

# **INNOWACYJNA TECHNOLOGIA WYKORZYSTANIA TKANEK TRANSGENICZNYCH ŚWIŃ DLA CELÓW BIOMEDYCZNYCH**

**PROF. DR HAB. RYSZARD SŁOMSKI,  
DR HAB. MARLENA SZALATA, PROF. UPP**

Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Niedobór organów i tkanek od zmarłych dawców, niezbędnych dla leczenia niewydolności narządów, jest znaczącym problemem w transplantologii. Wydłużająca się średnia długość życia ludzi doprowadziła do wzrostu liczby pacjentów cierpiących na choroby przewlekłe oraz schyłkową niewydolność narządów. Dodatkowo, niewydolność narządów pojawia się także u noworodków oraz w okresie niemowlęctwa. Zapotrzebowanie na organy, tkanki i komórki do transplantacji (np. serce, nerki, komórki Langerhansa, naczynia krwionośne) znacznie przewyższa liczbę dostępnych dawców. Mimo że obecnie w USA ponad sto tysięcy pacjentów oczekuje na przeszczep, liczba dawców organów, które staną się dostępne w ciągu bieżącego roku, będzie znacznie mniejsza (ok. czterdzieści tysięcy). Rozziew pomiędzy liczbą dostępnych organów a liczbą oczekujących na przeszczep rośnie z roku na rok. Mimo udanego wprowadzenia możliwości przeszczepiania nerek i wątroby od spokrewnionych dawców, mało prawdopodobne wydaje się spełnienie potrzeb wszystkich oczekujących na przeszczep.

Sytuacja jest jeszcze trudniejsza w przypadku pacjentów czekających na transplantację komórek, m.in. wysepek trzustkowych. Dotyczy to głównie osób dotkniętych cukrzycą. W USA wielu pacjentów spośród blisko 3 mln chorujących na cukrzycę typu I mogłoby skorzystać z możliwości przeszczepienia wysepek trzustkowych, ale wyraźny

spadek liczby potencjalnych dawców nie rozwiąże tego problemu. Liczba dostępnych zasobów wysepek trzustkowych człowieka nigdy nie będzie wystarczająca do wyleczenia milionów chorych pacjentów.

Jakie są alternatywy dla organów i komórek człowieka? Mimo ostatnich postępów w biologii komórek macierzystych i inżynierii tkankowej, kliniczne zastosowanie technik z zakresu powyższych dziedzin pozostaje w dalekiej przyszłości. Łatwo dostępne źródło narządów, tkanek i komórek pochodzenia zwierzęcego (transplantacja między gatunkami, ksenotransplantacja) rozwiązałoby istniejący problem. W ciągu minionego stulecia odnotowano niewielką liczbę klinicznych prób wykorzystania narządów pochodzenia zwierzęcego do transplantacji, przy czym w większości przypadków źródłem narządów były naczelnie, wyłączając człowieka. Wyniki w większości nie były satysfakcjonujące, chociaż zdarzyły się badania, w których wątroba pawiana funkcjonowała w organizmie człowieka około 70 dni, a nerki nawet do 9 miesięcy. Powyższe próby były obiecujące, czas przetrwania przeszczepu był stosunkowo długi, a pacjenci kwalifikowani do przeszczepu nie przeżywali z powodów związanych nie tylko z problemem odrzucenia przeszczepu. Rozwój ksenotransplantacji w układzie świnia – człowiek może przyczynić się rozwiązania powyższego problemu.

Ksenotransplantacja jest procedurą transplantacji, implantacji lub infuzji do organizmu człowieka żywych komórek, tkanek lub organów pochodzących od innych organizmów niż człowiek oraz płynów ustrojowych, komórek, tkanek lub organów, które miały *ex vivo* kontakt z komórkami, tkankami, organami innymi niż człowieka. Pierwsze tkanki zwierzęce zostały przeszczepione człowiekowi już w 1682 r.; kiedy uzupełniono ubytek czaszki człowieka fragmentem czaszki psa. W 1984 r. zainteresowanie ksenotransplantacją odnowiło się po próbie przeszczepienia niemowlęciu serca pochodzącego od pawiana – „przypadek Baby Fae”. Każda z tych prób, jak wiele innych, kończyła się tylko częściowym powodzeniem. Jednak dopiero nowoczesne metody inżynierii komórkowej umożliwiają zastosowanie ksenotransplantacji jako nieograniczonego źródła komórek i narządów do przeszczepów.

Obecnie nad ksenotransplantacją pracują najlepsze zespoły badawcze na świecie. Taki zespół pracuje również w Polsce. Ponieważ uzyskane wyniki badań mogą być wykorzystane w praktyce i wiążą się z uzyskiwaniem dochodów, szczególnie badań prowadzonych w wielu ośrodkach nie są udostępniane. Ksenotransplantacja jest przedsięwzięciem interdyscyplinarnym, wymagającym doskonalenia wielu metod badawczych. Badania obejmują cały szereg zagadnień, od biologii molekularnej (uzyskanie odpowiednich wektorów), poprzez rozród

zwierząt, a w szczególności embriologię eksperymentalną (wprowadzanie konstrukcji genowych), hodowlę świń (utrzymanie zwierząt), immunologię (ustalenie zgodności tkankowej biorcy i dawcy, detekcja wirusów), aż do chirurgii transplantacyjnej.

Badania kliniczne wskazują, że świnia domowa najlepiej spełnia kryteria przydatności organów do ksenotransplantacji. Wielkość narządów, ich wydolność fizjologiczna jest niemal identyczna z organami człowieka. Za wyborem świni jako potencjalnego dawcy narządów do ksenotransplantacji przemawiają również następujące fakty: świnia jest gatunkiem o wysokiej plenności i płodności, tanim i łatwym w utrzymaniu, ponadto osobniki szybko rosną, a ich organy w stosunkowo krótkim czasie osiągają pełną wielkość i wydolność fizjologiczną, stosowaną do potrzeb ksenotransplantacji. Ponadto świnia jest gatunkiem, u którego – w porównaniu do innych dużych zwierząt – dosyć łatwo można przeprowadzić modyfikacje genowe.

Transplantacja narządu zawsze wiąże się z ryzykiem odrzucenia przeszczepu, co w przypadku przeszczepów allogenicznych zostało w większości przypadków pokonane dzięki stosowaniu leków immunosupresyjnych, hamujących aktywność układu odpornościowego. Ma to związek z występowaniem ksenoreaktywnych przeciwciał i różnic w układzie dopełniacza. Nie bez znaczenia jest również ostre odrzucenie naczyniowe i opóźnione odrzucenie. Najpoważniejszą kwestią związaną z transplantacją w ogóle, a ksenotransplantacją w szczególności, jest właśnie problem zgodności immunologicznej narządu dawcy i organizmu biorcy.

Ksenotransplantacji poświęca się wiele uwagi ze względu na brak stuprocentowej pewności, czy jest to technologia całkowicie bezpieczna dla człowieka. Z całą pewnością trzeba być świadomym potencjalnych zagrożeń, jakie może nieść ksenotransplantacja. Jednym z nich jest możliwość zarażenia człowieka utajonymi renowirusami (PERV).

Przygotowywanie komórek świń do ksenotransplantacji prowadzone jest wielokierunkowo, poprzez wyłączenie określonych genów (*knock-out*), jak i przez wprowadzenie dodatkowych genów, zmieniających antygeny powierzchniowe komórek świni. Transgeneza zwierząt skupia się głównie na przygotowaniu konstrukcji genowych inaktywujących gen kodujący 1,3 galaktozylotransferazę (1,3GT) albo zwiększenia ekspresji enzymu  $\alpha$ 1,2-fukozylotransferazy konkurującego o ten sam substrat, alfa galaktozydazy człowieka, głównego układu zgodności tkankowej człowieka HLA-E oraz białka układu dopełniacza CD59. Otrzymano już kilka rodów transgenicznych zwierząt, w pełni scharakteryzowanych, dostępnych do prac wdrożeniowych. Do tej pory

uzyskano świnie zawierające gen 1,2-fukozylotransferazy człowieka, alfa galaktozydazy człowieka, głównego układu zgodności tkankowej człowieka HLA-E, białka układu dopełniacza CD59, a także wyłączono geny świni kodujące białko wiążące glikoproteinę UL-16 (gen *ULBP1*) czy alfa1,3-galaktozylotransferazę świni.

Mające miejsce w ostatnich latach najważniejsze wydarzenia dotyczące wykorzystania transgenicznych świń na potrzeby ksenotransplantacji można podsumować w następujący sposób. 1) Czynnikiem napędzającym badania jest ograniczenie dostępności organów od zmarłych na potrzeby transplantacji klinicznych. 2) Można ograniczyć natychmiastowe odrzucenie przeszczepu przez układ odpornościowy człowieka. 3) Główne cele inżynierii genetycznej świń obejmują zwiększenie przeżywalności transplantowanych serc, nerek, wysepek Langerhansa i rogówki świń u naczelnych. 4) Nowoczesna inżynieria genetyczna świń ogranicza ryzyko przeniesienia potencjalnie infekcyjnych mikroorganizmów. 5) Wprowadzono obecnie ok. 40 lub więcej zmian genetycznych u świń, przy czym świni mogą mieć wprowadzone nawet kilkanaście zmian. 6) Możliwe stają się badania kliniczne związane z transplantacją nerek, serca, naczyń krwionośnych i wysepek Langerhansa świń.

Niezmiernie ważny etap uzyskiwania transgenicznych świń stanowi wprowadzanie konstrukcji genowych do komórek zwierząt. Najważniejszą i najstarszą metodą jest mikroiniekcja konstrukcji genowej do przedjądrza męskiego zapłodnionej komórki jajowej. Ciekawą metodą przyspieszającą wydajność transgenezy jest klonowanie somatyczne transgenicznych zwierząt z potwierdzoną ekspresją transgenu. Obecnie stosuje się jednak głównie najnowocześniejsze podejście związane z edycją genomów, umożliwiające wprowadzanie modyfikacji zwierząt w sposób ściśle kontrolowany. Przed przystąpieniem do dalszych etapów konieczne jest przeprowadzenie oceny modyfikacji powierzchni komórek, ponieważ głównym celem jest usunięcie z powierzchni komórek świń epitopu  $\alpha 1,3\text{Gal}$ , powodującego natychmiastowe odrzucenie przeszczepu i wprowadzenie białek człowieka regulujących kaskadę dopełniacza. Niezmiernie ważne jest również określenie na poziomie DNA transgenezy oraz ocena jej stabilności. Z ksenotransplantacją wiąże się zagadnienie występowania potencjalnych zagrożeń związanych z ryzykiem zakażenia wirusami biorców przeszczepów. Transgeniczna świnia może stać się dawcą różnych narządów, a przeszczepienie każdego z nich (serce, wątroba, nerka, płuca, trzustka) stanowi oddzielny problem chirurgii transplantacyjnej.

W naszym kraju wybitni chirurdzy transplantolodzy wykazywali duże zainteresowanie postępami w badaniach z zakresu ksenotrans-

plantacji. Profesor Zbigniew Religa, który dokonał pierwszego w Polsce przeszczepu serca, minister zdrowia w latach 2005–2007, wielokrotnie podczas naszych roboczych spotkań wyrażał duże zainteresowanie badaniami i je popierał. Przewidywane na 15 minut spotkania z reguły trwały ponad godzinę. Zmarły ostatnio prof. Marian Zembala, minister zdrowia w rządzie Ewy Kopacz w 2015 r., bliski współpracownik prof. Religi, brał udział w latach 2002–2006 w realizacji projektu PBZ-KBN-048/P05/2001 „Wykorzystanie transgenezy w genetycznej modyfikacji świń dla pozyskiwania organów do transplantacji u człowieka”. Profesor Zembala, podobnie jak prof. Religa, wspierał badania ksenotransplantacyjne, jednak był bardziej sceptyczny. Ogromne zasługi w badaniach nad ksenotransplantacją i pozyskiwaniem środków na badania ma prof. Zdzisław Smorąg z Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego w Balicach.

W ostatnim dziesięcioleciu kilkanaście polskich zespołów badawczych uczestniczyło we wspólnych projektach badawczych z zakresu ksenotransplantacji. Ostatni projekt dotyczył opracowania innowacyjnej technologii wykorzystania tkanek transgenicznych świń, które ze względu na modyfikacje genetyczne znajdują zastosowanie w ksenotransplantacji, ze szczególnym uwzględnieniem skóry, zastawek, naczyń i przyszłościowo wysepek Langerhansa, nerek i serca. Efektem nowatorskiego podejścia było uzyskanie świń, których komórki nie są rozpoznawane przez układ odpornościowy biorcy i stanowią alternatywę dla komórek macierzystych i sztucznych narządów, jak również umożliwią przyszłościowe wykorzystanie transgenicznych tkanek u pacjentów oczekujących na przeszczepy. Uzyskane w projekcie transgeniczne świnię znalazły zastosowanie w praktyce, co jest znaczącym osiągnięciem nie tylko w ramach krajowych prac badawczo-rozwojowych, lecz również w obszarze światowych badań.

Cele badań zostały zrealizowane przez Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu (lider projektu, UPP); Instytut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy w Balicach (IZ-PIB); Instytut Genetyki Człowieka PAN (IGC PAN); Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (UMP); Fundację Rozwoju Kardiologii im. prof. Zbigniewa Religi w Zabrzu (FRK); Centrum Leczenia Oparzeń im. dr. Stanisława Sakiela w Siemianowicach Śląskich (CLO) oraz Laboratorium Genetyki Molekularnej w Poznaniu (LGM).

W trakcie badań pojawiła się obawa związana z ryzykiem zakażenia biorcy przez endogenne retrowirusy świni PERV (ang. *porcine endogenous retroviruses*), przy czym w ramach projektu rozwiązano ten problem poprzez selekcję świń pozbawionych wirusa PERV. Badania wirusolo-

giczne zostały zapoczątkowane w zespole prof. Tadeusza Wilczoka, rektora Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w latach 1999–2005, współpraca jest kontynuowana do dnia dzisiejszego przez jego następców. Znaczny dystans filogenetyczny między świnia a człowiekiem prowadzi również do natychmiastowego odrzucania narządów świni w wyniku tzw. nadostrej reakcji immunologicznej. Uważa się, że modyfikacja genetyczna zwierząt pozwoliłaby przedłużyć czas przeżycia przeszczepów odzwierzęcych z kilku minut do kilku lat, a to pozwoliłoby myśleć o ich wykorzystaniu w transplantologii. Szereg problemów związanych z ewentualnym odrzucaniem przeszczepu rozwiązano poprzez modyfikacje genetyczne. Prowadzone prace hodowlane umożliwiają uzyskanie transgenicznych świń z delecją w obydwu allelach genu, prowadząc do wyłączenia antygeny Gal. Obecnie w Fundacji Rozwoju Kardiochirurgii zespół prof. Piotra Wilczka prowadzi prace, których celem jest sprawdzenie możliwości wykorzystania do przeszczepów zastawek, natomiast w Centrum Leczenia Oparzeń w Siemianowicach Śląskich dr Agnieszka Klama-Baryła wykorzystuje w praktyce klinicznej skórę pochodzącą od uzyskanych w ramach projektu ksenotransplantacyjnego zwierząt jako materiał opatrunkowy. W ramach prac otrzymano patent nr P.404878 pt.: „Biotechnologiczny opatrunek do leczenia ran oparzeniowych, sposób wykonania opatrunku biotechnologicznego do leczenia ran oparzeniowych i sposób zastosowania opatrunku biotechnologicznego do leczenia ran oparzeniowych”, którego twórcami są Kazimierz Cieślík, Zdzisław Smorąg, Ryszard Słomski, Mariusz Nowak i Marek Kawecki.

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu podjął badania, których celem jest wykorzystanie skóry i naczyń krwionośnych transgenicznych świń. Badaniami kierowali prof. Grzegorz Oszkiniś i dr hab. Ewa Strauss.

Zrealizowanie zaplanowanych etapów zapewnia możliwość komercjalizacji projektu. Dodatkowo na uwagę zasługuje duża aktywność wszystkich zespołów w upowszechnianiu wyników projektu, co zostało również zauważone i nagrodzone przez organizatorów II Forum Inteligentnego Rozwoju i przyznanie Euro Symbolu Innowacji w 2017 r. Wartościami dodatkowymi projektu jest wykazanie możliwości ścisłej współpracy wykonawców na tym samym materiale biologicznym, jak również wprowadzenie do badań technologii modyfikacji CRISPR/Cas9 i uzyskanie tą metodą pierwszych na świecie dużych zwierząt z wyłączonymi genami warunkującymi odrzucanie przeszczepów.

Instytut Zootechniki – PIB pod kierunkiem prof. Zdzisława Smorąga opracował system hodowli oraz pozyskiwania tkanek transgenicznych świń oraz zaangażował się w biotechnologię rozrodu. Zespół pozyskiwał

skórę, zastawki i naczynia krwionośne od transgenicznych świń do wykorzystania w biomedycynie. Prowadzono prace krzyżownicze, mające na celu uzyskanie świń z wielogenową transgenezą, niezbędnych do realizacji innych zadań projektu. Po kilku lub kilkunastu dniach po urodzeniu od wszystkich prosiąt pobierano skrawki tkanki usznej i przekazywano je do kierowanych przeze mnie zespołów poznańskich, gdzie były identyfikowane osobniki transgeniczne. Wszystkie transgeniczne świny były monitorowane wirusologicznie w laboratoriach Śląskiego Uniwersytetu Medycznego, kierowanych przez prof. Urszulę Mazurek i prof. Ilonę Bednarek.



**Ryc. 1.** Pierwsza transgeniczna świnka - knur TG1154, założyciel rodu z genem człowieka kodującym  $\alpha 1,2$ -fukozylotransferazę człowieka regulowaną promotorem CMV. Był przygotowany na potrzeby ksenotransplantacji i był ojcem wielu pokoleń świń dzięki stosowanemu sztucznej zapłodnieniu.

Zespół prof. Zdzisława Smorąga opracował system hodowli oraz pozyskiwania skóry, zastawek i naczyń krwionośnych od transgenicznych świń do wykorzystywania w biomedycynie. Od knurów transgenicznych uzyskiwano plemniki najądrzowe, a lochy i loszki transgeniczne poddawano superowulacji i uzyskiwano od nich zarodki. Wykorzystano tutaj kompetentny kriobiologiczny zespół, który jako jeden z pierwszych na świecie uzyskał potomstwo po transplantacji kriokonserwowanych zarodków świni. Kriokonserwowane zarodki, podobnie jak kriokonserwowane nasienie pochodzące od transgenicznych świń, stanowiły bank materiału genetycznego, który w zależności od potrzeb w dowolnym miejscu i czasie może być wykorzystywany do odtwarzania stada transgenicznych świń.

Ten sam zespół zwiększał potencjał uzyskiwania świń politransgenicznych metodami biotechnologii rozrodu oraz uzyskiwanie politransgenicznych świń techniką klonowania somatycznego. Wyprowadzono linie komórek fibroblastycznych z eksplantów płodowych pochodzących od potencjalnie transgenicznych prosiąt, potwierdzono transgenezę

metodami molekularnymi. W badaniach wyprowadzono również linie klonalne transfekowanych fibroblastów płodowych.

Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu pod moim kierunkiem zajął się opracowaniem i charakterystyką nowych konstrukcji genowych zapobiegających odrzuceniu ksenoprzeszczepu. Przygotowane konstrukcje genowe wprowadzano do świń w Instytucie Zootechniki - PIB w Balicach oraz do linii komórkowych *in vitro* na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu, a potencjalnie transgeniczne potomstwo i komórki analizowano molekularnie oraz cytogenetycznie na UPP. Zaprojektowano i wykonano ekspresyjne konstrukcje genowe, wprowadzające białka człowieka, jak również inaktywujące konstrukcje genowe, wyłączające aktywność endogennych genów świni. Przygotowano ponadto konstrukcje typu inaktywującego w technologii CRISPR/Cas9. Zaadoptowano również magnetofekcję w celu otrzymania transgenicznych komórek, poprzez wprowadzanie kwasów nukleinowych do komórek w polu magnetycznym działającym na nanocząstki magnetyczne, które są zasocjowane z kwasem nukleinowym.

W ramach wieloparametrycznej charakterystyki transgenicznych zwierząt z uwzględnieniem genomiki, cytogenetyki, proteomiki i testów funkcjonalnych na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu pod moim kierunkiem oceniano integrację i ekspresję transgenów w komórkach i tkankach świń oraz określano prawidłowości kariotypu i mapowano transgen metodami cytogenetyki klasycznej i molekularnej.

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu zajął się opracowaniem metod leczenia chorób naczyń człowieka w oparciu o naczynia transgenicznych świń. Badania „*ex vivo*” materiału ksenogenicznego pozyskiwanego od świni transgenicznej obejmowały porównawcze badania morfometryczne aorty człowieka i świń, wykazując większą elastyczność naczyń zwierząt transgenicznych, co potwierdziły badania wstępne, wskazując jednocześnie ich wysoką przydatność kliniczną. Wykazano, że linie transgeniczne cechuje o połowę niższa immunogenność w zakresie odrzutu nadostrego w porównaniu z liniami nietransgenicznymi. Opracowano protokół badań przedklinicznych I mających na celu ocenę *in vivo* właściwości graftów skórnych pełnej grubości pochodzących od świń transgenicznych, jako substancji leczniczej w rozumieniu art. 2 pkt 38b ustawy z dnia 6 września 2001 r. - Prawo farmaceutyczne.

Fundacja Rozwoju Kardiochirurgii w Zabrze opracowała technologię wytwarzania innowacyjnych bioprotez zastawek serca z wykorzystaniem technik inżynierii tkankowej i metod biologii molekularnej. Ośrodek prowadził ocenę *in vitro* biokompatybilności badanych materiałów



z uwzględnieniem procesów indukcji reakcji immunologicznej, trombogenności i podatności na kalcyfikację. Materiał do badań stanowiły zastawki płucne pozyskiwane od transgenicznych świń. Jako grupę kontrolną wykorzystano tkanki od świń nietransgenicznych. Do badań wykorzystywano zarówno tkanki natywne, jak i decellularne. Badania prowadzono również na komórkach izolowanych z pozyskiwanych tkanek. Badania immunogenności oraz trombogenności *in vitro* wykonywano na krwi pełnej ludzkiej konserwowanej, pozyskiwanej z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa w Katowicach. Wszystkie testy prowadzono z wykorzystaniem bioreaktorów dla zapewnienia warunków przepływu zbliżonych do fizjologicznych.

Centrum Leczenia Oparzeń w Siemianowicach Śląskich opracowało dwa warianty opatrunku biologicznego ze skóry transgenicznych świń przeznaczonych do wykorzystania klinicznego u chorych z ranami oparzeniowymi i przewlekłymi, z zastosowaniem technik inżynierii tkankowej i komórkowej. W pierwszym etapie opracowano procedury przygotowania opatrunku skóry świńskiej pośredniej grubości, krioprezerwowanej w glicerolu.

Skóra świń transgenicznych pochodziła od zwierząt z wyłączonym genem warunkującym powstawanie antygeny  $\alpha$ Gal ( $\alpha$ -1,3-galaktozylotransferaza) oraz ze zmodyfikowanymi białkami powierzchniowymi komórek (gen  $\alpha$ -1,2-fukozylotransferazy człowieka). Początkowo w badaniach stosowano pobrane dermatomem skrawki skóry, które posiadały właściwości gojenia ran (ryc. 2).



**Ryc. 2.** Pozyskiwanie opatrunku ze skóry transgenicznych świń. Pierwsze prace wdrożeniowe prowadził dr Kazimierz Cieślak w Centrum Leczenia Oparzeń w Siemianowicach Śląskich. Prace kontynuowała dr Agnieszka Klama-Baryła.

Najwyższy odsetek komórek żywych odnotowano w hodowlach keratynocytów inkubowanych ze skórą świńską w 15% glicerolu (79% komórek to komórki żywe) i skórą ludzką inkubowaną w 15% glicerolu – 82% komórek żywych. Jedną z metod oceny jakościowej przygotowywanych produktów była analiza histopatologiczna przygotowanych opatrunków ze skóry konserwowanej w glicerolu.

W kolejnym etapie opracowano metody usuwania komórek z macierzy pozakomórkowej skóry właściwej świń transgenicznych (ADM) w celu uzyskania matrycy do hodowli komórek *in vitro*.

Centrum Leczenia Oparzeń w Siemianowicach Śląskich uzyskało zgody Komisji Bioetycznej na wykonanie eksperymentu medycznego obejmującego 50 chorych w pierwszej części eksperymentu (pacjentów z polami dawczymi) i 20 chorych w drugiej części eksperymentu (pacjenci z ranami oparzeniowymi). Badania kliniczne wykazały, że zastosowanie skóry świńskiej glicerowanej zmniejszyło odczuwane przez pacjentów dolegliwości bólowe, co jest znamienne z klinicznego punktu widzenia. Procedura umożliwiła skrócenie czasu hospitalizacji o średnio 8 dni, co znacznie wpływa na redukcję kosztów hospitalizacji. Skóra świńska glicerowana pod względem bezpieczeństwa stosowania jest porównywalna ze standardową metodą leczenia. Ponadto przeszczep macierzy pozakomórkowej skóry właściwej świń transgenicznych z autologicznymi keratynocytami zmniejsza odczuwane przez pacjentów dolegliwości bólowe w porównywalny sposób z obecną metodą leczenia i prowadzi do skrócenia czasu hospitalizacji średnio o 1 dzień, co nie jest wynikiem istotnym statystycznie, jednak ważnym z punktu widzenia redukcji kosztów hospitalizacji. Przeszczep ten jest również bezpieczny jak złoty standard, co wynika z braku różnic pomiędzy badanymi parametrami w grupie badanej i kontrolnej (ryc. 3).

Laboratorium Genetyki Molekularnej prowadzi kontrolę spójności jakościowej realizowanych zadań i stabilności transgenezy, łącząc partnerów naukowych i biznesowych. Zwracano również uwagę na zachowanie odpowiednich kontroli badań oraz płynność przekazywania informacji do Instytutu Zootechniki PIB w Balicach, pod którego kontrolą znajdują się zwierzęta i program ich krzyżowań oraz przekazywanie materiału biologicznego do wszystkich konsorcjantów. Przeprowadzono również weryfikację wyników transgenezy z zastosowaniem technologii CRISPR/Cas9 do uzyskiwania nowych modyfikacji, jak również określono zmienność genetyczną wybranych świń.

Laboratorium zgromadziło informacje o dostępnych regulacjach prawnych związanych z zastosowaniem komórek i tkanek ksenogenicznych pochodzących od zwierząt nietransgenicznych i transgenicznych



**Ryc. 3.** Pierwsze zastosowanie skóry transgenicznych świń do ratowania życia ciężko poparzonych osób w Centrum Leczenia Oparzeń w Siemianowicach Śląskich

w oparciu o przepisy amerykańskiej Agencji ds. Żywności i Leków (*Food and Drug Administration, FDA*) oraz Europejskiej Agencji Leków (*European Medicines Agency, EMA*). Należy pamiętać, że w ostatnich latach dokonał się olbrzymi postęp w tej dziedzinie, ponieważ dostępnych komercyjnie jest kilka leków uzyskiwanych w transgenicznych zwierzętach (rekombinowana antytrombina III człowieka uzyskiwana w mleku kóz – ATryn®; lizosomalna kwaśna lipaza człowieka uzyskiwana w białku jaj – Kanuma). Dopuszczono również pierwsze transgeniczne zwierzę do spożycia (łośność *AquAdvantage*). Laboratorium zwróciło również uwagę na prace prowadzone przez brytyjską firmę Oxitec, która opracowała genetycznie modyfikowaną linię komara *Aedes aegypti* (OX513A) w celu ograniczenia populacji tego komara w miejscu uwalniania. Prace związane z charakterystyką zwierząt transgenicznych na poziomie molekularnym, cytogenetycznym, komórkowym i funkcjonalnym spełniają wymagania niezbędne do zatwierdzenia proponowanych rozwiązań przez EMA czy FDA. Zagadnienia te obejmują zarówno zwierzęta, ich dobrostan, przygotowanie i charakterystykę konstrukcji genowych, wykrywanie transgenicznych zwierząt, analizy na poziomie DNA, RNA, białek, na poziomie komórkowym i zwierzęcym, aż do oceny ekspresji i stabilności transgenezy, jak również praktycznego zastosowania skóry, naczyń i zastawek. Na razie problem stanowić może ryzyko zakażenia wirusami PERV, ale dzięki metodom edycji genomu to zagrożenie wydaje się być ograniczone i w najbliższym czasie można oczekiwać komercyjnie dostępnych świń do ksenotransplantacji, nie

tylko w Chinach, które mają olbrzymie zapotrzebowanie na narządy do przeszczepów, ale także w Stanach Zjednoczonych i Europie. Tutaj bardzo dobrze wpisuje się projekt MEDPIG. Należy podkreślić również zaangażowanie jednostek bezpośrednio wdrażających osiągnięcia projektu, tj. Centrum Leczenia Oparzeń, Fundacji Rozwoju Kardiochirurgii, jak również Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Przez ostatnie lata nie było informacji o badaniach ksenotransplantacyjnych prowadzonych w Stanach Zjednoczonych. Podczas pobytu w Texas Heart Institute w Houston zorientowałem się, że prowadzone są badania z zastosowaniem dużych zwierząt, jednak nie było informacji o badaniach przełomowych. Dopiero pojawienie się technologii edycji genomu spowodowało przyspieszenie i szerokie rozwinięcie badań. W grudniu 2020 r. FDA zatwierdziła pierwszą zamierzoną zmianę genomową w linii świń domowych. Świnie GalSafe® pozbawione są epitopu  $\alpha 1,3\text{Gal}$  na powierzchni komórek. Homozygotyczne świnie GalSafe® są przeznaczone do stosowania zarówno jako żywność, jak i do wytwarzania leków dla ludzi.

W styczniu 2022 roku naukowcy Wydziału Medycznego Uniwersytetu Maryland w Baltimore donieśli o przeszczepie serca świni pacjentowi, dla którego nie można było znaleźć dawcy. Była to pierwsza transplantacja serca między zwierzęciem a człowiekiem. Odbiorcą był 57-letni pacjent David Bennett, a zabieg chirurgiczny przeprowadził dr Bartley P. Griffith. FDA udzieliła zezwolenia na operację w trybie pilnym, co ma zastosowanie jedynie w sytuacji, gdy eksperymentalny produkt medyczny, w tym przypadku serce zmodyfikowanej genetycznie świni, było jedyną dostępną opcją leczenia dla pacjenta. Badania z zakresu ksenotransplantacji na Uniwersytecie Maryland zostały zainicjowane pięć lat wcześniej przez znakomitej sławy uczonego Muhammada M. Mohiuddina, którego poznałem na Kongresie Międzynarodowego Towarzystwa Ksenotransplantacyjnego w Monachium w 2019 roku. Wymieniliśmy wówczas poglądy dotyczące nowoczesnych sposobów modyfikacji komórek świń, ponieważ realizowaliśmy w kraju omówiony wcześniej projekt MEDPIG „Opracowanie innowacyjnej technologii wykorzystania tkanek transgenicznych świń dla celów biomedycznych”. Podkreślić należy, że tkanki transgenicznych zwierząt – skóra, zastawki, naczynia mogą być stosowane do leczenia pacjentów onkologicznych. Poprzez uczestniczenie w unijnej akcji COST BM1308 „Sharing Advances on Large Animal Models” mogliśmy z wynikami prac prowadzonych w Polsce zaznajomić społeczność międzynarodową.

Przeszczep serca świni przeprowadzono zaledwie dwa miesiące po przeszczepieniu nerki świni przez dra Roberta Montgomery’ego z aka-

demickiego centrum medycznego w Nowym Jorku. U dawcy - świni transgenicznej, wprowadzono dziesięć modyfikacji genetycznych, których celem było zapobiegnięcie odrzuceniu przeszczepu. Zlikwidowano również niebezpieczeństwo uaktywnienia się wirusów świni. Pacjent zmarł dwa miesiące po zabiegu, a szpital stwierdził, że przeszczepione serce działało dobrze przez kilka tygodni i nie zaobserwowano oznak odrzucenia.

Badania nad ksenotransplantacją intensywnie się rozwijają. Naukowcy z Niemiec również pracują nad hodowlą świń, których serca mogą potencjalnie zostać przeszczepione ludziom, jest to związane z dużym zapotrzebowaniem i poparciem społecznym. Działająca tam firma Xtransplant-LMU ma na celu rozwój chronionych patentem genetycznie modyfikowanych świń dawców, jak również produkcję świń dawców w warunkach określonych jako wolne od patogenów. Planowane jest przygotowanie kanałów dystrybucji narządów obejmujących również sieć klinik transplantacyjnych z certyfikatem XTransplant. Niezbędne jest wsparcie techniczne podczas przeszczepu narządów oraz zapewnienie obserwacji klinicznej pacjentów po przeszczepieniu i biobankowanie. Do badań wybrano świnię Auckland Island z Nowej Zelandii ze względu na niewielkie rozmiary, co sprawia, że ich serce jest bardziej odpowiednie dla człowieka. Profesor Eckhard Wolf z Uniwersytetu Ludwiga Maximiliana w Monachium planuje genetyczne modyfikowanie świń dawców, aby ich narządy nie zostały odrzucone po przeszczepieniu ludziom. Naukowcy wyłączają określone geny świń i dodają geny człowieka, aby umożliwić przeszczep. Projekt przejdzie testy w 2025 r.

## BIBLIOGRAFIA

- Gabriel, M., Pukacki, F., Dzieciuchowicz, Ł., Oszkinis, G., Chęciński, P. (2004). Cryopreserved arterial allografts in the treatment of prosthetic graft infections. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 27, 590–596.
- Goerlich, C.E., Griffith, B.; Hanna, P., Hong, S.N., Ayares, D., Singh, A.K., Mohiuddin, M.M. (2021) The growth of xenotransplanted hearts can be reduced with growth hormone receptor knockout pig donors. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* S0022-5223(21)01261-7.
- Hryhorowicz, M., Grześkowiak, B., Mazurkiewicz, N., Śledziński, P., Lipiński, D., Słomski, R. (2019). Improved Delivery of CRISPR/Cas9 System Using Magnetic Nanoparticles into Porcine Fibroblast. *Mol. Biotechnol.* 61, 3, 173–180.

- Kemter, E., Schnieke, A., Fischer, K., Cowan, P.J., Wolf, E. (2020). Xeno-organ donor pigs with multiple genetic modifications – the more the better? *Current Opinion in Genetics & Development*. 64:60–65.
- Kemter, E., Citro, A., Wolf-van Buerck, L., Qiu, Y., Böttcher, A., Policardi, M., Pellegrini, S., Valla, L., Alunni-Fabbroni, M., Kobolák, J., Kessler, B., Kurome, M., Zakhartchenko, V., Dinnyes, A., Cyran, C.C., Lickert, H., Piemonti, L., Seissler, J., Wolf, E. (2022). Transgenic pigs expressing near infrared fluorescent protein-A novel tool for noninvasive imaging of islet xenotransplants. *Xenotransplantation*. 29(1): e12719.
- Kimsa-Dudek, M., Strzalka-Mrozik, B., Kimsa, M.W., Blecharz, I., Gola, J., Skowronek, B., Janiszewski, A., Lipinski, D., Zeyland, J., Szalata, M., Słomski, R., Mazurek, U. (2015). Screening pigs for xenotransplantation: expression of porcine endogenous retroviruses in transgenic pig skin. *Transgenic Res*. 24, 3, 529–536.
- Klama-Baryła, A., Kitala, D., Łabuś, W., Kraut, M., Szapski, M., Słomski, R. (2020). Is Transgenic Porcine Skin as Good as Allogeneic Skin for Regenerative Medicine? Comparison of Chosen Properties of Xeno- and Allogeneic Material. *Transplant. Proc.* 52, 7, 2208–2217.
- Meier, R.P.H., Longchamp, A., Mohiuddin, M., Manuel, O., Vrakas, G., Maluf, D.G., Buhler, L.H., Muller, Y.D., Pascual, M. (2021) Recent progress and remaining hurdles toward clinical xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 28(3): e12681.
- Ryczek, N., Hryhorowicz, M., Lipiński, D., Zeyland, J., Słomski, R. (2020). Evaluation of the CRISPR/Cas9 Genetic constructs in efficient disruption of porcine genes for xenotransplantation purposes along with an assessment of the off-target mutation formation. *Genes (Basel)*. 11, 6, 713.
- Samiec, M., Skrzyszowska, M. (2014). Biological transcomplementary activation as a novel and effective strategy applied to the generation of porcine somatic cell cloned embryos. *Reprod. Biol.* 14, 2, 128–139.
- Sikora, B., Skubis-Sikora, A., Kimsa-Furdzik, M., Ciszek, W., Kostrzewski, M., Stojko, J., Mazurek, U., Gola, J. (2019). Adipose-derived stem cells undergo differentiation after co-culture with porcine limbal epithelial stem cells. *Stem Cell Res*. 41, 101609.
- Słomski, R., Strauss, E., Lipiński, D., Smorąg, Z., Jura, J., Skrzyszowska, M., Samiec, M., Wilczek, P., Klama-Baryła, A. (2021). Innowacyjna technologia wykorzystania tkanek transgenicznych świń w ksenotransplantacji. [W:] *Nauka dla społeczeństwa. Osiągnięcia Instytutu Genetyki Człowieka PAN*. R. Słomski (red.), Wydawnictwo Instytutu Genetyki Człowieka PAN, Poznań, 149-174. ISBN: 978-83-950393-8-6.
- Smorąg, Z., Słomski, R., Cierpka, L. (red.) (2006). *Biotechnologiczne i medyczne podstawy ksenotransplantacji*. Wydawnictwo OWN, Poznań, 1-388. ISBN: 83-7314-013-1.

- Smoraǳ, Z., Słomski, R., Modliński, J.A. (2008). Od genomu tura po ksenotransplantację. Z. Smoraǳ, R. Słomski, J.A. Modliński (red.). Wyd. OWN, Poznań, 1–182.
- Wiater, J., Samiec, M., Skrzyszowska, M., Lipiński, D. (2021). Trichostatin A-Assisted Epigenomic Modulation Affects the Expression Profiles of Not Only Recombinant Human  $\alpha$ 1,2-Fucosyltransferase and  $\alpha$ -Galactosidase A Enzymes But Also Gal $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3Gal Epitopes in Porcine Bi-Transgenic Adult Cutaneous Fibroblast Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 3, 1386.
- Wilczek, P., Lesiak, A., Niemiec-Cyganek, A., Kubin, B., Słomski, R., Nozynski, J., Wilczek, G., Mzyk, A., Gramatyka, M. (2015). Biomechanical properties of hybrid heart valve prosthesis utilizing the pigs that do not express the galactose- $\alpha$ -1,3-galactose ( $\alpha$ -Gal) antigen derived tissue and tissue engineering technique. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 26, 1, 5329.