

Uzyskiwanie ludzkiej hemoglobiny od zwierząt zmodyfikowanych metodami inżynierii genetycznej

Grzegorz Grzybowski
Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt
Polska Akademia Nauk
Jastrzębiec

1. Wstęp

Krew od stuleci uważana była za „płyn życia”, przypisywano jej przenoszenie cech dziedzicznych, a nawet przypuszczano, że jest to siedlisko właściwości metafizycznych.

W zootechnice i weterynarii do dziś stosowane są terminy genetyczno-hodowlane związane z krwią. Obecne są one m.in. w nazwach ras koni (np. rasa koni **czystej krwi** arabskiej lub konie **pełnej krwi** angielskiej), oraz w terminologii genetyczno-selekcyjnej (np. genetyczne doskonalenie jednej rasy poprzez **dolew krwi** innej, **udział krwi** jednej rasy u drugiej itd.).

Z punktu widzenia klasyfikacji histologicznej, krew jest szczególnym rodzajem tkanki łącznej (elementy morfotyczne rozmieszczone w przestrzeni pozakomórkowej). Najliczniejszą kategorią elementów komórkowych krwi są erytrocyty, a ich najważniejszym elementem jest hemoglobina służąca do dostarczania tlenu do metabolizmu komórkowego oraz do wymiany gazowej w organizmie.

Celem pracy jest przedstawienie aktualnego stanu badań w zakresie uzyskiwania ludzkiej hemoglobiny od zwierząt zmodyfikowanych metodami inżynierii genetycznej, a także omówienie wybranych problemów medycznych i kulturowo-obyczajowych związanych z zastosowaniem „transgenicznej” hemoglobiny jako leku krwiozastępczego.

Duże zainteresowanie hemoglobina wynika m.in. z ciągłego zapotrzebowania na to białko w różnych specjalnościach medycyny klinicznej, a także ma związek z różnymi hemoglobinopatiami rejestrowanymi u ludzi. Według Światowej Organizacji Zdrowia, co najmniej 5% ludzi na świecie jest nosicielami różnorodnych dziedzicznych aberracji genów hemoglobiny. Każdego roku grupa homozygotycznych mutacji genów hemoglobiny powiększa

się o około 300 000 nowych ciężkich dysfunkcji wymagających medycznej interwencji (cyt. za 1)

2. Zastosowanie krwi i preparatów krwiopochodnych w leczeniu — podejście tradycyjne

Krew, jej składniki i preparaty z niej wytwarzane są w wielu sytuacjach lekiem bezcennym i niezastąpionym. W Polsce, podobnie jak w innych krajach, do zaopatrywania chorych w hemoglobinę wykorzystuje się przetaczanie krwi o pełnym składzie, albo podawanie erytrocytów krwi ludzkiej. Hemoglobina jest tu zatem podawana wraz ze swym naturalnym komórkowym nośnikiem (erytrocytami). Zainteresowanie badawcze hemoglobiną jako lekiem, oraz preparatami krwiopochodnymi i krwiozastępczymi jest duże. Prace z tego zakresu są już w niektórych krajach poważnie zaawansowane. Na przykład, w USA trwają już przedkliniczne próby terapeutycznego zastosowania biochemicznie zmodyfikowanej hemoglobiny pozyskiwanej z ludzkich erytrocytów (2). Znaczenie produkcji i stosowania leczniczych preparatów krwiopochodnych jest coraz większe. Wynika to z przesłanek ekonomicznych, a także ma związek z narastającymi problemami zdrowotno-cywilizacyjnymi na świecie.

Pozyskiwanie krwi jest coraz bardziej utrudnione m.in. ze względu na kryzys systemu honorowego krwiodawstwa (dotyczy to w dużym zakresie Polski), a także z uwagi na to, że przetaczanie krwi stwarza zagrożenia dla życia związane z zakażeniem wirusem HIV, wirusem zapalenia wątroby (żółtaczką) itd. Dawcy krwi muszą być selekcjonowani według ostrych kryteriów zdrowotno-hematologicznych, lecz nawet po ich spełnieniu, nie zawsze pozyskana od nich krew nadaje się do wykorzystania. Odnosi się to do przypadków kiedy doszło do wtórnego zakażenia krwi, np. podczas akcji ratowania życia po wypadku, kiedy pobierana jest krew na ulicy, nierzadko w niesprzyjających warunkach.

Również immunoserologia grup krwi u ludzi jest bardzo złożona. Znane są obecnie 23 układy grupowe, w których występuje 194 antygenów (3). Wprawdzie genetyka i medycyna dysponują już metodami testowań niektórych układów grupowych na podstawie polimorfizmu DNA (4-7), lecz są to techniki kosztowne. Testowanie dawców i biorców krwi w zakresie formuły antygenowej, choć jest uciążliwe m.in. ze względu na konieczność specjalistycznego przygotowania, testowania i odnawiania puli immunoreagentów, musi być dokonywane. Po przetoczeniach krwi niedopasowanej antygenowo mogą występować szoki anafilaktyczne, groźne dla życia biorców. Zgodność dawcy i biorcy w zakresie formuły antygenowej jest zatem podstawowym warunkiem zapobiegania tym groźnym zjawiskom.

Odrębnym problemem jest przechowywanie krwi przeznaczonej do przetoczeń oraz archiwizowanie danych o jej pozyskaniu i dystrybucji. Krew musi być zdeponowana w głębokim zamrożeniu co pociąga za sobą skutki finansowe, tak ze względu na wysokie koszty zakupu, amortyzacji oraz obsługi

dużych urządzeń chłodniczych i pomieszczeń, jak i ze względu na wzrastające koszty energii. Ponadto, krew może być przechowywana tylko przez kilka tygodni i po tym okresie nie może być już zastosowana zgodnie ze swym przeznaczeniem (8).

Dysponowanie hemoglobina o pożądanymi właściwościami biologicznymi spreparowaną *in vitro* lub pozyskaną z ludzkich erytrocytów rozwiązałyby nurtujące problemy. Dlatego Pool uważa (8), że korzyści medyczne oraz zyski handlowe związane z dysponowaniem takim preparatem byłyby nie do przecenienia. Firmy biotechnologiczne poszukują zatem technologii, które umożliwiłyby efektywne uzyskiwanie „sztucznej” hemoglobiny w celu jej zastosowania jako niekonwencjonalnego preparatu leczniczego.

3. Bioreaktory zwierzęce do uzyskiwania ludzkich białek leczniczych

Genetyka molekularna przechodzi okres bardzo szybkiego rozwoju. W rezultacie manipulacji laboratoryjnych, na poziomie DNA tworzone są nowe konstrukcje genowe będące częstokroć połączeniem informacji dziedzicznej wywodzącej się z różnych odległych od siebie organizmów. Dzięki uniwersalności kodu genetycznego możliwe jest utworzenie nowej konstrukcji składającej się, np. z części kodujących jakiegoś genu ludzkiego z sekwencjami regulatorowymi (promotorem) jakiegoś genu mysiego.

Istotne jest to, że nowa konstrukcja genu wraz z niesioną przezeń informacją może być wprowadzona do genomu innych organizmów, np. do komórek linii płciowej (*germ line*) zwierząt gospodarskich. W konsekwencji, nowa informacja wprowadzona do genomu techniką laboratoryjną może być dziedziczona dając początek linii osobników nie występujących w naturze. Organizmy, u których nastąpiło zintegrowanie w ich genomie obcego DNA (transgeny) określane są jako transgeniczne.

W zakresie technik inżynierii genetycznej osiągnięto już duży stopień zaawansowania i w coraz większym zakresie mają one charakter badań aplikacyjnych. Jedną z najnowszych koncepcji uzyskiwania ludzkiej hemoglobiny jako leku krwiozastępczego jest wykorzystanie do tego celu transgenicznych zwierząt. Badaniom z tej dziedziny sprzyja duży zasób informacji napływającej na temat sekwencji i struktury genów globin człowieka, a także wiedzy na temat budowy i funkcji ludzkiej hemoglobiny.

W różnych okresach rozwoju ontogenetycznego znaleziono u człowieka 6 łańcuchów globin, którym nadano greckie symbole: α , β , γ , δ , ϵ oraz ζ . Oznacza to, że w genomie ludzi jest obecnych 6 strukturalnie odmiennych genów tego białka. Strukturalne i funkcjonalne aspekty dotyczące ludzkiej hemoglobiny omawiane są w wielu artykułach, m.in. w obszernym opracowaniu Weatheralla i wsp. (1). Częsteczką hemoglobiny dorosłego zdrowego człowieka jest heterotetramerem składającym się z dwóch łańcuchów α i dwóch łańcuchów β -globiny oraz z hemu (kompleks metaloporfirynowy).

U normalnych dorosłych osobników, 97% stanowi hemoglobina A ($\alpha_2\beta_2$), a pozostałą część — hemoglobina A₂ ($\alpha_2\delta_2$). W życiu płodowym występuje hemoglobina F ($\alpha_2\gamma_2$), której domieszkę (ok. 0,5%) można niekiedy spotkać także u ludzi dorosłych. W okresie zarodkowym występują natomiast u człowieka hemoglobiny *Gower 1* i *Gower 2* oraz hemoglobina *Portland* o konfiguracji łańcuchów globin w cząsteczce odpowiednio — $\zeta_2\varepsilon_2$, $\alpha_2\varepsilon_2$, i $\zeta_2\gamma_2$.

Geny — α - i β -globiny umiejscowione są na innych chromosomach autosomalnych, podczas gdy loci genów „płodowych” i pozostałych (z wyjątkiem genu dla łańcucha α) są ze sobą sprzężone i znajdują się w jednym zgrupowaniu (*cluster*) — (1).

W badaniach nad transkrypcją różnych konstrukcji genowych tworzonych za pomocą metod inżynierii genetycznej wykazano, że ekspresja zachodzi pod kontrolą promotora wprowadzonego do transgenu. Gen obecny w konstrukcji jest zatem aktywny w tych komórkach, tkankach lub narządach, w których odpowiednie geny lub promotory są aktywne u zwierząt normalnych. Konstrukcje wyposażone zatem w promotory genów białek mleka podlegają ekspresji w gruczole mlecznym, promotor metalotioneiny skierowuje ekspresję do komórek wątroby, promotor globiny — do komórek erytroidalnych itp.

Konstrukcja składająca się z promotora genu mysiej metalotioneiny (mMT) i części kodujących genu hormonu wzrostu szczurów (rGH), przy wykorzystaniu której uzyskano po raz pierwszy słynne już „gigantyczne” myszy (9) była praktycznym dowodem, że dobranie odpowiedniej sekwencji regulatorowej do genu struktury może stworzyć możliwości niekonwencjonalnego uzyskiwania pożądanych produktów genowych. Słuszność tego założenia zwerifikowano już w wielu eksperymentach przeprowadzonych głównie na myszach. W zakresie inżynierii genetycznej organizmów eukariotycznych zapoczątkowano w ten sposób nowy nurt badań, którego celem jest wykorzystanie zwierząt gospodarskich jako tzw. „żywych bioreaktorów” do uzyskiwania metabolitów ważnych dla ludzi (10-16).

Przeszkodą w dotychczasowych badaniach nad tworzeniem „żywych bioreaktorów” jest mała efektywność transgenezy, a zatem wysokie koszty przeprowadzanych eksperymentów. Efektywność procesu integracji transgenu w genomie jest niska i nie przekracza 1%, a tylko w połowie przypadków zintegrowany transgen podlega ekspresji (transkrypcji) — (17).

Badania te zostały obecnie zaktywizowane w związku z postępowaniem prac nad tworzeniem konstrukcji genowych, umożliwiających poprawę ekspresji transgenu. Przyczyniły się do tego obserwacje nad mechanizmami regulacji ekspresji genów globin. W eksperymentach nad transfekowaniem komórek ludzkimi genami — α - i β -globiny wykazano, że wysoki poziom ekspresji genów osiągnąć można wtedy, kiedy są one połączone z odcinkiem o długości 20-kb położonym w kierunku 5' bezpośrednio obok genu ε -globiny (cyt za 1). Region ten znany obecnie jako LCR (*locus control region*) posiada cztery charakterystyczne miejsca superwrażliwe na działanie DNA-azy I. Dwa z nich są istotne dla funkcjonowania samych LCR, natomiast za maksymalny efekt odpowiedzialny jest cały region. Przyjmuje się, że obecność w obrębie LCR

miejsc superwrażliwych na działanie DNA-azy I świadczyć może, że wiążą się tu białka regulacyjne. W przeprowadzonych eksperymentach związanych z transgenezą istotne jest to, że obecność LCR w konstrukcji genowej wydawnie podwyższa ekspresję transgenu i to niezależnie od miejsca jego integracji w genomie. Wykorzystując LCR można zatem regulować ekspresję większej liczby genów położonych obok siebie.

W badaniach prowadzonych nad ekspresją genów globin człowieka, istotność obecności LCR potwierdzono poprzez obserwacje pacjentów z delecją tego regionu. W przypadkach tych nie występowała ekspresja genów globin, mimo że one same nie wykazywały wad strukturalnych. Wyniki tych badań odegrały dużą rolę w eksperymentach przeprowadzanych nad uzyskiwaniem zwierząt transgenicznych w ogóle, a w szczególności przyczyniły się do dużego postępu w zakresie uzyskiwania ludzkiej hemoglobiny w „bioreaktorach” zwierzęcych.

Początkowe eksperymenty prowadzono na myszach. W 1989 r. wykazano po raz pierwszy, że ludzkie geny — α - i β -globiny ulegają ekspresji w mysich tkankach krwiotwórczych (18,19) oraz udowodniono, iż można uzyskać zdolne do życia osobniki posiadające ludzkie oraz hybrydowe, „mysio/ludzkie” cząsteczki hemoglobiny (20). Wykazano ponadto, że dla prawidłowej regulacji ekspresji transgenu w czasie rozwoju ontogenetycznego zwierząt, istotne jest ułożenie (porządek) genów globin względem LCR (21,22). Na modelu transgenicznych myszy podjęto także obserwacje nad biologicznymi skutkami aberracji genów globin, w szczególności nad anemią sierpowatą u ludzi oraz jej hematologicznymi następstwami (23,24).

W biomedycznych analizach porównawczych stosowanych w medycynie ludzkiej, jednym z najczęściej wykorzystywanych gatunków jest świnia domowa (25). Istotne są tu m.in. podobieństwa anatomiczne (podobny kaliber ciała), zbliżony typ odżywiania (wszystkożerność), podobieństwa w zakresie fizjologii trawienia, bilansu energetycznego (np. termoregulacja) itd. W zakresie badań nad uzyskiwaniem ludzkiej hemoglobiny poprzez transgenezę zwierząt gospodarskich, świnia domowa jest dotychczas jedynym gatunkiem wykorzystywanym w tych eksperymentach.

Z ekonomicznego punktu widzenia związanego z uzyskiwaniem ludzkiej hemoglobiny, istotna jest wielopłodowość świń, szybka rotacja pokoleń u tego gatunku, a także duża masa ciała zwierzęcia, co umożliwia uzyskiwanie dużej ilości krwi. Generalnie, u ras białych rodzi się ok. 11 prosiąt w miocie (możliwe jest otrzymanie nawet trzech miotów w roku), które już po ok. 12 miesiącach można przeznaczać do rozrodu. Stosunkowo szybko można uzyskać zatem odpowiednio liczne stado podstawowe oraz populację gwarantującą ciągłość w otrzymywaniu większej ilości surowca do wytwarzania białka.

Transgeniczne świny we krwi których występowała ludzka hemoglobina, uzyskano po raz pierwszy w 1992 r. (26). Zastosowano pięć różnych konstrukcji genowych, jednak we wszystkich przypadkach zarejestrowano niekorzystne zjawisko polegające na dużych różnicach w ekspresji ludzkich genów globin. Gen α -globiny charakteryzował się wysoką ekspresją co kontrastowało z minimalną ekspresją genu β -globiny. Możliwości utworzenia wię-

kszej ilości funkcjonalnych cząsteczek H α H β były dlatego nieduże (H-łańcuchy ludzkie). Krzywa równowagi tlenowej „transgenicznej” hemoglobiny była taka sama jak dla hemoglobiny krwi człowieka, jednak nieduży był udział ludzkiej hemoglobiny (maksymalnie 9%) w ogólnej puli hemoglobiny transgenicznych świń. Z ekonomicznego punktu widzenia w produkcji metabolitu, zarejestrowany poziom był dalece niewystarczający. Oszacowano, że gdyby poziom „transgenicznej” hemoglobiny u świń osiągnął co najmniej 50%, zaistniałyby warunki opłacalności ekstrakcji białka na skalę techniczną.

Przy wykorzystaniu konstrukcji genowej nowej generacji, którą wprowadzono do genomu transgenicznych świń uzyskano istotny postęp w badaniach co unaocniło realność komercyjnej produkcji ludzkiej hemoglobiny w „świńskim bioreaktorze” (27). Wspomniana konstrukcja oznaczona kryptonimem „339” miała długość ok. 18,0 kpz. Zawierała omówiony już ludzki — β -LCR (6,5 kpz) zawierający cztery miejsca superwrażliwe na DNA-azę I, który połączony był z ludzkimi genami — α - i ϵ -globiny oraz z chimerowym (świnia-człowiek) genem β -globiny. Gen ϵ -globiny włączony był do konstrukcji w celu poprawy regulacji ekspresji genu β -globiny we wczesnych fazach rozwoju ontogenetycznego. W poprzednio przeprowadzonych eksperymentach wykazano bowiem, że wadliwa ekspresja genu β w okresie wczesnej embriogenezy jest bardzo szkodliwa dla płodu.

Chimerowy gen β zawierał promotor oraz region 5' UTR (*untranslated region*) świńskiego genu β -globiny (2,5 kpz) do którego przyłączony był segment (1,5 kpz) obejmujący trzy eksony, dwa introny oraz segment (2,0 kpz) końca 3' ludzkiego genu β -globiny. Konstrukcję „339” zastosowano do mikroiniekcji 1714 świńskich oocytów, które przeniesiono do macicy 50 biorecipientek. Uzyskano 23 mioty, liczące ogółem 145 prosiąt. Stwierdzono, że 8 prosiąt było pochodzenia transgenicznego (efektywność 5,3%). Ich waga przy urodzeniu wahała się w granicach 1-2 kg i była zbliżona do wagi nietransgenicznego rodzeństwa. Wystąpiła maksymalna dodatnia korelacja między integracją transgenu a jego ekspresją. Wszystkie osobniki u których nie wystąpiła ekspresja transgenu nie posiadały transgenu zintegrowanego w genomie. Natomiast integracja transgenu każdorazowo wiązała się z jego ekspresją.

U transgenicznych świń zarejestrowano obecność trzech rodzajów cząsteczek hemoglobiny. U wszystkich osobników występowała hemoglobina mieszana (hybrydowa), w której łańcuchy α pochodziły z globiny człowieka (H), natomiast łańcuchy β pochodziły z globiny świńskiej (P) — H α P β . Stwierdzić można zatem, że u wszystkich osobników gen ludzkiej α -globiny podlegał ekspresji. Ponadto zarejestrowano obecność hemoglobiny ludzkiej H α H β oraz hemoglobiny świńskiej P α P β . U żadnego osobnika nie zanotowano natomiast obecności cząsteczki składającej się z ludzkich łańcuchów β i świńskich łańcuchów α -globiny (H β P α). Trudno zinterpretować ten fakt. Być może jest to przypadek związany z niewielką liczbą zwierząt wykorzystanych do przeprowadzonych badań. Nie można także wykluczyć obecności głębszych przyczyn biologiczno-funkcjonalnych, związanych np. z tym, że struktura dimerów α/β w takiej cząsteczce była zasadniczo odmienna niż w cząsteczce normalnej, co powodowało jej dysfunkcję.

U wszystkich transgenicznych świń poziom hemoglobiny znajdował się na normalnym poziomie, w granicach normy fizjologicznej pozostawał hematokryt oraz liczba erytrocytów.

U siedmiu świń ludzka hemoglobina stanowiła od 5 do 24% całkowitego poziomu hemoglobiny obecnej w erytrocytach. Najkorzystniejsze natomiast proporcje zanotowano u świni nr 70-3. Hemoglobina ludzka (32g/l) stanowiła tu 24%, a hybrydowa tzn. „ludzko/świńska” (30 g/l) — 30%. Hemoglobina „transgeniczna” stanowiła zatem aż 54% ogólnej puli hemoglobiny obecnej w organizmie.

Od lochy nr 70-3 uzyskano 12 sztuk potomstwa z których 5 sztuk było transgenicznych. Wykazywały one taki sam poziom ekspresji ludzkiej hemoglobiny jaki notowany był u lochy nr 70-3. Transgen podlegał zatem dziedziczeniu według klasycznych reguł i nie wykazywał zmienności ekspresji często notowanej w innych eksperymentach. Z obserwacji procesów fizjologicznych organizmu najistotniejsze było to, że transgeniczna świnka posiadająca ponad 50% obcogatunkowej hemoglobiny była całkowicie zdrowa. Wysłunięto hipotezę, że skoro zrekombinowana (hybrydowa) cząsteczka hemoglobiny „świńsko/ludzkiej” jest przez organizm skutecznie wykorzystywana, możliwe jest całkowite zastąpienie u świń ich własnej hemoglobiny, hemoglobiną ludzką. Tylko z pozoru jest to mało prawdopodobne. Analizując bowiem dotychczasowe dokonania z zakresu transgenezy, uwzględniając szybkie postępy w tworzeniu udoskonalonych (i skuteczniejszych) konstrukcji genowych, a także biorąc pod uwagę szerokie możliwości związane z doбором i selekcją odpowiednich osobników — trudno odrzucić taką hipotezę.

4. Perspektywy zastosowania „transgenicznej” hemoglobiny jako leku krwiozastępczego

Smith uważa (28), że światowy rynek dla niekonwencjonalnych („transgenicznych”) produktów farmaceutycznych jest olbrzymi. Na przykład, wartość ludzkiej hemoglobiny oceniana jest na 10 miliardów USD rocznie. Szacuje się, że 100 tysięcy transgenicznych świń dostarczyłoby ludzkiej hemoglobiny o wartości 300 milionów USD.

Przytoczone w artykule wyniki eksperymentów dotyczących uzyskiwania poprzez transgenezę u świń ludzkiej hemoglobiny są optymistyczne. Przewidywane wielkie zapotrzebowanie na ten produkt sprawia, że w niedługim czasie (3-4 lata) może być on zaakceptowany i stać się jednym z pierwszych leczniczych preparatów stosowanych w medycynie ludzkiej, uzyskiwanym poprzez inżynierię genomu zwierząt gospodarskich (28). Dotychczasowe wyniki badań nad uzyskiwaniem ludzkiej hemoglobiny poprzez transgenezę u świń są niewątpliwie dużym sukcesem inżynierii genetycznej. Dla jego pełnego spożytkowania w medycznej praktyce klinicznej konieczne są jednak badania biochemiczno-medyczne w celu udowodnienia, że stosowanie takiego „transgenicznego” preparatu przynosi pozytywne efekty terapeutyczne, spełniając

jednocześnie naczelną normę lekarską — *primum non nocere* (przede wszystkim nie zaszkodzić).

Informacje na temat wyników, prowadzenia i postępu w badaniach dotyczących medycznych zastosowań produktów inżynierii genetycznej są obecnie fragmentaryczne. Nie jest to niczym zaskakującym, ponieważ danych tych strzegą konkurujące ze sobą firmy biotechnologiczne, ubiegające się o prawa patentowe dla własnych preparatów wprowadzanych na rynek.

O charakterze, kierunku, zaawansowaniu i (nie)powodzeniu eksperymentów nad zastosowaniem hemoglobiny w medycynie można wnioskować opierając się głównie na danych pośrednich. Wydaje się, że najistotniejszym elementem aktualnie prowadzonych prac jest wyeliminowanie skutków ubocznych aplikowania hemoglobiny oddzielonej od swego nośnika oraz zapewnienie dłuższego czasu utrzymywania się preparatu w organizmie. W pierwszych informacjach dotyczących wprowadzania do krążenia ludzkiej hemoglobiny uwolnionej z ludzkich erytrocytów wskazywano, że może się to wiązać z wieloma niekorzystnymi zjawiskami ubocznymi, z których najpoważniejszym było uszkodzenie nerek (cyt. za 8). Wykazano, że ludzka hemoglobina oddzielona od swego nośnika (erytrocytów) ma istotnie zwiększone powinowactwo do tlenu (wiąże tlen znacznie silniej niż w normalnych warunkach) i w związku z tym oddawanie tlenu w tkankach jest mało efektywne. Ponadto, cząsteczka hemoglobiny (w normalnych warunkach będąca tetramerem) po uwolnieniu z erytrocytów nie jest stabilna i dysocjuje na dwa jednakowe dimery ($\alpha\beta$), które są szybko usuwane z organizmu (29). Procesowi temu towarzyszy uszkodzenie nerek, którego przyczyny tkwią w tym, że preparaty wolnej hemoglobiny zawierają trudne do usunięcia składniki toksyczne, bądź toksyczne są same dimery hemoglobiny (8).

Generalnie uważa się, że rozwiązanie tych istotnych problemów nie nastąpi szybko, jednak będzie możliwe (29,8). Zakładając, że ludzka hemoglobina uzyskiwana z krwi transgenicznych świń będzie pełnowartościowym substytutem hemoglobiny ludzkiej, a także, że założenia związane z opłacalnością jej produkcji zostaną w pełni potwierdzone, wyłonić się mogą inne bariery stosowania preparatów „transgenicznych”. Przeszkody te można wiązać z kulturowo-wyznaniowym podejściem do transgenezy oraz z bardzo ostrymi kryteriami medyczno-sanitarnymi dotyczącymi pozajelitowego stosowania u ludzi preparatów pochodzenia zwierzęcego.

W niektórych społecznościach obowiązują specjalne reguły związane z tradycją utrwaloną poprzez zalecenia (nakazy) wpływające z wyznawanej przez nie religii. Zagadnienia te dyskutowane są m.in. przez Chaudry z Islamic Food and Nutrition Council of America oraz Regensteina z Cornell Kosher Food Initiative (30), na przykładzie produktów przeznaczonych do spożycia, uzyskiwanych metodami biotechnologicznymi.

Do zwierząt kategorycznie odrzuconych przez muzułmanów jako źródło pokarmowe zaliczona jest świnia, wszystkie pochodzące od niej produkty, a nawet wszystko to co ma jakikolwiek kontakt ze świnią. W islamie krew, w każdej postaci, bez względu od jakiego zwierzęcia pochodzi, określana jest arabskim terminem *Haram* i jest surowo zakazana. Również w judaistycznym

kręgu kulturowo-wyznaniowym obowiązują bardzo surowe zasady. Artykuły spożywcze podzielone są tu na cztery kategorie (*genders*). Spożywane mogą być tylko produkty koszerne (tzn. zgodne z przepisami o rytualnej czystości przedmiotów lub pokarmów). Proces uboju zwierzęcia oraz wszystkie dalsze etapy obróbki (solenie, peklowanie itd.) muszą być ukierunkowane na usunięcie krwi, której obecność w mięsie jest zabroniona. O wyjątkowo restrykcyjnym podejściu do tej zasady świadczyć może np. kurze jajo, które jeżeli zawiera nawet „małą plamkę krwi” (sytuacja dość często spotykana) to wówczas nie może być dopuszczone do spożycia.

Niekoszerny może być także sam proces wytwarzania. Zastrzeżenie to dotyczy, np. manipulacji genetycznych umożliwiających uzyskiwanie zwierząt transgenicznych.

Omawiane reguły są bardzo surowe i rozciągają się na znacznie szerszy obszar. Na przykład, nawet z pozoru nie budzące zastrzeżeń przedsięwzięcia nie mające nic wspólnego z transgenezą, a związane z wytwarzaniem drogą rozrodu płciowego krzyżówek międzygatunkowych (hybrydyzacją międzygatunkową), np. **U** osioł \times **T** koń (powstaje muł), czy niektóre szczepienia drzew są w judaizmie zabronione.

Uzględniając przytoczone przykłady, rodzić się mogą wątpliwości jak będzie potraktowana przez te społeczności ludzka hemoglobina uzyskiwana z krwi transgenicznych świń, a także czy w cytowanych już rynkowych kalkulacjach Smitha (28) bierze się pod uwagę fakt krytycznego podejścia islamu i judaizmu do tego zwierzęcia gospodarskiego oraz krwi i substancji (preparatów) krwiopochodnych. Społeczność żydowska i muzułmańska przy wszystkich swych przeciwnościach, sprzecznościach, a niekiedy nawet i wrogości, są wyjątkowo zgodne, krytycznie nastawione do niektórych przedsięwzięć biotechnologicznych. Dlatego Chaudry i Regenstein uważają (30), że pełne rynkowe urzeczywistnienie koncepcji biotechnologicznych nie będzie możliwe. Biorąc pod uwagę siłę rynkowego oddziaływania tych społeczności, określanych jako znaczące grupy konsumenckie, jak również ich wpływ opiniotwórczo-decyzyjny w wielu rejonach świata, wagę i potencjał kontrolowanego kapitału, występować mogą w różnych krajach istotne kontrowersje dotyczące prowadzenia (finansowania) badań z tej dziedziny. Mogą również powstać bariery przy wprowadzaniu na rynek niektórych produktów otrzymywanych przy zastosowaniu biotechnologii. Przykładem tego mogą być transgeniczne pomidory „Flavr Savr” o przedłużonej trwałości, do których obydwie społeczności są negatywnie nastawione i domagają się szybkiego wprowadzenia znakowania żywności pochodzącej z genetycznie modyfikowanych źródeł. Z punktu widzenia przeprowadzanych w Polsce badań nad modyfikacjami genomu zwierząt gospodarskich za pomocą metod inżynierii genetycznej zagrożenia te, jak się wydaje, nie są obecnie istotne. Nie osiągnięto jeszcze w Polsce stanu zaawansowania badań, które uzasadniałyby rozważanie problemów aplikacyjnych. Przytoczone przykłady możliwych kontrowersji dotyczących transgenezy należy jednak brać pod uwagę m.in. ze względu na procesy integracyjne zachodzące w Europie i na świecie, wymogi związane z wymianą międzynarodową, a także z uwagi na to, że transgeneza jako

metoda celowej modyfikacji genetycznej odnosi się w szerokim zakresie także do roślin, a nawet i do człowieka (np. terapia genowa u ludzi).

5. Podsumowanie

Z informacji przytoczonych w artykule wynika, że krew i jej składnik — hemoglobina, ogniskują w sobie różnorodne zagadnienia nie tylko genetyczno-medyczne, biotechnologiczne i ekonomiczne, lecz także wyznaniowo-kulturowe.

Krew jako duże interdyscyplinarne zagadnienie obecna jest w wielu dziedzinach życia, a historyczne określenie „płyn życia” nabiera dzięki temu realnego wymiaru. Ludzka hemoglobina pochodząca z krwi transgenicznych świń jest dowodem świadczącym o dużej randze naukowej i praktycznej badań z dziedziny inżynierii genetycznej. Dziedzina ta rozwija się szybko (m.in. w Polsce) także w zakresie problematyki weterynaryjno-zootechnicznej u zwierząt gospodarskich, gdzie wciąż poszukuje się nowych dróg i dyscyplin dla praktycznych zastosowań. Wydaje się, że nurty ukierunkowane na uzyskiwanie specyfików leczniczych dla ludzi i zwierząt mogą być zaakceptowane przez opinię publiczną, zostaną obiektywnie spopularyzowane (także w środowisku naukowym), i dzięki temu uzyskają przychyłność w finansowaniu badań, proporcjonalną do swej rangi.

Można wyrazić nadzieję, że już w bliskiej przyszłości „transgeniczna” hemoglobina będzie kolejnym przykładem świadczącym nie tylko o dużej skuteczności badań naukowych, lecz także argumentem przekonującym o konieczności i opłacalności podejmowania dużego wysiłku w związku z finansowaniem prac badawczych, mogących przynieść duże korzyści krajowej gospodarce.

Literatura

1. Weatherall D. J., Clegg J. B., Higgs D. R., Wood W. G., (1995), *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, Eds. Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D., McGraw-Hill, Inc., New York, 113, 3417-3484.
2. Sabliński J., (1997), informacja ustna.
3. Daniels G. L., Anstee D. J., Cartron J. P., Dahr W., Issitt P. D., Jorgensen J., Kornstad L., Levene C., Lomas-Francis C., Lubenko A., Mallory D., Moulds J. J., Okubo Y., Overbeeke M., Reid M. E., Rouger P., Seidl S., Sistonen P., Wendel S., Woodfield G., Zelinski T., (1995), *Vox Sanguinis*, 69, 265-279.
4. Grunnet N., Steffensen R., Bennett E. P., Clausen H., (1994), *Vox Sanguinis*, 67, 210-215.
5. Hessner M. J., McFerland J. G., Endean D. J., (1996), *Transfusion*, 36, 495-499.
6. Issitt P. D., (1996), *Vox Sanguinis*, 70 (suppl 3), 26-33.
7. Ogasawara K., Yabe R., Uchikawa M., Saitou N., Bannai M., Nakata K., Takenaka M., Fujisawa K., Ishikawa Y., Juji T., Tokunaga K., (1996), *Blood*, 88(7), 2732-2737.
8. Pool R., (1990), *Science*, 250, 1655-1656.
9. Palmiter R. D., Brinster R. L., Hammer R. E., Trumbauer M. E., Rosenfeld M. G., Brinberg N. C., Evans R. M., (1982), *Nature*, 300, 611-615.

10. Clark A. J., (1996), *American Journal of Clinical Nutrition*, 63, 633S-638S.
11. Colman A., (1996), *American Journal of Clinical Nutrition*, 63, 639S-645S.
12. Espanion von Gudrun, Nieman H., (1996), *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 103, 285-368, 8/9, (August/September).
13. Hennighausen V. L., (1994), *Züchtungskunde*, 66, (1), 14-22.
14. Houdebine L. M., (1994), *Journal of Biotechnology*, 34, 269-287.
15. Lee S. H., De Boer H., (1996), *9th World Holstein-Friesian Conference*, (10-13 September), Sapporo, 83-95.
16. Wong D. W. S., Camirand W. M., Pavlath A. E., (1996), *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36 (8), 807-844.
17. Wall R. J., (1996), *Theriogenology*, 45, 57-68.
18. Hanscombe O., Vidal M., Kaedea J., Luzatto L., Greaves D. R., Grosveld F., (1989), *Genes and Development*, 3, 1572-1581.
19. Magram J., Niederreith K., Constantini F., (1989), *Molecular and Cellular Biology*, 9, 4581-4584.
20. Behringer R. R., Ryan T. M., Reilly M. P., Asakura T., Palmiter R. D., Brinster R. L., Townes T. M., (1989), *Science*, 245, 971-973.
21. Hanscombe O., Whyatt D., Fraser P., Yannoutsos N., Greaves D., Dillon N., Grosveld F., (1991), *Genes and Development*, 5, 1387-1394.
22. Strouboulis J., Dillon N., Grosveld F., (1992), *Genes and Development*, 6, 1857-1864.
23. Fabry M. E., Nagel R. L., Pachnis A., Suzuka S. M., Constantini F., (1992), *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 89, 12150-12154.
24. Greaves D. R., Fraser P., Vidal M. A., Hedges M. J., Ropers D., Luzzatto L., Grosveld F., (1990), *Nature*, 343, 183-185.
25. Petters R. M., (1994), *Reproduction Fertility and Development*, 6, 643-645.
26. Swanson M. E., Martin M. J., O'Donnell K. J., Hoover K., Lago W., Huntress V., Parson C. T., Pinkert C. K., Pilder S., Logan J. S., (1992), *BioTechnology*, 10, 557-559.
27. Sharma A., Martin M. J., Okabe J. F., Truglio R. A., Dhanjal N. K., Logan J. S., Kumar R., (1994), *BioTechnology*, 12, 55-59.
28. Smith T. J., (1994), *Biotechnology Advances*, 12, 679-686.
29. Moffat A. S., (1991), *Science*, 253, 32-34.
30. Chaudry M. M., Regenstein J. M., (1994), *Trends in Food Science and Technology*, 5, 165-168.

Production of human hemoglobin from animals modified by genetic engineering

Summary

Medical and economic arguments for the investigation of methods of producing blood substitutes are presented. The paper presents the current state of investigations aimed at the production of human hemoglobin from animals modified by genetic engineering methods. Certain problems related to medicine and public perception are presented in connection with the use of „transgenic“ hemoglobin as blood substitute.

Swine is at present the only species among farm animals which is used in research on the production of human hemoglobin. Animals were obtained in which „transgenic“ hemoglobin accounted for 54% of the total hemoglobin in the organism. When human hemoglobin accounted for 24% of the total, and 30% was hybrid (human/swine), the animals were in perfect health, fit for reproduction and their progeny demonstrated the same transgene expression.

It is assumed that human hemoglobin, extracted from the blood of transgenic swine, will be the first commercial product used in medicine and obtained through transgenesis of domestic animals.

Key words:

hemoglobin, blood substitute, human, pig, transgenesis.

Adres do korespondencji:

Grzegorz Grzybowski, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Jastrzębiec, 05-551 Mroków.