

<https://doi.org/10.56583/frp.2541>

**Ryszard Słomski\***

*Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk  
Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich Państwowy Instytut Badawczy*  
<https://orcid.org/0000-0001-5601-7002>

**Karolina Wielgus\*\***

*Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu*  
<https://orcid.org/0000-0003-0629-2991>

**Mikołaj Danielewski\*\*\***

*Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu*  
<https://orcid.org/0000-0002-2344-9471>

**Milena Szalata\*\*\*\***

*Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich Państwowy Instytut Badawczy*  
<https://orcid.org/0000-0003-1500-8251>

**Mariola Dreger\*\*\*\*\***

*Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich Państwowy Instytut Badawczy*  
<https://orcid.org/0000-0001-7594-2615>

**Marcin Ożarowski\*\*\*\*\***

*Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich Państwowy Instytut Badawczy*  
<https://orcid.org/0000-0003-2305-3116>

**Marlena Szalata\*\*\*\*\***

*Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*  
<https://orcid.org/0000-0002-0153-4317>

---

\* Ryszard Słomski – profesor nauk medycznych, biolog molekularny, genetyk i biotechnolog. Kierownik Zakładu Biotechnologii i Zakładu Komórek Macierzystych i Medycyny Regeneracyjnej Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich – PIB, pełnomocnik Dyrektora IWNiRZ – PIB ds. Rozwoju Naukowego, profesor w Instytucie Genetyki

## ROCZNICA ODKRYCIA STRUKTURY DNA – NOWE WYZWANIA DLA MEDYCYNY<sup>1</sup>

### Streszczenie

Odkrycie DNA i poznanie jego struktury miało duże znaczenie zarówno na polu naukowym jak i w życiu codziennym. Rozpoznanie DNA jako związku stanowiącego nośnik informacji genetycznej pozwoliło na rozwój genetyki oraz opracowanie metod genetyki molekularnej. Znalazły one zastosowanie m. in. w medycynie, genetyce sądowej i kryminalistyce, diagnostyce molekularnej chorób genetycznych, pozyskiwaniu substancji bioaktywnych z zastosowaniem biotechnologii roślin, analizie archiwalnego DNA (aDNA), innowacyjnej technologii wykorzystania tkanek transgenicznych zwierząt dla celów biomedycznych, transgenicznych zwierzętach jako bioreaktorach oraz zastosowania organizmów modyfikowanych do prewencji chorób. W kwestii zdrowia, analizy DNA pozwoliły na wykrycie podłoża chorób genetycznych, a także przyczyniły się do poznania mechanizmów prowadzących do ich rozwoju. Techniki genetyki molekularnej znacząco ułatwiają i czynią bardziej dokładnym analizy pokrewieństwa i ocenę przynależności śladów biologicznych pozostawionych na miejscu zbrodni. Stale polepszający się warsztat metod analiz DNA umożliwił też postawienie kolejnego kroku milowego w nauce w postaci opracowania technik sekwencjonowania i poznania genomów człowieka oraz wielu innych organizmów. Postęp umożliwił głębsze pozna-

Człowieka PAN w Poznaniu (Dyrektor ds. naukowych w latach 1986-2022). Emerytowany kierownik Katedry Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu (1997-2020). Pionier badań DNA w kraju dla potrzeb diagnostycznych, medyczo-sądowych oraz prekursor upowszechnienia diagnostyki molekularnej, w 1987 r. wdrożył w Polsce tzw. odcisk genetyczny a w 1989 r. łańcuchową reakcję polimerazy (PCR).

\*\* Karolina Wielgus – doktor nauk medycznych. Adiunkt w Klinice Gastroenterologii Dziecięcej i Chorób Metabolicznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Wieloletni kierownik Zakładu Biotechnologii Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich – PIB w Poznaniu (2009-2021).

\*\*\* Mikołaj Danielewski – magister inżynier biotechnologii. Doktorant w Klinice Gastroenterologii Dziecięcej i Chorób Metabolicznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

\*\*\*\* Milena Szalata – doktor nauk rolniczych. Adiunkt w Zakładzie Biotechnologii Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich – PIB.

\*\*\*\*\* Mariola Dreger – doktor nauk biologicznych. Adiunkt w Zakładzie Biotechnologii Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich – PIB.

\*\*\*\*\* Marcin Ożarowski – doktor habilitowany nauk farmaceutycznych, mgr farm., mgr biol. Profesor Instytutu w Zakładzie Biotechnologii Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich – PIB.

\*\*\*\*\* Marlena Szalata – doktor habilitowany nauk rolniczych. Profesor UPP w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

<sup>1</sup> Publikację przygotowano w ramach projektu Narodowego Centrum Badań i Rozwoju 2017/26/E/NZ5/00851.

nie przeszłości poprzez analizę archiwalnego DNA, które początkowo poznawaliśmy stopniowo, a obecnie znamy genomy naszych przodków, w tym Neandertalczyków i Denisowian. Z kolei opanowanie informacji genomowej dało możliwość produkcji wielu substancji biologicznie aktywnych na skalę przemysłową.

Odkrycie struktury DNA przyczyniło się do olbrzymiego przełomu w poznaniu zasad kierujących procesami życiowymi. Znajomość struktury DNA przełożyła się na zdolność człowieka do wprowadzania zmian w DNA innych organizmów dla wykorzystania ich dla potrzeb biomedycznych. Z pewnością transgeneza zwierząt obejmująca wykorzystanie tkanek i organów transgenicznych świń na potrzeby ksenotransplantacji będzie prowadziła do dalszego postępu. Pojawiają się również możliwości wykorzystania trójwymiarowego biodruku do przygotowywania organów do przeszczepów. Produkcja biologicznie aktywnych substancji w organizmach transgenicznych zwierząt wskazuje na istotną rolę zwierząt jako bioreaktorów. Modyfikacje DNA z zastosowaniem nowoczesnych metod edycji genomu umożliwiają ponadto ograniczanie populacji owadów, które mogą przenosić patogeny człowieka. Nie można zapominać również o uzyskiwaniu zwierząt, które są odporne na powodujące duże straty choroby. Należy również wskazać wkład polskich badaczy rozwój medycyny.

Przedstawiony artykuł składa się z dwóch części: pierwszej pt. *Odkrycie struktury DNA i jej znaczenie dla medycyny*, oraz drugiej pt.: *Zastosowanie biotechnologii i bioinżynierii w transplantologii w świetle rocznicy odkrycia struktury DNA*. Obie części wzajemnie się uzupełniają i tworzą obraz badań nad strukturą DNA w kontekście zastosowań we współczesnej medycynie.

**Słowa kluczowe:** DNA, medycyna, choroby genetyczne, medycyna sądowa, kryminalistyka, genetyka molekularna, biotechnologia roślin, archiwalny DNA, transgeneza, bioreaktor, edycja genomu, ksenotransplantacja, leki, zwierzęta, owady, patogeny

## ANNIVERSARY OF THE DISCOVERY OF DNA STRUCTURE – NEW CHALLENGES FOR MEDICINE

### Abstract

The discovery of DNA and of its structure were of great importance both in the scientific field and in everyday life. The recognition of DNA as a compound that carries genetic information allowed the development of genetics and the development of molecular genetics methods. They have found applications in medicine, forensic genetics and forensics, molecular diagnosis of genetic diseases, extraction of bioactive substances, analysis of archival DNA (aDNA), innovative technology for the use of transgenic animal tissues for biomedical purposes, transgenic animals as bioreactors and the use of modified organisms for disease prevention, among others. In terms of health, DNA analysis has made it possible to detect the basis of genetic diseases, and has contributed to the understanding of the mechanisms leading to their development.

Molecular genetics techniques make the analyses of kinship or identifying biological traces on crime scenes much easier and more accurate. The ever improving tool-box of DNA researchers made it possible to reach another milestone in the form of fully sequencing human genome as well as genomes of many other organisms. In turn, mastery of genomic information has provided the opportunity to produce many biologically active substances on an industrial scale.

The discovery of the structure of DNA has contributed to a huge breakthrough in the understanding of the principles that guide life processes. Knowledge of DNA structure has translated into the ability of humans to make changes to the DNA of other organisms for use in biomedical applications. Certainly, animal transgenesis involving the use of tissues and organs from transgenic pigs for xenotransplantation will lead to further advances. There are also emerging opportunities to use 3D bioprinting to prepare organs for transplantation. The production of biologically active substances in transgenic animals points to the important role of animals as bioreactors. In addition, DNA modifications using modern genome editing methods make it possible to reduce insect populations that can transmit human pathogens. One should also not forget about obtaining animals that are resistant to diseases that cause high losses. The contribution of Polish researchers to the development of medicine should also be pointed out.

The presented article consists of two parts: the first one entitled: *The discovery of the DNA structure and its relevance to medicine* and the second one entitled: *The application of biotechnology and bioengineering to transplantation in the context of the anniversary of the discovery of the structure DNA*. The two parts complement each other and paint a picture of DNA structure research in the context of applications in modern medicine.

**Keywords:** *DNA, medicine, genetic diseases, forensic medicine, forensic sciences, molecular genetics, plants biotechnology, archival DNA, transgenesis, bioreactor, genome editing, xenotransplantation, drugs, animals, insects, pathogens*

~ . ~

## Część I

### Odkrycie struktury DNA i jej znaczenie dla medycyny

Popularyzacja nauki jest kluczowa dla prawidłowego rozpowszechniania informacji we współczesnych społeczeństwach. Komunikowanie nauki to złożony proces, dzięki któremu niebędący ekspertem ogół społeczeństwa otrzymuje informacje na temat wiedzy opracowanej przez specjalistów w danej dyscyplinie naukowej. Dwa podstawowe kanały komunikowania nauki to edukacja i środki

masowego przekazu, ponadto konferencje, festiwale nauki, muzea i wystawy. DNA jako przedmiot popularyzacji przeszedł dwie fazy, jedną przed i drugą po 1953 r., kiedy to poznano strukturę DNA. Mimo doniosłych odkryć: identyfikacji DNA jako molekularnego nośnika dziedziczenia informacji genetycznej (1944 r.), określenia składu chemicznego cząsteczki oraz wskazania, że liczba zasad azotowych różni się w zależności od badanego organizmu (1950 r.), w pierwszym okresie zainteresowanie szerzeniem wiedzy o tej cząsteczce było stosunkowo niewielkie.

W dniu 25 kwietnia 2003 r., rok po doniosłej pięćdziesiątej rocznicy poznania struktury DNA, ustanowiono w USA Narodowy Dzień DNA. Miało to być jednorazowe wydarzenie dla uczczenia i jednocześnie celebrowania pomyślnego zakończenia projektu sekwencjonowania genomu człowieka (ang. *Human Genome Project*, HGP). Narodowy Dzień DNA zaczęto obchodzić cyklicznie w USA, a wkrótce na całym Świecie jako Międzynarodowy Dzień DNA.

W ostatnich latach dużo uwagi poświęcono Friedrichowi Miescherowi, który pracując w Bazylei i Tybindze wyizolował nukleinę. Doniosłość jego badań przedstawił Bronisław Filipowicz w jednym z pierwszych numerów czasopisma „Postępy Biochemii” w 1956 r.: „W latach siedemdziesiątych zeszłego stulecia, w pracowni Hoppe-Seylera w Tybindze pracował młody biochemik – Fryderyk Miescher, interesujący się zagadnieniem budowy i składu chemicznego jądra komórkowego. Aby usunąć materiał cytoplazmatyczny Miescher trawił pepsyną ropę z bandaży chirurgicznych. Z niestrawionej pozostałości wyodrębnił substancję, którą dla podkreślenia jej jądrowego pochodzenia nazwał nukleiną. Nukleina okazała się substancją złożoną, zbudowaną z zasadowego białka o niewielkiej masie cząsteczkowej oraz z drugiego, niebiałkowego składnika, posiadającego właściwości wielozasadowego kwasu o znacznej zawartości fosforu.” Później Miescher odkrył, że nukleina znajduje się głównie w chromosomach. W 1893 r. napisał: „...dziedziczenie zapewnia ciągłość formy z pokolenia na pokolenie; podstawy tej ciągłości tkwią nawet głębiej niż w cząsteczce chemicznej. Tkwią w budowie grup atomów”<sup>2</sup>.

Z poznaniem struktury DNA kojarzą się głównie James Watson i Francis Crick. Pracujący w Laboratorium Cavendisha na Uniwersytecie w Cambridge odkryli strukturę DNA, najważniejszego składnika każdego organizmu. W kwietniu 1953 r. ukazał się w czasopiśmie *Nature* artykuł dotyczący struktury DNA<sup>3</sup>. Duet brytyjsko-amerykański, we współpracy z Rosalind Franklin i Maurice Wilkinsem dokonał odkrycia uważanego za przełomowe dla XX wieku. Rosalind Franklin i Maurice Wilkins, specjaliści w dziedzinie chemii i krystalografii działali w King's College w Londynie.

<sup>2</sup> W. Leyko, B. Filipowicz, *Przestrzenna budowa kwasów nukleinowych*, „Postępy Biochemii” 1956, nr 2, s. 61-75.

<sup>3</sup> J. Watson, F. Crick, *Molecular structure of nucleic acids*, „Nature” 1953, 151, s. 737-738.

Podczas Kongresu Medycyny Molekularnej w Berlinie w 1997 r. Ryszard Słomski miał możliwość bezpośredniej rozmowy z Jamesem Watsonem. Watson wygłosił kontrowersyjny wykład *Genes and politics*, w którym odniósł się do badań genetycznych prowadzonych w okresie III Rzeszy. Watson, pełniący obowiązki dyrektora *Cold Spring Harbor Laboratory*, wyraził zainteresowanie prowadzonymi przez Słomskiego szkołami letnimi, w których uczestniczyło ponad 1000 osób. Według trafnych przewidywań Watsona prowadzone obecnie i w przyszłości badania powinny skupiać się na dokładnych opracowaniach początków genetyki od jej powstania poprzez mroczne okresy genetyki do czasów obecnych, wyjaśnieniem wszystkich podstawowych i pogłębionych zawłości struktury DNA i wpływu poznania struktury DNA na życie. Kolejne badania będą dotyczyły możliwości projektowania budowy genów, przy czym należy pamiętać, że każda ingerencja w materiał genetyczny może mieć nieprzewidywalne, potencjalnie niebezpieczne, konsekwencje. Powszechnie akceptowane będą badania dotyczące uzyskiwania nowych leków w procesach biotechnologicznych, jednak te działania są silnie powiązane z firmami biotechnologicznymi i finansowaniem przez nie badań dających zyski. Duże kontrowersje towarzyszą natomiast przygotowaniu zmodyfikowanych genetycznie mikroorganizmów i organizmów, ze szczególnym uwzględnieniem modyfikacji roślin uprawnych. Najwięcej uwagi poświęca się obecnie nowym technikom hodowli (ang. *new breeding technologies*, NBT), a w ostatnim okresie technikom określanym jako nowe techniki genomowe (ang. *new genomic techniques*, NGT), które umożliwiają ulepszanie cech dotyczących tolerancji na suszę, oporności na choroby i szkodniki oraz podwyższonej zawartości wybranych składników. Nad prawidłowością prowadzonych w Polsce badań sprawuje nadzór Komisja ds. GMM i GMO przy Ministerstwie Klimatu i Środowiska, która przygotowała dwie bazy danych dotyczące mikroorganizmów i organizmów genetycznie zmodyfikowanych (<https://gmo.ekoport.pl/>) oraz elektroniczne rejestry mikroorganizmów i organizmów genetycznie zmodyfikowanych (<https://gmo.klimat.gov.pl/>). Intensywnie będą rozwijały się badania dotyczące genetyki człowieka. Ponieważ genom człowieka został już poznany, cały czas trwają badania nad zawartym w DNA scenariuszem życia w ujęciu ewolucyjnym. Prowadzone są intensywne badania genów warunkujących występowanie chorób, problem stanowią jednak choroby uwarunkowane wielogenowo, w tym także choroby cywilizacyjne oraz choroby rzadkie. Ciągłe pozostaje otwarte pytanie w jakim stopniu od genów zależy nasz fenotyp i czy mogą one wpływać na wychowanie człowieka i warunkować naszą przyszłość.

Watson zakłada, że w najbliższym okresie największe zainteresowania badaczy będą stanowiły: wykonywanie badań w skali masowej, globalizacja metod analitycznych, dalszy rozwój badań z zakresu genomiki, rozwój nowych, szybkich metod sekwencjonowania RNA i DNA zarówno przy łóżku pacjenta

jak i w warunkach poza laboratoryjnych. W dalszym ciągu poznawane będą struktury genomów wirusów, bakterii i organizmów eukariotycznych. Jak ważne są to badania przekonał się również podczas pandemii. Olbrzymi napływ danych genomicznych związany jest z intensywnym rozwojem bioinformatyki, która w coraz szerszym zakresie wykorzystywana będzie w badaniach z zakresu genomiki porównawczej, genomiki ekspresyjnej, genomiki strukturalnej (proteomika) i inżynierii genomowej. Coraz więcej uwagi poświęca się również badaniom epigenetycznym oraz wpływowi mikroorganizmów zasiedlających organizm człowieka, tzw. mikrobioty, na jego funkcjonowanie, w tym podatności na występowanie chorób.

## Badania DNA w medycynie sądowej i kryminalistyce

W 1993 r. ukazała się książka *DNA Fingerprinting: State of the Science*, którą redagowały takie osobistości jak Sérgio D. J. Pena, Ranjay Chakraborty, Joerg T. Eppelen i Alec J. Jeffreys. Stanowiła ona podsumowanie dotychczasowych osiągnięć związanych z opracowaniem w 1985 r. przez Jeffreys'a i wsp. sond molekularnych (*multilocus*) zdolnych do jednoczesnego ujawnienia hiperzmienności wielu *loci* genomu człowieka, znanej jako metoda odcisku DNA – *DNA fingerprinting*<sup>4</sup>. W drugiej połowie lat osiemdziesiątych genetyka człowieka święciła prawdziwy rozkwit. W tym czasie jeden z autorów (RS) dysponował już dużym doświadczeniem w badaniach molekularnych DNA, głównie dzięki wybranej zaraz po studiach tematyce badawczej oraz stażom naukowym na Uniwersytecie Chicago i Uniwersytecie Illinois w Chicago USA, co umożliwiło wdrożenie badań w Polsce<sup>5</sup>.

W dniu 9 maja 1987 r. wydarzyła się w Lesie Kabackim katastrofa lotnicza samolotu pasażerskiego Ił-62M „Tadeusz Kościuszko” Polskich Linii Lotniczych LOT. W wyniku katastrofy śmierć na miejscu poniosły 183 osoby, w tym 172 pasażerów - wszyscy znajdujący się na pokładzie samolotu, a samolot został doszczętnie zniszczony. Pod względem liczby ofiar była to największa katastrofa lotnicza w historii polskiego lotnictwa. Żadne z ciał nie zostało znalezione w całości. Z tej przyczyny udało się zidentyfikować zwłoki jedynie 121 osób. Kilka miesięcy później odbył się w Poznaniu VIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Medycyny Sądowej i Kryminalistyki. Na Zjeździe prezentowany był również film z akcji ratunkowej wspomnianej wyżej katastrofy lotniczej. Ryszard Słomski wypowiedział się o konieczności wprowadzenia nowej technologii – badań DNA do medycyny sądowej i kryminalistyki i zadeklarował pomoc w tym zakresie. Na

<sup>4</sup> A. J. Jeffreys, V. Wilson, S.W. Thein, *Hypervariable “minisatellite” region in human DNA*, „Nature 1985”, 314, s. 67-73; A. J. Jeffreys, V. Wilson, S.W. Thein, *Individual-specific “fingerprints” of human DNA*, „Nature” 1985, nr 316, s. 67-79.

<sup>5</sup> Tamże.

kolejnych konferencjach sprawy dotyczące DNA stały się ważnymi punktami programu<sup>6</sup>.

Środowisko medyczno-sądowe było w dużej mierze przeciwne wdrażaniu badań DNA i z punktu widzenia jego przedstawiciele takie stanowisko było w pełni uzasadnione. Przyczyn było kilka, a najważniejsze z nich to bardzo dobrze wdrożone metody badań serologicznych, zapasy materiałów i odczynników niezbędnych do badań serohematologicznych, brak wykwalifikowanej kadry niezbędnej do prowadzenia badań na poziomie DNA oraz brak odpowiedniej infrastruktury badawczej w Zakładach Medycyny Sądowej. W tym czasie genetyka sądowa miała do dyspozycji kilkadziesiąt układów grupowych, które można było stosować do określania cech człowieka. Dostępny do badań był polimorfizm antygenowy czerwonych krwinek (ABO, MN, Rh, Kell, Ss, FY, JK, LU, P), polimorfizm białek surowicy (Gm1, Km1, Hp, Gc, Tf, C3, BFTE, PI, 2HS, PLG, F13A, F13B, ORM), układy grupowe enzymów erytrocytarnych (ACP, PGM1, GPT, GLO, AK, ADA, ESD, PGP, 6-PGD) a także antygeny zgodności tkankowej HLA. Oczywiście był to ogromny postęp w stosunku do wcześniejszych lat, szczególnie po wprowadzeniu badań antygenów HLA, jednak ciągle występowała znaczna grupa mężczyzn, którzy zostali uznani za ojca dziecka, choć nadal nie mieli pewności, czy faktycznie są ojcami biologicznymi. W badaniach klasycznych układów grupowych oznaczano fenotyp, natomiast w badaniach DNA efekt ekspresji genów jest pomijany, ponieważ badaniem objęty jest szczególny rodzaj DNA tzw. sekwencje powtórzone, najczęściej nie kodujące, natomiast cechujące się olbrzymim polimorfizmem. Termin polimorfizm obejmuje wg Vogela i Motulsky'ego „cechy dziedziczone zgodnie z prawami Mendla, które występują w populacji co najmniej w dwóch fenotypach i których częstość występowania przekracza 1%”. Zastosowanie badań genetycznych na potrzeby medycyny sądowej i kryminalistyki stanowiło ogromny przełom. Wkrótce po doniesieniach Jeffreys'a, Nakamura i wsp. opisali dalsze sekwencje minisatelitarne i potwierdzili polimorfizm powtarzających się jednostek jak również zaproponowali dla nich nazwę VNTR (ang. *variable number of tandem repeats*) – zmienna liczba tandemowych powtórzeń<sup>7</sup>.

W 1988 r. Ryszard Słomski podczas stażu w Instytucie Genetyki Człowieka na Uniwersytecie w Getyndze (Niemcy) zapoznał się z bardzo czytelnymi obrazami odcisku genetycznego, po powrocie do kraju zajął się opracowaniem własnych rozwiązań i jako pierwszy w Polsce wdrożył badania DNA do identyfikacji indy-

<sup>6</sup> A. Tucholska-Lenart, *Genetyczna identyfikacja człowieka – zarys historii kryminalistycznych badań DNA*, „Kwartalnik Historii Nauki i Techniki” 2016, nr 61 (3), s. 7-42.

<sup>7</sup> Y. Nakamura i inni, *Characterization of a human “midisatellite” sequence*, „Nucleic Acids Research” 1987, 15, s. 2537-2547; Y. Nakamura i inni, *New approach for isolation of VNTR markers*, „American Journal of Human Genetics” 1988, 43, s. 854-859.



widualnej. Dzięki konsultacjom przeprowadzonym dla Zakładu Kryminalistyki Komendy Głównej MO w Warszawie w 1989 r. wydano pierwszą ekspertyzę kryminalistyczną w Polsce z zastosowaniem badań genetycznych. Było to niewiele później po pionierskim zastosowaniu analizy genetycznej w procesie karnym, które miało miejsce w Wielkiej Brytanii w 1987 r. do identyfikacji sprawcy gwałtu i zabójstwa dokonanego na dwóch nieletnich dziewczynach. Ryszard Słomski starał się również przekonać ówczesne władze, że najlepszą drogą do rozwinięcia badań jest ukierunkowanie ich na amplifikację DNA z zastosowaniem PCR. Laboratoria uczestniczące w badaniach DNA dla potrzeb medyczno-sądowych wyspecjalizowały się wówczas w kilku rodzajach analiz<sup>8</sup>. Historycznie najwcześniejszą stosowaną była analiza RFLP, obejmująca również odcisk genetyczny<sup>9</sup>. Detekcja fragmentów DNA rozdzielonych w żelu agarozowym odbywała się przy użyciu sond molekularnych znakowanych radioaktywnie lub poprzez chemiluminescencję sondy<sup>10</sup>. Fragmenty RFLP były jednak zbyt duże, dlatego kontynuowano badania hybrydazyjne z zastosowaniem sond molekularnych, wysoce polimorficznych, rozpoznających pojedyncze *locus* lub kilka pojedynczych *loci* równocześnie. Badania tego typu trwały ok. tygodnia<sup>11</sup>. Przełomem było wprowadzenie do badań *locus* D1S80, które mogło być analizowane metodą PCR<sup>12</sup>.

W latach 90. ubiegłego stulecia nastąpił kolejny przełom w zastosowaniu analizy DNA w medycynie sądowej i kryminalistyce<sup>13</sup>. Do badań wkroczyła analiza krótkich tandemowych powtórzeń (ang. *short tandem repeats*, STR). Najbardziej przydatne okazały się powtórzenia tetranukleotydów, gdyż dobrze wpisują się w możliwości amplifikacji metodą PCR przy jednoczesnym, łatwym rozdzieleniu poszczególnych alleli w żelach poliakrylamidowych. Analiza STR jest obecnie najczęściej stosowana, a na rynku dostępne są zestawy obejmujące jednoczesną

<sup>8</sup> T. Dobosz, *Zastosowanie polimorfizmu DNA w medycynie sądowej*, „Postępy Medycyny Sądowej i Kryminologii” 1995, t. 2, s. 431-434; J. M. Butler, J., *Forensic DNA Typing*, Elsevier 2005, s. 1-660.

<sup>9</sup> A. J. Jeffreys, R. Neumann, V. Wilson, *Repeat unit sequence variation in minisatellites: a novel source of DNA polymorphism for studying variation and mutation by single molecule analysis*, *Cell* 1990, 60, s. 473-485.

<sup>10</sup> P. Nürnberg i inni, *DNA fingerprinting with the oligonucleotide probe (CAC)<sub>5</sub>/(GTG)<sub>5</sub>: somatic stability and germline mutations*, „Human Genetics” 1989, nr 84 (1):75-8; I. Bohm i inni, *Paternity testing with oligonucleotide probe (CAC)<sub>5</sub>/(GTG)<sub>5</sub> a multi-center study*, „Forensic Scientific International” 1993, vol. 59, s. 101-107.

<sup>11</sup> M. Czarny i inni, *Czy analiza DNA jest zawsze skuteczna: Problemy w dochodzeniu spornego ojcostwa w przypadku bliskiego pokrewieństwa domniemanych ojców. Is DNA analysis always usefull: Problems in paternity testing in case of closely related alleged fathers*, „Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii” 1995, XLV, s. 287-295.

<sup>12</sup> M. Ciesielka, P. Kozioł, A. Krajka, *Allele frequency distributions of D1S80 in the Polish population*, „Forensic Science International” 1996, vol. 81(2-3), s. 141-147.

<sup>13</sup> J. M. Butler, *Forensic DNA Typing*, Elsevier 2005, s. 1-660.

analizę kilkunastu markerów. Drabiny alleli umożliwiają genotypowanie poszczególnych próbek prowadząc do powstania tzw. profilu DNA<sup>14</sup>.

Dzisiaj, po 35 latach od wprowadzenia w naszym kraju badań DNA dla potrzeb medyczno-sądowych sytuacja ponownie uległa skomplikowaniu. Rozwinął się system wysyłania próbek do badań poza laboratorium, co jest nie do pomyślenia w innych krajach, gdzie placówka przyjmująca próbkę do badań musi samodzielnie wykonać wszystkie badania i wydać opinię. Wynik analizy DNA musi być jednoznaczny i „zapinać się jak zamek błyskawiczny”, nie pozostawiając cienia wątpliwości. Nadal jednak pojawiają się błędy. Wystarczy wspomnieć sprawę Jakuba T. oskarżonego o gwałt w Exeter w Wielkiej Brytanii. Wyniki uzyskane w różnych laboratoriach różniły się. Innym przykładem jest sprawa „super morderstw” w Niemczech, gdzie sprawcą miała być jedna kobieta i dopiero po zmudnych, zakrojonych na wielką skalę pracach okazało się, że doszło do zanieczyszczenia zestawów do pobierania próbek przez pakującą je bez rękawic ochronnych pracownicę wytwórni. Dzięki badaniom genetycznym każdy zabezpieczony ślad będący źródłem DNA, jak płyny ustrojowe, fragmenty tkanek, wydaliny lub wydzieliny (np. krew, ślina, nasienie, włosy, tkanki, ślady kontaktowe), może być obecnie dowodem w sprawie. Najczęściej wykorzystywany materiał DNA do badań genetycznych pochodzi z krwi, śliny oraz nasienia. Postęp w naukach biologicznych i rozwój technologiczny ostatnich 30. lat dostarczyły nowych metod analizy DNA, które uszczegółowiły wyniki badań genetycznych oraz doprowadziły do skrócenia czasu analizy laboratoryjnej do kilku godzin, przy jednoczesnym wzroście czułości metod. Umożliwia to pracę na bardzo małej (śladowej) ilości materiału DNA, która jeszcze pod koniec ubiegłego wieku nie miała żadnej zdolności dowodowej. Coraz częściej badania skupiają się na pozostawianych bezwiednie śladach biologicznych zawierających niewielkie ilości DNA w postaci tzw. śladów kontaktowych. W ostatnich latach rozwija się coraz bardziej technologia *Rapid DNA* do szybkiej identyfikacji materiału biologicznego (ok. 2 godz.), pobranego na wymazówkę ze śluzówki policzków osoby, ofiar katastrofy masowej lub z pozostawionego materiału biologicznego przez sprawcę na miejscu popełnienia czynu zabronionego.

## Diagnostyka molekularna chorób genetycznych

Rozwój genetyki molekularnej człowieka przyczynił się do wdrożenia badań DNA do diagnostyki chorób. Badania początkowo skupiały się na diagnostyce molekularnej chorób uwarunkowanych zmianami w pojedynczych genach<sup>15</sup>.

<sup>14</sup> A. Tucholska-Lenart i inni, *Allele frequencies for 10 STR loci in a population from central Poland*, „Forensic Science International” 2002, 129 (2), s. 131-133.

<sup>15</sup> D. Napierała i inni, *Molecular diagnostics of genetic diseases. Experience from studies of DMD, APC, TSC1 and OPG genes. Part 1*, „Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition” 2000, vol. 28, s. 113-127.

Przez szereg lat poszukiwano podłoża molekularnego fenylketonurii (ang. *phenylketonuria*, PKU) w polskiej populacji. Przyczyną PKU okazały się mutacje genu kodującego hydroksylazę fenylalaniny (ang. *phenylalanine hydroxylase*, PAH) przetwarzającej fenylalaninę w tyrozynę. Gen PAH obejmuje 90 kbp i zawiera 13 eksonów, sekwencja genu PAH i jej regiony flankujące obejmują ok. 171 kbp. W populacji polskiej najcięższa, tzw. klasyczna PKU, charakteryzująca się wysokim stężeniem fenylalaniny w płynach ustrojowych, jest szczególnie rozpowszechniona. Nasze badania koncentrowały się na analizie segregacji nieprawidłowych alleli w rodzinach obarczonych PKU. Pierwsze badania molekularne przeprowadzili w Instytucie Genetyki Człowieka PAN Ryszard Słomski i Jadwiga Jaruzelska. Zmienność *locus* PAH (8 neutralnych polimorfizmów) umożliwiła początkowo analizę RFLP (ang. *restriction fragment length polymorphism*) do wykrywania nosicielstwa nieprawidłowego allelu PAH u zdrowych dzieci w rodzinach z PKU<sup>16</sup>. Wykazano także wysoką częstość trzech mutacji genu PAH (R408W, IVS12nt1 oraz IVS10nt546, 70% nieprawidłowych alleli) powodujących całkowity brak aktywności PAH<sup>17</sup>. Odpowiednie postępowanie pozwala całkowicie uchronić dzieci przed upośledzeniem rozwoju intelektualnego, dlatego jej szybkie rozpoznanie jest bardzo ważne. Badania przesiewowe w kierunku fenylketonurii prowadzone są u każdego noworodka urodzonego w Polsce, w pierwszych dobach jego życia. Obecnie diagnostyka molekularna w klasycznej postaci fenylketonurii dotyczy 4 najczęstszych mutacji: R408W (59,3%), R158Q (3,4%), IVS10 – c.1066-11g-a (5%), IVS12 – c.1315+1g-a (3,9%), które obejmują ok. 72% wszystkich mutacji. Sekwencjonowanie eksonu 7 pozwala wykryć mutacje R262Q, G272X, R252W, P281L stanowiące łącznie 4,5% mutacji w klasycznej PKU. W łagodnej fenylketonurii wykrywane są mutacje R408W, E390G, Y414C, A104D, R241H, IVS10, R261Q, V388M, R68G, R68S, I95F obejmujące ok. 84% wszystkich mutacji.

Na początku lat 90-tych Ryszard Słomski przebywał na stypendium Alexandra von Humboldta w Institut für Humangenetik, Universität Göttingen, którym kierował Wolfgang Engel. W Getyndze poznał Petera E. Beckera, który opisał alleliczny wariant dystrofii Duchenne’a – dystrofię Beckera. Słomski jest współautorem artykułu<sup>18</sup>, umieszczonego w opisie dystrofiny kodowanej przez gen *DMD* w bazie OMIM – \* 300377 *Dystrophin*. Gen *DMD* zawiera 2,5 miliona

<sup>16</sup> J. Jaruzelska i inni, *Haplotype analysis of phenylalanine hydroxylase alleles in polish families with phenylketonuria*, w: „Acta Biochimica Polonica” 1989, nr 36(3-4):323-32.

<sup>17</sup> J. Jaruzelska i inni, *The codon 408 mutation associated with haplotype 2 is predominant in Polish families with phenylketonuria*, „Human Genetics” 1991, Jan.; 86(3):247-50; *Genetic background of clinical homogeneity of phenylketonuria in Poland*, „Journal of Medical Genetics”, 1993 Mar;30(3):232-4.

<sup>18</sup> F. Rininsland i inni, *Identification of a new DMD gene deletion by ectopic transcript analysis*, „Journal of Medical Genetics” 1992, 29: 647-651.

par zasad (2,5 Mbp), co stanowi ponad 1% DNA chromosomu X (0,001 genomu człowieka). Jest ponad 12 razy większy od olbrzymiego genu kodującego czynnik VIII krzepnięcia krwi. Liczba eksonów genu *DMD* wynosi 79 lecz w związku z alternatywnym składaniem nie jest liczbą stałą. Nie ma ścisłej korelacji między wielkością delecji lub duplikacji genu *DMD*, a stopniem zaawansowania choroby. Anthony P. Monaco i wraz z współpracownikami wysunęli hipotezę, że mutacje nie powodujące zmiany ramki odczytu prowadzą do łagodnej postaci dystrofii typu Beckera, a zmieniające ramkę odczytu powodują letalną dystrofię typu Duchenne'a. Hipoteza Monaco znajduje potwierdzenie w 96% badanych przypadkach. Nie zmieniające ramki odczytu delecje eksonów 31-44 powodują łagodną postać BMD lub nawet przebiegają bezobjawowo. Wiele delecji rozpoczyna się w obrębie intronu między eksonem 44 a 45. Prawdopodobnie wpływa na to olbrzymia wielkość tego intronu (ponad 200 kpz)<sup>19</sup>.

W Zakładzie Genetyki Człowieka PAN badania molekularne genu *DMD* rozpoczęto pod koniec lat 80-tych. Było to swoiste wyzwanie, ponieważ poznanie największego z dotychczas opisanych genów i wyjaśnienie molekularnego podłoża dystrofii mięśniowej Duchenne'a i Beckera było przykładem ogromnego postępu biologii molekularnej. To olbrzymie zainteresowanie genem *DMD* zaowocowało wprowadzeniem do nauki nowych metod badawczych - metody PCR (reakcji łańcuchowej polimerazy) w wersji multipleks i kompleksowej analizy mutacji poprzez cDNA-PCR. Stosowana rutynowo w badaniach metoda PCR w wersji multipleks umożliwia identyfikację prawie 100% delecji. Jednak aż 40% przypadków dystrofii mięśniowej Duchenne'a spowodowanych jest przez mutacje punktowe, których badanie w tak dużym genie jest niezwykle trudne.

Diagnostyka molekularna obejmuje obecnie wykrywanie delecji oraz duplikacji w genie *DMD* z zastosowaniem komercyjnie dostępnej amplifikacji multipleks zależnej od ligacji sond molekularnych (ang. *multiplex ligation-dependent probe amplification*, MLPA). Umożliwiona jest weryfikacja nosicielstwa delecji/duplikacji (eksony 1-10, 21-30, 41-50, 61-70) i potwierdzenie zmian w rodzinie (eksony 11-20, 31-40, 51-60, 71-79). Prowadzone są również badania z zastosowaniem metod sekwencjonowania nowej generacji (ang. *next generation sequencing*, NGS). Coraz więcej badań poświęca się przewlekłym schorzeniom układu pokarmowego obejmującym nieswoiste choroby zapalne jelit NChZJ (ang. *inflammatory bowel disease*, IBD). Badania w zespole Ryszarda Słomskiego w Instytucie Genetyki Człowieka PAN we współpracy z Katedrą i Kliniką Gastroenterologii, Dietetyki i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu skupiają się głównie na chorobie Leśniowskiego-Crohna (ChL-C, ang. *Crohn disease*, CD) oraz wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego WZJG (ang.

<sup>19</sup> A. P. Monaco i inni, *An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus*, „Genomics” 1988, Jan;2(1):90-5.

*ulcerosa colitis*, UC). Badania molekularne obejmują poszukiwanie czynników genetycznych warunkujących ich występowanie, współwystępowanie osteoporozy, farmakogenetykę i badania mikrobioty jako czynnika wpływającego na funkcjonowanie całego organizmu. Dotychczasowe badania obejmowały również analizę genu *NOD2*<sup>20</sup>, w którym w populacji polskiej wykazano występowanie wariantu c.802C>T (p.Pro268Ser) oraz mutacji p.Leu1007Profs1Ter (rs2066847, c.3019\_3020insC, c.3020insC), a także warianty genów *DLG5*, *OCTN1*, *CARD15/NOD2*, *ATG16L1*, *IL23R*. Ze względu na często występujące u pacjentów z nieswoistymi chorobami jelit obniżenie gęstości mineralnej kości podjęto badania genów zaangażowanych w regulację szlaku RANKL/RANK/OPG (ligand receptora aktywującego jądrocytów czynnika kappab (RANKL), receptor aktywujący jądrocytów czynnika kappab (RANK), osteoprotegeryna (OPG)) i wykazano, że w przypadku wrzodziejącego zapalenia jelita grubego niskie poziomy osteoprotegeryny mogą być związane z osteoporozą, ale nie są skorelowane z polimorfizmem -223C>T w genie *TNFRSF11B*<sup>21</sup>.

Silnie rozwijanym nurtem jest farmakogenetyka umożliwiająca dobranie leków i ich dawek dla każdego pacjenta, indywidualizację leczenia rozpoczęto od badań genu *TMPT* kodującego S-metylotransferazę tiopuryny odpowiedzialnej za metabolizm leków tiopurynowych<sup>22</sup>. Oporność na leki tiopurynowe lub występowanie działań niepożądanych po ich stosowaniu wynika z występowania znanych wariantów genu *TMPT* obejmujących głównie trzy allele genu: *TPMT\*2* (c.238G>C), *\*3A* (c.460G>A, c.719A>G) i *\*3C* (c.719A>G), wykazując w badaniach własnych występowanie w populacji polskiej 11 różnych wariantów sekwencji. Podjęto również badania związane z stosowaniem glikokortykosteroidów (GKs) oraz leków biologicznych anty-TNF<sup>23</sup>. Dla 11 wariantów zlokalizowanych w 5 genach: *FCGR3A*, *TNFRSF1B*, *FAS*, *IL1B* i *IL1R* uzyskano znamienne różnice w częstości występowania wariantów genetycznych pomiędzy grupą pacjentów odpowiadających i nieodpowiadających na leczenie anty-TNF<sup>24</sup>. Prowadzone

<sup>20</sup> A. Dobrowolska-Zachwieja i inni, *Wariant mutacji genu NOD2/CARD15 w rodzinie chorej z chorobą Leśniowskiego-Crohna. The sequence variant of NOD2/Card15 in a Polish family on the background of Polish patients with Crohn's disease*, „Gastroenterologia Polska” 2004, nr 11/4, s. 325-331.

<sup>21</sup> I. Kreła-Każmierczak i inni, *ESR1 Gene Variants Are Predictive of Osteoporosis in Female Patients with Crohn's Disease*, „J Clin Med” 2019 Aug 24;8(9):1306.

<sup>22</sup> M. Skrzypczak-Zielinska i inni, *A Simple Method for TPMT and ITPA Genotyping Using Multiplex HRMA for Patients Treated with Thiopurine Drugs*, „Molecular Diagnosis and Therapy” 2016 Oct;20(5):493-9.

<sup>23</sup> M. Walczak i inni, *Long-range PCR libraries and next-generation sequencing for pharmacogenetic studies of patients treated with anti-TNF drugs*, „Pharmacogenomics J” 2019, 19, 4, 358-367.

<sup>24</sup> L. Lykowska-Szuber i inni, *Association of the IL1R1 and FAS gene variants with primary nonresponse to anti-tumor necrosis factor therapy in patients with Crohn disease*, „Polish Archives of Internal Medicine”, 2023 Oct 26;133(10):16461.

badania rozszerzyły się o określenie znaczenia receptorów kannabinoidowych *CNR1* i *CNR2* w nieswoistych chorobach zapalnych jelit<sup>25</sup>. Coraz więcej badań poświęca się mikrobiocie jelitowej, której funkcjonowanie wpływa na organizm gospodarza, ze względu na znaczenie dysbiozy jelita w nieswoistych zapaleniach jelit<sup>26</sup>.

## Wpływ badań dotyczących struktury DNA na pozyskiwanie substancji bioaktywnych z zastosowaniem biotechnologii roślin

Przykładem postępu badań od rośliny do leku jest pozyskiwanie substancji biologicznie czynnych w kulturach *in vitro* celem otrzymania surowca o określonych parametrach fitochemicznych. Otrzymane rośliny charakteryzowały się pożądanym profilem fitochemicznym i wysoką zawartością związków aktywnych, co umożliwiało standaryzację surowca i dalsze prace nad formułą preparatów przeznaczonych dla określonych grup pacjentów. W ramach projektu badawczego Sormisol (PBS1/A8/0/2012) otrzymano protokół regeneracji roślin sorgo na drodze organogenezy bezpośredniej i organogenezy pośredniej i opracowano metodę transformacji genetycznej z wykorzystaniem mikrowstrzeliwania do tkanek sorgo genu kodującego pirofosforylazę UDP-glukozy oraz genu kodującego syntazę fosforanu sacharozy, celem zwiększenia wydajności produkcji bioetanolu. W ramach projektu Epiman (PBS2/A8/23/2013) opracowano protokół mikropropagacji wierzbówki koprzy ( *Epilobium angustifolium* L.) i otrzymano standaryzowany na oenoteinę B oraz flawonoidy surowiec przeznaczony na sadzonki do produkcji suplementu diety stosowanego w profilaktyce łagodnego przerostu prostaty (ang. *benign prostatic hyperplasia*, BPH) i zapalenia gruczołu krokowego. Kontynuacją projektu Epiman był projekt Epiman Plus (Inkubator Innowacyjności 4.0 Projektu „Plant-Tech 4.0”) w ramach którego przeprowadzono prace przedwdrożeniowe w skali ćwierćtechnicznej dla prototypu suplementu diety na bazie suchego wyciągu z wierzbówki koprzy.

W projekcie Onkokan (INNOMED/I/11/NCBR/2014) opracowano metodę namnażania konopi włóknistych celem otrzymania surowca o zwiększonej zawartości kannabidiolu (CBD) przy zachowaniu niskiej zawartości  $\Delta$ -9 tetrahydrokannabinolu (THC). Otrzymano ponad 40 genotypów konopi, z których wyselekcjonowano klony roślin o założonych parametrach oraz opracowano prototyp leku przeciwbólowego wspomagającego leczenie pacjentów onkologicznych. Opracowane różne metody mikropropagacji konopi, a otrzymane genotypy

<sup>25</sup> S. Hryhorowicz i inni, *Endocannabinoid System as a Promising Therapeutic Target in Inflammatory Bowel Disease – A Systematic Review*, „Frontiers in Immunology”, 2021;12:790803.

<sup>26</sup> O. Zakerska-Banaszak i inni, *Dysbiosis of gut microbiota in Polish patients with ulcerative colitis: a pilot study*, „Scientific Reports” 2021, Jan 25;11(1):2166.

były poddane weryfikacji oraz udoskonaleniu. Efektem prowadzonych prac było opracowanie efektywnej metody wytwarzania roślin konopi siewnych metodą *in vitro*, zapewniającej stabilność profilu fitochemicznego<sup>27</sup>.

Narkotyczne odmiany konopi zawierają składnik psychoaktywny  $\Delta$ -9 THC, który w odmianach przemysłowych występuje w śladowych ilościach. Właściwości lecznicze THC, takie jak ulga w nudnościach powodowanych chemioterapią oraz obniżenie bólu chorych na stwardnienie rozsiane, wywierane są poprzez receptory kannabinoidowe CB1 i CB2 w mózgu ssaków i komórkach układu odpornościowego. Izomer THC, kannabidiol (CBD), posiada silne właściwości antyutleniające, dzięki czemu zapewnia ochronę układu nerwowego, zapobiegając ostrej i chronicznej degradacji neuronów.

THC i CBD powstają odpowiednio z kwasu tetrahydrokannabinolowego (THCA) i kwasu kannabidiolowego (CBDA), na drodze nieenzymatycznej dekarboksylacji, natomiast THCA i CBDA na drodze reakcji enzymatycznych, katalizowanych przez syntazę THCA oraz syntazę CBDA. Obydwa enzymy ulegają specyficznej ekspresji w zależności od chemicznego fenotypu konopi, narkotycznego (bogatego w THCA) lub włóknistego (bogatego w CBDA). Obecnie prowadzone są badania, których celem jest określenie podobieństwa strukturalnego, funkcjonalnego i genetycznego syntazy THCA i syntazy CBDA. Enzymy te są pierwszymi poznanymi syntazami kannabinoidowymi kodującymi bezpośrednie prekursory farmakologicznie aktywnych kannabinoidów i stanowią atrakcyjny cel dla biotechnologii.

Gen kodujący syntazę THCA zawiera 1635-nukleotydową otwartą ramkę odczytu kodującą peptyd złożony z 545 aminokwasów, z których reszty 28 pierwszych aminokwasów stanowią peptyd sygnałowy. Masa cząsteczki obliczona na podstawie struktury pierwszorzędowej enzymu wynosi 58 597 Da i jest znacznie niższa od masy cząsteczki wyizolowanej z tkanek rośliny i oczyszczonej poprzez elektroforezę w żelu poliakrylamidowym z SDS, która wynosi 75 kDa. Różnica mas wynika z posttranslacyjnych modyfikacji syntazy THCA, która w warunkach *in vivo* ulega m.in. glikozylacji. Sekwencja genu syntazy THCA wykazuje wysoką homologię do sekwencji syntazy CBDA (87,9% homologii).

<sup>27</sup> Mi. Szalata i inni, *Simple Extraction of Cannabinoids from Female Inflorescences of Hemp (Cannabis sativa L.)*, *Molecules* 2022, vol. 27, 5868; T. Wróbel i inni, *Modified Nodal Cuttings and Shoot Tips Protocol for Rapid Regeneration of Cannabis sativa L.*, „*Journal of Natural Fibers*” 2022; 19:2, s. 536-545; J. Bartkowiak-Wieczorek i inni, *THC-reduced Cannabis Sativa L.- how does the solvent determine the bioavailability of cannabinoids given orally?*, *Nutrients* 2023; 15(12):2646; A. Zielińska i inni, *Phytocannabinoids: Chromatographic Screening of Cannabinoids and Loading into Lipid Nanoparticles*, *Molecules* 2023; 28(6), 2875; P. Sledziński i inni, *In Vitro Evidence of Selective Pro-Apoptotic Action of the Pure Cannabidiol and Cannabidiol-Rich Extract*, *Molecules* 2023; 28(23):7887.

## Analiza archiwalnego DNA (aDNA)

Dynamiczny rozwój biologii molekularnej umożliwił opracowanie wydajnych metod sekwencjonowania DNA, a analiza porównawcza sekwencji DNA organizmów żyjących współcześnie stała się powszechna. Obecnie wiele nadziei wiąże się z sekwencjonowaniem i porównywaniem DNA uzyskanego ze szczątków archeologicznych z DNA gatunków żyjących współcześnie. Uzyskanie DNA z wykopalisk (aDNA) oraz odczytanie jego sekwencji umożliwia odbycie swoistej wędrówki w czasie, której celem jest zdobycie wiedzy na temat pokrewieństwa genetycznego w obrębie populacji gatunków wymarłych oraz między nimi a ich potomkami żyjącymi współcześnie.

Jednym z najważniejszych problemów dotyczących materiałów wykopaliskowych jest degradacja DNA w wyniku działania endogennych nukleaz, która rozpoczyna się zaraz po śmierci organizmu, dlatego ze starożytnych znalezisk izoluje się przede wszystkim DNA o długości od 100 do 200 pz. Wysokie stężenie soli i niskie temperatury inaktywują enzymy, jednak nawet wówczas zachodzą procesy hydrolizy i utleniania, które wolno, lecz nieubłaganie, niszczą cząsteczki DNA.

Szanse uzyskania dobrych preparatów maleją, jeśli próbki nie zostały natychmiast po śmierci organizmu zamrożone i przechowywane przez cały czas w obniżonej temperaturze, np. na lodowcach. Sukces otrzymania DNA maleje ze wzrastającą średnią temperaturą otoczenia, w którym znaleziono skamieniałości ograniczając się do w suchym i gorącym klimacie zaledwie do 2-4 procent. Biorą w tym udział także czynniki wpływające na reakcje chemiczne jak pH, potencjał redukujący utlenianie, promieniowanie, skład chemiczny kości i gleby oraz wilgotność. Wykazano, że kości są częściowo niszczone przez bakterie i grzyby i w tych miejscach z reguły rozpoczyna się mineralizacja. Na możliwość zachowania DNA wpływają procesy, które opóźniają degradację DNA poprzez adsorpcję DNA do kryształów apatytów, niską miejscową reaktywność chemiczną, lokalne pH, warunki jonowe itp. Wydaje się, że gwałtowne zmiany warunków, w których przebywają szczątki, włączając w to znalezienie kości i transport, mogą obniżyć zawartość DNA.

Pomimo wprowadzenia określonych zasad pracy w laboratorium, wyniki badań często budzą wiele kontrowersji. Analiza DNA ze szczątków paleontologicznych i archeologicznych, które przetrwały setki lat w niekontrolowanych warunkach środowiska stanowi nowe wyzwanie. Dodatkową trudnością jest bardzo mała zawartość DNA w badanej próbce, przy niezwykle wysokim ryzyku zanieczyszczenia próbki współczesnym DNA. Większość tkanek analizowanych przez badaczy aDNA zawiera nie tylko swój własny materiał genetyczny, ale także



DNA bakterii, grzybów i innych organizmów, w tym także samego badacza<sup>28</sup>. Problem można częściowo rozwiązać stosując badania specyficzne tylko dla określonego gatunku (specyficzne startery reakcji PCR).

Materiał do badań od chwili uzyskania należy przechowywać w warunkach aseptycznych, bez dostępu bakterii i grzybów, które mogą zniszczyć znalezisko, najlepiej w warunkach, w których je znaleziono. Do badań wybiera się fragment materiału wyjściowego, który nie miał kontaktu z warunkami zewnętrznymi i nie mógł być wcześniej dotykany lub zabezpieczony w pracach muzealnych (np. klejem kostnym). Do analiz można wybrać wewnętrzny fragment kości lub wnętrze zęba. Kości oraz zęby są często jedynym elementem, który zostaje zachowany w zapisie kopalnym, tak więc ich obecność w odsłonięciach archeologicznych sprawia, że są jednym z najczęściej analizowanych materiałów w badaniach antropologicznych. Stanowią one ważne „archiwa” informacji o organizmie, które można wykorzystać do rekonstrukcji np. historii życia biologicznego i środowiska. Sprawnym narzędziem do tego celu staje się chemia izotopów stabilnych ze szkliwa zębów, która bywa szeroko stosowana do rekonstrukcji szybkich zmian nawyków żywieniowych zwierząt, wzoru migracji lub charakteru klimatu. Kluczowa jest tu przydatność chemii izotopów tlenu, która dostarcza informacji związanych z różnymi aspektami pochodzenia geograficznego a także pobytu ludzi. Analiza izotopów tlenu w biogenicznych fosforanach i węglanach od dawna jest uznana za znaczącą metodykę w badaniach archeologicznych i paleoekologicznych.

Początkowo źródłem materiału do badań starożytnego DNA były okazy roślin i zwierząt zgromadzone w muzeach. DNA pochodzenia starożytnego jest najczęściej zdegradowany, dlatego cząsteczki DNA występujące w komórce w wielu kopiach można łatwiej pozyskać do dalszych badań, niż cząsteczki DNA występujące wyłącznie w dwóch kopiach w komórkach organizmów diploidalnych. W jednej komórce występuje kilkaset mitochondriów, a w każdym z nich znajduje się 2-10 kopii mitochondrialnego DNA (mtDNA). Mitochondrialny genom człowieka charakteryzuje się niewielką wielkością (16 569 pz), dziedziczony jest wyłącznie w linii żeńskiej i stosunkowo szybko ewoluuje. Jedyną niekodującą sekwencją w mtDNA człowieka jest pętla D. Częstość mutacji mtDNA jest 5-10 razy większa niż jądrowego DNA, dlatego może być źródłem informacji o ewolucji gatunków rozdzielonych stosunkowo niedawno. Jednak mtDNA reprezentuje pojedynczy genetyczny locus, który może nie odzwierciedlać historii całego genomu. Trzeba

<sup>28</sup> J. Dabney i inni, *Ancient DNA Damage*, „Cold Spring Harbor Perspectives in Biology” 2013, vol. 5(7): 012567; M. Danielewski i inni, *Methodological Changes in the Field of Paleogenetics*, „Genes” 2023, vol. 14(1), s. 234.

o tym pamiętać, w szczególności, gdy badania dotyczą genetyki populacji lub gdy obejmują gatunki blisko spokrewnione<sup>29</sup>.

Z doświadczeń własnych autorów można przytoczyć badania, których celem była analiza porównawcza fragmentu mtDNA człowieka żyjącego około trzech tysięcy lat temu z tym samym fragmentem DNA człowieka współczesnego. Materiał do badań stanowiły zęby znalezione podczas badań archeologicznych prowadzonych na Warmii i Mazurach oraz zęby człowieka współczesnego i próbki krwi od tej samej osoby. Zaobserwowano dwie substytucje A>G oraz substytucję T>C w DNA wyizolowanym z zęba człowieka żyjącego trzy tysiące lat temu, w stosunku do DNA człowieka współczesnego<sup>30</sup>.

W historii badań aDNA zasłużonym badaczem jest Svante Pääbo; jeden z pionierów w dziedzinie paleogenetyki<sup>31</sup>. W 1985 r. udało mu się wyizolować fragment jądrowego DNA z egipskiej mumii liczącej dwa tysiące czterysta lat<sup>32</sup>. W następnych latach Pääbo eksperymentował ze stosowaniem PCR do amplifikacji antycznego DNA<sup>33</sup>, mając ogromny wpływ na proces kształtowania się dziedziny naukowej jaką jest paleogenetyka. W 1997 r. zespół Svante Pääbo ogłosił otrzymanie pierwszej w historii dziejów sekwencji nukleotydów w DNA pochodzącego od Neandertalczyka, wykazując, że nie przekazali oni współczesnym ludziom sekwencji mitochondrialnych, ale jednocześnie nie wykluczono całkowicie możliwości zajścia wymiany genów pomiędzy tymi gatunkami<sup>34</sup>. Pääbo i jego zespół jako pierwsi zsekwencjonowali genom jądrowy Neandertalczyka w 2010 r., wskazując, że transfer genów pomiędzy anatomicznie współczesnymi ludźmi i Neandertalczycami miał miejsce po migracji z Afryki, ale przed oddzieleniem się od siebie Europejczyków i Azjatów. W tym samym roku zespół Pääbo zsekwencjonował genom pochodzący ze szczątków znalezionych w jaskini Denisova, co doprowadziło do odkrycia Denisowian<sup>35</sup>. W kolejnych latach uzyskano pierwsze na świecie genomy Denisowianina i Neandertalczyka o wysokiej wiarygodności,

<sup>29</sup> M. Merheb i inni, *Mitochondrial DNA, a Powerful Tool to Decipher Ancient Human Civilization from Domestication to Music, and to Uncover Historical Murder Cases*, „Cells” 2019, 8(5), s. 433.

<sup>30</sup> K. Wielgus, *Analiza sekwencji mitochondrialnego DNA z materiału wykopaliskowego*, w: „Analiza DNA. Teoria i praktyka”, red. R. Słomski, Poznań, 2008, s. 390-398.

<sup>31</sup> K. Wielgus i inni, *Svante Pääbo, reader of the Neanderthal genome*, „Acta Physiologica” 2023, 237(1).

<sup>32</sup> S. Pääbo, *Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA*, „Nature”, 1985, 314(6012), s. 644-645. 0

<sup>33</sup> E. Willerslev, A. Cooper, *Review Paper. Ancient DNA*, „Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences”, 2005, 272(1558), s. 3-16.

<sup>34</sup> M. Krings i inni, *Neandertal DNA Sequences and the Origin of Modern Humans*, „Cell”, 1997, 90(1), s. 19-30.

<sup>35</sup> M. Meyer i inni, *A High-Coverage Genome Sequence from an Archaic Denisovan Individual*, „Science”, 2012, 338(6104), s. 222-226.

potwierdzono również krzyżowanie pomiędzy Neandertalczykami, Denisowanami a anatomicznie współczesnymi ludźmi w późnym Plejstocenie, przedstawiając listę substytucji nukleotydowych, które utrwały się w naszym genomie po tym, jak nasi przodkowie wyodrębnili się od Neandertalczyków i Denisowian<sup>36</sup>.

Wraz z rozwojem technik sekwencjonowania nowej generacji (ang. *Next-Generation Sequencing*, NGS), diametralnie zmieniła się liczba uzyskiwanych danych<sup>37</sup>. Jeden z autorów (MD) odbył staż naukowy w *Department of Organismal Biology* na Uniwersytecie Uppsala w Szwecji, w zespole specjalizującym się w badaniach antycznych genomów i na bazie tego doświadczenia potwierdza, że dostępność niezliczonej ilości cało-genomowych sekwencji zwiększyła istotność etapu obróbki i analizy danych, który wyparł mokrą pracę laboratoryjną jako najbardziej czasochłonną, a nawet nieodzowną część badań.

## Podsumowanie

Odkrycie struktury cząsteczki DNA było przełomowym naukowym osiągnięciem, do którego przyczyniło się wiele wybitnych naukowców. Główną rolę odegrali James Watson i Francis Crick, którym przypisuje się to dokonanie. Nie można zapomnieć o Rosalind Franklin i Maurice Wilkinsie, którzy współpracowali z powyższą dwójką, dostarczając im wyników analiz laboratoryjnych. Należy również pamiętać o Friedrichu Miescher, który wyizolował DNA jako jeden z pierwszych i nadał mu miano nukleiny.

Znajomość budowy DNA znalazła zastosowanie w wielu dziedzinach naukowych, a także w przemyśle, medycynie, kryminalistyce oraz życiu codziennym. Wiedza ta w znacznej mierze przyczyniła się do gwałtownego tempa rozwoju nauk biologicznych w latach 90. Pozwoliła on m. in. na opracowanie tzw. metody odcisku DNA, która umożliwia identyfikację przynależności materiału biologicznego do osoby z bardzo dużą pewnością. Inną, niemniej ważną konsekwencją poznania struktury DNA, a w następstwie, budowy genu, jest diagnostyka molekularna chorób genetycznych. Wprowadzenie metod opartych o diagnostykę molekularną drastycznie zmieniło oblicze współczesnej medycyny, pozwalając na prostsze i szybsze wykrycie wielu różnorodnych chorób, a także opracowanie szczepionek opartych w kwasy nukleinowe. Natomiast dzięki analizom antyczne go DNA możliwe stało się pozyskiwanie informacji historycznych i medycznych wcześniej uznawanych za stracone lub trudne do potwierdzenia. Badania DNA były prowadzone do tej pory bardzo intensywnie i można oczekiwać, iż trend ten utrzyma się również w przyszłości.

<sup>36</sup> K. Prüfer i inni, *The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains*, „Nature” 2014, 505(7481), s. 43-49; K. Wielgus i inni, *Svante Pääbo...*, dz. cyt., e13902.

<sup>37</sup> E. D. Jones, E. Bösl, *Ancient human DNA: A history of hype (then and now)*, „Journal of Social Archaeology” 2021, 21(2), s. 236-255; K. Wielgus i inni, dz. cyt., e13902.

## Część II

### Zastosowanie biotechnologii i bioinżynierii w transplantologii w świetle rocznicy odkrycia struktury DNA

W pracy „Rocznica odkrycia struktury DNA – nowe wyzwania dla medycyny” przedstawiono informacje dotyczące udziału autorów w ważnych odkryciach ukierunkowanych na DNA. DNA jako przedmiot popularyzacji przeszło dwie fazy, jedną przed i drugą po 1953 r. Przed tym rokiem zainteresowanie szerzeniem wiedzy o tej cząsteczce było stosunkowo niewielkie. W 1944 r. zidentyfikowano DNA jako molekularny nośnik dziedziczenia informacji genetycznej i od tego czasu obserwujemy duży postęp w badaniach przy jednoczesnym szybkim wdrażaniu badań DNA do praktyki. Jednym z przykładów takich działań są badania archiwalnego DNA.

Innowacyjna technologia wykorzystania tkanek transgenicznych zwierząt dla celów biomedycznych. W 2001 r. dzięki inicjatywie i wsparciu finansowym dr Marka Marii Pieńkowskiego z Knoxville w USA Ryszard Słomski z Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu w ramach współpracy ze Zdzisławem Smorągiem z Instytutu Zootechniki – PIB uzyskał transgenicznego królika, założyciela rodu z genem hormonu wzrostu człowieka wytwarzanym w mleku. W tamtych latach transgen uległ wbudowaniu na drodze rekombinacji niehomologicznej w przypadkowe miejsce w genomie, a osiągnięcie miało światowy zasięg<sup>38</sup>. Wykazano dziedziczenie i ekspresję u samic, przeprowadzono mapowanie transgenu i oczyszczanie hormonu do homogenności. Królik był pierwszym transgenicznym ssakiem uzyskanym w Polsce i jednym z pierwszych na świecie tak dobrze scharakteryzowanym molekularnie i cytogenetycznie. Wyniki badań nad królikiem zostały wykorzystane do badań nad uzyskaniem transgenicznych świń na potrzeby ksenotransplantacji.

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, skóra) znacznie przewyższa liczbę dawców. Rozziew pomiędzy liczbą

<sup>38</sup> D. Lipiński i inni, *Transgenic rabbit producing human growth hormone in milk*, „Journal of Applied Genetics” 2003, 44(2), s. 165-174; M. Skrzyszowska i inni, *Generation of transgenic rabbits by the novel technique of chimeric somatic cell cloning*, „Biology of Reproduction” 2006, 74(6), s. 1114-1120.

dostępnych organów a liczbą oczekujących na przeszczep rośnie z roku na rok. Łatwo dostępne źródło narządów, tkanek i komórek pochodzenia zwierzęcego (ksenotransplantacja) rozwiązałyby istniejący problem. W ciągu minionego stulecia odnotowano niewielką liczbę prób wykorzystania narządów pochodzenia zwierzęcego, przy czym w większości przypadków źródłem narządów były naczelnice. Ksenotransplantacja w układzie świnia-człowiek może przyczynić się do rozwiązania problemu<sup>39</sup>.

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”. Dopiero nowoczesne metody inżynierii komórkowej umożliwiają zastosowanie ksenotransplantacji jako nieograniczonego źródła komórek i narządów do przeszczepów<sup>40</sup>. Ksenotransplantacja jest przedsięwzięciem interdyscyplinarnym obejmującym cały szereg specjalności, od biologii molekularnej, poprzez rozród zwierząt, a w szczególności embriologię eksperymentalną, hodowlę świń, immunologię aż po chirurgię transplantacyjną<sup>41</sup>.

Za wyborem świni jako potencjalnego dawcy narządów do ksenotransplantacji przemawiają 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<sup>42</sup>. Ponadto, 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. Najpoważniejszą kwestią jest problem zgodności immunologicznej narządu dawcy

<sup>39</sup> C. E. Goerlich i inni, *The growth of xenotransplanted hearts can be reduced with growth hormone receptor knockout pig donors*, „Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery”, 2023, 165(2), s. e69-e81.

<sup>40</sup> Z. Smorąg i inni, red., *Biotechnologiczne i medyczne podstawy ksenotransplantacji*, red. Z. Smorąg, R. Słomski, L. Cierpka, Poznań, 2006, s. 1-388.

<sup>41</sup> Z. Smorąg i inni, red., *Biotechnologiczne i medyczne podstawy ksenotransplantacji*, red. Z. Smorąg, R. Słomski, L. Cierpka, Poznań, 2006, s. 1-388; Z. Smorąg i inni, *Od genomu tura po ksenotransplantacje*, red. Z. Smorąg, R. Słomski, J. A. Modliński, Poznań, 2008, s.1-182.

<sup>42</sup> C. E. Goerlich i inni, *The growth of xenotransplanted hearts can be reduced with growth hormone receptor knockout pig donors*, „Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery” 2023, 165(2), s. e69-e81.

i organizmu biorcy. Ksenotransplantacji poświęca się wiele uwagi ponieważ brak stuprocentowej pewności, czy jest to technologia całkowicie bezpieczna dla człowieka. Trzeba uwzględnić potencjalne zagrożenia, jednym z nich jest możliwość zarażenia człowieka utajonymi retrowirusami, np. endogennymi retrowirusami świni PERV (ang. *porcine endogenous retroviruses*).

Przygotowywanie komórek świń do ksenotransplantacji prowadzone jest wielokierunkowo, poprzez wyłączenie określonych genów (*knock-out*), jak i przez wprowadzenie dodatkowych genów, zmieniających antygeny powierzchniowe komórek świń. Transgeneza zwierząt skupia się głównie na przygotowaniu konstrukcji genowych inaktywujących gen kodujący  $\alpha$ 1,3-galaktozylotransferazę (1,3GT) albo zwiększenia ekspresji enzymu  $\alpha$ 1,2-fukozylotransferazy konkurującego o ten sam substrat. W badaniach wykonanych przez autorów otrzymano kilka rodów transgenicznych zwierząt, w pełni scharakteryzowanych, dostępnych do prac wdrożeniowych. Do świń wprowadzono gen  $\alpha$ 1,2-fukozylotransferazy człowieka,  $\alpha$  galaktozydazy człowieka, głównego układu zgodności tkankowej człowieka HLA-E, białka układu dopełniacza CD59, wyłączono geny świni kodujące białko wiążące glikoproteinę UL-16 (gen *ULBP1*) i  $\alpha$ 1,3-galaktozylotransferazę świni<sup>43</sup>.

Wykorzystaniu transgenicznych świń na potrzeby ksenotransplantacji sprzyja ograniczenie dostępności organów od zmarłych na potrzeby transplantacji klinicznych, możliwość ograniczenia natychmiastowego odrzucenia przeszczepu przez układ odpornościowy człowieka, wzrost przeżywalności transplantowanych serc, nerek, wysepek Langerhansa i rogówki świń u naczelných oraz ograniczenie ryzyka przeniesienia potencjalnie infekcyjnych mikroorganizmów. Ponadto wprowadzono obecnie ok. 40 lub więcej zmian genetycznych u świń, przy czym świniom mogą mieć wprowadzone nawet kilkanaście zmian. Możliwe stały się badania kliniczne związane z transplantacją nerek, serca, naczyń krwionośnych i wysepek Langerhansa świń.

Niezmiernie ważnym etapem transgenezy świń jest wprowadzanie konstrukcji genowej 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. Najnowocześniejsze podejście obejmuje edycję genomów, umożliwiając modyfikację zwierząt w sposób ściśle kontrolowany<sup>44</sup>. Niezmiernie ważne

<sup>43</sup> R. Słomski i inni, *Innowacyjna technologia wykorzystania tkanek transgenicznych świń w ksenotransplantacji*, w: „Nauka dla Społeczeństwa. Osiągnięcia Instytutu Genetyki Człowieka PAN”, red. R. Słomski, Poznań, 2021, s. 149-174.

<sup>44</sup> J. Wiater i inni, *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*, „International Journal of Molecular Sciences” 2021, 22(3), 1386.

jest również określenie transgenezy na poziomie DNA, ocena jej stabilności oraz wykrywanie potencjalnych zagrożeń związanych z ryzykiem zakażenia wirusami biorców przeszczepów. Transgeniczna świnia może stać się dawcą różnych narządów, a przeszczepienie każdego z nich stanowi oddzielny problem chirurgii transplantacyjnej<sup>45</sup>.

W naszym kraju wybitni chirurdzy transplantolodzy wykazywali duże zainteresowanie postęпами w badaniach z zakresu ksenotransplantacji. Profesor Zbigniew Religa, który dokonał pierwszego w Polsce przeszczepu serca, Minister Zdrowia w latach 2005–2007, wielokrotnie wyrażał duże zainteresowanie badaniami i je popierał. Profesor Marian Zembala, Minister Zdrowia w 2015 r., bliski współpracownik profesora Religi, brał udział w latach 2002–2006 w realizacji projektu „Wykorzystanie transgenezy w genetycznej modyfikacji świń dla pozyskiwania organów do transplantacji u człowieka” (PBZ-KBN-048/P05/2001). Ogromne zasługi w badaniach nad ksenotransplantacją i pozyskiwaniem środków na badania ma profesor Zdzisław Smorąg z Instytutu Zootechniki – PIB w Balicach<sup>46</sup>. Uzyskane w projekcie transgeniczne świny znalazły zastosowanie w praktyce, co jest znaczącym osiągnięciem nie tylko w ramach krajowych prac badawczo-rozwojowych, lecz również w obszarze światowych badań.

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 wirusologiczne zostały zapoczątkowane w zespole profesora Tadeusza Wilczoka na Uniwersytecie Medycznym, współpraca jest kontynuowana do dnia dzisiejszego przez jego następców, profesor Urszulę Mazurek i Ilonę Bednarek<sup>47</sup>. W Centrum Leczenia Oparzeń w Siemianowicach Śląskich dr Agnieszka Klama-Baryła wykorzystała w praktyce klinicznej skórę pochodzącą od uzyskanych w ramach projektu ksenotransplantacyjnego zwierząt jako materiał opatrunkowy<sup>48</sup>. Uzyskano ponadto patent (numer prawa ochronnego 240144 pt.: „Biotechnologiczny opatrunek do leczenia ran oparze-

<sup>45</sup> N. Ryczek i inni, *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)” 2020, 11(6), s. 713; C. E. Goerlich i inni, *The growth of xenotransplanted hearts can be reduced with growth hormone receptor knockout pig donors*, „Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery” 2023, 165(2), s. e69-e81.

<sup>46</sup> Z. Smorąg i inni, red., *Biotechnologiczne i medyczne podstawy ksenotransplantacji*, red. Z. Smorąg, R. Słomski, L. Cierpka, Poznań 2006, s. 1-388; Z. Smorąg i inni, *Od genomu tura po ksenotransplantacje*, red. Z. Smorąg, R. Słomski, J. A. Modliński, Poznań 2008, s. 1-182.

<sup>47</sup> M. Kimsa-Dudek i inni, *Screening pigs for xenotransplantation: expression of porcine endogenous retroviruses in transgenic pig skin*, „Transgenic Research” 2015, 24(3), s. 529-536.

<sup>48</sup> A. Klama-Baryła i inni, *Is transgenic porcine skin as good as allogeneic skin for regenerative medicine? Comparison of chosen properties of xeno- and allogeneic material*, „Transplantation Proceedings” 2020, 52(7), s. 2208-2217.

niowych, sposób wykonania opatrunku biotechnologicznego do leczenia ran oparzeniowych i sposób zastosowania opatrunku biotechnologicznego do leczenia ran oparzeniowych”, którego twórcami byli Kazimierz Cieślik, Zdzisław Smorąg, Ryszard Słomski, Mariusz Nowak i Marek Kawecki. Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu podjął badania, których celem było wykorzystanie skóry i naczyń krwionośnych transgenicznych świń<sup>49</sup>, którymi kierowali Grzegorz Oszkinis i Ewa Strauss. W badaniach wyprowadzono również linie klonalne transfekowanych fibroblastów płodowych<sup>50</sup>.

Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu pod kierunkiem Ryszarda Słomskiego 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 następnie potencjalnie transgeniczne potomstwo i komórki analizowano molekularnie oraz cytogenetycznie. 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<sup>51</sup>.

Fundacja Rozwoju Kardiochirurgii w Zabrze opracowała technologię wytwarzania innowacyjnych bioprotez zastawek serca z wykorzystaniem technik inżynierii tkankowej i metod biologii molekularnej. Do badań wykorzystywano zarówno tkanki natywne, jak i decellularne<sup>52</sup>. 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

<sup>49</sup> M. Gabriel i inni, *Cryopreserved arterial allografts in the treatment of prosthetic graft infections*, „European Journal of Vascular and Endovascular Surgery” 2004;27(6):590-6.

<sup>50</sup> M. Samiec, M. Skrzyszowska, *Biological transcomplementary activation as a novel and effective strategy applied to the generation of porcine somatic cell cloned embryos*, „Reproductive Biology” 2014, 14(2), s. 128-139.

<sup>51</sup> M. Hryhorowicz i inni, *Improved delivery of CRISPR/Cas9 system using magnetic nanoparticles into porcine fibroblast*, „Molecular Biotechnology” 2019, 61(3), s. 173-180; N. Ryczek i inni, *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)” 2020, vol. 11(6), s. 713.

<sup>52</sup> P. Wilczek i inni, *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*, „Journal of Materials Science. Materials in Medicine” 2015; 26(1):5329.



inżynierii tkankowej i komórkowej<sup>53</sup>. Przeprowadzono również weryfikację wyników transgenetyzacji z zastosowaniem technologii CRISPR/Cas9 do uzyskiwania nowych modyfikacji, jak również określono zmienność genetyczną wybranych świń<sup>54</sup>.

Przez ostatnie lata nie było informacji o badaniach ksenotransplantacyjnych prowadzonych w USA. W 2006 r. Ryszard Słomski wziął udział w delegacji polskich naukowców i biznesmenów do Houston w Teksasie. Głównym wydarzeniem były wykłady dla zaproszonych gości, a wśród nich obecny był Francis Collins, amerykański lekarz i genetyk znany z przełomowych odkryć w dziedzinie chorób genetycznych, który kierował Projektem poznania genomu człowieka. Podczas pobytu w *Texas Heart Institute* w Houston Ryszard Słomski zorientował się, że prowadzone są badania z zastosowaniem dużych zwierząt, jednak nie było informacji o przełomowych wynikach. Dopiero pojawienie się technologii edycji genomu spowodowało przyspieszenie i szerokie rozwinięcie badań. W grudniu 2020 r. amerykańska Agencja Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) zatwierdziła pierwszą zamierzoną zmianę genomową (ang. *Intentional Genomic Alteration*) w linii świń domowych. Świnie GalSafe® pozbawione są epitopu  $\alpha$ 1,3Gal na powierzchni komórek. Homozygotyczne świny GalSafe® są przeznaczone do stosowania zarówno jako żywność, jak i do wytwarzania leków dla ludzi.

Modyfikacje obejmują wyłączenie genów odpowiedzialnych za powstanie węglowodanów związanych z natychmiastowym odrzuceniem tkanek świń, galaktozo- $\alpha$ -1,3-galaktozy (GT),  $\beta$ 1,4-N-acetylogalaktozylotransferazy ( $\beta$ 4Gal), hydroksylazy kwasu cytydino-monofosfo-N-acetylneuraminowego (CMAH) oraz ograniczenie wewnętrznego wzrostu przeszczepu przez blokadę receptora hormonu wzrostu (GHR). Wprowadzono ponadto sześć genów człowieka, które biorą udział w regulacji układu dopełniacza jak CD46, czynnik przyspieszający rozpad (DAF), biorących udział w antykoagulacji jak receptor białka C komórek śródbłonna (EPCR) i trombomodulina (TBM) oraz działające przeciwwzapalnie jak hemooksygenaza 1 (HO-1) oraz CD47<sup>55</sup>.

W styczniu 2022 r. 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 transgenicznym

<sup>53</sup> A. Klama-Baryła i inni, *Is transgenic porcine skin as good as allogeneic skin for regenerative medicine? Comparison of chosen properties of xeno- and allogeneic material*, „Transplantation Proceedings”, 2020, 52(7), s. 2208-2217.

<sup>54</sup> N. Ryczek i inni, *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)”, 2020, 11(6), s. 713.

<sup>55</sup> B. P. Griffith i inni, *Genetically Modified Porcine-to-Human Cardiac Xenotransplantation*, „The New England Journal of Medicine” 2022, vol. 387(1), s. 35-44.

zwierzęciem a człowiekiem. Odbiorcą był 57 letni pacjent David Bennett, a zabieg chirurgiczny przeprowadził dr Bartley P. Griffith. Przeszczep serca świni przeprowadzono zaledwie dwa miesiące po przeszczepieniu nerki świni przez dra Roberta Montgomery'ego z akademickiego centrum medycznego w Nowym Jorku. Pacjent zmarł dwa miesiące po zabiegu, a szpital stwierdził, że przeszczepione serce działało dobrze przez kilka tygodni i nie zaobserwowano oznak odrzucenia. Badania z zakresu ksenotransplantacji na Uniwersytecie Maryland zostały zainicjowane pięć lat wcześniej przez znakomitej sławy uczonego Muhammada M. Mohiuddina<sup>56</sup>. We wrześniu 2023 r. przeprowadził on pierwszy na świecie przeszczep nerki genetycznie zmodyfikowanej świni człowiekowi. Pacjent, za zgodą rodziny był podłączony do respiratora, po tym jak przed ksenoprzeszczepem stwierdzono zgon na podstawie kryteriów neurologicznych. Po dwóch miesiącach pobrano przeszczep i podczas badań zaobserwowano nieznane do tej pory zmiany komórkowe, wskazujące na łagodny proces odrzucania, wymagający intensyfikacji leczenia immunosupresyjnego. Dr Montgomery wskazał, że prowadzone badania umożliwią optymalizację schematu immunosupresji i wybór modyfikacji genów bez narażania żywego pacjenta na ryzyko, zwiększając bezpieczeństwo przyszłych badań klinicznych.

Badania nad ksenotransplantacją intensywnie się rozwijają. Naukowcy z Niemiec pracują nad hodowlą świń, których serca mogą potencjalnie zostać przeszczepione ludziom, jest to związane z dużym zapotrzebowaniem i poparciem społecznym<sup>57</sup>. Intensywne prace prowadzi firma Xtransplant-LMU ze wsparciem ze strony profesora Eckharda Wolfa z Uniwersytetu Ludwiga Maximiliana w Monachium. Do badań wybrano świnię Auckland Island z Nowej Zelandii ze względu na niewielkie rozmiary i projekt przejdzie testy w 2025 r.

Prowadzone są również prace nad transgenezą świń na potrzeby ksenotransplantacji przez inne firmy. Firma biotechnologiczna eGenesis z siedzibą w Cambridge w stanie Massachusetts we współpracy z firmą PorMedTec z Japonii uzyskała genetycznie modyfikowane świnię do stosowania w transplantacjach<sup>58</sup>. Modyfikacja komórek świń obejmowała 1) usunięcie trzech genów zaangażowanych w syntezę antygenów glikanowych związanych z odrzuceniem nadostnym (8 alleli); 2) wprowadzenie siedmiu genów człowieka zaangażowanych w regulację kilku szlaków modulujących odrzucenie oraz 3) inaktywację endogennych retrovirusów w genomie świń (PERV, 59 kopii). Do badań wybrano rasę miniaturo-

<sup>56</sup> C. E. Goerlich i inni, *The growth of xenotransplanted hearts can be reduced with growth hormone receptor knockout pig donors*, „Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery” 2023, vol. 165(2), s. e69-e81.

<sup>57</sup> E. Kemter i inni, *Xeno-organ donor pigs with multiple genetic modifications - the more the better?*, „Current Opinion in Genetics and Development” 2020;64:60-65.

<sup>58</sup> R. P. Anand i inni, *Design and testing of a humanized porcine donor for xenotransplantation*, „Nature” 2023, 622(7982), s. 393-401.

wych świń jukatańskich, ponieważ rozmiary ich narządów są porównywalne do narządów człowieka, z grupą krwi zero (OO), aby wyeliminować niezgodności grupy krwi w układzie ABO. Łącznie wprowadzono 69 zmian genomowych z zastosowaniem metod edycji genomu (technologia CRISPR/Cas9)<sup>59</sup>. Średni czas oczekiwania na przeszczep nerki w Japonii wynosi piętnaście lat, w porównaniu do czterech lat w USA.

Mimo olbrzymiego postępu, stosowanie urządzeń do długoterminowego mechanicznego wspomaganie krążenia przy znaczących korzyściach klinicznych, nadal związane jest poważnymi powikłaniami w zakresie hemokompatybilnością, w tym zakrzepicą, nawracającymi krwawieniami i incydentami naczyniowo-mózgowymi, stąd podobnie jak inne rozwiązania, wymaga dalszych badań<sup>60</sup>.

Inną alternatywą do przeszczepów może być biodruk 3D, który wykorzystuje biokompatybilne materiały i komórki człowieka do tworzenia żywych tkanek i struktur narządów. Organy 3D znajdują zastosowanie w medycynie regeneracyjnej, poszukiwaniu nowych leków jak i testach toksykologicznych. Przyjmuje się, że w krótkim czasie będzie można wykorzystać je w przeszczepach narządów<sup>61</sup>. Chociaż biodruk 3D może przynieść wiele korzyści, wiąże się z szeregiem wyzwań i wymagań, w szczególności związanych z biodrukowaniem różnych tkanek, m.in. komórkami, białkami i biodrukarkami, a także kwestiami etycznymi, skutecznością kliniczną i opłacalnością, co utrudnia włączenie biodruku 3D do powszechnej praktyki klinicznej<sup>62</sup>. Istotną część biodruku 3D stanowią komórki macierzyste, ponieważ decydują o możliwości przygotowania funkcjonalnych narządów. Komórki macierzyste powinny wykazywać zdolność do podziałów, funkcjonalność, bezpieczeństwo stosowania, niską kosztocłonność oraz zdolność do samoorganizacji i odtwarzania prawidłowych struktur tkanek, umożliwiając pełną funkcjonalizację organu<sup>63</sup>. W badaniach *in vitro* uzyskano struktury trójwymiarowe dla m.in. wątroby, nerek, płuc, serca, jelit, oczu, skóry, nerwów i kości<sup>64</sup>. Dla potrzeb inżynierii tkankowej i medycyny regeneracyjnej w trójwymiarowym biodrukowaniu wykorzystuje się coraz częściej decellularyzowaną macierz zewnątrzkomórkową (ang. *decellularized extracellular matrix*, dECM), myśli

<sup>59</sup> Tamże.

<sup>60</sup> A. Nascimbene i inni, *Hemocompatibility and biophysical interface of left ventricular assist devices and total artificial hearts*, „Blood” 2024, 143(8), s. 661-672.

<sup>61</sup> Y. Ma i inni, *Advancements of 3D bioprinting in regenerative medicine: Exploring cell sources for organ fabrication*, „Heliyon” 2024, 10(3), s. e24593.

<sup>62</sup> R. S. Veeravalli i inni, *Three-Dimensional Bioprinting in Medicine: A Comprehensive Overview of Current Progress and Challenges Faced*, „Cureus”, 2023, 15(7), s. e41624.

<sup>63</sup> Y. Ma i inni, *Advancements of 3D bioprinting in regenerative medicine: Exploring cell sources for organ fabrication*, „Heliyon” 2024, 10(3), s. e24593.

<sup>64</sup> J. Frankowski i inni, *Utilization of 3D bioprinting technology in creating human tissue and organoid models for preclinical drug research - State-of-the-art*, „International Journal of Pharmaceutics” 2023, 644, s. 123313.

się także o przygotowaniu na ich podstawie biotuszu<sup>65</sup>. Nasi współpracownicy prowadzili prace nad wykorzystaniem decellularyzowanych struktur w projekcie ksenotransplantacyjnym<sup>66</sup>.

Rozwój hodowli komórek w układach trójwymiarowych zapewnia prawidłowe oddziaływania między komórkami i macierzą zewnątrzkomórkową, co umożliwia odtworzenie warunków występujących naturalnie w tkankach i organach. Badania w dużym stopniu skupiają się na organoidach<sup>67</sup>, wywodzących się z komórek macierzystych, odtwarzających złożoną strukturę narządów w układach *in vitro*<sup>68</sup>. Druk trójwymiarowy organów do przeszczepów wymaga pokonania wyzwań obejmujących odpowiednie unaczynienie narządów, dostępności dużej liczby komórek o określonych parametrach, ograniczenia odpowiedzi immunologicznej związanej z pojawianiem się składników pochodzenia zwierzęcego oraz funkcjonalizację komórek tworzących struktury 3D<sup>69</sup>.

## Podsumowanie

Odkrycie budowy cząsteczki DNA stanowi jedno z najważniejszych osiągnięć ludzkości. Wiedza ta znalazła zastosowanie nie tylko w nauce, gdzie dała początek kilku nowym dziedzinom, ale także w przemyśle, medycynie oraz życiu codziennym. Znajomość DNA była podłożem dla rozwoju inżynierii genetycznej, której chyba najbardziej ambitnym zastosowaniem jest hodowla zwierząt transgenicznych na potrzeby ksenotransplantacji. Przeszczepy odzwierzęce są jednym z najbardziej obiecujących rozwiązań dla problemu niedoboru podaży narządów do przeszczepu i nie ulega wątpliwości, że wiedza o genetyce jest kluczem do zmniejszenia bariery immunologicznej i, w konsekwencji, prawdopodobieństwa odrzucenia przeszczepu. W połączeniu z odpowiednią terapią immunosupresyjną obecnie trwające eksperymenty dają coraz lepsze wyniki. Kolejnym zaproponowanym rozwiązaniem jest biodruk w 3D. Ponieważ metoda ta zakłada wykorzystanie materiałów biokompatybilnych oraz komórek macierzystych pacjenta,

<sup>65</sup> M. Gadre i inni, *Decellularization and Their Significance for Tissue Regeneration in the Era of 3D Bioprinting*, „ACS Omega”, 2024, 9(7), s. 7375-7392.

<sup>66</sup> A. Klama-Baryła i inni, *Is transgenic porcine skin as good as allogeneic skin for regenerative medicine? Comparison of chosen properties of xeno- and allogeneic material*, „Transplantation Proceedings” 2020, 52(7), s. 2208-2217; M. Gierek i inni, *Platelet-Rich Plasma and Acellular Dermal Matrix in the Surgical Treatment of Hidradenitis Suppurativa: A Comparative Retrospective Study*, „Journal of Clinical Medicine” 2023, 12(6), 2112.

<sup>67</sup> Z. Sumbalova Koledova, *3D Cell Culture: Techniques For and Beyond Organoid Applications*, „Methods in Molecular Biology”, 2024, 2764, s. 1-12.

<sup>68</sup> M. Cabral i inni, *Three-Dimensional Bioprinting of Organoids: Past, Present, and Prospective*, „Tissue Engineering. Part A”, 2024.

<sup>69</sup> Y. Ma i inni, *Advancements of 3D bioprinting in regenerative medicine: Exploring cell sources for organ fabrication*, „Heliyon”, 2024, 10(3), s. e24593.

ryzyko odrzucenia takiego przeszczepu powinno być zdecydowanie mniejsze. Wyzwaniem pozostaje jednak dobór materiałów tak aby oddawały one w pełni właściwości fizyczne drukowanego organu, a także żeby komórki macierzyste mogły łatwo skolonizować i egzystować na sporządzonym rusztowaniu.

## References

### Bibliografia

- Anand R. P., Layer J. V., Heja D., Hirose T., Lassiter G., Firl D. J., Paragas V. B., Akkad A., Chhangawala S., Colvin R. B., Ernst R. J., Esch N., Getchell K., Griffin A. K., Guo X., Hall K. C., Hamilton P., Kalekar L. A., Kan Y., Karadagi A., Li F., Low S. C., Matheson R., Nehring C., Otsuka R., Pandelakis M., Policastro R. A., Pols R., Queiroz L., Rosales I. A., Serkin W. T., Stiede K., Tomosugi T., Xue Y., Zentner G. E., Angeles-Albores D., Chris Chao J., Crabtree J. N., Harken S., Hinkle N., Lemos T., Li M., Pantano L., Stevens D., Subedar O. D., Tan X., Yin S., Anwar I. J., Aufhauser D., Capuano S., Kaufman D. B., Knechtle S. J., Kwun J., Shanmuganayagam D., Markmann J. F., Church G. M., Curtis M., Kawai T., Youd M. E., Qin W., *Design and testing of a humanized porcine donor for xenotransplantation*, „Nature” 2023, 622 (7982), s. 393-401.
- Bartkowiak-Wieczorek J., Mądry EE, Książkiewicz M, Winkler-Galicki J, Szalata Mi, Szalata Ma, Jiménez UE, Wielgus K, Grześkowiak E, Słomski R, Bienert A., *THC-reduced Cannabis Sativa L.- how does the solvent determine the bioavailability of cannabinoids given orally?*, „Nutrients” 2023; 15(12):2646
- Bohm, I., Krawczak, M., Nurnberg, P., Hampe, J., Hundrieser, J., Poche, H., Peters Ch., Słomski, R., Kwiatkowska, J., Nagy, M., Popperl, A., Epplen, J.T., Schmidtke, J., *Paternity testing with oligonucleotide probe (CAC)5/(GTG)5 a multi-center study*, „Forensic Scientific International” 1993, 59, 101-107.
- Butler, J. M., *Forensic DNA Typing*, Elsevier 2005, 1-660.
- Cabral M., Cheng K., Zhu D., *Three-Dimensional Bioprinting of Organoids: Past, Present, and Prospective*, „Tissue Engineering. Part A”, 2024.
- Ciesielka, M., Kozioł, P., Krajka A., *Allele frequency distributions of D1S80 in the Polish population*, „Forensic Science International” 1996, 81(2-3), s. 141-147.
- Czarny, M., Janiszewska, H., Kwiatkowska, J., Chlebowska, H., Siemieniako, B., Słomski, R., *Czy analiza DNA jest zawsze skuteczna: Problemy w dochodzeniu spornego ojcostwa w przypadku bliskiego pokrewieństwa domniemanych ojców. Is DNA analysis always usefull: Problems in paternity testing in case of closely related alleged fathers*, w : „Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii” 1995, XLV, s. 287-295.
- Dabney J., Meyer M., Paabo, S., *Ancient DNA Damage*, „Cold Spring Harbor Perspectives in Biology”, 2013, 5(7), a012567–a012567.
- Danielewski M., Żuraszek J., Zielińska A., Herzig K.-H., Słomski R., Walkowiak J., Wielgus K., *Methodological Changes in the Field of Paleogenetics*, „Genes” 2023, vol. 14(1).
- Dobosz, T., *Zastosowanie polimorfizmu DNA w medycynie sądowej*, „Postępy Medycyny Sądowej i Kryminologii” 1995, T.2. 431-434.
- Dobrowolska-Zachwieja, A., Kaczmarek, M., Hoppe-Golebiewska, J., Słomski R., *Wariant mutacji genu NOD2/CARD15 w rodzinie chorej z chorobą Leśniowskiego-Crohna. The sequence variant of NOD2/Card15 in a Polish family on the background of Polish patients with Crohn's disease*, „Gastroenterologia Polska” 2004, 11, 4, 325-331.

- Frankowski J., Kurzątkowska M., Sobczak M., Piotrowska U., *Utilization of 3D bioprinting technology in creating human tissue and organoid models for preclinical drug research - State-of-the-art*, „International Journal of Pharmaceutics” 2023, 644, s. 123313.
- Gabriel M., Pukacki F., Dzieciuchowicz Ł., Oszkini G., Checiński P., *Cryopreserved arterial allografts in the treatment of prosthetic graft infections*, „European Journal of Vascular and Endovascular Surgery” 2004, 27(6), s. 590-596.
- Gadre M., Kasturi M., Agarwal P., Vasanthan K. S., *Decellularization and Their Significance for Tissue Regeneration in the Era of 3D Bioprinting*, „ACS Omega” 2024, 9(7), s.7375-7392.
- Gierek M., Klama-Baryła A., Łabuś W., Bergler-Czop B., Pietrauszka K., Niemiec P., *Platelet-Rich Plasma and Acellular Dermal Matrix in the Surgical Treatment of Hidradenitis Suppurativa: A Comparative Retrospective Study*, „Journal of Clinical Medicine” 2023, 12(6), s. 2112.
- Goerlich C. E., Griffith B., Hanna P., Hong S. N., Ayares D., Singh A. K., Mohiuddin M. M., *The growth of xenotransplanted hearts can be reduced with growth hormone receptor knockout pig donors*, „Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery” 2023, 165(2), s. e69-e81.
- Griffith B. P., Goerlich C. E., Singh A. K., Rothblatt M., Lau C. L., Shah A., Lorber M., Grazioli A., Saharia K. K., Hong S. N., Joseph S. M., Ayares D., Mohiuddin M. M., *Genetically Modified Porcine-to-Human Cardiac Xenotransplantation*, „The New England Journal of Medicine”, 2022, 387(1), s. 35-44.
- Hryhorowicz M., Grzeskowiak B., Mazurkiewicz N., Śledziński P., Lipiński D., Słomski R., *Improved delivery of CRISPR/Cas9 system using magnetic nanoparticles into porcine fibroblast*, „Molecular Biotechnology” 2019, 61(3), s.173-180.
- Hryhorowicz S., Kaczmarek-Ryś M., Zielińska A., Scott RJ, Słomski R, Pławski A., *Endocannabinoid System as a Promising Therapeutic Target in Inflammatory Bowel Disease - A Systematic Review*, „Frontiers in Immunology” 2021 Dec 22;12:790803).
- Jaruzelska J, Borski K, Riess O, Blin N, Słomski R., *Haplotype analysis of phenylalanine hydroxylase alleles in polish families with phenylketonuria*, „Acta Biochimica Polonica” 1989; 36(3-4):323-32.
- Jaruzelska J, Matuszak R, Lyonnet S, Rey F, Rey J, Filipowicz J, Borski K, Munnich A., *Genetic background of clinical homogeneity of phenylketonuria in Poland*, „Journal of Medical Genetics” 1993;30(3):232-4
- Jeffreys, A. J, Wilson, V., Thein, S.W., *Individual-specific “fingerprints” of human DNA*, „Nature” 1985, 316, 76-79.
- Jeffreys, A. J, Wilson, V., Thein, S. W. „*Hypervariable “minisatellite” region in human DNA*”, „Nature”, 1985, 314, 67-73.
- Jeffreys, A. J., Neumann, R., Wilson, V., *Repeat unit sequence variation in minisatellites: a novel source of DNA polymorphism for studying variation and mutation by single molecule analysis*, „Cell” 1990, 60, 473-485.
- Jones E. D., Bösl, E., *Ancient human DNA: A history of hype (then and now)*, „Journal of Social Archaeology”, 2021, 21(2), s. 236-255.
- Kemter E., Schnieke A., Fischer K., Cowan P. J., Wolf E., *Xeno-organ donor pigs with multiple genetic modifications - the more the better?* “Current Opinion in Genetics and Development” 2020, 64, s.60-65.
- 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., *Screening pigs for xenotransplantation: expression of porcine endogenous retroviruses in transgenic pig skin*, „Transgenic Research” 2015, 24(3), 529-536.
- Klama-Baryła A., Kitala D., Łabuś W., Kraut M., Szapski M., Słomski R., *Is transgenic porcine skin as good as allogeneic skin for regenerative medicine? Comparison of chosen properties of xeno- and allogeneic material*, „Transplantation Proceedings” 2020, 52(7), s. 2208-2217.

- Krela-Kaźmierczak I, Skrzypczak-Zielińska M, Kaczmarek-Ryś M, Michalak M, Szymczak-Tomczak A, Hryhorowicz ST, Szalata M, Łykowska-Szuber L, Eder P, Stawczyk-Eder K, Tomczak M, Słomski R, Dobrowolska A., *ESR1 Gene Variants Are Predictive of Osteoporosis in Female Patients with Crohn's Disease.*, „Journal of Clinical Medicine” 2019, Aug 24;8(9):1306.
- Krings M., Stone A., Schmitz R. W., Krainitzki H., Stoneking M., Pääbo S., *Neandertal DNA Sequences and the Origin of Modern Humans*, „Cell” 1997, 90(1), s. 19-30.
- Leyko W., Filipowicz B., *Przestrzenna budowa kwasów nukleinowych*, „Postępy Biochemii” 1956, vol. 2, 61-75.
- Lipiński D., Jura J., Kalak R., Pławski A., Kala M., Szalata M., Jarmuz M., Korcz A., Słomska K., Jura J., Groniek P., Smorag Z., Pieńkowski M., Słomski R., *Transgenic rabbit producing human growth hormone in milk*, „Journal of Applied Genetics” 2003, vol. 44(2), s. 165-174.
- Łykowska-Szuber L., Skrzypczak-Zielinska M., Zuraszek J., Walczak M, Stawczyk-Eder K., Krela-Kaźmierczak I., Michalak M., Słomski R., Dobrowolska A., *Association of the ILR1 and FAS gene variants with primary nonresponse to anti-tumor necrosis factor therapy in patients with Crohn disease*, „Polish Archives of Internal Medicine” 2023, Oct 26;133(10):16461.
- Ma Y., Deng B., He R., Huang P., *Advancements of 3D bioprinting in regenerative medicine: Exploring cell sources for organ fabrication*, „Heliyon” 2024, 10(3), s. e24593.
- Merheb M., Matar R., Hodeify R., Siddiqui S. S., Vazhappilly C. G., Marton J., Azharuddin S., Al Zouabi H., *Mitochondrial DNA, a Powerful Tool to Decipher Ancient Human Civilization from Domestication to Music, and to Uncover Historical Murder Cases*, „Cells”, 2019, 8(5), s. 433.
- Meyer M., Kircher M., Gansauge M.-T., Li H., Racimo F., Mallick S., Schraiber J. G., Jay F., Prüfer K., de Filippo C., Sudmant P. H., Alkan C., Fu Q., Do R., Rohland N., Tandon A., Siebauer M., Green R. E., Bryc K., Briggs A. W., Stenzel U., Dabney J., Shendure J., Kitzman J., Hammer M. F., Shunkov M. V., Dereviānko A. P., Patterson N., Andrés A. M., Eichler E. E., Slatkin M., Reich D., Kelso J., Pääbo S., *A High-Coverage Genome Sequence from an Archaic Denisovan Individual*, „Science” 2012, 338(6104), s. 222–226.
- Monaco A. P., Bertelson C. J., Liechti-Gallati S., Moser H., Kunkel L. M., *An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus*, „Genomics” 1988; 2(1):90-5.
- Nakamura Y., Carlson M., Krapcho K., Kanamori M., White R., *New approach for isolation of VNTR markers*, „American Journal of Human Genetics”, 1988, 43, 854-859.
- Nakamura Y., Julier C., Wolff R., Holm R., O'Connell P., Leppert M., White R., *Characterization of a human “midisatellite” sequence*, „Nucleic Acids Research” 1987, 15, s. 2537-2547.
- Napierała D., Pławski A., Kalak R., Jura J., Wronka J., Sowińska J., Banasiewicz T., Słomski R., *Molecular diagnostics of genetic diseases. Experience from studies of DMD*, 28, s. 113-127.
- Nascimbene A., Bark D., Smadja D. M., *Hemocompatibility and biophysical interface of left ventricular assist devices and total artificial hearts*, „Blood”, 2024, 143(8), s. 661-672.
- Nürnberg P., Roewer L., Neitzel H., Sperling K., Pöpperl A., Hundrieser J., Pöche H., Epplen C., Zischler H., Epplen J. T., *DNA fingerprinting with the oligonucleotide probe (CAC)5/(GTG)5: somatic stability and germline mutations*, „Human Genetics” 1989, Dec;84(1):75-8.
- Pääbo S., *Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA*, „Nature” 1985, vol. 314(6012), s. 644–645.
- Prüfer K., Racimo F., Patterson N., Jay F., Sankararaman S., Sawyer S., Heinze A., Renaud G., Sudmant P. H., de Filippo C., Li H., Mallick S., Dannemann M., Fu Q., Kircher M., KuhlwilM M., Lachmann M., Meyer M., Ongyerth M., Siebauer M., Theunert C., Tandon A., Moorjani P., Pickrell J., Mullikin J. C., Vohr S. H., Green R. E., Hellmann I., Johnson P. L., Blanche H., Cann H., Kitzman J. O., Shendure J., Eichler E. E., Lein E. S., Bakken T. E., Golovanova L. V.,

- Doronichev V. B., Shunkov M. V., Derevianko A. P., Viola B., Slatkin M., Reich D., Kelso J., Pääbo S., *The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains*, „Nature” 2014, 505(7481), s. 43–49.
- Rininsland F., Hahn A., Niemann-Seyde S., Słomski R., Hanefeld F., Reiss J., *Identification of a new DMD gene deletion by ectopic transcript analysis*, „Journal of Medical Genetics” 1992, 29: s. 647-651.
- Ryczek N., Hryhorowicz M., Lipiński D., Zeyland J., Słomski R., *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)” 2020, 11(6), s. 713.
- Samiec M., Skrzyszowska M., *Biological transcomplementary activation as a novel and effective strategy applied to the generation of porcine somatic cell cloned embryos*, „Reproductive Biology”, 2014, 14(2), s. 128-139.
- Skrzypczak-Zielinska M., Borun P., Bartkowiak-Kaczmarek A., Zakerska-Banaszak O., Walczak M., Dobrowolska A., Kurzawski M., Waszak M., Lipinski D., Plawski A., Słomski R., *A Simple Method for TPMT and ITPA Genotyping Using Multiplex HRMA for Patients Treated with Thiopurine Drugs*, „Molecular Diagnosis and Therapy” 2016; 20(5): s. 493-9.
- Skrzyszowska M., Smorąg Z., Słomski R., Kańska-Książkiewicz L., Kalak R., Michalak E., Wielgus K., Lehmann J., Lipiński D., Szalata M., Pławski A., Samiec M., Jura J., Gajda B., Ryńska B., Pieńkowski M., *Generation of transgenic rabbits by the novel technique of chimeric somatic cell cloning*, „Biology of Reproduction” 2006, 74(6), s. 1114-1120.
- Słomski R., Strauss E., Lipiński D., Smorąg Z., Jura J., Skrzyszowska M., Samiec M., Wilczek P., Klama-Baryła A., *Innowacyjna technologia wykorzystania tkanek transgenicznych świń w ksenotransplantacji*, w: „Nauka dla Społeczeństwa. Osiągnięcia Instytutu Genetyki Człowieka PAN”, red. R. Słomski, Poznań, 2021, s. 149-174.
- Smorąg Z., Słomski R., Cierpka L., *Biotechnologiczne i medyczne podstawy ksenotransplantacji*, red. Z. Smorąg, R. Słomski, L. Cierpka, Poznań, 2006.
- Smorąg Z., Słomski R., Modliński J. A., *Od genomu tura po ksenotransplantację*, red. Z. Smorąg, R. Słomski, J.A. Modliński, Poznań, 2008, s. 1-182.
- Sumbalova Koledova Z., *3D Cell Culture: Techniques For and Beyond Organoid Applications*, „Methods in Molecular Biology” 2024, 2764, s. 1-12.
- Szalata Mi., Dreger M., Zielińska A., Banach J., Szalata Ma., Wielgus K., *Simple Extraction of Cannabinoids from Female Inflorescences of Hemp (Cannabis sativa L.)*, *Molecules* 2022, 27, 5868.
- Śledziński P., Nowak-Terpiłowska A., Rzymyski P., Słomski R., Zeyland J., *In Vitro Evidence of Selective Pro-Apoptotic Action of the Pure Cannabidiol and Cannabidiol-Rich Extract*, *Molecules* 2023, 28(23):7887.
- Tucholska-Lenart A., *Genetyczna identyfikacja człowieka – zarys historii kryminalistycznych badań DNA*, „Kwartalnik Historii Nauki i Techniki”, 2016, 61 (3), s. 7-42.
- Tucholska-Lenart A., Wujec J., Samborski J., Jakubowska E., *Allele frequencies for 10 STR loci in a population from central Poland*, „Forensic Science International” 2002, 129 (2), s. 131-133.
- Veeravalli R. S., Vejandla B., Savani S., Nelluri A., Peddi N. C., *Three-Dimensional Bioprinting in Medicine: A Comprehensive Overview of Current Progress and Challenges Faced*, „Cureus” 2023, 15(7), s. e41624.
- Walczak M., Skrzypczak-Zielinska M., Plucinska M., Zakerska-Banaszak O., Marszałek D., Lykowska-Szuber L., Stawczyk-Eder K., Dobrowolska A., Słomski R., *Long-range PCR libraries and next-generation sequencing for pharmacogenetic studies of patients treated with anti-TNF drugs*, „Pharmacogenomics J” 2019; 19(4): s. 358-367.
- Watson J. D., Crick F. H., *Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid*, „Nature” 1953; 171(4356):737-8.



- Wiater J., Samiec M., Skrzyszowska M., Lipiński D., *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*, „International Journal of Molecular Sciences” 2021, 22(3), s. 1386.
- Wielgus K., Danielewski M., Walkowiak J., *Svante Pääbo, reader of the Neanderthal genome*, „Acta Physiologica”, 2023, 237(1), s. e13902.
- Wielgus K., Lipiński D., Dzieduszycki A., Ryba M., Słomski R., *Analiza sekwencji mitochondrialnego DNA z materiału wykopaliskowego*, w: „Analiza DNA. Teoria i praktyka”, red. R. Słomski, Poznań, 2008, s. 390-398.
- Wilczek P., Lesiak A., Niemiec-Cyganek A., Kubin B., Słomski R., Nozynski J., Wilczek G., Mzyk A., Gramatyka M., *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*, „Journal of Materials Science. Materials in Medicine”, 2015, 26(1), s. 5329.
- Willerslev E., Cooper A., *Review Paper. Ancient DNA*, „Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences”, 2005, 272(1558), s. 3–16.
- Wróbel T., Dreger M., Wielgus K., Słomski R., *Modified Nodal Cuttings and Shoot Tips Protocol for Rapid Regeneration of Cannabis sativa L.*, „Journal of Natural Fibers”, 2022; 19:2, s. 536-545.
- Zakerska-Banaszak O., Tomczak H., Gabryel M., Baturo A., Wolko L., Michalak M., Malinska N., Mankowska-Wierzbicka D., Eder P., Dobrowolska A., Słomski R., Skrzypczak-Zielinska M., *Dysbiosis of gut microbiota in Polish patients with ulcerative colitis: a pilot study*, „Scientific Reports” 2021, Jan 25;11(1):2166.
- Zielińska A., da Ana R., Fonseca J., Szalata Mi., Wielgus K., Fathi F., Oliveira M. B. P. P., Staszewski R., Karczewski J., Souto E. B., *Phytocannabinoids: Chromatographic Screening of Cannabinoids and Loading into Lipid Nanoparticles*, *Molecules* 2023; 28(6), 2875.