

Received: 30.10.2017  
Accepted: 23.07.2018  
Published: 11.12.2018

## Świnia jako zwierzę modelowe w translacyjnych badaniach biomedycznych

### The pig as an animal model in biomedical research: A review

Natalia Dzięgiel<sup>1</sup>, Paulina Szczurek<sup>2</sup>, Jacek Jura<sup>1</sup>, Marek Pieszka<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji, Instytut Zootechniki PIB, Balice

<sup>2</sup>Zakład Fizjologii Żywnienia, Instytut Zootechniki PIB, Balice

#### Streszczenie

Postępy w translacyjnych badaniach biomedycznych oraz w dziedzinie inżynierii genetycznej, stworzyły nowe możliwości prześledzenia procesów chorobowych człowieka i opracowania skutecznych metod terapeutycznych. Medycyna wciąż jednak nie dysponuje odpowiednimi modelami zwierzęcymi, które pozwalałyby na precyzyjną ocenę skuteczności i bezpieczeństwa nowych leków lub koncepcji terapeutycznych. Gryzonie, najczęściej wykorzystywane jak dotąd w badaniach translacyjnych modele zwierzęce, ze względu na wiele różnic w ekspresji określonych chorób człowieka, są coraz częściej zastępowane przez bardziej adekwatny model świński. Dzięki anatomicznym i fizjologicznym podobieństwom świni i człowieka, to właśnie świnia jest uważana za najbardziej wartościowy model zwierzęcy wykorzystywany w badaniach przedklinicznych, w badaniach żywieniowych, metabolicznych czy w badaniach dotyczących chorób sercowo-naczyniowych człowieka. Podobieństwa te dotyczą budowy i funkcjonowania przewodu pokarmowego, układu sercowo-naczyniowego, moczowego, oddechowego, odpornościowego oraz mięśni szkieletowych. Ponadto, co istotne, narządy wewnętrzne świni mają podobny rozmiar i budowę. Preferencje żywieniowe człowieka i świni są takie same – wszystkożerność. O przydatności świni jako zwierzęcia modelowego stanowi również to, że cechuje się wysoką płodnością i plennością oraz jest tania i łatwa w utrzymaniu. Co więcej, dostępne obecnie techniki inżynierii genetycznej pozwalają na stosunkowo efektywne wyhodowanie odpowiednich modeli świńskich dla określonych chorób człowieka. Niemniej jednak, przy zastosowaniu modelu świńskiego do opracowania skutecznej terapii dla określonej choroby człowieka, w celu prawidłowej interpretacji wywołanych zmian toksykologicznych, należy pamiętać o istnieniu pewnych różnic w fizjologii człowieka i świni.

W artykule przedstawiono aktualne techniki genetycznej modyfikacji świń, umożliwiające wyhodowanie modeli świńskich, a także możliwości wykorzystania świń jako zwierząt modelowych w badaniach translacyjnych na przykładzie ksenotransplantacji, chorób metabolicznych, choroby naczyń wieńcowych serca, a także badań nad motoryką przewodu pokarmowego.

#### Słowa kluczowe:

świnia • modele zwierzęce • transgeneza • medycyna translacyjna

#### Summary

The advances in translational biomedical research, especially in genetic engineering, created new opportunities to trace the courses of human diseases and develop effective therapeutic methods. There remains, however, a growing demand for appropriate animal models for the precise evaluation of the efficacy and safety of new drugs or therapeutic concepts. Thus far,

rodent models have been most widely used in translational research; however, since they do not perfectly reflect the human disease phenotype, transgenic pigs are increasingly being utilized as animal models. Thanks to the anatomical and physiological similarities between pigs and humans, swine are considered to be one of the most valuable animal models used in preclinical studies, including nutritional, metabolic and cardiovascular research. The resemblances involve the gastrointestinal, cardiovascular, urinary, respiratory, skeletal muscle and immune systems, as well as body size, body composition and the omnivorous food choice. In addition, pigs are characterized by high fertility and fecundity, as well as the ease of use and low maintenance costs. Importantly, the existing efficient genetic engineering techniques enable relatively easy generation of tailored porcine models of human disease. One should be aware, however, of some physiological differences between humans and pigs to correctly interpret induced toxicological changes. The article provides an overview of current techniques for genetic modification of pigs, as well as the use of swine models in translational research exemplified by xenotransplantation, metabolic and coronary heart disease, and the gastrointestinal motility studies.

**Keywords:** pig • transgenesis • animal model • translational biomedical research

**GICID** 01.3001.0012.7815  
**DOI:** 10.5604/01.3001.0012.7815  
**Word count:** 4574  
**Tables:** 1  
**Figures:** –  
**References:** 79

**Adres autorki:** mgr inż. Natalia Dzięgiel, Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji, Instytut Zootechniki PIB, ul. Krakowska 1, 32-083 Balice, e-mail: natalia.dziegiel@izoo.krakow.pl

## WSTĘP

Postęp w badaniach biologicznych, a przede wszystkim w inżynierii genetycznej, która umożliwiła dzisiaj dowolne modyfikowanie DNA czy RNA oraz badanie wielu procesów zachodzących w komórkach na poziomie molekularnym i submolekularnym spowodowała, że współczesna medycyna może dogłębnie i precyzyjnie prześledzić procesy chorobowe oraz opracować skuteczne postępowanie terapeutyczne.

Do opracowania bezpiecznych protokołów przedklinicznych w badaniach biomedycznych ukierunkowanych na człowieka, istotnym jest dysponowanie odpowiednimi modelami zwierzęcymi. Takimi, które w sposób najbardziej obiektywny, umożliwiłyby weryfikację oraz uzyskanie nowych, adekwatnych dla ludzkiego organizmu informacji badawczych. Takich, które pozwoliłyby zwerifikować te uzyskiwane na najbardziej rozpowszechnionym modelu zwierzęcym jakim są gryzonie – mysz i szczur, czy wykorzystywane w badaniach dotyczących układu ruchu oraz rozrodu - owca i królik.

Świnia zajmuje szczególne miejsce jako zwierzę modelowe w badaniach biomedycznych. Wiąże się to przede wszystkim z tym, że genom świni domowej jest prawie w 94% zbieżny z genomem człowieka. Po poznaniu genomu świni, okazało się, że świnie podobnie jak człowiek, mają identyczne zaburzenia i dysfunkcje bio-

łek, które wywołują w ten sam sposób takie choroby jak otyłość, choroba Parkinsona czy Alzheimer. Ponadto, narządy wewnętrzne świni podobnie funkcjonują i są podobnie zbudowane jak analogiczne narządy człowieka. W związku z tym, narządy świni najlepiej spełniają kryteria przydatności do ksenotransplantacji. Wielkość narządów, ich wydolność fizjologiczna jest niemal identyczna z ludzkimi. Ponadto, za przydatnością świni jako zwierzęcia modelowego w badaniach biomedycznych przemawia również i to, że świnia jest gatunkiem o dużej plenności i płodności, tanim i łatwym w utrzymaniu. Ponadto jest gatunkiem, u którego, w porównaniu do innych dużych zwierząt dosyć łatwo można przeprowadzić modyfikacje genowe, tzn. można spowodować wyłączenie lub dodanie określonej informacji genetycznej.

## PODSTAWY WYKORZYSTANIA ŚWIŃ W BADANIACH BIOMEDYCZNYCH

Nieocenioną rolę w poznawaniu mechanizmów chorób, testowaniu nowych leków i metod leczenia oraz ich wpływu na organizm człowieka, także pod względem toksykologicznym, odgrywają zwierzęta doświadczalne. Nie tylko sam układ doświadczania, ale i wybór odpowiednich do niego zwierząt może zaważyć na jego wyniku i prawidłowej ocenie uzyskanych rezultatów. Z tego powodu, w badaniach medycznych poszukuje się modeli zwierzęcych, które zapewniłyby jak najlepsze odwzorowanie procesów zachodzących w ludzkim organizmie.

W ostatnich latach wzrasta znaczenie dużych zwierząt jako modeli doświadczalnych. Udowodniono, że wykorzystanie myszy jako zwierząt modelowych do badań nad chorobami, takimi jak mukowiscydoza, zespół Lescha-Nyhana czy choroba Huntingtona może powodować uzyskanie wyników, które nie są adekwatne i porównywalne, ze względu na różnice w rozmiarach ciała czy fizjologii [70]. Świnie pod wieloma względami są dużo lepszymi zwierzętami modelowymi niż najczęściej wykorzystywane w badaniach modelowych gryzoni. Budowa anatomiczna i fizjologia narządów świni charakteryzuje się wieloma podobieństwami do analogicznych narządów człowieka. Ponadto, świnie żyją znacznie dłużej niż gryzoni. Rozmiary organów świni pozwalają na pobranie większej liczby próbek oraz wykonywanie bardziej skomplikowanych zabiegów niż na narządach myszy czy szczurów [23]. Dostępność licznych ras świni o zróżnicowanych parametrach użytkowych, różnych fenotypach pozwala, tak jak w przypadku licznych szczepów myszy czy szczurów, na odpowiednie dobranie zwierząt doświadczalnych do badanych czynników. Za wykorzystaniem świni w badaniach medycznych przemawiają również takie aspekty jak ich płodność i plenność, krótki odstęp między pokoleniami, brak sezonowości w rozrodzie, wczesna dojrzałość płciowa, dzięki którym możliwe jest uzyskanie ustandaryzowanych grup badawczych. Cechy fizjologiczne i genetyczne świni pozwalają na właściwe odwzorowanie procesów zachodzących w ludzkim organizmie [41, 68].

Narządy świni mają homologiczną wielkość do organów człowieka. Szczególne podobieństwa występują w budowie i funkcjonowaniu układu krążenia, pokarmowego oraz trzustki, co czyni świnie znakomitymi zwierzętami modelowymi do badań nad schorzeniami tych układów i narządów u ludzi. Występują natomiast różnice w budowie układu limfatycznego [67]. Natomiast układ sercowo-naczyniowy świni wykazuje wiele podobieństw do ludzkiego. Dotyczą one anatomii serca, czy trójwarstwowej budowy płata zastawki. Podobne są również reakcje na uszkodzenie naczyń wieńcowych. Wymienione podobieństwa, pozwalają zatem na wykorzystanie świni jako zwierząt modelowych w badaniach chorób kardiologicznych człowieka. Świnie są także lepszymi od gryzoni modelami w badaniach związanych z przyczynami powstawania otyłości, ponieważ prawie nie mają brunatnej tkanki tłuszczowej, a sposób otłuszczenia przebiega podobnie jak u człowieka [20]. Także budowa mózgu, jego wielkość i struktura warstwy korowej, aktywność elektryczna i rozwój są podobne do mózgu ludzkiego, w przeciwieństwie do mózgu gryzoni. W związku z tym, mózg świni jest dużo lepszym modelem do badania etiologii chorób neurologicznych niż mózg gryzoni [4]. Odpowiedź immunologiczna w trakcie infekcji jest u świni dużo bardziej podobna do ludzkiej, niż u gryzoni. Umożliwia to lepsze poznanie przebiegu chorób o podłożu bakteryjnym, wirusowym czy pasożytniczym [55]. Dla badań nad przebiegiem infekcji korzystne są także parametry leukocytów u świni, które dużo bardziej niż u myszy, przypominają ludzkie. Podobna do ludzkiej jest także budowa skóry

oraz nerek świni [8]. Poznanie genomów człowieka i świni oraz stosunkowa mała odległość genetyczna między obydwoma gatunkami umożliwia prowadzenie na modelu świńskim badań nad wpływem i regulacją ekspresji genów [7, 17]. Dużą zaletą świni jako zwierząt modelowych do badań biomedycznych jest także podobny do ludzkiego metabolizm i szlaki przemian w komórkach. Dzięki tym cechom badania prowadzone na świnich umożliwiają szersze ujęcie badanych aspektów, które mogą obejmować kilka tkanek czy narządów jednocześnie, dostarczając obszernych danych na temat zmian metabolicznych, translacyjnych czy progresji zmian w całym organizmie. Podobieństwa wielu układów, a także procesów na poziomie komórkowym umożliwiają wykorzystywanie świni jako modeli do badania chorób metabolicznych, czy otyłości, które współcześnie są zakwalifikowane do chorób cywilizacyjnych [34]. Badania prowadzone na świnich pozwoliły lepiej poznać funkcję komórek mezenchymalnych, procesy różnicowania się komórek i zjawisko pluripotencji, wywierając w ten sposób duży wpływ na rozwój medycyny regeneracyjnej [31, 43]. Podstawowe podobieństwa w biologii człowieka i świni ujęto w tabeli 1.

#### **METODY UZYSKIWANIA ŚWINI TRANSGENICZNYCH**

Poza licznymi podobieństwami między anatomią i fizjologią świni i człowieka, za wykorzystaniem świni w badaniach biomedycznych przemawia także opracowanie metod sterowania rozrodem tego gatunku oraz możliwości genetycznych modyfikacji świni. Zsekwencjonowanie genomu świni stało się kolejnym, uzupełniającym narzędziem w procesie uzyskiwania świni transgenicznych. Z dotychczas wykorzystywanych metod produkowania świni transgenicznych, najstarszą jest mikroiniekcja DNA do przedjądra zygoty. Metoda umożliwia uzyskiwanie zwierząt z ekspresją określonego genu. Pozwala także na wprowadzenie do genomu stosunkowo długich odcinków DNA w postaci konstruktów genowych [66]. Pierwsze, genetycznie zmodyfikowane świnie (świnie transgeniczne) uzyskano w 1985 r., stosując metodę mikroiniekcji DNA [24]. Od tego czasu metody uzyskiwania/produkcji transgenicznych świni są stale rozwijane. Metoda produkowania transgenicznych świni z wykorzystaniem linii zarodkowych komórek macierzystych (ZKM), efektywna i szeroko wykorzystywana w przypadku myszy, nie jest stosowana u świni, ponieważ nie wytworzono jeszcze stabilnych linii takich komórek świni [15]. Inną metodą stosowaną do produkowania świni transgenicznych jest klonowanie z wykorzystaniem jąder komórek somatycznych (SCNT). Klonowanie somatyczne, które stało się jednym z najdonioślejszych osiągnięć embriologii eksperymentalnej z końca XX w., ma jednak wiele ograniczeń. Okazało się, że procedury stosowane w tej technologii wywołują daleko idące zmiany w funkcjonowaniu kodu epigenetycznego, co przekłada się na niską efektywność procesu [12]. Aby uniknąć problemów związanych ze złożonością procesu klonowania, jak również w celu podniesienia jego efektywności, w 2002 r. opracowano technologię „hand made cloning – HMC”, która eliminuje wiele złożonych manipulacji. Technologia ta została

**Tabela 1.** Porównanie wybranych cech anatomicznych i fizjologicznych u człowieka, świni i szczura

	Świnia			
	Człowiek	Domowa	Miniaturowa	Szczur
Koszt zakupu i utrzymania	-	Wysoki	Bardzo wysoki	Niski
Dojrzałość płciowa (samce /samice)	13-16 lat/11-14 lat	5-18 miesięcy /6 miesięcy	140-170 dni	6 tygodni
Średnia długość życia	70 lat	25 lat (w środowisku naturalnym)	-	1-3 lata
Czas trwania ciąży	38 tygodni	115 dni	114 dni	21 dni
Maksymalna liczba miotów na rok	1	2,3	2,3	6-8
Liczba potomstwa na miot	1-2	8-12	5-6	10-12
Masa ciała dorosłego osobnika (kg)	70	60-280	30	0,25-0,40
Możliwość wielokrotnego pobrania materiału biologicznego	tak	tak	tak	nie
Konieczność łączenia materiału biologicznego	nie	nie	nie	tak
Wszystkożerność	tak	tak	tak	tak
Możliwość wykorzystania standardowych technologii medycznych	tak	tak	tak	nie
Wielkość narządów wewnętrznych	-	podobnie jak u człowieka	podobnie jak u człowieka	brak podobieństwa z człowiekiem

Na podstawie [57]

z powodzeniem wykorzystana do uzyskania transgenicznych świń modelowych z ekspresją genów odpowiedzialnych u człowieka za choroby Parkinsona, Alzheimer'a, łuszczycy, arteriosklerozy czy cukrzycy [63]. Do uzyskania transgenicznych świń na potrzeby badań biomedycznych, zastosowano również technologię, w której nośnikami określonej modyfikacji genetycznej są opłaszczony DNA plemniki, wprowadzane do cytoplazmy oocyty metodą ICSI – docytoplazmatyczna iniekcja plemnika (intracytoplasmic sperm injection) [41]. Najnowsze metody uzyskiwania transgenicznych świń z ekspresją określonego genu (transgenu), warunkową ekspresją lub knock-in/knock-out genetycznym, wykorzystują technologie, takie jak: zinc finger nuclease (ZFN), transcription activator-like effector nucleases (TALEN) oraz najnowszą technologię CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9) [78]. Dzięki ich zastosowaniu uzyskano już pierwsze transgeniczne świny. Technologie te charakteryzują się bardzo dużą skutecznością, co pozwala sądzić, że ich stosowanie znacząco wpłynie na efektywność procesu produkowania świń genetycznie zmodyfikowanych na potrzeby badań biomedycznych [28, 71].

### **LINIE ŚWIŃ TRANSGENICZNYCH DLA BADAŃ BIOMEDYCZNYCH - POSTĘP I PERSPEKTYWY**

Z użyciem powyższych metod wytworzono linie świń transgenicznych, które mogą być wykorzystywane w badaniach dotyczących zarówno etiologii procesów chorobotwórczych, jak i do opracowania skutecznych metod terapeutycznych. Wykorzystywanie świń transgenicznych jako modeli chorób ludzkich, umożli-

wia obserwację przebiegu choroby i ocenę skuteczności potencjalnych terapii na przykładzie organizmu charakteryzującego się licznymi podobieństwami w budowie anatomicznej oraz fizjologii w odniesieniu do organizmu człowieka. Dzięki modyfikacjom genetycznym możliwe jest także uzyskanie zwierząt z podobnym przebiegiem choroby, co poprawia standaryzację, często trudniejszą u zwierząt modelowych indukowanych za pomocą podawania określonych substancji chemicznych. Udowodniono jednoznacznie, że przebieg niektórych chorób człowieka odwzorowanych i badanych na modelu świńskim dużo lepiej odzwierciedla jej przebieg i skutki, w porównaniu do modelu mysiego [1]. Stąd też, uzyskano już m.in. transgeniczne świny będące zwierzęcymi modelami chorób układu naczyniowego - miażdżycy [46], mukowiscydozy, chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimer'a, płasawica Huntingtonga, stwardnienie zanikowe boczne, zespół AT, a także dystrofii mięśniowej Duchenne'a [25, 49]. W oparciu o udowodnione podobieństwa w odpowiedzi immunologicznej u człowieka i świni uzyskano transgeniczne świny modelowe do badań nad zespołem SCID (severe combined immunodeficiency disease) oraz stanem zapalnym skóry [30, 59]. Wiele podobieństw pod względem fizjologii i metabolizmu sprawia, że genetycznie zmodyfikowane świny są dobrymi modelami do badań chorób o podłożu metabolicznym, w tym dla cukrzycy. Uzyskane modele świńskie umożliwiają, przede wszystkim obserwację spowodowanych przez cukrzycę nefropatii, retino- i neuropatii. Uzyskano również linie świń GIPRdn będące efektywnym modelem cukrzycy typu 2, z mutacją genu insuliny *INSC94Y*, czy modyfikacją genu

*HNF1A* prowadzącą m.in. do retinopatii, mającej podłoże w cukrzycy [50, 62, 74].

Wykorzystanie wielu podobieństw między organizmami świni i człowieka było podstawą do uzyskania linii świń transgenicznych - modeli chorób nowotworowych. Choroby nowotworowe są zróżnicowaną i szeroką grupą. Wykorzystanie świni jako zwierzęcia modelowego sprawia, że możliwe jest obserwowanie progresji choroby z wykorzystaniem licznych próbek i badanie wielu układów jednocześnie. Badania nad procesem kancerogenezy prowadzono dotychczas głównie z wykorzystaniem myszy. Udowodniono jednak, że myszy mogą wytwarzać nowotwory głównie o podłożu mezenchymalnym, w przeciwieństwie do dominujących u ludzi nowotworów nabłonkowych związanych z procesem starzenia się. Wykorzystanie dużego zwierzęcia modelowego, jakim jest świnia, umożliwia także zastosowanie w czasie prowadzonych badań, takich narzędzi diagnostycznych jak tomografia komputerowa czy rezonans magnetyczny, co często jest niemożliwe u znacznie mniejszych gryzoni [69]. Informacje uzyskane po zsekwencjonowaniu genomu świni oraz potwierdzona skuteczność technologii Cre-LoxP (site-specific recombinase technology) umożliwiającej wprowadzanie w genomie zwierzęcia modelowego insercji, delecji, translokacji czy inwersji określonego genu oraz technologii CRISPR-Cas9, stwarzają obecnie możliwość szybkiego uzyskania różnych linii transgenicznych świń jako modeli chorób nowotworowych [53].

Wykorzystanie genetycznie zmodyfikowanych świń jako modeli do poznania etiologii określonych chorób człowieka nie jest jedynym kierunkiem wykorzystania tego gatunku w badaniach biomedycznych. Coraz częściej, dla potrzeb medycznych, tworzy się modele świńskie, u których wywołuje się ekspresję ogólnoustrojową lub ukierunkowaną na określony narząd czy tkankę, genów kodujących białka fluorescencyjne. Takie transgeniczne świni są doskonałymi modelami, które umożliwiają obrazowanie wybranych procesów w komórkach. Są również niezastąpionym modelem w badaniach, których celem jest testowanie nowych metod przeprowadzania zabiegów chirurgicznych, narzędzi czy endoprotez chirurgicznych [57, 61, 65].

Innym kierunkiem transgenezy świń, jest wykorzystanie ich jako żywe bioreaktory. Wytwarzane przez nie białka o znaczeniu terapeutycznym, mogą być izolowane z płynów ustrojowych czy mleka i wykorzystywane w farmakologii. Transgeniczne świni jako żywe bioreaktory charakteryzują się dużą efektywnością w produkowaniu określonych, zmodyfikowanych białek. Jako ssaki, oferują najwyższą jakość potranslacyjnych modyfikacji otrzymywanych produktów [73]. Dotychczas uzyskano już liczne linie świń transgenicznych, które produkują w mleku m.in.: ludzkie czynniki krzepnięcia krwi VIII i IX, białko C, erytropoetynę, czy czynnik von Willebranda [37, 47]. Świńskie żywe bioreaktory umożliwiają, na dużo większą skalę produkcję białek o znaczeniu tera-

peutycznym w porównaniu do innych znanych systemów uzyskiwania białek zrekombinowanych.

## TRANSGENICZNE ŚWINIE I KSENOTRANSPLANTACJA

Termin ksenotransplantacja u człowieka oznacza zabieg przeszczepienia tkanki lub narządu od dawcy, którym jest zwierzę. W ostatnim czasie dużo uwagi poświęca się możliwości wykorzystania do ksenotransplantacji serca pochodzącego od genetycznie zmodyfikowanych świń (świni ze zmodyfikowanym układem immunologicznym). Z przeprowadzonych do tej pory badań wynika, że świnia domowa, a nie jak sądzono początkowo najbliższej z człowiekiem spokrewnione mały naczelne, najlepiej spełnia kryteria przydatności organów do ksenotransplantacji. Uzyskanie transgenicznych świń, których tkanki lub organy mogłyby być przeszczepiane ludziom, byłoby rozwiązaniem problemu niedostatecznej dostępności ludzkich organów przydatnych do transplantacji. Użycie tkanek czy narządów świni do przeszczepu ludziom musi jednak być poprzedzone zniesieniem barier związanych z różnicą filogenetyczną tych dwóch gatunków. Podstawową przeszkodą jest reakcja nadostrego odrzucenia przeszczepu, która może się pojawić już po kilkunastu minutach od wykonania przeszczepu. Obecnie prowadzi się badania nad modyfikacją genetyczną świni w taki sposób, by jej serce i inne narządy były pokryte na powierzchni ludzkimi białkami i dzięki temu nie wywoływały odpowiedzi immunologicznej po przeszczepieniu człowiekowi. Przypuszcza się, że tak zmodyfikowane organy świni nie byłyby rozpoznawane przez układ odpornościowy pacjenta jako obce, a wszczepiony narząd mógłby funkcjonować do czasu znalezienia stosownego narządu ludzkiego lub do uzyskania go z hodowli pozaustrojowej w oparciu o komórki macierzyste pobrane od pacjenta. Alternatywnym podejściem byłoby uzyskanie odpowiedniego organu w procesie organicznego druku 3D. Pierwsza genetycznie zmodyfikowana świnia wyhodowana na potrzeby ksenotransplantacji urodziła się w 1992 r. i nazwano ją Astrid.

Aby zapobiec reakcji nadostrego odrzucenia przeszczepu niezbędne są modyfikacje zmierzające do wyeliminowania występującego u świni genu  $\alpha$ -1,3-galaktozylotransferazy oraz wprowadzenie do genomu świni genów odpowiedzialnych za ekspresję ludzkiego układu dopełniacza. Następnym krokiem jest wyeliminowanie reakcji ostrego i przewlekłego odrzucenia przeszczepu, które wiążą się z procesami krzepliwości krwi. Udowodniono, że obecność genów ograniczających reakcje ostrego i przewlekłego odrzutu przeszczepu znacząco przedłuża okres funkcjonowania ksenoorganu po przeszczepie [45]. Wykorzystanie nowych narzędzi w transgenezie, takich jak ZFN, TALEN, czy CRISPR/Cas9 stwarza duże nadzieje na przyspieszenie prac nad ksenotransplantacją. Uzyskane do tej pory rezultaty w badaniach nad ksenotransplantacją, takie jak utrzymanie funkcjonującego prawidłowo serca od zmodyfikowanej genetycznie świni w organizmie pawiana przez ponad dwa lata od zabiegu transplantacji, wskazują na ogromny postęp

jaki dokonał się w tej dziedzinie. Przeprowadzone jednocześnie badania wykazały, że ograniczenie trombotycopenii i leukopenii po przeszczepie, pozwoliłoby na znaczne wydłużenie funkcjonowania przeszczepianych organów pozyskiwanych od genetycznie zmodyfikowanych świń [35].

Prace nad uzyskiwaniem transgenicznych świń pod kątem wykorzystania ich organów do ksenotransplantacji, muszą być uzupełnione o badania związane z zagrożeniem transmisji występujących u świni endogennych retrovirusów – PERV (porcine endogenous retrovirus). W związku z tym, utrzymywanie stad świń transgenicznych na potrzeby ksenotransplantacji musi być prowadzone z zachowaniem surowych reguł dotyczących sterylności i stałego monitorowania stada pod kątem patogenów. Takie postępowanie znacznie ogranicza ryzyko transmisji patogenów do organizmu biorcy, co w przypadku przeszczepu organu pochodzącego od ludzkiego dawcy, gdy często ze względu na bardzo ograniczony czas od chwili pobrania do transplantacji, wykonanie badań pod kątem niektórych mikroorganizmów jest niemożliwe [13, 30].

Biorąc pod uwagę złożoność ludzkiego układu zgodności tkankowej oraz różnice i odmienności układów u człowieka i świni, uzyskanie genetycznie zmodyfikowanych świń, których narządy będą w pełni spełniać kryteria przydatności do ksenotransplantacji, będzie wymagało jeszcze wielu lat pracy.

### **ŚWINIE W BADANIACH NAD CUKRZYCĄ I ZESPOŁEM METABOLICZNYM**

Jedną z wielu chorób człowieka, które zyskały status „chorób cywilizacyjnych” jest cukrzyca i często powiązany z nią zespół metaboliczny. Z najnowszych danych WHO wynika, że od 1980 r. dwukrotnie wzrosła liczba zarejestrowanych przypadków występowania nadwagi u ludzi (422 mln osób na całym świecie) jednego z głównych czynników prowadzących do cukrzycy typu 2 [75].

Z tego względu, stworzenie odpowiedniego modelu zwierzęcego, który będzie naśladować patofizjologię i przebieg cukrzycy u człowieka, umożliwiając testowanie nowych metod leczniczych, staje się obecnie koniecznością. Opracowane wiele lat temu modele cukrzycy w oparciu o myszy czy szczury [26], nie spełniają wymogów współczesnej medycyny.

Ze względu na anatomiczne podobieństwa trzustek świni i człowieka przejawiające się podobną wielkością, umiejscowieniem, kształtem, unaczynieniem, czy rozmieszczeniem i typem komórek endokrynych [74], a także podobieństwo w metabolizmie glukozy, model świński wydaje się najbardziej odpowiedni. Ponadto, zarówno u człowieka jak i świni spadek masy komórek  $\beta$  trzustki zmniejsza wydzielanie insuliny i upośledza tolerancję glukozy [11, 51]. Ponadto, insulina czy hormony inkretynowe odpowiedzialne za poposiłkowe

wydzielanie insuliny, takie jak zależny od glukozy peptyd insulinotropowy (GIP) czy glukagonopodobny peptyd-1 (GLP-1) są niemal identyczne u człowieka i świni w sekwencji aminokwasowej i budowie chemicznej [74]. Podobieństwa fizjologiczne w obrębie układu sercowo-naczyniowego, metabolizmu lipoprotein, preferencji żywieniowych czy predyspozycji do rozwoju miażdżycy i retinopatii sprawiają, że świński model do badań cukrzycy może dostarczyć wielu istotnych informacji na temat jej patofizjologii [10]. Jedyną niedogodnością modelu świńskiego w badaniach nad cukrzycą jest to, że świni przystosowały się w wyniku ewolucji do gromadzenia dużych zapasów energii w okresie letnim, które mogą następnie wykorzystać w okresie zimowym [19]. Naturalna zdolność do regulacji anaboliczno-lipogennej u świń, została dodatkowo wzmocniona przez udomowienie świń i ich selektywną hodowlę w kierunku zwiększonego kumulowania tkanki tłuszczowej. W rezultacie komórki trzustkowe świni są odporne na różnego rodzaju czynniki diabetogenne, takie jak: dieta wysokokaloryczna, dieta wywołująca procesy miażdżycowe czy mała aktywność fizyczna. Dlatego też cukrzyca jest chorobą niezwykle rzadko występującą naturalnie u świń [33]. Aby uzyskać odpowiedni model cukrzycy u świni, konieczna jest jego indukcja, czyli eksperymentalne zainicjowanie choroby. Najczęściej wywołuje się ją przez zastosowanie odpowiedniej diety, farmakologicznie lub chirurgicznie. Aby jak najlepiej odwzorować przebieg naturalnego rozwoju cukrzycy typu 2 człowieka, świnię utrzymuje się na wysokokalorycznej diecie, bogatej w niezdrowe tłuszcze, przy bardzo ograniczonej aktywności fizycznej [33]. Mimo takiego postępowania nie zawsze udaje się wywołać cukrzycę typu 2 u świń. Czasami pierwsze symptomy mogą się pojawić dopiero po 2 latach. Niemniej jednak, mimo wspomnianych trudności, udało się opracować świński model łagodnej cukrzycy przez zastosowanie diety wzbogaconej w sacharozę (37%) i smalec (10%) [76]. Po 6 miesiącach stosowania takiej diety u zwierząt modelowych, zaobserwowano wzrost stężenia glukozy na czczo w krwi powyżej 130 mg/dL, przy czym poziom insuliny pozostawał bez zmian. Oprócz spadku wrażliwości na insulinę, stwierdzono także zmiany w profilu lipidowym, charakterystycznym dla zmian miażdżycowych, a także wzrost zawartości tkanki tłuszczowej w organizmie. Model ten został m.in. wykorzystany w badaniach nad nowym lekiem zapobiegającym miażdżycy naczyń krwionośnych. Jest syntetycznym aktywatorem lipazy lipoproteinowej (N0-1886) [77].

Wyniki przedstawionych badań są niewątpliwie ważne, lecz wskazują raczej na wystąpienie stanu przedcukrzycowego. Stosowanie diety wysokokalorycznej z dużą zawartością cukrów rafinowanych i niezdrowych tłuszczów u świń prowadzi do rozwoju zespołu metabolicznego (ZM), w tym otyłości trzewnej, uważanej za jedną z najgroźniejszych postaci otyłości, także dla człowieka, nietolerancji glukozy, odporności insulinowej, przewlekłego stanu zapalnego, zaburzenia czynności nerek czy miażdżycy tętnic [21]. U człowieka, zanim dojdzie do

rozwoju cukrzycy typu 2 i jawnej hiperglikemii, często obserwuje się trwający nawet wiele lat ZM. Częstość występowania ZM wzrasta w niepokojącym tempie dotykając obecnie około 20-30% populacji ludzkiej. Dotyczy to również Polski. Spowodowane jest to przede wszystkim siedzącym trybem życia, niewłaściwym odżywianiem oraz starzeniem się społeczeństwa [27].

Świński model ZM jest dużo lepszy niż model oparty na gryzoniach, z tego względu, że u gryzoni bardzo rzadko stwierdza się jednocześnie występowanie trzech lub więcej typowych objawów klinicznych ZM, podczas gdy u człowieka i świni jest to zjawisko powszechne [39]. U świń podobnie jak u ludzi, nowo narodzone osobniki są pozbawione brązowej tkanki tłuszczowej, co odgrywa kluczową rolę w regulacji równowagi energetycznej, a także ich depozyty tłuszczowe są na tyle duże, że umożliwiają bezproblemowe przeprowadzenie wielu testów i analiz, a to powoduje, że właśnie świnię są bardzo dobrym modelem w badaniach metabolizmu i otyłości [59].

Świnie rasy Ossabaw karmione paszą o zwiększonej zawartości kalorycznej, charakteryzują się najwyższym poziomem tłuszczu w organizmie wśród wszystkich ssaków, a więc stanowią doskonały model chorobliwej otyłości [59]. Ponadto, świnię Ossabaw karmione przez 9 tygodni paszą składającą się w 45% z tłuszczu, rozwijają aż 5 klinicznych objawów ZM, w tym otyłość brzuszna, oporność insulinową, dyslipidemię, nadciśnienie tętnicze oraz chorobę wieńcową [14].

Inną rasą świń, niezwykle przydatną do badań nad ZM, cukrzycą i otyłością, są świnię iberyjskie. Rasa ta charakteryzuje się podatnością do gromadzenia dużej ilości tłuszczu podskórnego [62]. Wynika to z występowania u tej rasy polimorfizmu genu receptora leptyny. Powoduje to, że świnię tej rasy mają zaburzoną regulację ilości pobierania pokarmu, co wywołuje u nich stan otyłości. U ludzi stan ten określany jest mianem oporności leptynowej. Badania przeprowadzone wśród tej rasy świń wykazały, że zwiększenie w ich diecie zawartości tłuszczu o 5% spowodowało istotny wzrost poziomu tkanki tłuszczowej, wzrost ciśnienia tętniczego, a także stężenia trójglicerydów, cholesterolu, LDL i insuliny we krwi i w efekcie rozwój zespołu metabolicznego (ZM) [62].

Także u świń miniaturowych rasy Göttingen po zastosowaniu diety wysokotłuszczowej udało się uzyskać model ZM, cechujący się podwyższonym stężeniem glukozy we krwi i insuliny na czczo. [36]. Model ten wykorzystano do badań aplikacyjnych nad nowym lekiem o nazwie NN2211, będącym pochodną GLP-1 w hiperglikemii [52]. Świnię miniaturowe zostały również wykorzystane do opracowania dziecięcego modelu otyłości i oporności na insulinę oraz określenia mechanizmów odpowiedzialnych za ich rozwój [54]. Model opracowano stosując u świń miniaturowych w wieku 4 miesięcy nadmierną podaż kalorii (1,5 razy ponad rekomendowaną wartość) i dietę bogatą w tłuszcze nasycone i węglowo-

dany o wysokim indeksie glikemicznym. Wykazano, że u osobników przed osiągnięciem dojrzałości płciowej, zastosowana dieta powoduje upośledzenie metabolizmu glukozy i oporność insulinową, angażując odmienne szlaki regulacyjne niż u osobników dorosłych.

Badania przeprowadzone na kulturach adipocytów ludzkich i świńskich wykazały, że funkcja endokrynną tkanki tłuszczowej u świń, na wielu poziomach przypomina endokrynną funkcjonowanie tkanki tłuszczowej człowieka. Zwłaszcza w obrębie sekrecji leptyny, czy aktywacji wielu czynników prozapalnych odpowiedzialnych za rozwój otyłości, takich jak czynnik martwicy nowotworów (TNF- $\alpha$ ) czy interleukina 6 (IL-6) [59]. Podobieństwo wykazano również na poziomie proteomu, gdzie zarówno u ludzi jak i u świń ze stwierdzonym ZM, wykryto istotne nieprawidłowości w ekspresji określonych białek [5], a ponadto obraz histopatologiczny u obu gatunków wykazywał wiele analogii [7].

Ponieważ, jak nadmieniono wcześniej, zabiegi związane z modyfikacją żywienia u świń, nie zawsze dają odpowiednie wyniki w uzyskaniu adekwatnego modelu do badań nad rozwojem cukrzycy, stosuje się środki farmakologiczne, które przyspieszają degradację komórek trzustki, prowadząc do wystąpienia cukrzycy. Najczęściej jest stosowana streptozotocyna (SZT), uszkadzająca  $\beta$  komórki trzustki wytwarzające insulinę. Zastosowanie SZT u świń w celu spowodowania uszkodzeń  $\beta$  komórek trzustki wymaga bardzo precyzyjnego dobrania indywidualnej dawki dla każdego zwierzęcia, która spowoduje kontrolowany spadek wydzielania insuliny, wywołując hiperglikemię, jednocześnie nie doprowadzając do insulinooporności i upośledzenia wychwytu i utylizacji glukozy. Wynika to z tego, że insulina jest konieczna do wywołania i utrzymania otyłości, a jej zbyt niski poziom we krwi prowadzi do lipolizy i katabolizmu [33].

Opisano wiele modeli świńskich cukrzycy uzyskanych podaniem STZ, np. Koopmans i wsp. [36] wykazali, że powolna infuzja 130 mg STZ/kg m.c., bez stosowania diety wysokotłuszczowej, prowadzi do hiperglikemii, zaburzonego profilu lipidowego oraz pozostałych nieprawidłowości metabolicznych charakterystycznych dla cukrzycy typu 2. Co więcej, świnię z indukowaną tą metodą cukrzycą bardzo dobrze reagowały na metforminę, lek powszechnie stosowany w cukrzycy typu 2, powodujący podobnie jak u człowieka spadek insulinooporności. Inni badacze wywoływali cukrzycę u świń modelowych przez dożylną podanie SZT jeden raz dziennie w ilości 50 mg/kg m.c., przez trzy dni [2, 18]. Spowodowało to ponad 80% redukcję liczebności komórek  $\beta$  trzustki, doprowadzając do hiperglikemii (około 4-krotnie wyższy poziom glukozy w krwi na czczo u świń modelowych w porównaniu do świń zdrowych grupy kontrolnej) i zaburzonej tolerancji glukozy. Model ten został następnie wykorzystany do badań nad mechanizmami towarzyszącymi miażdżycy tętnic powstałej w wyniku przebiegającej cukrzycy [18]. Po około 20 tygodniach od rozpoczęcia badań, u świń modelowych

stwierdzono istotne zwężenie światła tętnicy wieńcowej połączone z hipertriglicerydemią – objawy charakterystyczne także u człowieka. Jest to dowód na to, że model ten może być także przydatny w badaniach nad powikłaniami związanymi z chorobami układu krążenia.

Oprócz STZ, innym środkiem farmakologicznym stosowanym w celu upośledzenia funkcji komórek  $\beta$  trzustki jest alloszan. Podanie świniom miniaturowym alloszanu w połączeniu z dietą o podwyższonej zawartości tłuszczu umożliwiło uzyskanie cukrzycowego modelu dyslipidemii [10]. Zwierzęta modelowe miały podwyższony poziom glukozy (300-400 mg/dL), jak również podwyższone stężenie cholesterolu i trójglicerydów we krwi. Z przeprowadzonych badań wynika, że farmakologiczna indukcja cukrzycy u świń modelowych, prowadząca do destrukcji komórek  $\beta$  trzustki bardziej przypomina etiologię cukrzycy typu 1, natomiast obserwowane symptomy, takie jak oporność insulinowa, czy dyslipidemia są bliższe symptomom przebiegu cukrzycy typu 2 [6].

Zwierzęcy model cukrzycy typu 1 najczęściej uzyskiwany jest w wyniku zabiegu chirurgicznego - pankreatektomii. W tym postępowaniu stopień zaawansowania choroby zależy będzie od stopnia ablacji komórek trzustkowych [40, 72]. Niestety, wywołany w ten sposób rozwój cukrzycy typu 1, nie odpowiada w pełni naturalnemu przebiegowi tej choroby u człowieka, ponieważ przez zabieg chirurgiczny usuwana jest zarówno tkanka zewnątrz- jak i wewnątrzwydzielnicza trzustki. Dodatkową wadą tej techniki jest duża inwazyjność i konieczność stosowania szczególnej opieki pooperacyjnej nad zwierzętami [39].

### **ŚWINIE W BADANIACH NAD CHOROBAŁ NACZYŃ WIEŃCOWYCH SERCA**

Świnie są coraz częściej używane do badań nad prze-wlekłą niedokrwistością, terapeutyczną angiogenezą i hipertroficzną angiomiopatią mięśnia sercowego. Dlatego, iż budowa anatomiczna naczyń wieńcowych świń jest bardzo podobna do budowy anatomicznej naczyń wieńcowych człowieka. Ponadto, przebieg wapnienia żył zaobserwowany u świń rasy Ossabaw czyni je bardzo użytecznym modelem w tego typu badaniach. Badania proteomu lewej i prawej komory serca u osobników rasy świń Ossabaw z wywołaną kardiomiopatią, gdzie stosując metodę elektroforezy żelowej w połączeniu ze spektrometrią mas (MS) zidentyfikowano 600 białek, wykazały istotne zmiany w profilu ekspresji tych białek w porównaniu do osobników zdrowych [48]. Jest to doskonały przykład, wykazujący uniwersalność modelu świńskiego w badaniach nad rozwojem technik diagnostycznych oraz możliwości stosowania nowych terapii w przypadku zmian kardiologicznych wywołanych niedokrwieniem komórek mięśnia sercowego, czy stanem mięśnia sercowego po przebytych zawałach u ludzi [65]. Badania na prosiętach, jak i zwierzętach dorosłych z wywołanymi zmianami kardiologicznymi

mięśnia sercowego, są bardzo przydatne w diagnozowaniu kinetyki przemian enzymów m.in. dehydrogenazy izocytrynianowej i malonowej w odniesieniu do ludzkiego mięśnia sercowego [16] czy obrazowania metodą rezonansu magnetycznego MR [79]. Eksperymentalnie wywołane niedotlenie mięśnia sercowego u nowo narodzonych prosiąt spowodowało obniżenie poziomu tych enzymów. Natomiast po zastosowaniu diety wysokocholesterolowej obserwowano obniżenie aktywności syntazy tlenku azotu w ich mięśniu sercowym [38]. Dorosła świnia jest doskonałym modelem do badań przedklinicznych analizujących dysfunkcję struktur serca po przebytych zawałach. Przykładem takim są badania przeprowadzone na miocytach uzyskanych z serc modelowych świń z ograniczonymi uszkodzeniami przegród międzykomorowych, gdzie stwierdzono zwiększoną ilość białek mitochondrialnych i desminy. Uzyskane wyniki wskazują na wzrost ekspresji białek mitochondrialnych/cytoszkieletowych w dysfunkcjach rozkurczowych (m.in. calscyryny-1 i vinculiny) przy jednoczesnym obniżeniu aktywności niektórych enzymów beta łańcucha F1-ATPazy [79]. Na modelu świńskim z wywołanym niedokrwieniem mięśnia sercowego badano również zjawisko autofagii. W badaniach tych oznaczano białko katepsynę, które jest uznawane za główny mediator mechanizmu homeostazy, hamujący apoptozę i chroniczne niedokrwienie mięśnia sercowego. Wykazano również, że białka macierzy pozakomórkowej, m.in. chrząstki warstwy pośredniej białek, marylin-4, kolagenu alfa1 (należą do małej rodziny proteoglikanów bogatych w leucynę) przyczyniają się do zmian w mięśniu sercowym [3, 79]. Z przedstawionych faktów jednoznacznie wynika, że badania wykorzystujące świnię jako model miażdżycy tętnic w połączeniu z analizami proteomu są bardzo precyzyjnymi narzędziami diagnostycznymi. Dzięki nim można wskazać przyczyny uszkodzeń naczyń krwionośnych wynikające m.in. ze zmiany w aktywacji mięśni gładkich tętnic ze spokojnego do aktywującego proliferację w połączeniu ze zmianami w białkach zaangażowanych w migrację komórek i adhezję. Model serca świńskiego w badaniach łożyska naczyniowego serca, w połączeniu z analizami proteomu pomagają w diagnozowaniu i zrozumieniu mechanizmów różnicowania i odpowiedzi na uszkodzenia, co wprowadza do medycyny ludzkiej istotny postęp wiedzy o mechanizmach związanych z etiologią stanów patologicznych. O wyjątkowej przydatności świni jako zwierzęcia modelowego dla medycyny świadczy również to, że istnieją wśród nich rasy, które charakteryzują się istotnymi różnicami w otluszczeniu i rozkładzie tłuszczu w organizmie. Badania, które umożliwią określenie genów i białek odpowiedzialnych za występowanie tych zmienności u świni stworzyłyby możliwości na wykorzystanie uzyskanych informacji do zrozumienia podobnej zmienności wśród ludzi, poznania przyczyn i procesu powstawania otyłości. Geny te mogłyby być użyte do uzyskania genetycznie zmodyfikowanych świń jako specjalistycznego modelu do walki z otyłością, chorobą cywilizacyjną.



## PODSUMOWANIE

Posiadanie zwierząt modelowych, naśladowujących daną chorobę człowieka stwarza możliwości sprawdzenia skuteczności zastosowanej terapii, przetestowania różnych wariantów terapeutycznych, przebadania ewentualnych działań niepożądanych, jakie mogą wystąpić podczas bądź po jakimś czasie od przeprowadzenia leczenia. Zwierzęce modele okazały się niezmiernie przydatne w walce z chorobami, które określono mianem cywilizacyjnych. Sądzi się, że pozwolą one w niedalekiej przyszłości na opracowanie skutecznych metod ich zwalczania.

Wydaje się, że największą szansę powodzenia mają obecne badania ukierunkowane na uzyskiwanie preparatów leczniczych od transgenicznych świń przy założeniu spełnienia wysokich norm sanitarnych, które postawiono wytwarzanym tymi metodami specyfikom oraz badania translacyjne. Te ostatnie można zdefiniować jako badania naukowe polegające na przeniesieniu osiągnięć uzyskanych w trakcie badań osobników jednego gatunku na osobniki innych gatunków. Najczęściej badania takie dotyczą przeniesienia wyników badań doświadczalnych na zwierzętach do człowieka, ale mogą również odnosić się do medycyny weterynaryjnej, służąc poprawie stanu zdrowia jednych zwierząt dzięki badaniom na innych (modele zwierzęce chorób).

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Aigner B., Renner S., Kessler B., Klymiuk N., Kurome M., Wünsch A., Wolf E.: Transgenic pigs as models for translational biomedical research. *J. Mol. Med.*, 2010; 88: 653-664
- [2] Askari B., Carroll M.A., Capparelli M., Kramer F., Gerrity R.G., Bornfeldt K.E.: Oleate and linoleate enhance the growth-promoting effects of insulin-like growth factor-I through a phospholipase D-dependent pathway in arterial smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 36338-36344
- [3] Barallobre-Barreiro J., Didangelos A., Schoendube F.A., Drozdov I., Yin X., Fernández-Caggiano M., Willeit P., Puntmann V.O., Aldama-López G., Shah A.M., Doménech N., Mayr M.: Proteomics analysis of cardiac extracellular matrix remodelling in a porcine model of ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, 2012; 125: 789-802
- [4] Bassols A., Costa C., Eckersall P.D., Osada J., Sabrià J., Tibau J.: The pig as an animal model for human pathologies: A proteomics perspective. *Proteomics Clin. Appl.*, 2014; 8: 715-731
- [5] Bell L.N., Lee L., Saxena R., Bemis K.G., Wang M., Theodorakis J.L., Vuppalanchi R., Alloosh M., Sturek M., Chalasani N.: Serum proteomic analysis of diet-induced steatohepatitis and metabolic syndrome in the Ossabaw miniature swine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2010; 298: G746-G754
- [6] Bellinger D.A., Merricks E.P., Nichols T.C.: Swine models of type 2 diabetes mellitus: insulin resistance, glucose tolerance, and cardiovascular complications. *ILAR J.*, 2006; 47: 243-258
- [7] Bendixen E., Danielsen M., Larsen K., Bendixen C.: Advances in porcine genomics and proteomics - a toolbox for developing the pig as a model organism for molecular biomedical research. *Brief. Funct. Genomics*, 2010; 9: 208-219
- [8] Berseth C.L.: Gestational evolution of small intestine motility in preterm and term infants. *J. Pediatr.*, 1989; 115: 646-651
- [9] Bisset W.M., Watt J.B., Rivers R.P., Milla P.J.: Ontogeny of fasting small intestinal motor activity in the human infant. *Gut*, 1988; 29: 483-488
- [10] Boullion R.D., Mokolke E.A., Wamhoff B.R., Otis C.R., Wenzel J., Dixon J.L., Sturek M.: Porcine model of diabetic dyslipidemia: Insulin and feed algorithms for mimicking diabetes mellitus in humans. *Comp. Med.*, 2003; 53: 42-52
- [11] Butler A.E., Janson J., Bonner-Weir S., Ritzel R., Rizza R.A., Butler P.C.:  $\beta$ -cell deficit and increased  $\beta$ -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*, 2003; 52: 102-110
- [12] Clark K.J., Carlson D.F., Fahrenkrug S.C.: Pigs taking wing with transposons and recombinases. *Genome Biol.*, 2007; 8 (Suppl. 1): S13
- [13] Cooper D.K.: A brief history of cross-species organ transplantation. *Proceedings*, 2012; 25: 49-57
- [14] Dyson M.C., Alloosh M., Vuchetich J.P., Mokolke E.A., Sturek M.: Components of metabolic syndrome and coronary artery disease in female Ossabaw swine fed excess atherogenic diet. *Comp. Med.*, 2006; 56: 35-45
- [15] Fan N., Lai L.: Genetically modified pig models for human diseases. *J. Genet. Genomics*, 2013; 40: 67-73
- [16] Fert-Bober J., Sawicki G., Lopaschuk G.D., Cheung P.Y.: Proteomic analysis of cardiac metabolic enzymes in asphyxiated newborn piglets. *Mol. Cell. Biochem.*, 2008; 318: 13-21
- [17] Freeman T.C., Ivens A., Baillie J.K., Beraldi D., Barnett M.W., Dorward D., Downing A., Fairbairn L., Kapetanovic R., Raza S., Tomoiu A., Alberio R., Wu C., Su A.I., Summers K. i wsp.: A gene expression atlas of the domestic pig. *BMC Biol.*, 2012; 10: 90
- [18] Gerrity R.G., Natarajan R., Nadler J.L., Kimsey T.: Diabetes-induced accelerated atherosclerosis in swine. *Diabetes*, 2001; 50: 1654-1665
- [19] Gerstein H.C., Waltman L.: Why don't pigs get diabetes? Explanations for variations in diabetes susceptibility in human populations living in a diabetogenic environment. *Can. Med. Assoc. J.*, 2006; 174: 25-26
- [20] Gondret F., Guével B., Com E., Vincent A., Lebret B.: A comparison of subcutaneous adipose tissue proteomes in juvenile piglets with a contrasted adiposity underscored similarities with human obesity. *J. Proteomics*, 2012; 75: 949-961
- [21] Grundy S.M., Brewer H.B. Jr., Cleeman J.I., Smith S.C. Jr., Lenfant C.: Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*, 2004; 109: 433-438
- [22] Gün G., Kues W.A.: Current progress of genetically engineered pig models for biomedical research. *Biores. Open Access*, 2014; 3: 255-264
- [23] Gutierrez K., Dicks N., Glanzner W.G., Agellon L.B., Bordignon V.: Efficacy of the porcine species in biomedical research. *Front. Genet.*, 2015; 6: 293
- [24] Hammer R.E., Pursel V.G., Rexroad C.E. Jr., Wall R.J., Bolt D.J., Ebert K.M., Palmiter R.D., Brinster R.L.: Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, 1985; 315: 680-683
- [25] Holm I.E., Alstrup A.K., Luo Y.: Genetically modified pig models for neurodegenerative disorders. *J. Pathol.*, 2016; 238: 267-287
- [26] Islam M.S., Loots du T.: Experimental rodent models of type 2 diabetes: A review. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 2009; 31: 249-261

- [27] Kalinowski P., Mianowana M.: Zespół metaboliczny cz. II: Epidemiologia zespołu metabolicznego w Polsce i na świecie. *J. Educ. Health Sport*, 2016; 6: 466-480
- [28] Kang J.T., Ryu J., Cho B., Lee E.J., Yun Y.J., Ahn S., Lee J., Ji D.Y., Lee K., Park K.W.: Generation of RUNX3 knockout pigs using CRISPR/Cas9-mediated gene targeting. *Reprod. Domest. Anim.*, 2016; 51: 970-978
- [29] Kiciak A., Borycka K., Woliński J., Zabielski R., Bielecki K.: Pig as a model for studying the early sanation of the jejunal myoelectric activity following Roux-en-Y surgery. *J. Physiol. Pharmacol.*, 2003; 54 (Suppl. 2): 6
- [30] 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 Res.*, 2015; 24: 529-536
- [31] Kobayashi E., Hishikawa S., Teratani T., Lefor A.T.: The pig as a model for translational research: overview of porcine animal models at Jichi Medical University. *Transplant. Res.*, 2012; 1: 8
- [32] Koopmans S.J., Mroz Z., Dekker R., Corbijn H., Ackermans M., Sauerwein H.: Association of insulin resistance with hyperglycemia in streptozotocin-diabetic pigs: Effects of metformin at isoenergetic feeding in a type 2-like diabetic pig model. *Metabolism*, 2006; 55: 960-971
- [33] Koopmans S.J., Schuurman T.: Considerations on pig models for appetite, metabolic syndrome and obese type 2 diabetes: From food intake to metabolic disease. *Eur. J. Pharmacol.*, 2015; 759: 231-239
- [34] Kuzmuk K.N., Schook L.B.: Pigs as a model for biomedical sciences. W: *The genetics of the pig*, red.: M.F. Rothschild, A. Ruvinovskiy. CAB International, Wallingford 2011, 426-444
- [35] Kwon D.J., Kim D.H., Hwang I.S., Kim D.E., Kim H.J., Kim J.S., Lee K., Im G.S., Lee J.W., Hwang S.: Generation of  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase knocked-out transgenic cloned pigs with knocked-in five human genes. *Transgenic Res.*, 2017; 26: 153-163
- [36] Larsen M.O., Rolin B., Wilken M., Carr R.D., Svendsen O., Bolten P.: Parameters of glucose and lipid metabolism in the male Göttingen minipig: Influence of age, body weight, and breeding family. *Comp. Med.*, 2001; 51: 436-442
- [37] Lee H.G., Lee H.C., Kim S.W., Lee P., Chung H.J., Lee Y.K., Han J.H., Hwang L.S., Yoo J.I., Kim Y.K., Kim H.T., Lee H.T., Chang W.K., Park J.K.: Production of recombinant human von Willebrand factor in the milk of transgenic pigs. *J. Reprod. Dev.*, 2009; 55: 484-490
- [38] Lee M.Y., Cai Y., Wang Y., Liao S.Y., Liu Y., Zhang Y., Bai B., Tse H.F., Vanhoutte P.M.: Differential genomic changes caused by cholesterol- and PUFA-rich diets in regenerated porcine coronary endothelial cells. *Physiol. Genomics*, 2012; 44: 551-561
- [39] Litten-Brown J.C., Corson A.M., Clarke L.: Porcine models for the metabolic syndrome, digestive and bone disorders: a general overview. *Animal*, 2010; 4: 899-920
- [40] Löhr M., Lübbersmeyer J., Otremba B., Klapdor R., Grossner D., Klöppel G.: Increase in B-cells in the pancreatic remnant after partial pancreatectomy in pigs: An immunocytochemical and functional study. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.*, 1989; 56: 277-286
- [41] Lunney J.K.: Advances in swine biomedical model genomics. *Int. J. Biol. Sci.*, 2007; 3: 179-184
- [42] Luo Y., Lin L., Bolund L., Jensen T.G., Sørensen C.B.: Genetically modified pigs for biomedical research. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 2012; 35: 695-713
- [43] Matsunari H., Nagashima H.: Application of genetically modified and cloned pigs in translational research. *J. Reprod. Dev.*, 2009; 55: 225-230
- [44] Meurens F., Summerfield A., Nauwynck H., Saif L., Gerdtts V.: The pig: a model for human infectious diseases. *Trends Microbiol.*, 2012; 20: 50-57
- [45] Niemann H., Petersen B.: The production of multi-transgenic pigs: update and perspectives for xenotransplantation. *Transgenic Res.*, 2016; 25: 361-374
- [46] Ozawa M., Himaki T., Ookutsu S., Mizobe Y., Ogawa J., Miyoshi K., Yabuki A., Fan J., Yoshida M.: Production of cloned miniature pigs expressing high levels of human apolipoprotein(a) in plasma. *PLoS One*, 2015; 10: e0132155
- [47] Park J.K., Lee Y.K., Lee P., Chung H.J., Kim S., Lee H.G., Seo M.K., Han J.H., Park C.G., Kim H.T., Kim Y.K., Min K.S., Kim J.H., Lee H.T., Chang W.K.: Recombinant human erythropoietin produced in milk of transgenic pigs. *J. Biotechnol.*, 2006; 122: 362-371
- [48] Phillips D., Aponte A.M., Covian R., Neufeld E., Yu Z.X., Balaban R.S.: Homogenous protein programming in the mammalian left and right ventricle free walls. *Physiol. Genomics*, 2011; 43: 1198-1206
- [49] Prather R.S., Lorson M., Ross J.W., Whyte J.J., Walters E.: Genetically engineered pig models for human diseases. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, 2013; 1: 203-219
- [50] Renner S., Dobenecker B., Blutke A., Zöls S., Wanke R., Ritzmann M., Wolf E.: Comparative aspects of rodent and nonrodent animal models for mechanistic and translational diabetes research. *Theriogenology*, 2016; 86: 406-421
- [51] Renner S., Fehlings C., Herbach N., Hofmann A., von Waldthausen D.C., Kessler B., Ulrichs K., Chodnevskaja I., Moskalenko V., Amsegruber W., Göke B., Pfeifer A., Wanke R., Wolf E.: Glucose intolerance and reduced proliferation of pancreatic  $\beta$ -cells in transgenic pigs with impaired glucose-dependent insulinotropic polypeptide function. *Diabetes*, 2010; 59: 1228-1238
- [52] Ribel U., Larsen M.O., Rolin B., Carr R.D., Wilken M., Sturis J., Westergaard L., Deacon C.F., Knudsen L.B.: NN2211: a long-acting glucagon-like peptide-1 derivative with anti-diabetic effects in glucose-intolerant pigs. *Eur. J. Pharmacol.*, 2002; 451: 217-225
- [53] Schook L.B., Rund L., Beghini K.R., Remião M.H., Seixas F.K., Colares T.: Emerging technologies to create inducible and genetically defined porcine cancer models. *Front. Genet.*, 2016; 7: 28
- [54] Sébert S.P., Lecannu G., Kozłowski F., Siliart B., Bard J.M., Krempf M., Champ M.J.: Childhood obesity and insulin resistance in a Yucatan mini-piglet model: putative roles of IGF-1 and muscle PPARs in adipose tissue activity and development. *Int. J. Obes.*, 2005; 29: 324-333
- [55] Seok J., Warren H.S., Cuenca A.G., Mindrinos M.N., Baker H.V., Xu W., Richards D.R., McDonald-Smith G.P., Gao H., Hennessy L., Finnerty C.C., López C.M., Honari S., Moore E.E., Minei J.P. i wsp.: Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013; 110: 3507-3512
- [56] Sheikh A.M., Barrett C., Villamizar N., Alzate O., Valente A.M., Herlong J.R., Craig D., Lodge A., Lawson J., Milano C., Jaggars J.: Right ventricular hypertrophy with early dysfunction: A proteomics study in a neonatal model. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2009; 137: 1146-1153
- [57] Shigetani T., Hsu H.C., Enosawa S., Matsuno N., Kasahara M., Matsunari H., Umeyama K., Watanabe M., Nagashima H.: Transgenic pig expressing the red fluorescent protein kusabira-orange as a novel tool for preclinical studies on hepatocyte transplantation. *Transplant. Proc.*, 2013; 45: 1808-1810
- [58] Sper R.B., Koh S., Zhang X., Simpson S., Collins B., Sommer J., Petters R.M., Caballero I., Platt J.L., Piedrahita J.A.: Generation of a stable transgenic swine model expressing a porcine histone 2B-eGFP fusion protein for cell tracking and chromosome dynamics studies. *PLoS One*, 2017; 12: e0169242
- [59] Spurlock M.E., Gabler N.K.: The development of porcine models of obesity and the metabolic syndrome. *J. Nutr.*, 2008; 138: 397-402

- [60] Staunstrup N.H., Madsen J., Primo M.N., Li J., Liu Y., Kragh P.M., Li R., Schmidt M., Purup S., Dagnæs-Hansen F., Svensson L., Petersen T.K., Callesen H., Bolund L., Mikkelsen J.G.: Development of transgenic cloned pig models of skin inflammation by DNA transposon-directed ectopic expression of human  $\beta 1$  and  $\alpha 2$  integrin. *PLoS One*, 2012; 7: e36658
- [61] Teratani T., Matsunari H., Kasahara N., Nagashima H., Kawarasaki T., Kobayashi E.: Islets from rats and pigs transgenic for photo-genic proteins. *Curr. Diabetes Rev.*, 2012; 8: 382-389
- [62] Torres-Rovira L., Astiz S., Caro A., Lopez-Bote C., Ovilo C., Pal-lares P., Perez-Solana M.L., Sanchez-Sanchez R., Gonzalez-Bulnes A.: Diet-induced swine model with obesity/leptin resistance for the study of metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Sci. World J.*, 2012; 2012: 510149
- [63] Umeyama K., Nakajima M., Yokoo T., Nagaya M., Nagashima H.: Diabetic phenotype of transgenic pigs introduced by dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ . *J. Diabetes Compli-cations*, 2017; 31: 796-803
- [64] Verma G., Arora J.S., Sethi R.S., Mukhopadhyay C.S., Verma R.: Handmade cloning: recent advances, potential and pitfalls. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 2015; 6: 43
- [65] Verma N., Rettenmeier A.W., Schmitz-Spanke S.: Recent ad-vances in the use of *Sus scrofa* (pig) as a model system for proteomic studies. *Proteomics*, 2011; 11: 776-793
- [66] Wakchaure R., Ganguly S., Praveen P.K., Para P.A.: Transgenic ani-mals: A review on its various dimensions and applications in animal biotechnology. *Int. J. Em. Technol. Eng.*, 2015; 5: 210-213
- [67] Walters E.M., Agca Y., Ganjam V., Evans T.: Animal models got you puzzled?: think pig. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2011; 1245: 63-64
- [68] Walters E.M., Wolf E., Whyte J.J., Mao J., Renner S., Nagashima H., Kobayashi E., Zhao J., Wells K.D., Critser J.K., Riley L.K., Prather R.S.: Completion of the swine genome will simplify the production of swine as a large animal biomedical model. *BMC Med. Genomics*, 2012; 5: 55
- [69] Watson A.L., Carlson D.F., Largaespada D.A., Hackett P.B., Fahren-krug S.C.: Engineered swine models of cancer. *Front. Genet.*, 2016; 7: 78
- [70] Whitelaw C.B., Sheets T.P., Lillico S.G., Telugu B.P.: Engineering large animal models of human disease. *J. Pathol.*, 2016; 238: 247-256
- [71] Whitworth K.M., Lee K., Benne J.A., Beaton B.P., Spate L.D., Mur-phy S.L., Samuel M.S., Mao J., O'Gorman C., Walters E.M., Murphy C.N., Driver J., Mileham A., McLaren D., Wells K.D., Prather R.S.: Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs from in vitro-derived oocytes and embryos. *Biol. Reprod.*, 2014; 91: 78
- [72] Wilson J.D., Dhall D.P., Simeonovic C.J., Lafferty K.J.: Induction and management of diabetes mellitus in the pig. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 1986; 64: 489-500
- [73] Whyte J.J., Prather R.S.: Genetic modifications of pigs for medicine and agriculture. *Mol. Reprod. Dev.*, 2011; 78: 879-891
- [74] Wolf E., Braun-Reichhart C., Streckel E., Renner S.: Genetically engi-neered pig models for diabetes research. *Transgenic Res.*, 2014; 23: 27-38
- [75] World Health Organization. Global Report on Diabetes. Geneva: World Health Organization, 2016
- [76] Xi S., Yin W., Wang Z., Kusunoki M., Lian X., Koike T., Fan J., Zhang Q.: A minipig model of high-fat/high-sucrose diet-induced diabetes and atherosclerosis. *Int. J. Exp. Pathol.*, 2004; 85: 223-231
- [77] Yin W., Liao D., Kusunoki M., Xi S., Tsutsumi K., Wang Z., Lian X., Koike T., Fan J., Yang Y., Tang C.: NO-1886 decreases ectopic lipid deposi-tion and protects pancreatic beta cells in diet-induced diabetic swine. *J. Endocrinol.*, 2004; 180, 399-408
- [78] Yum S.Y., Yoon K.Y., Lee C.I., Lee B.C., Jang G.: Transgenesis for pig models. *J. Vet. Sci.*, 2016; 17: 261-268
- [79] Zalewski J., Claus P., Bogaert J., Driessche N.V., Driesen R.B., Ga-lan D.T., Spido K.R., Buszman P., Milewski K., Van de Werf F.: Cyclosporine A reduces microvascular obstruction and preserves left ventricular function deterioration following myocardial ischemia and reperfusion. *Basic Res. Cardiol.*, 2015; 110: 18

---

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktow inte-resow.