukowych.

Wraz z rozwojem nauki zaczęły pojawiać się pytania, wątpliwości i obawy przed czymś dotychczas nieznanym. W ostatnim czasie obawy te znacznie się nasiliły. Zmiany w sferze nauki budzą większe emocje niż w przeszłości (jak to było z tematyką transformacji genetycznej i klonowania), gdyż dotyczą istoty ludzkiego życia, ingerencji w mechanizmy kodowania i przekazywania informacji genetycznej oraz w pewien sposób naruszają też sposób życia, odżywiania i obyczajów, zostawiając niepewność w kontekście ich przyszłości. Zauważalny staje się aktualnie postępujące zwątpienie w postęp oraz brak zaufania do nauki. Mając lepszy dostęp do nowych informacji poprzez różnego rodzaju szeroko dostępne media, ludzie coraz częściej napotykać na intensywnie rozpowszechniane mity i uproszczenia. Wielokrotnie też padają fałszywe, przerysowane stwierdzenia, które nasilają dyskusję lub dane informacje są przekazywane w nieodpowiedni sposób, wprowadzając przeciętnego odbiorcę w błąd i narażając naukę na pochojne, nieprzychylnie osądy [2].

Podsumowanie

Równoległe do rozwoju technologii społeczeństwo powinno być zachęcane do zapoznania się z samą ideą biotechnologii i bioinżynierii, gdyż nowe technologie otwierają nowe perspektywy, nie tylko poprawy jakości ludzkiego życia, ale wręcz ratowania go. Także rozwój tych nauk to równoczesny rozwój wszelakich płaszczyzn życia codziennego, zaczynając od etycznego traktowania zwierząt i ich wykorzystywania do badań, a kończąc na najważniejszej i bezpośrednio dotykającej ludzi, czyli medycynie i wszystkich jej dziedzinach.

Wykorzystywanie zwierząt do doświadczeń jest kontrowersyjne i wywołuje wiele dyskusji i sporów. Dzięki temu rozbudowano przepisy prawa, tworząc liczne ustawy (np. wspomniana wyżej dyrektywa 2010/63), mające gwarantować dobrostan zwierząt wykorzystywanych w badaniach naukowych. Przeprowadzanie niektórych badań na zwierzętach jest jednak niezbędne w celu uniknięcia prowadzenia analogicznych badań na ludziach. Uwaga społeczeństwa skupia się głównie na niehumanitarnym przeprowadzaniu procedur, które mimo przebiegu zgodnego z prawem, wiążą się z bólem, cierpieniem, narażeniem zwierząt na strach lub trwałe uszczerbek na zdrowiu oraz nierzadko śmierć. Aktualnie wprowadza się jednak niezbędne środki mające na celu przeciwdziałanie dolegliwościom fizycznym, jak również negatywnym stanom psychicznym i emocjonalnym (cierpienie i stres) (np. wspomniana wyżej zasada 3R). Co więcej, przepisy są regularnie aktualizowane w celu ograniczenia krzywdzenia wobec zwierząt. Doświadczenia muszą być szczegółowo opisywane i akceptowane przez lokalne komisje etyczne. W świetle tych ustaw każda z procedur jest obowiązkowo poddawana wczesnemu i humanitarnemu zakończeniu [22]. Zwierzęta są więc, wbrew temu co niekiedy kreują media, traktowane w sposób humanitarny, zarówno przed doświadczeniami, jak i w trakcie ich trwania. Mają one swoich opiekunów, którzy codziennie bacznie doglądają ich dobrostanu. Procedury są przeprowadzane w taki sposób, aby uzyskiwać jak najbardziej miarodajne wyniki. Unika się powielania takich samych badań, dzięki udostępnianiu ich wyników w środowisku naukowym oraz ogranicza liczbę zwierząt do minimum.

Nauka, poprzez ciągły rozwój, tworząc coraz to nowsze techniki i metody, prowadzi do rozwoju różnych nowych nauk, które powstają na podstawie już istniejących lub w wyniku ich podziału na mniejsze dziedziny nauki. Bioinżynieria, będąca odnogą biotechnologii, ma duży potencjał, który widoczny jest przez jej rozwój w postaci powstawania i polepszania metod laboratoryjnych, mających zastosowanie w różnych sferach życia. W zaprezentowanym artykule zostały omówione pokrótce najważniejsze i najczęściej wykorzystywane spośród nich. Należy zauważyć, że laboratoria również są ukierunkowane na przeprowadzanie w nich konkretnych badań, stąd trudno wymienić i opisać wszystkie istotne techniki, które są aktualnie lub będą w przyszłości prak-

tykowane. Nauka ma przed sobą jeszcze wiele do zaprezentowania – miejmy nadzieję, że wkrótce się o tym przekonamy.

Literatura

- [1] Animal Dissection – Top 3 Pros and Cons. [online]. Britannica. Dostęp w Internecie [25.08.2022]: <https://www.procon.org/headlines/top-3-pros-and-cons-of-animal-dissection/>.
- [2] Anioł A.: Kontrowersje wokół transgenicznych odmian roślin uprawnych: przezorność czy technofobia? *Postępy Nauk Rolniczych*, 2008, 3, 3-16.
- [3] Bardadin K.: *Historia Patomorfologii*, Polskie Towarzystwo Patologów, 1995, pp. 8-11.
- [4] Blackburn C., Waite A., Couturier A.: New tools for disease research: reprogrammed cells in disease modelling. *EuroStemCell*, 2016.
- [5] Brzozowska E.: Był niewierzący, ale nazywali go Święty – prof. Zbigniew Religa naprawił tysiące polskich serc, Dostęp w Internecie [27.03.2022]: <https://www.medonet.pl/zdrowie,100-lat-polsko--zbigniew-religa-przeprowadzil-pierwszy-w-polsce-udany-przeszczep-serca-i-rownoczesny-przeszczep-serca-i-pluca--naprawil-tysiace-serc,artykul,1726173.html>.
- [6] Bukowska D., Kempisty B., Zawierucha P., Piotrowska H., Antosik P., Jackowska M., Jaśkowski J.M., Bryja A., Nowicki M.: Wybrane aspekty związane z zapłodnieniem *in vitro* u świń. *Med. Veter.*, 2012, 68(12), 717-721.
- [7] Cappella M., Ciotti C., Cohen-Tannoudji M., Biferi M.G.: Gene Therapy for ALS-A Perspective. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, 20(18), #4388.
- [8] Campbell K.H., McWhir J., Ritchie W.A., Wilmut I.: Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 1996, 380(6569), 64–6.
- [9] Chien S., Fung Y.C., Gough D.A., Intaglietta M., Kassab G., Paison B., Sah R.L., Schmid-Schönbein G., Sung L.A., Tong P., Yen M.R.T., Huang W.: *Introduction to bioengineering*, World Scientific, 2001, 2, V.
- [10] Crawford M.: *Top 10 Bioengineering Trends for 2020*, The American Society of Mechanical Engineers, 2020.
- [11] Czaban A.: *Kukurydza transgeniczna MON 810*, praca inżynierska. Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, 2010.
- [12] Doke S.K., Dhawale S.C.: Alternatives to animal testing. *A review*, *Saudi. Pharm. J.*, 2015, 23, 223-229.
- [13] Duszewska A.M., Rapała Ł., Trzeciak P., Dąbrowski S., Piliszek A.: Obtaining farm animal embryos *in vitro*. *J. Anim. Feed Sci.*, 2012, 21.2: 217-233.
- [14] Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych. *Dz. Urz. UE L 276*, s. 33-79 z 20.10.2010.
- [15] Eriksson S., Jonas E., Rydhmer L., Röcklinsberg H.: Invited review: Breeding and ethical perspectives on genetically modified and genome edited cattle, *J. Dairy Sci.*, 2018, 101, 1–17.
- [16] FDA Approves First-of-its-Kind Intentional Genomic Alteration in Line of Domestic Pigs for Both Human Food, Potential Therapeutic Uses [online]. Dostęp w Internecie [14.12.2020]: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-of-its-kind-intentional-genomic-alteration-line-domestic-pigs-both-human-food#:~:text=The%20FDA%20determined%20that%20food%20from%20GalSafe%20pigs,alpha-gal%20sugar%20across%20multiple%20generations%20of%20GalSafe%20pigs>.

- [17] FDA. GMO Crops, Animal Food, and Beyond [online]. Dostęp w Internecie [08.03.2022]: <https://www.fda.gov/food/agricultural-biotechnology/gmo-crops-animal-food-and-beyond>.
- [18] Federowicz S., Wiśniewski J., Sosnowska M., Jabłoński S.: Bioróżnorodność i jej ochrona; GMO a ochrona środowiska, IIIE, 2020.
- [19] Filimanow K., Wawrzyniak M., Maleszewski M.: Injection of higher DNA concentration into pronucleus as putative troubleshooting for generating transgenic mice. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 2021, 39(3), 225-235.
- [20] Fountain H.: Building a \$325,00 Burger. *The New York Times*. Dostęp w Internecie [12.05.2013]: <https://www.nytimes.com/2013/05/14/science/engineering-the-325000-in-vitro-burger.html>.
- [21] Gabryelska M. M., Barciszewski J.: Świat podwójnej helisy–„Nie uszło naszej uwadze”. *Postępy Biochemii*, 2013, 59.
- [22] Gądzik Z.: Etyczne aspekty wykorzystywania zwierząt w procedurach doświadczalnych. *Studia Ecologiae et Bioethicae*, 2021, 19, 1, 17-30.
- [23] Gordon J.W., Scangos G. A., Plotkin D.J., Barbosa J.A., Ruddle F.H.: Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1980, 77(12), 7380-7384.
- [24] Gross T.: 'Frankenstein's Cat': Bioengineering The Animals Of The Future. Dostęp w Internecie [11.03.2013]: <https://www.npr.org/2013/03/11/174060869/frankensteins-cat-bioengineering-the-animals-of-the-future>.
- [25] Gurdon J.B., Elsdale T. R., Fischberg M.: Sexually Mature Individuals of *Xenopus laevis* from the Transplantation of Single Somatic Nuclei. *Nature*, 1958, 182, 64-65.
- [26] Gurdon J.B.: The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 1962, 622-40.
- [27] Joachimiak A.: Inżynieria genetyczna roślin, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, 1988, 1-2, 9.
- [28] Jura J.: Transgeniczne zwierzęta hodowlane - efektywność transgenezy przy zastosowaniu techniki mikroiniekcji. *Biotechnologia*, 1995, 3(30), 95.
- [29] Karp G.: *Cell and Molecular Biology: concepts and Experiments*. 3rd ed., Wiley, 2002, 757.
- [30] Klug W. S., Cummings M. R.: *Concepts of Genetics*. 7th ed. New Jersey, Prentice Hall, 2002, 800.
- [31] Korbutowicz T.: Żywność genetycznie modyfikowana na świecie – zagrożenia czy korzyści, Uniwersytet Wrocławski, 2019, s. 152.
- [32] Kośmider A., Czarczyk K.: Witamina B12 – budowa, biosynteza, funkcje i metody oznaczania, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, 5 (72), 17-32.
- [33] Looi Y.F., Baker M.L., Townson T., Richard M., Novak B., Doran T.J., Short K. R.: Creating Disease Resistant Chickens: A Viable Solution to Avian Influenza?, *Viruses*, 2018, 10, #561.
- [34] Maciołek H., Stajszczak M.: Medyczne i prozdrowotne wykorzystanie żywności modyfikowanej genetycznie (GMO); Aspekty ekonomiczne, zdrowotne i fitosanitarne żywności modyfikowanej genetycznie, *Naukowe Wydawnictwo Piotrkowskie*, 2004, s. 121.
- [35] Madl C.M., Heilshorn S.C., Blau H.M.: Bioengineering strategies to accelerate stem cell therapeutics. *Nature*, 2018, 557, 335-342.
- [36] McGovern P., Voigt M., Glusker D., Exner L.: Neolithic resinated wine. *Nature*, 1996, 381, 480-481.
- [37] McGovern P.E., Zhang J., Tang J., Zhang Z., Hall G. R., Moreau R.A., Nunez A. M., Butrym E.D., Richards M.P., Wang C. S., Cheng G., Zhao Z., Wang C. C.: Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101, 17593-17598.
- [38] Miron: Kujawy kolebką wyrobu sera, Słowianie - Wiara Przyrodzenia. Dostęp w Internecie [23.03.2015]: <https://wiaraprzyrodzona.wordpress.com/2015/03/23/kujawy-kolebka-sera/>.

- [39] Modliński J.A., Karasiewicz J.: Klonowanie somatyczne ssaków. *Medycyna Wieku Rozwojowego V*, 2001, Suplement I do nr 1, 9-25.
- [40] Modliński J., Greda P., Papis K., Stachowiak E., Smorąg Z., Słomski R., Krzywiński A., Ryba M., Karasiewicz J.: Wykorzystanie klonowania somatycznego w ochronie zagrożonych ras i gatunków zwierząt. *Prace i Materiały Zootechniczne*, 2008, 66, 151-155.
- [41] Montaldo H.H.: Genetic engineering applications in animal breeding. *Electr. J. Biotechnol.*, 2006, 9(2), 157-170.
- [42] Nazari H., Afzali A., Mirshokraei P.: Effect of different oocyte retrieval and culture methods on *in vitro* maturation of bovine oocytes derived from vitrified ovarian tissue slices. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 2023, 41,1, 63-77.
- [43] Nerem R.: *The Emergence of Bioengineering. The Bridge*, 1997, 27, 4.
- [44] Nine Things You Need To Know About GMO Salmon. [online]. *GMO answers*. Dostęp w Internecie [20.11.2023]: <https://gmoanswers.com/nine-9-things-you-need-know-about-gmo-salmon>.
- [45] Nowakowska J.A., Berezowska D., Szulińska A.: Postawa społeczeństwa wobec organizmów modyfikowanych genetycznie (GMO) w Polsce – na przykładzie wybranych grup osób, *Studia Ecologiae et Bioethicae*, 2021, 19, 1, 103-114.
- [46] Post M.J.: Cultured beef: medical technology to produce food. *J. Sci Food Agr.*, 2013.
- [47] Denner, Joachim. "First transplantation of a pig heart from a multiple gene-modified donor, porcine cytomegalovirus/roseolovirus, and antiviral drugs." *Xenotransplantation* 2023, 30. #12800
- [48] Redman M., King A., Watson C., King D.: What is CRISPR/Cas9?, *Arch Dis Child Educ Pract Ed*, 2016, 101:213-215.
- [49] Rubel, W.: *Bread: A global history*. Reaktion Books, 2011.
- [50] Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1977, 74(12), 5463-5467.
- [51] Schollenberger A.: Zasada 3R w ochronie zwierząt wykorzystywanych do badań naukowych. *Życie Weterynaryjne*, 2017, 92(6), 424-426.
- [52] Sicard, D., Legras, J. L.: Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensustric*-to complex. *Comptes Rendus Biologies*, 2011, 334(3), 229-236.
- [53] Sieja B.: Przeszczep zwierzęcych narządów to żadna nowość. Życie z nimi to jednak wyzwanie dla nauki. Dostęp w Internecie [17.01.2022]: <https://www.komputerswiat.pl/artykuly/redakcyjnej/przeszczep-zwierzecznych-narzadow-to-zadna-nowosc-zycie-z-nimi-to-jednak-wyzwanie-dla/2qq1cs7>.
- [54] Skrzyszowska M., Samiec M.: Możliwości wykorzystania technik klonowania we wspomaganym rozrodzie bydła, technologii żywności, przemyśle biofarmaceutycznym, biomedycynie oraz restytucji ginących lub wymarłych ras i gatunków zwierząt. *Wiadomości Zootechniczne*, 2019, LVII, 4, 78-92.
- [55] Smorąg Z., Słomski R., Jura J., Lipiński D., Skrzyszowska M.: Transgeniczne świnie jako dawcy tkanek i narządów do transplantacji u ludzi. *Przegląd Hodowlany*, 2011, 11, 1-4.
- [56] Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 2015/2283 z dnia 25 listopada 2015 r. w sprawie nowej żywności, zmieniające rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1169/2011 oraz uchylające rozporządzenie (WE) nr 258/97 Parlamentu Europejskiego i Rady oraz rozporządzenie Komisji (WE) nr 1852/2001.
- [57] Stasiak K., Łakota P., Stadnicka K.: Ocena zdolności zapładniającej nasienia buhajów w oparciu o analizę *in vivo* i *in vitro*. *Med. Weter.*, 2017, 73 (6), 357-361.
- [58] Sun L., Nasrullah, Ke F., Nie Z., Wang P., Xu J.: Citrus Genetic Engineering for Disease Resistance: Past, Present and Future. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, 20, #5256.

- [59] Szczurek P., Pieszka M.: Dlaczego świnie są tak cenne dla badań biomedycznych? Klaster LifeScience Kraków, 2019.
- [60] Tyczewska A., Bąkowska-Żywicka K.: Zwierzęta jako bioreaktory - przyszłość przemysłu farmaceutycznego? *Biotechnologia*, 2008, 3(82), 64-70.
- [61] Ustawa z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych. *Dz. U.* 2015 poz. 266.
- [62] Wall R. J.: Biotechnology for the production of modified and innovative animal products: transgenic livestock bioreactors. *Livestock Production Science*, 1999, 59, 2-3, 243-255.
- [63] Watson J. D., Crick F. H.: Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature*, 1953, 30, 171(4361), 964-967.
- [64] Watson J.D., Crick F.H.: The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 1953, 18, 123-131.
- [65] Wolko L., Słowski R.: Biblioteki DNA - droga do poznania organizacji genomów. *Biotechnologia*, 2003, 3 (62), 159-179.
- [66] Wroniewski S.: Rzodkiewnik pospolity – jednoroczna roślina z rodziny kapustowatych, Dostęp w Internecie [10.09.2022]: <https://swiatrolnika.info/informacje/rzodkiewnik-pospolity-jednoroczna-roslina-z-rodziny-kapustowatych.html>.
- [67] Wysoczańska A.: Produkcja mięsa komórkowego coraz tańsza. Dostęp w Internecie [25.09.2023]: <https://naukawpolsce.pl/aktualnosci/news%2C98555%2Cprodukcja-miesia-komorkowego-coraz-tansza.html>.
- [68] Zabielski R., Zarzyńska J.: Wyzwania związane z produkcją „sztucznego mięsa”. *Życie Weterynaryjne*, 2020, 95(2), 74-80.
- [69] Zbigniew Religa. [online]. PAP. Dostęp w Internecie [02.06.2020]: <https://dzieje.pl/postacie/zbigniew-religa>.
- [70] Zhao Z., Chen X., Dowbaj A.M., Sljukic A., Bratlie K., Lin L., Shan Fong E. L., Balachander G. M., Chen Z., Soragni A., Huch M., Zeng Y. A., Wang Q., Yu H.: Organoids. *Nat Rev Methods Primers*, 2022, 2, 94.
- [71] Zmarł sześć tygodni po przeszczepie serca świni. "Wiedział, że to jego ostatnia szansa, aby zrobić coś dla innych". [online]. TVN24. Dostęp w Internecie [03.11.2023]: <https://tvn24.pl/swiat/usa-przeszczep-serca-swini-pacjent-zmarl-po-szesciu-tygodniach-od-operacji-7421432>.

DEVELOPMENT OF RESEARCH IN THE FIELD OF BIOENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY

S u m m a r y

Background. Science has been developing since time immemorial. As a result of curiosity, observation or the desire to improve the standard of living, various techniques and methods used in every field of science have been created over the centuries, and are still being developed nowadays. This made it possible to develop biotechnology, and subsequently, bioengineering. Changes in industry start with laboratory works. The most important and most frequent methods and techniques used in laboratories, the history of their creation, their current applications and possible use in the future were discussed in the article. These methods and techniques concern various areas of life and involve interference in the lives of animals, such as crossbreeding, genetic transformations or manipulations carried out on material obtained from them.

Results and conclusions. Animal research makes it possible to improve the quality of human life, especially for patients. However, it should be remembered that animals are also sentient beings and cannot be overexploited. They must be provided with appropriate living conditions, ensuring animal welfare. The development and implementation of new legal regulations and the 3R principles, as well as the development of state-of-the-art cell and tissue culture technologies, allow for limiting the use of invasive procedures in animal research. It is impossible to list and describe all important methods and techniques that are currently, or will be, practiced and developed in the future. Science still has a lot to discover, develop and offer for practice.

Keywords: biotechnology, in vitro, bioengineering, GMO, genetic modifications 