

KOMÓRKI MACIERZyste I INŻYNIERIA TKANKOWA W TECHNOLOGII POZAUSTROJOWEJ PRODUKCJI MIĘSA

STEM CELLS AND TISSUE ENGINEERING
FOR CULTURED MEAT PRODUCTION

Natalia HIPPMANN¹, Piotr RZYMSKI^{1,2}

¹Zakład Medycyny Środowiskowej,
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

²Integrated Science Association (ISA),
Universal Scientific Education and Research Network (USERN)

Streszczenie: Współczesne sposoby pozyskiwania mięsa, na które rośnie globalne zapotrzebowanie, dalekie są od założeń zrównoważonego rozwoju, stwarzają zagrożenia epidemiologiczne, jak również środowiskowe, w tym także w kontekście stabilności klimatycznej, oraz budzą wątpliwości natury etycznej. W niniejszej pracy przybliżono najważniejsze technologiczne założenia pozaustrojowej produkcji mięsa jako realnej, zrównoważonej i bardziej bezpiecznej alternatywy. Omówiona została (i) charakterystyka komórek macierzystych stanowiących podstawę rozwoju całego procesu, (ii) prowadzenie współhodowli komórkowych, (iii) odtwarzanie fizjologicznych skurczy mięśni w warunkach *in vitro*, (iv) zastosowanie rusztowań 3D, (v) wykorzystywanie pożywek nie mających zwierzęcego pochodzenia, (vi) wdrożenie odpowiednio zaprojektowanych bioreaktorów przemysłowych oraz (vii) implementacja technik bioprintingu 3D. Dostępne współcześnie techniki *in vitro* pozwalają na uzyskanie mięsa zarówno zwierząt hodowlanych, jak i dzikich, a także produkcję mięsa dla zwierząt domowych – psów i kotów. Współczesny postęp naukowo-technologiczny, pilna potrzeba zapewnienia bezpieczeństwa klimatycznego i żywnościowego, jak również rosnąca, zwłaszcza pośród osób młodych, świadomość ekologiczna, tworzą optymalne warunki dla rozwoju i komercjalizacji produktów pozaustrojowego mięsa.

Słowa kluczowe: hodowla komórkowa, produkcja żywności, inżynieria tkankowa, mięso *in vitro*, bezpieczeństwo żywności

Summary: The global meat demand is increasing while its conventional production is not sustainable, creating epidemiological and environmental risks, including those related to climate stability. It also raises ethical concerns. The present paper characterizes cultured meat production as a realistic, more sustainable, and safer alternative. The following issues are discussed: (i) types of stem cells used to initiate the production process, (ii) co-culturing of different cell types, (iii) recreating muscle contrac-

tions under *in vitro* conditions, (iv) use of 3D scaffolding, (v) use of non-animal media for cell culture, (vi) implementation of industrial bioreactors, and (vii) use of 3D bioprinting technology. The discussed methods allow for the production of meat of livestock and wild animal species, and pet food. It appears that scientific and technological advances, the urgent need to ensure climate and food security, as well as the growing environmental awareness, especially among young people, create optimal conditions for the development and commercialization of cultured meat products.

Keywords: cell culture, food production, tissue engineering, cultured meat, food safety

WSTĘP

Zapewnienie bezpieczeństwa żywnościowego staje się jednym z najważniejszych wyzwań XXI w. z uwagi na prognozowany wzrost populacyjny, zmiany klimatyczne, zanieczyszczenie środowiska oraz postępujący rozwój gospodarczy i związany z nim konsumpcjonizm. Istotne obiekcje pod tym względem rodzi sektor hodowli przemysłowej zwierząt. Organizacja Narodów Zjednoczonych uznaje produkcję mięsa i produktów odzwierzęcych jako jedno z największych źródeł zużycia wody i powierzchni oraz emisji gazów cieplarnianych. Hodowla zwierząt zabiera 50% nadających się do zamieszkania terenów na Ziemi. Większość pól uprawnych zakładana jest w celu produkcji paszy. W rezultacie hodowla zwierząt odpowiada za 25% globalnego zużycia wody, ma 40% udział w stosowanych w rolnictwie pestycydów oraz wpływa na eutrofizację wód powierzchniowych na skutek spływu nutrientów z obszarów rolnych, odpowiadając w okresie lat 1950-2010 za trzykrotny wzrost nadwyżek wprowadzanego do środowiska azotu i pięciokrotny – fosforu [29, 67].

Jednocześnie, przemysłowa hodowla zwierząt rodzi szereg obiekcji o charakterze etycznym, związanych zarówno ze złym dobrostanem, jak i samym wykorzystywaniem zwierząt i ich zabijaniem. Pozyskiwanie mięsa od zwierząt dzikich nie jest natomiast realną alternatywą, a zarazem rodzi szereg obiekcji, również na tle epidemiologicznym [37, 73]. Polowanie na dzikie zwierzęta było w przeszłości źródłem transmisji istotnych klinicznie patogenów. Pierwszy przypadek zakażenia wirusem Ebola w Afryce Zachodniej był prawdopodobnie rezultatem kontaktu z nietoperzami owocożernymi [39], pochodzenie wirusa różyczki jest również odzwierzęce, związane z nietoperzami z rodzaju płaskonosów (*Hipposideros*) jako pierwotnymi gospodarzami [5], podczas gdy ludzki wirus niedoboru odporności 1 (HIV-1) i HIV-2 są powiązane z pierwotną transmisją i dalszą mutacją małpiego wirusa niedoboru odporności odpowiednio z szympansov oraz mangab szarych podczas przygotowywania i spożywania ich mięsa [16, 76]. Współcześnie handlem objętym jest na świecie ponad 18 tys. gatunków zwierząt (w tym ok. 7,6 tys. lądowych kręgowców, z czego 4,5 tys. gatunków ptaków, 1,2 tys. gadów i ssaków i ok. 500 gatunków płazów [37]). Szacuje się, że ok. 75%

nowych patogenów człowieka, w przeważającej większości reprezentowanych przez wirusy, ma pochodzenie odzwierzęce [37, 94].

Współczesna hodowla przemysłowa zwierząt również tworzy zagrożenia o charakterze epidemiologicznym. Przykładowo, znanych jest dotychczas sześć koronawirusów związanych ze świniami (w tym jeden z rodzaju *Deltacoronavirus*, jeden przedstawiciel *Betacoronavirus* i cztery gatunki z rodzaju *Alfacoronavirus*), w tym alfakoronawirus SADS-CoV, który jest potencjalnie zakaźny dla człowieka [26, 87]. Wirus Nipah, powodujący ciężkie zapalenie mózgu, układowe zapalenie naczyń i ciężkie zapalenie płuc, odpowiedzialny za regularne, coroczne wybuchy epidemii w południowej Azji, przenoszony przez nietoperze, również związany jest z hodowlą świń [38]. Hodowle trzody chlewnej sprzyjają również genetycznej reasortacji wirusów grypy, która polega na wymianie jednego bądź kilku fragmentów jednoniciowego RNA wirusa i ma miejsce, gdy jedną komórkę gospodarza zakazi więcej niż jeden szczep wirusa grypy. Jest to możliwe, gdyż drogi oddechowe świń charakteryzują się kwasem sialowym wykorzystywanym jako receptor zarówno przez hemaglutyniny ptasiego wirusa grypy (H5), jak i ludzkiego wirusa grypy (H1). W 2020 r. opisano szczep G4 EA H1N1, który wyewoluował na terenie chińskich hodowli trzody chlewnej i charakteryzuje się istotnym potencjałem pandemicznym. Jego genom stanowi materiał genetyczny wirusa ptasiej grypy, ale zawiera również fragmenty pochodzące m.in. z linii H1N1/09 [84]. Z kolei w lutym 2021 r. w Rosji wykryto pierwsze zakażenie człowieka wirusem ptasiej grypy H5N8, powiązane z fermami drobiu [90].

Ponadto, konwencjonalna produkcja mięsa wiąże się z ryzykiem narażenia na patogenne bakterie (np. *Salmonella*), pasożyty (tasiemce, glisty, nitkowce) oraz priony, będące czynnikami etiologicznymi chorób takich jak gąbczasta encefalopatia bydła [31]. Problem zakażeń bakteryjnych wymusza rosnące użycie farmakceutyków w hodowlach zwierząt, w tym antybiotyków, co z kolei przekłada się na wzrost ich emisji do środowiska i oddziaływania na jego elementy, jak również na promocję antybiotykooporności, zjawiska rozpoznane przez Światową Organizację Zdrowia jako jedno z bardziej istotnych wyzwań zdrowia publicznego [18, 49].

Z powyższego omówienia wynika jednoznacznie, że współczesne sposoby pozyskiwania mięsa na cele konsumpcyjne nie spełniają zasad zrównoważonego rozwoju, sprzyjają degradacji środowiska, zmianom klimatu, a także rodzą istotne zagrożenia o charakterze zdrowotnym. Aspekt ograniczenia konsumpcji mięsa, na korzyść produktów roślinnych, znalazł odzwierciedlenie zarówno w raporcie Międzyrządowego Zespołu ds. Zmian Klimatu powołanego przez ONZ w 2019 r., oficjalnym stanowisku Rady Naukowej Europejskich Akademii Nauk (EASAC), a także w stanowisku opublikowanym na łamach czasopisma *BioScience*, które podpisało łącznie 11 tys. badaczy ze 152 krajów. Z drugiej strony, globalna konsumpcja mięsa rośnie, osiągając niemal 350 milionów ton rocznie [71]. Mimo wzrostu popularności diet roślinnych, nie wydaje się, by ich dalsza promocja mo-

gła stanowić realny sposób rozwiązania problemów, którym sprzyja produkcja mięsa. Przeciętne spożycie mięsa per capita wzrosło z 20 kg w 1961 r., do 43 kg w 2014 r. Najwyższy poziom konsumpcji mięsa odnotowuje się w krajach wysoko rozwiniętych – powyżej 100 kg na osobę w krajach takich jak Australia i USA oraz ok. 80 kg na osobę w Europie. Istotny wpływ na wzrost konsumpcji mięsa ma również populacja krajów rozwijających. W połowie lat .70 XX w. w Chinach spożywano rocznie mniej niż 10 mln ton mięsa, podczas gdy w 2012 r. już ponad 70 mln. Największy wzrost konsumpcji mięsa odnotowuje się natomiast w Indiach, których populacja liczyła niegdyś 40% osób stosujących dietę wegetariańską. Według prognoz Światowego Forum Ekonomicznego, do 2050 r. zapotrzebowanie na mięsa na całym świecie podwoi się – decydować będzie o tym zarówno wzrost liczebności ludzkiej populacji, jak i postępujący rozwój gospodarczy [95].

W związku z tym wszystkim potrzeba pilnych działań mających na celu odmianę współczesnego oblicza przemysłowej hodowli zwierząt [37, 67, 73]. W ostatnich latach, dzięki osiągnięciom technik hodowli komórkowej, inżynierii tkankowej oraz medycyny regeneracyjnej udało się istotnie rozwinąć produkcję tkanki mięśniowej w warunkach *in vitro* w celach spożywczych. Pierwszy tego typu produkt – burger wołowy złożony z 20 tys. włókien mięśniowych – powstał w 2013 r., jego produkcja zajęła trzy miesiące i kosztowała ponad 330,000 USD [83]. Na przestrzeni następných lat znacząco zwiększyło się zainteresowanie pozaustrojową produkcją mięsa, co umożliwiło pokonanie wielu wyzwań, a także obniżyło koszty. W 2020 r. Singapurska Agencja Żywności dopuściła na rynek pierwszy produkt tego typu – mięso drobiowe w formie tzw. „nuggetsów”, produkowane przez firmę Eat Just [40].

W niniejszej pracy omówiono najważniejsze technologiczne założenia pozaustrojowej hodowli mięsa na cele konsumpcyjne ze szczególnym uwzględnieniem charakterystyki komórek macierzystych stanowiących podstawę rozwoju całego procesu, prowadzenia współhodowli komórkowych, odtwarzania procesów fizjologicznych skurczy mięśni, zastosowania rusztowania 3D, wykorzystywania pożywek nie mających zwierzęcego pochodzenia, wdrożenia odpowiednio zaprojektowanych bioreaktorów przemysłowych oraz implementacji technik bioprintingu 3D.

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA TKANKI MIĘŚNIOWEJ

Mięsem nazywamy wszystkie przeznaczone do spożycia części umięśnienia szkieletu zwierząt z przyległymi tkankami: tkanką łączną właściwą (włącznie z tłuszczową), tkanką chrzęstną, kostną nerwową, naczyniami krwionośnymi i pozostałością krwi. W przypadku procesu pozaustrojowej produkcji mięsa wyzwaniem staje się zatem nie tylko wytworzenie tkanki mięśniowej, ale także odtworzenie całego systemu tkanek współtworzących konwencjonalnie rozumia-

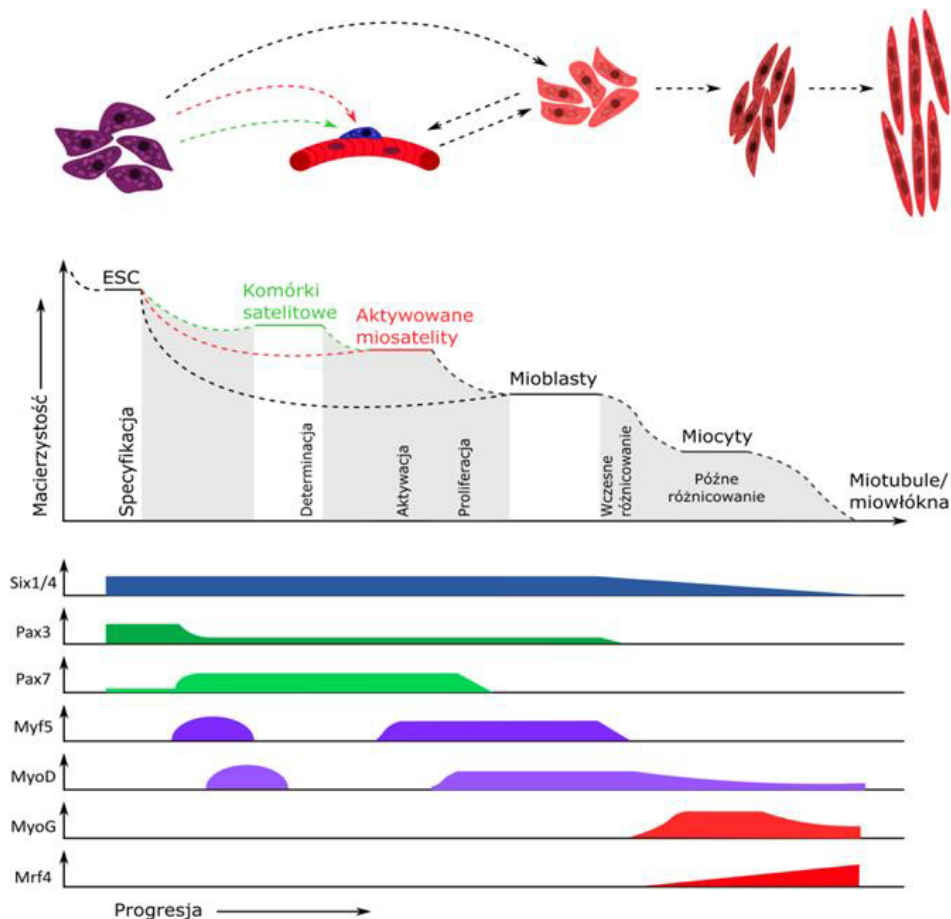
ne mięso. W przemyśle mięsnym, spożywane są najczęściej mięśnie prążkowane szkieletowe zwierząt hodowlanych. Mięsień szkieletowy jest wysoce wyspecjalizowaną tkanką, której główną funkcją jest generowanie skurczy. Podczas rozwoju zarodkowego ssaków, komórki mezodermy przekształcają się w mioblasty, a następnie długie, cylindryczne, wielojądrowe komórki (włókna) zlewają się w pęczki włókien mięśniowych, które stanowią wielojądrzasty zrab. Funkcjonalny mięsień tworzą pęczki miotubuli z siecią naczyń włosowatych poprowadzonych przez środek, dostarczających niezbędnych substancji do prawidłowej pracy tkanki. Mioblasty, które nie przekształcają się w miotubule, pozostaną komórkami macierzystymi mięśni szkieletowych – komórkami satelitarnymi [74]. Komórki te są istotne w procesie regeneracji uszkodzonych tkanek, ale mają też kluczowe znaczenie dla hodowli *in vitro* [45]. Jednym z największych wyzwań w produkcji mięsa *in vitro* jest wybór najlepszego źródła komórek inicjatorowych do rozpoczęcia hodowli komórkowej [73].

KOMÓRKI INICJATOROWE I PROCESY ICH RÓŻNICOWANIA

KOMÓRKI MACIERZYSTE TKANKI MIĘŚNIOWEJ

Komórki satelitarne mięśni, opisane pierwszy raz przez A. Mauro w 1961 r., umiejscowione są pod warstwą blaszki podstawnej miofibrili, gdzie przebywają w formie uśpionej i niezróżnicowanej [60]. W przypadku uszkodzenia tkanki, mogą one wejść w fazę mitotycznego podziału, co indukuje proliferację i fuzję mioblastów [13]. W produkcji mięsa *in vitro*, to właśnie one są najpowszechniejszym źródłem komórek mięśniowych. Wyzwaniem w ich hodowli jest trudność w utrzymaniu ciągłości proliferacji, ponieważ w warunkach *in vitro* poziom replikacji maleje wraz z wiekiem komórki [72] i może przekroczyć 20 podziałów, nie osiągając nawet limitu Hayflicka, czyli typowej dla komórek macierzystych liczby podziałów (50-70). Rozwiązaniem tego problemu może być m.in. rutynowe uzupełnianie hodowli immortatlizowanymi komórkami, co skutkuje zwiększeniem potencjału proliferacyjnego [64].

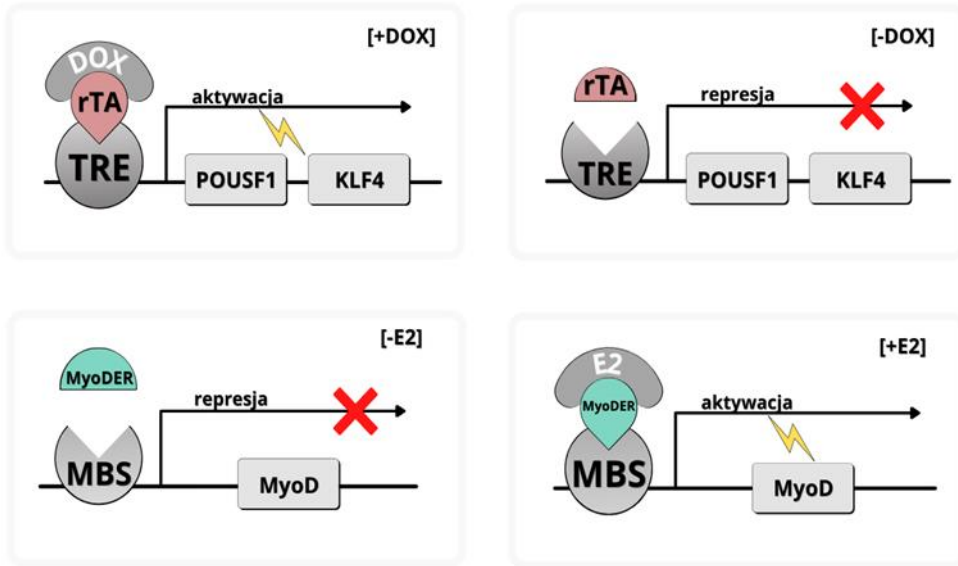
Trwają również prace z zastosowaniem specyficznych inhibitorów, mających na celu utrzymać komórki satelitowe w stanie macierzystości, bez determinacji w kierunku mioblastów. Komórki satelitowe niezdeteminowane charakteryzują się ekspresją PAX7, przy jednoczesnym braku ekspresji myoD (**Ryc. 1**). Z badań wynika, że aktywacja szlaku sygnałowego kinazy p38 α / β MAPK prowadzi do systematycznego spadku ekspresji PAX7 [88]. W związku z tym, zastosowanie inhibitora p38 α / β MAPK pozwala na wydłużenie cykli proliferacyjnych komórek satelitowych w warunkach *in vitro*. Ograniczeniem tej metody jest natomiast hamowanie zdolności miosatelit, poddanych wcześniej działaniu powyższego inhibitora, do progresji w kierunku miocytów i tworzenia miotubul [23].



RYCINA 1. Najistotniejsze czynniki transkrypcyjne odgrywające rolę w kolejnych etapach miogenezy (na podstawie [6])

FIGURE 1. Main transcription factors in the myogenesis (based on [6])

Firma Memphis Meat opatentowała również metodę prowadzenia linii komórek satelitowych świni O2K (patent US20160227830A1) z zastosowaniem systemu TET-ON. Komórki transdukowane POU5F1 (OCT3/4) i KLF4, utrzymuje się pod kontrolą doksycyliny i beta-estradolu z zastosowaniem transaktywatorów (**Ryc. 2**). W obecności doksycyliny nie dochodzi do ekspresji myoD i możliwe jest proliferowanie niezdeterminowanych komórek satelitowych. Usunięcie antybiotyku z medium, przy jednoczesnym dodaniu beta-estradolu prowadzi do ekspresji myoD i progresji komórek w kierunku mioblastów. Tego typu rozwiązanie pozwala na istotne ekspandowanie populacji komórek satelitowych, ich krioprezervację i długoterminowe przechowywanie i wykorzystywanie zgodnie z po-



RYCINA 2. System TET-ON zastosowany przez Memphis Meat w linii świńskich komórek satelitowych O2K uzyskanych z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (patent US20160227830A1)

FIGURE 2. The Tetracycline-Controlled Transcriptional Activation (TET-ON) system in the O2K cell line, obtained from induced pluripotent stem cells and patented by the Memphis Meat ((patent US20160227830A1)

trezabami produkcji mięsa. Takie rozwiązanie jest korzystne z punktu widzenia aspektów bezpieczeństwa żywności. Jego ograniczeniem jest natomiast występowanie potencjalnych śladowych ilości doksycykliny w produkcie docelowym, otrzymanym przy wykorzystaniu komórek O2K. Ryzyko to można ograniczyć w przypadku odpowiedniego przemycia komórek w trakcie pasażowania [73].

Po osiągnięciu określonej liczby, komórki te już z łatwością różnicują w komórki mięśniowe i bardziej złożone miofibryle [68]. Komórki macierzyste tkanki mięśniowej od lat z powodzeniem izoluje się z tkanek mięśniowych gatunków zwierząt o znaczeniu gospodarczym: -bydła domowego [24], kury domowej [96], owcy (40), świni domowej [92], ryb [70] oraz indyka domowego [61].

EMBRIONALNE KOMÓRKI MACIERZYZSTE

Embrionalne komórki macierzyste (ESCs), izolowane z blastocysty po zapłodnieniu, są kolejnym potencjalnym źródłem komórek mięśniowych w hodowli, dzięki swojej zdolności do różnicowania. Mogą stanowić alternatywę dla komórek satelitarnych, ze względu na lepsze przystosowanie do warunków *in vitro*:

zdolność do utrzymania stanu aktywnej proliferacji, zachowania niezmienionego genotypu i wysoką ekspresję białka telomerazy, które odpowiada za utrzymanie odpowiedniej długości telomerów [3, 99]. Ich duża zdolność do różnicowania może być szczególnie korzystna na etapie inicjacji hodowli [86].

Dotychczas nie wyizolowano jednak stabilnej linii ESCs ze zwierząt hodowlanych, więc ich potencjał do przekształcenia się w komórki tkanki mięśniowej pozostaje niezbadany.

INDUKOWANE PLURIPOTENTNE KOMÓRKI MACIERZyste

Indukowane pluripotentne komórki macierzyste (iPSC) również mogą stanowić komórki starterowe w hodowli mięsa *in vitro*. Technologia iPSCs polega na przekształceniu zróżnicowanej już komórki, na przykład komórki skóry, w pluripotentną komórkę macierzystą poprzez uruchomienie ekspresji embrionalnych genów za pomocą specyficznych czynników transkrypcyjnych (tzw. czynników Yamanaki): Oct4, Sox2, KLF4 i c-Myc [85]. Czynniki te wprowadza się na drodze transdukcji z wykorzystaniem wirusowych wektorów integrujących bądź transfekcji plazmidu. Dotychczas udało się już pozyskać iPSC m.in. z fibroblastów świni domowej [28], a także przekształcić je w komórki mięśniowe [63]. Oprócz tego, komórki mięśni szkieletowych zostały także uzyskane poprzez odróżnicowanie dojrzałych komórek tłuszczowych [47]. Pracując z iPSC można docelowo uzyskać zarówno komórki mięśniowe, ale również adipocyty oraz komórki śródbłonna, a następnie wykorzystać je do strukturyzowania produktu docelowego, np. wołowiny [82].

MEZENCHYMALNE KOMÓRKI MACIERZyste

Mezenchymalne komórki macierzyste (MSCs) to multipotencjalne komórki, które mogą być wyizolowane z płynu owodniowego, krwi pępowinowej, galarety Whartona i dojrzałych narządów, takich jak szpik kostny, miazga zębowa, płuca i wątroba [53]. W ciągu ostatnich lat, MSCs zostały skutecznie wyizolowane, między innymi, z bydła, bawołów i kóz [41]. Zespół Mann i in. wyizolował MSCs z płynu owodniowego zarodka wołu domowego i rozszerzał hodowlę do 20 pasaży. Komórki wykazywały ekspresję genów pluripotencji – Oct4, Nanog, Sox2 i GAPDH, podobnie do komórek ludzkich [58]. Innym potencjalnym źródłem MSCs jest krew pępowinowa [97]. Mezenchymalne komórki macierzyste mogą różnicować się w miocyty, a następnie miotuby, dzięki ekspresji Pax3, Pax7, MyoD, Myf-5 i MyoG – przez co, podobnie jak ESCs, mogą stanowić komórki inicjatorowe w hodowli.

STYMULACJA SKURCZY MIĘŚNI W HODOWLI

Jednym z ważnych aspektów w hodowli tkanki mięśniowej jest zapobieganie atrofii miocytów. Jako że tkanka *in vitro* jest pozbawiona unerwienia i mięśnie

nie są w czynnym użyciu, istnieje ryzyko zaniku włókien mięśniowych, dlatego niezbędne jest zapewnienie komórkom możliwości wykonywania skurczy [7]. W warunkach *in vivo* mięsień szkieletowy podlega regularnym skurczom dzięki unerwieniu. W warunkach *in vitro* – mimo, że komórki czasami same ulegają spontanicznym skurczom – konieczna jest alternatywna stymulacja [21]. Oprócz zapobiegania atrofii, skurcze pozytywnie wpływają na wzrost i tworzenie odpowiedniej struktury tkanki [33]. Komórki można pobudzać mechanicznie. Jedną z metod polega na regularnym, cyklicznym umieszczaniu i zdejmowaniu obciążenia z pokrytego komórkami mięśni gładkich porowatego rusztowania, co promuje różnicowanie i łączenie się ze sobą komórek [14]. Oprócz tego, rozwiązaniem są ruchome rusztowania – na przykład kulki z biomateriału, które mogą się regularnie powiększać i pomniejszać [25]. Podobne do naturalnych warunki skurczu pobudzającego rozrost komórek mięśniowych udało się stworzyć w 2000 r., kiedy zauważono właściwość fibroblastów do organizacji włókien kolagenu w macierzy pozakomórkowej, tym samym tworząc stałe napięcie pomiędzy rozwijającymi się komórkami mięśniowymi [35]. Innym rozwiązaniem jest elektryczna stymulacja komórek. W badaniu przeprowadzonym w 2000 r. zauważono, że stymulacja elektryczna mięśnia *in vitro* jest bardziej efektywna niż mechaniczna: jej zaletą jest łatwość w stosowaniu na dużą skalę i pozytywny wpływ na formację sarkomerów i różnicowanie się komórek [20]. Umożliwia też skurcz każdego włókna z osobna, ponieważ sygnał elektryczny wnika głęboko w każdą komórkę, w przeciwieństwie do mechanicznego, pasywnego pobudzania [20]. Pozytywny wpływ na wzrost i rozwój komórek miało nawet hodowanie ich na mikrowłóknach, które znajdowały się pod stałym napięciem elektrycznym [43].

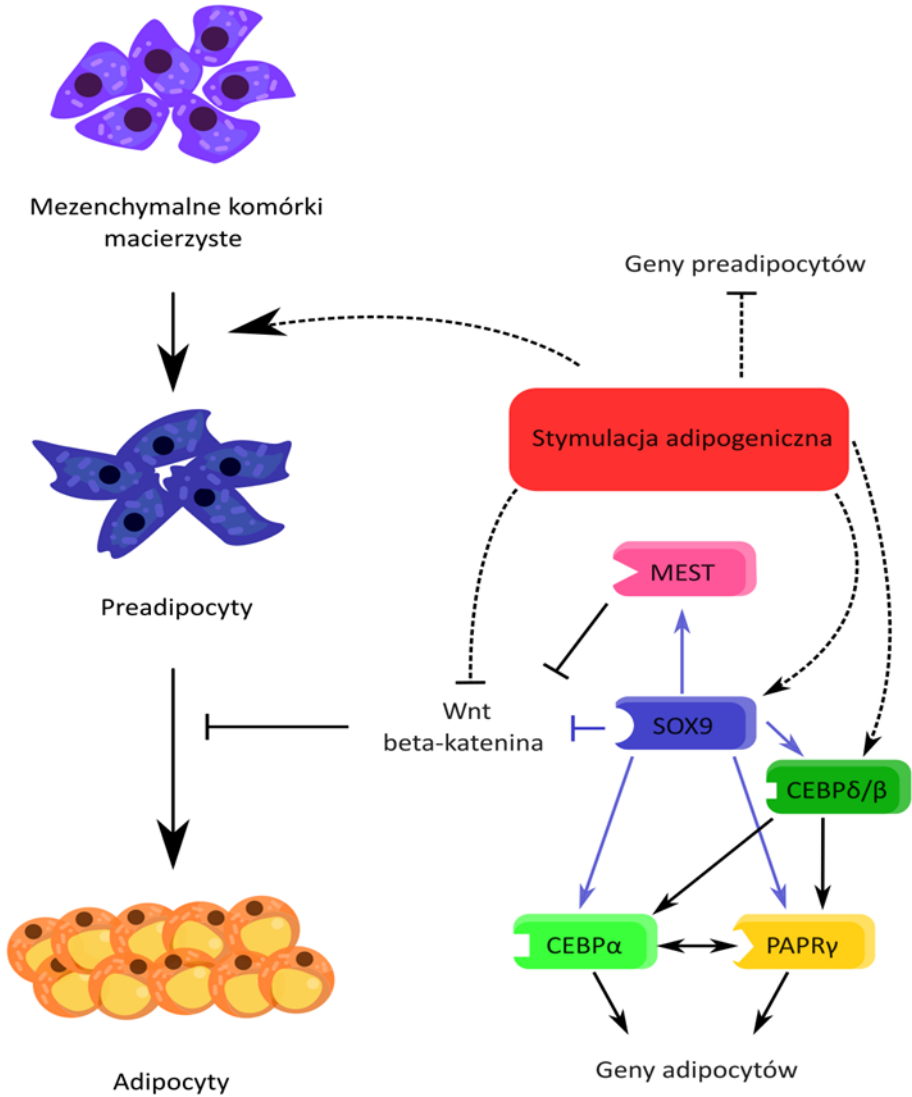
PROWADZENIE WSPÓŁHODOWLI Z FIBROBLASTAMI

Tkanka łączna w warunkach *in vivo*, w tym także w tkance mięśniowej, stanowi zrab i ochronę mechaniczną dla innych tkanek i narządów oraz transportuje substancje odżywcze i produkty metabolizmu. Jest zbudowana z komórek oraz istoty międzykomórkowej – ECM (ang. *extracellular matrix*) – na którą składają się głównie włókna kolagenowe, glikozaminoglikany (np. kwas hialuronowy), proteoglikany i glikoproteiny. Fibroblasty stanowią najliczniejszą grupę komórek tkanki łącznej, ich główną funkcją jest produkcja składników ECM, między innymi kolagenu i elastyny [74]. Fibroblasty wpływają na wzrost i różnicowanie innych komórek i taki efekt został zaobserwowany także w przypadku ko-kultury z mioblastami. Ko-kultura jest hodowlą komórkową, do której powstania potrzebne są co najmniej dwa rodzaje komórek, co ma wpływać korzystnie na ich rozwój, poprzez lepsze odwzorowanie warunków naturalnych oraz parakrynną regulację odpowiednimi czynnikami wzrostu. Wykazano rolę fibroblastów

w proliferacji, różnicowaniu i fuzji komórek satelitarnych mięśni [56], z czym związany jest głównie czynnik wzrostu fibroblastów – FGF-2 (ang. *fibroblasts growth factor*) [91]. FGF-2 jest białkiem sekrecyjnym, aktywującym kinazę związaną z białkiem RhoA, która odpowiada za inhibicję procesu różnicowania się mioblastów poprzez fosforylację seryny substratów receptora insulinowego [55]. Inhibicja RhoA prowadzi do zwiększenia poziomu RhoE, które z kolei prowadzi do zróżnicowania w komórkę mięśniową i reguluje ścieżkę sygnałową związaną z M-kadheryną, biorąc tym samym udział w fuzji mioblastów [32]. Zatem czynniki wydzielane przez fibroblasty regulują stopień zróżnicowania komórek mięśniowych. Fibroblasty biorą też udział w zatrzymywaniu procesów apoptotycznych mioblastów podczas ich różnicowania poprzez regulację β 1 integryny, ufosforylowanego białka Akt oraz białka antyapoptotycznego Bcl2 [101]. Dodatkowo, obecność fibroblastów może poprawiać walory smakowe mięsa, poprzez zwiększenie jego jędrności. Obecny stan wiedzy sugeruje, że odpowiednio zoptymalizowana hodowla fibroblastów i mioblastów jest kluczowa w odpowiednim wzroście tkanki mięśniowej, a produkcja mięsa *in vitro* będzie wymagała prowadzenia takiej ko-kultury [66].

WYKORZYSTANIE ADIPOCYTÓW

Adipocyty to komórki tkanki łącznej, których główną funkcją jest magazynowanie i produkcja energii z lipidów, izolacja termiczna oraz wypełnianie pustych przestrzeni w organizmie. Adipocyty rezydują także w tkance mięśniowej [74]. W przypadku mięsa, procent tkanki tłuszczowej wewnątrzmięśniowej jest podstawą do oceny jego marmurkowatości – parametru oceniającego smak i konsystencję mięsa. Większa zawartość tłuszczu pozytywnie wpływa na jego smak, jednakże konsumenci chętniej wybierają mięso, w którym tkanki tłuszczowej jest mniej, powołując się na niekorzystny wpływ tłuszczu zwierzęcego na zdrowie [11]. Marmurkowatość mięsa konwencjonalnego może być uwarunkowana przez genotyp, ale również dietę zwierzęcia [93]. Zaletą mięsa *in vitro* może być możliwość regulacji zawartości tkanki tłuszczowej, w zależności od potrzeb konsumenta. Istotnym wyzwaniem prowadzenia kultury adipocytów na cele konsumpcyjne jest wyeliminowanie związków chemicznych klasycznie wykorzystywanych do indukcji adipogenezy w mezenchylanych komórkach macierzystych. W tym celu wykorzystuje się bowiem insulinę, deksametazon, indometacynę oraz 3-izobutylo-1-metyloksantyna (IBMX). W hodowlach adipocytów na cele konsumpcyjne, zastosowanie tych związków jest wykluczone z uwagi na specyfikę ich aktywności biologicznej [36]. W związku z tym potrzebne są alternatywy działające jako induktory receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów gamma,



RYCINA 3. Główne szlaki uczestniczące w adipogenezie, które wymagają odtworzenia w produkcji komórek tłuszczowych w procesie pozaustrojowej produkcji mięsa (na podstawie [36])

FIGURE 3. Main pathways of adipogenesis needed to be recreated in the production of cultured meat (based on [36])

których aktywacja jest jednym z głównych procesów w progresji adipogenezy (**Ryc. 3**). Postuluje się, iż induktorem tego typu może być m.in. kwas prystanowy, długołańcuchowy kwas nasycony, otrzymywany z kwasu fitanowego [34].

WASKULARYZACJA

W przypadku hodowli mięsa, które nie ulegnie przetworzeniu, na przykład wołowego steku, kluczowe staje się dokładne odwzorowanie struktury tkanki mięśniowej. Jednym z niezbędnych elementów jest jej odpowiednie unaczynienie. Jednym z proponowanych rozwiązań jest stworzenie sieci naczyń z jadalnego kolagenu lub z biomateriału, do którego mioblasty się przyłączają, a który następnie zostanie usunięty, pozostawiając wydrążone kanały symulujące naczynia krwionośne [25]. Idąc krok dalej, proponowane jest również zastosowanie podobnego modelu, jednakże z wykorzystaniem komórek tkanki nabłonkowej, która w warunkach *in vivo* buduje żyły i tętnice [10] – biopolimer zostałaby pokryty nabłonkiem, a następnie usunięty, poprzez użycie odpowiedniego rozpuszczalnika. Alternatywną propozycją jest kontrolowana angiogeneza mięśnia w hodowli, w której mioblasty wzrastałyby w ko-kulturze z komórkami nabłonka z zastosowaniem cytokin promujących waskularyzację – VEGF, IGF-1, EGF [4].

WYBÓR ODPOWIEDNIEGO MEDIUM HODOWLANEGO

Powszechnie stosowanym źródłem składników odżywczych w hodowlach komórkowych *in vitro* są surowice zwierzęce, zwłaszcza surowice z cieląt (ang. *fetal bovine serum*, FBS) [42]. Głównym składnikiem FBS jest surowicza albumina bydlęca (ang. *bovine serum albumin*, BSA) – białko globularne, które po oczyszczeniu charakteryzuje się neutralnością i nie wykazuje aktywności enzymatycznej [57]. Z uwagi na to, że FBS powstaje jako produkt uboczny uboju krów, jest stosunkowo tani. Docelowo jednak, w produkcji mięsa *in vitro* dąży się do ograniczenia, a następnie całkowitego wyeliminowania FBS ze stosowania [65]. Wynika to z kilku czynników. Po pierwsze, koszt FBS (ok. 1000 zł za 0,5L) stosowanego w produkcji przemysłowej takiego mięsa znacząco podnosiłby cenę ostatecznego produktu. Po drugie, wykorzystanie surowic zwierzęcych pozyskiwanych z płodów budzi kontrowersje na płaszczyźnie etycznej. Po trzecie, wykluczenie FBS zwiększyłoby grupę potencjalnych odbiorców produktu o osoby obecnie stosujące diety roślinne. Po czwarte, stosowanie innych dodatków odżywczych do mediów umożliwiłoby zachowanie pełnej kontroli nad składem pożywki i pozwoliłoby spełnić wszystkie wymogi GMP (Good Manufacture Production).

The Good Food Institute przeprowadził w 2020 r. analizę [81] dotyczącą między innymi składu i kosztów syntetycznej pożywki. Essential 8 to powstałe w 2011 r., szeroko stosowane i dostępne komercyjnie medium komórkowe, nie zawierające składników pochodzenia zwierzęcego. Charakteryzuje się prostym składem: DMEM/F12, AA2P, NaHCO₃, selenin sodu, insulina, transferyna FGF-2

i TGF- β . Litr pożywki Essential 8 kosztuje 400 USD i według analizy ponad 99% kosztów generują czynniki wzrostu – insulina, transferyna, FGF-2 i TGF- β oraz jeden ze składników bazy medium: bufor HEPES. Raport przedstawia siedem realistycznych scenariuszy na obniżenie kosztów, między innymi poprzez zmniejszenie stężenia wszystkich czynników wzrostu oraz zastąpienie buforu HEPES, tańszym buforem TES – oszacowano, że w najlepszym przypadku cena jednego litra pożywki może spaść z 377 USD do 0.24 USD – udowadniając tym samym, że ostateczna cena mięsa produkowanego w laboratorium może w przyszłości osiągnąć wartość konkurencyjną do konwencjonalnego mięsa [81]. Warto również wspomnieć, że obecnie na rynku przybywa pożywek niemających zwierzęcego pochodzenia, np. ClonaCell™-HY AOF Expansion Medium, Gibco® CHO Medium lub MilliporeSigma™ Chemicon™ AOF ITS. Nie wszystkie tego typu media spełniają swoje zadanie w kulturach mioblastów, często stymulując proliferację w sposób istotnie niższy w porównaniu do FBS [50]. Do hodowli komórek w celu produkcji mięsa *in vitro* można by również wykorzystać lizat z ludzkich trombocytów, np. PLTGold®. W tym przypadku ograniczeniem jest jego bardzo wysoki koszt, kształtujący się obecnie na poziomie kilku tys. zł za 0.5L.

ZASTOSOWANIE SZTUCZNEGO RUSZTOWANIA

Wraz z intensywnym rozwojem inżynierii tkankowej, zrodziła się potrzeba nowego rodzaju podłoża, na którym komórki mają się dzielić, tak, aby jak najskuteczniej imitować naturalne warunki i tym samym tworzyć realistyczne modele tkanek *in vitro*. Jednym ze sposobów na utrzymanie określonej struktury przestrzennej hodowli, jest zastosowanie sztucznego rusztowania. Do jego najważniejszych cech należą: umożliwienie swobodnego przemieszczania się i przylegania komórek, dostarczanie składników odżywczych, czynników wzrostu oraz biokompatybilność i biodegradowalność [15]. Najczęściej używanymi materiałami są m.in. naturalne polimery (kolagen, fibryna, kwas hialuronowy), surowce ceramiczne (tlenek glinu, hydroksyapatyt) i materiały syntetyczne (glikol polietylenowy, poliestry) [48]. Mioblasty w hodowli *in vitro* są komórkami spontanicznie się kurczącymi i wymagającymi kontaktu z podłożem do prawidłowego wzrostu, zatem najlepszym rodzajem rusztowania byłby elastyczny materiał o dużej powierzchni, który umożliwi swobodną dyfuzję medium z niezbędnymi składnikami, a także taki, który może być z łatwością oddzielony od finalnego produktu lub jest jadalny [19]. Wśród zaproponowanych rusztowań znalazły się kolagenowe, celulozowe lub chitozanowe mikrosfery, które powiększałyby się pod wpływem zmiany pH lub temperatury, dzięki czemu osadzone na nich włókna mięśniowe mogłyby być poddawane regularnym skurczom oraz kolagenowa siateczka, o tek-

sturze podobnej do gąbki o dużej powierzchni adhezyjnej dla komórek i wysokiej przepuszczalności dla substancji odżywczych [25]. Bardzo dobrą propozycją wydają się być mikrosfery kwasu alginowego (Alginate), kopolimeru kwasu mannanowego i kwasu gulonowego, które dostępne są komercyjnie, gdyż znajdują zastosowanie w sektorze medycznym [30]. Jednocześnie sole kwasu alginowego są bezpieczne dla konsumenta, mogą być wykorzystywane w produktach spożywczych i w przeciwieństwie do kolagenu, nie mają pochodzenia zwierzęcego [27].

KSZTAŁTOWANIE WŁAŚCIWOŚCI SENSORYCZNYCH

Akceptacja społeczna mięsa *in vitro* będzie zależała od jego właściwości sensorycznych, takich jak smak, tekstura, kolor i wartość odżywcza, dlatego kolejnym wyzwaniem w produkcji tej alternatywy będzie zadbanie o spełnienie tych oczekiwań. Wpływ na strukturę tkanki mają m.in. fizyczne warunki hodowli oraz ko-kultury. Tkanka mięśniowa wyhodowana w warunkach *in vitro* ma bardziej żółtawy niż czerwonawo-różowy kolor, charakterystyczny dla mięsa konwencjonalnego – głównie z powodu zmniejszonej ekspresji mioglobiny w warunkach dużej zawartości tlenu, jakie panują w hodowli [69]. Rozwiązaniem może być prowadzenie hodowli w warunkach niskotlenowych – zostało udowodnione, że prowadzi to do zwiększenia ekspresji mioglobiny, tym samym poprawiając kolor tkanki [46]. Tekstura, smak i soczystość mięsa zależą od zawartości tłuszczu śródmięśniowego. Oprócz wspomnianej już ko-kultury z adipocytami, zawartość tłuszczu może być kontrolowana poprzez suplementację tłuszczu na końcowym etapie produkcji i zachowanie odpowiedniego stosunku kwasów tłuszczowych nasyconych do nienasyconych [9].

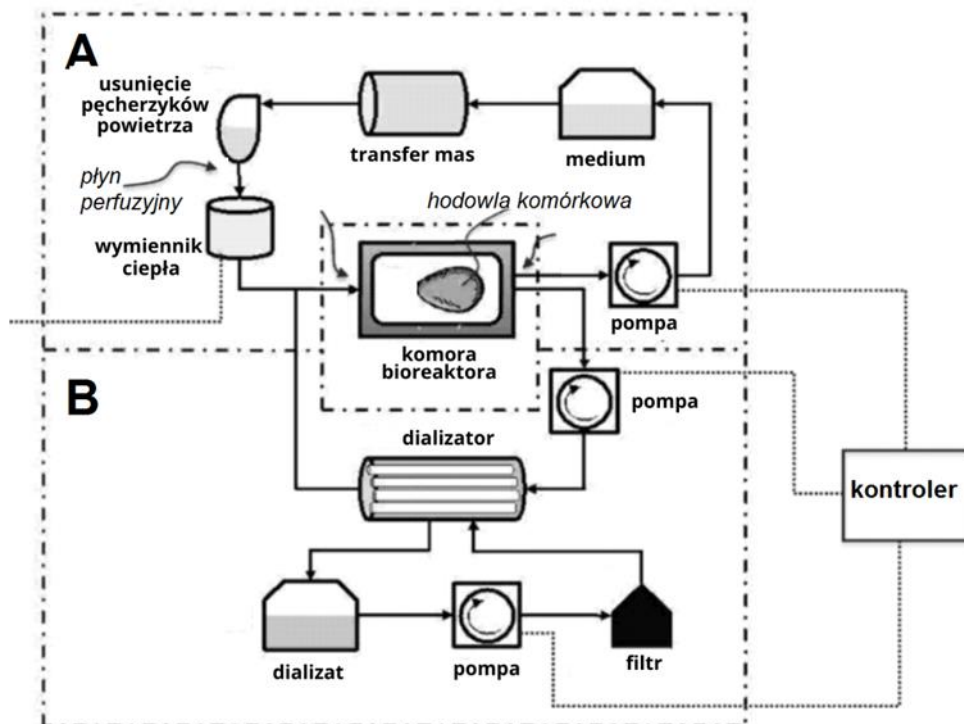
KSZTAŁTOWANIE WARTOŚCI ODŻYWCZEJ

Mięso pochodzenia naturalnego składa się z kilku tkanek – tkanki mięśniowej, tłuszczowej, łącznej i kostnej. Dzięki temu, mięso może być bogatym źródłem białek, aminokwasów, kwasów tłuszczowych, minerałów, takich jak cynk, selen, potas, sód, magnez, a także kreatyny i witamin A, B i D. Jest także istotnym źródłem witaminy B12, wytwarzanej przez bakterie występujące w jelitach zwierząt, oraz wysoce biodostępnego żelaza (Fe^{2+}) [98]. Zawartość białka zależy od gatunku i wieku zwierzęcia, średnio wynosi 22%. Podobnie zależności obserwuje się w odniesieniu do poszczególnych aminokwasów, np. wołowina posiada wysoki stosunek niezbędnych aminokwasów, takich jak leucyna, walina i lizyna, w porównaniu do cielęciny i wieprzowiny [1]. Istotnym składnikiem są także wy-

stępujące w mięsie nasycone kwasy tłuszczowe, które znacznie zwiększają wartość odżywczą, ale których nadmierne spożycie może sprzyjać rozwojowi chorób sercowo-naczyniowych [19]. Istotnym aspektem produkcji mięsa *in vitro* jest zapewnienie wszystkich wartości odżywczych mięsa konwencjonalnego z ewentualnym wyeliminowaniem niepożądanych składników. Rozwiązaniem może być suplementacja tkanki jonami Fe^{3+} związanymi z transferryną oraz witaminą B12. Dodatkowo, kompleks Fe^{3+} z transferryną po dotarciu do mitochondriów jest włączany do syntezy hemu, a tym samym syntezy mioglobiny i może korzystnie wpływać na osiągnięcie charakterystycznego, czerwonego koloru [19].

HODOWLA W BIOREAKTORZE

Jednym z największych wyzwań w produkcji mięsa *in vitro* jest zwiększenie skali produkcji, przy zachowaniu maksymalnej wydajności i opłacalności. Niezbędnym elementem jest więc bioreaktor, który zwiększa skalę procesu, zapewnia komórkom miejsce do wzrostu, a jednocześnie nie generuje dużych kosztów związanych z działaniem. W przemyśle farmaceutycznym tkanki zwierzęce są zazwyczaj hodowane w reaktorach o objętości od 1 do 20 m³. Aby produkcja mięsa miała charakter masowy, z jednoczesnym zachowaniem konkurencyjnej ceny do swojego konwencjonalnego odpowiednika, objętość bioreaktora musiałaby zostać zwiększona do takich wielkości, jakie są obecnie wykorzystywane w produkcji bakterii fermentujących lub innych produktów spożywczych przemysłu biotechnologicznego – 100-1000 m³[54]. Zwiększenie objętości samego naczynia reakcyjnego może nie wpłynąć znacząco na redukcję kosztów, jako że koszt urządzeń wykorzystywanych do produkcji stanowi małą część całkowitej inwestycji, więc wielkość pojedynczego bioreaktora nie zwiększa znacząco opłacalności procedury. Zwiększenie liczby mniejszych naczyń reakcyjnych bioreaktora może okazać się jednak korzystne, ze względu na redukcję ryzyka kontaminacji, jak również z powodu łatwiejszej optymalizacji prowadzonego procesu hodowli [100]. Czynnikiem, który najbardziej ogranicza zwiększenie skali jest wrażliwość komórek na uszkodzenia mechaniczne. Z tego względu, konieczne jest zminimalizowanie naprężenia ścinającego poprzez zastosowanie małych obrotów mieszadła oraz wolnego tempa napowietrzania. Brak odpowiedniego ruchu w bioreaktorze prowadzi jednak do słabego mieszania i tym samym do niewystarczającego transferu mas i wymusza zastosowanie większego stężenia tlenu, co skutkuje ostatecznie także większym stężeniem CO₂. Obecność tego gazu obniża pH mieszaniny, co negatywnie wpływa na komórki w naczyniu reakcyjnym. Wrażliwość miocytów uniemożliwia także podwyższenie temperatury, co mogłoby pomóc w transferze mas [44]. W 2020 r. opracowano bioreaktor z podnośnikiem powietrznym o obn



RYCINA 4. Schemat działania bioreaktora opatentowanego przez Future Meat Technologies (patent WO2018011805A9) z dwoma obiegami i automatyczną kontrolą pH, temperatury, poziomu glukozy i białka. Obieg 1: utrzymujący stałe ciepło z medium natlenowanym i wzbogacanym w CO_2 i N_2 , z usunięciem pęcherzyków powietrza. Obieg 2: oparty o system dializacyjny i filtrujący ma na celu usuwanie toksycznych związków, zwłaszcza amoniaku, uzupełnianie nutrientów – aminokwasów i czynników wzrostu (insuliny) i wprowadzania medium z powrotem do bioreaktora. System filtrujący nie usuwa albuminy, która jest transporterem dla nutrientów, kwasów tłuszczowych i czynników wzrostu

FIGURE 4. Schematic illustration of bioreactor patented by the Future Meat Technologies (patent WO2018011805A9) with two circuits, automatic control of pH, temperature, glucose and protein level. Circuit A maintains constant heat with an oxygenated medium enriched with CO_2 and N_2 , and removes air bubbles. Circuit B: based on a dialysis and filtration system, its purpose is to remove toxic compounds, especially ammonia, replenish nutrients – amino acids and growth factors (insulin) and return the medium to the bioreactor. The filtration system does not remove albumin, a transporter for nutrients, fatty acids and growth factors

jętości 300 m^3 i dzięki zastosowaniu obliczeniowej mechaniki płynów udało się ustalić geometrię naczynia reakcyjnego tak, aby zapewnić odpowiedni przepływ masy, przy optymalnych dla komórek zwierzęcych parametrach mieszania i rozproszenia energii [54]. Kwestia zwiększenia skali procesu produkcji mięsa *in vitro* jest obecnie największym wyzwaniem i wymaga dobrej optymalizacji tak, aby móc jak najszybciej przejść do komercjalizacji produktu. Przykładowym roz-

wiązaniem, wykorzystywanym w praktyce, jest bioreaktor opatentowany przez Future Meat Technologies (patent WO2018011805A9) z dwoma obiegami i automatyczną kontrolą pH, temperatury, poziomu glukozy i białka (**Ryc. 4**).

WYKORZYSTANIE TECHNOLOGII BIOPRINTINGU 3D

Bioprinting jest relatywnie nową i zaawansowaną techniką inżynierii tkankowej. Polega na wykorzystaniu zawiesiny komórkowej z hydrożelem jako biotuszu i odpowiednim rozmieszczeniu go w formie kolejnych warstw, do uzyskania pożądanej struktury 3D [44]. Stworzone w ten sposób tkanki imitują te występujące *in vivo* nie tylko poprzez wygląd zewnętrzny i skład komórkowy, ale także poprzez odpowiednie unaczynienie [8]. Bioprinting może przyjąć formę ekstruzji, drukowania kropelkowego lub drukowania za pomocą lasera [22]. Drukowanie metodą ekstruzji polega na depozycji biotuszu w formie ciągłego filamentu, zaś drukowanie kropelkowe opiera się na odpowiedniej dystrybucji kropli biotuszu, za pomocą temperatury lub impulsu elektrycznego. Drukowanie za pomocą lasera wykorzystuje zjawisko fotopolimeryzacji, może być też wykorzystywane do precyzyjnego pozycjonowania komórek w produkcji za pomocą techniki LIFT (ang. *Laser-Induced Forward Transfer*, transfer do przodu indukowany laserowo). W 2020 r. zespół Kupfer i in. wykorzystał technikę bioprintingu laserowego do stworzenia serca *in vitro* [51]. Jako biotusz, wykorzystane zostały kardiomiocyty otrzymane z ludzkich iPSC z fotosieciowanymi białkami macierzy zewnątrzkomórkowej jako łącze. Otrzymana pompa mięśniowa wykazywała pełen potencjał do skurczu i reagowała na stymulację i wykazywała ciągły potencjał czynnościowy regulowany przez odpowiednią stymulację i leki, co może sugerować, że stworzony w ten sposób mięsień również będzie zachowywał odpowiednie funkcje. Z uwagi na charakterystykę tkanki mięśniowej, metody ekstruzji i drukowania kropelkowego mogą okazać się najbardziej korzystne. Duża kontrola nad układem i składem powstającej tkanki może znacząco obniżyć koszty produkcji mięsa [80].

ZALETY, WYZWANIA I PERSPEKTYWY

Do najważniejszych zalet związanych z pozaustrojową produkcją mięsa należą:

- ograniczenie emisji gazów cieplarnianych (aspekt środowiskowy) [59, 89]
- ograniczenie zużycia wody (aspekt środowiskowy) [59, 89]
- ograniczenie deforestacji (aspekt środowiskowy) [2, 59, 89]
- ograniczenie emisji pestycydów i nawozów rolniczych (aspekt środowiskowy) [2]

- eliminacja użycia antybiotyków w procesie produkcji mięsa (aspekt zdrowotny) dzięki zastosowaniu w pełni lub częściowo zautomatyzowanych systemów hodowli, przestrzegania reżimu sanitarnego, stosowania filtrów HEPA i promieniowania UV-C [52]
- ograniczenie ryzyka zoonoz związanych z kontaktem ze zwierzętami dzikimi i hodowlanymi (aspekt zdrowotny) [37, 73]
- przewidywalna i szybka produkcja (aspekt bezpieczeństwa żywnościowego)
- ograniczenie/brak cierpienia zwierząt (aspekt etyczny) [75]

TABELA 1. Liderzy rozwoju technologii pozaustrojowej produkcji mięsa na cele konsumpcyjne
TABLE 1. The most important companies involved in cultured meat production

Startup/firma	Kraj pochodzenia	Główny produkt
Finless Foods	USA	Mięso ryb
Just	USA	Drób, wołowina
Memphis Meats	USA	Drób, wołowina
Blue Nalu	USA	Mięso ryb
Because Animals	USA	Produkty mięsne dla psów i kotów (m.in. mięso myszy)
Mission Barns	USA	Drób, wieprzowina
Wild Type	USA	Mięso ryb
Aleph Farms	Izrael	Wołowina
Future Meat Technologies	Izrael	Drób, wołowina, baranina
SuperMeat	Izrael	Drób
Mosa Meat	Holandia	Wołowina
Biftek	Turcja	Wołowina
Integriculture	Japonia	Wołowina, drób, foie gras
Shiok Meats	Singapur	Mięso krewetek, krabów i homarów

Jednym z największych problemów technologii mięsa *in vitro* jest fakt, że jest to relatywnie nowa dziedzina – metody nie są jeszcze odpowiednio zoptymalizowane i przetestowane, a pożywki i suplementy używane w hodowli nie są wystandaryzowane. Przekładać może się to na mniejszą konsumencką akceptację produktów żywnościowych wytworzonych w ten sposób [80]. W dobie rosnącej

go zapotrzebowania na optymalne źródło białka, związane z rosnącą populacją ludzką, mięso *in vitro* nadal pozostaje jednak jednym z najbardziej obiecujących alternatyw. Szacuje się, że globalny rynek alternatyw białka zwierzęcego, do 2025 r. wart będzie 17.9 mld USD [62]. Zgodnie z danymi Good Food Institute, amerykańscy inwestorzy, w ciągu ostatniej dekady, przeznaczyci łącznie 16 mld USD firmom i startupom zajmującym się produkcją mięsa *in vitro*, z czego ok. 13 mld USD tylko w latach 2017-2018 [77]. Firmy takie jak MosaMeat, Memphis Meat, Finless Foods, czy Supermeat, oprócz optymalizacji procesu produkcji, inwestują w komercjalizację swoich produktów. Warto zauważyć, że technologia pozaustrojowego pozyskiwania mięsa rozwijana jest niemal wyłącznie przy udziale środków finansowych pochodzących od prywatnych inwestorów (**Tab. 1**).

Akceptacja konsumentów jest szczególnie ważnym aspektem wprowadzenia na rynek mięsnych produktów pozyskiwanych pozaustrojowo. Według badań opinii publicznej, istotne jest samo nazewnictwo – terminy takie jak „mięso *in vitro*”, „mięso sztuczne”, mięso laboratoryjne” budzą negatywne skojarzenia [79]. Jednym z proponowanych rozwiązań jest zmiana nazwy na „mięso hodowane” (ang. *cultured meat*), „czyste mięso” (ang. *clean meat*) lub „mięso pozbawione cierpienia” (ang. *slaughter-free meat*) – odpowiednie nazewnictwo może pomóc budować bardziej pozytywne skojarzenia [12]. Oprócz tego, sugeruje się, że na lepszy odbiór może mieć wpływ także ograniczenie szczegółowości opisu używanej technologii podczas prezentacji produktu [78].

PODSUMOWANIE

Omówione w niniejszej pracy procesy mogą zostać zastosowane zarówno do wytworzenia mięsa zwierząt hodowlanych, jak i gatunków dziko występujących, w tym gatunków rzadkich, dostępnych lokalnie lub zagrożonych wyginięciem. Wykorzystując techniki hodowli komórkowej i inżynierii tkankowej możliwe jest uzyskanie zarówno mięsa konsumowanego przez człowieka, jak również karmy dla zwierząt domowych – psów i kotów. Technologia ta jest również obiecująca w kontekście planów eksploracji kosmosu z udziałem misji załogowych, zwłaszcza związanych z Marssem. Postęp naukowo-technologiczny, potrzeba zapewnienia bezpieczeństwa klimatycznego i żywnościowego, jak również rosnąca, zwłaszcza wśród osób młodych, świadomość ekologiczna, tworzą optymalne warunki dla rozwoju i komercjalizacji produkcji pozaustrojowego mięsa. Wszystko wskazuje, iż w XXI w. zrealizowany zostanie, wyrażony w 1931 r., postulat Winstona Churchilla: „Powinniśmy porzucić absurdalną hodowlę żywych kurczaków prowadzoną tylko po to, by zjeść skrzydełko czy pierś, na korzyść osobnej hodowli tych części w specjalnej pożywce” [17].

LITERATURA

- [1] AHMAD RS, IMRAN AHUSSAIN MB, Nutritional composition of meat. *Meat science and nutrition* 2018; **4**.
- [2] ALEXANDER P, BROWN C, ARNETH A, DIAS C, FINNIGAN J, MORAN DROUNSEVELL MDA, Could consumption of insects, cultured meat or imitation meat reduce global agricultural land use? *Global Food Security* 2017; **15**: 22-32.
- [3] AMIT M, CARPENTER MK, INOKUMA MS, CHIU CP, HARRIS CP, WAKNITZ MA, ITSKOVITZ-ELDOR JTHOMSON JA, Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 2000; **227**: 271-8.
- [4] BENJAMINSON MA, GILCHRIST JALORENZ M, In vitro edible muscle protein production system (mpps): stage 1, fish. *Acta Astronautica* 2002; **51**: 879-889.
- [5] BENNETT AJ, PASKEY AC, EBINGER A, PFAFF F, PRIEMER G, HÖPER D, BREITHAUP T A, HEUSER E, ULRICH RG, KUHN JH, BISHOP-LILLY KA, BEER MGOLDBERG TL, Relatives of rubella virus in diverse mammals. *Nature* 2020; **586**: 424-428.
- [6] BENTZINGER CF, WANG YXRUDNICKI MA, Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2012; **4**: a008342.
- [7] BHAT ZFHINA B, Animal-free meat biofabrication. *American Journal of Food Technology* 2011; **6**: 441-459.
- [8] BHAT ZF, KUMAR SBHAT HF, In vitro meat: A future animal-free harvest. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017; **57**: 782-789.
- [9] BHAT ZF, KUMAR SFAYAZ H, In vitro meat production: Challenges and benefits over conventional meat production. *Journal of Integrative Agriculture* 2015; **14**: 241-248.
- [10] BORENSTEIN JT, TERAI H, KING KR, WEINBERG EJ, KAAZEMPUR-MOFRAD MRVACANTI JP, Microfabrication Technology for Vascularized Tissue Engineering. *Biomedical Microdevices* 2002; **4**: 167-175.
- [11] BREWER MS, ZHU LGMCKEITH FK, Marbling effects on quality characteristics of pork loin chops: consumer purchase intent, visual and sensory characteristics. *Meat Sci* 2001; **59**: 153-63.
- [12] BRYANT CJBARNETT JC, What's in a name? Consumer perceptions of in vitro meat under different names. *Appetite* 2019; **137**: 104-113.
- [13] CAMPION DR, The muscle satellite cell: a review. *Int Rev Cytol* 1984; **87**: 225-51.
- [14] CHA JM, PARK S-N, NOH SHSUH H, Time-dependent Modulation of Alignment and Differentiation of Smooth Muscle Cells Seeded on a Porous Substrate Undergoing Cyclic Mechanical Strain. *Artificial Organs* 2006; **30**: 250-258.
- [15] CHEN G, USHIDA TTATEISHI T, Scaffold Design for Tissue Engineering. *Macromolecular Bioscience* 2002; **2**: 67-77.
- [16] CHEN Z, LUCKAY A, SODORA DL, TELFER P, REED P, GETTIE A, KANU JM, SADEK RF, YEE J, HO DD, ZHANG LMARX PA, Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) seroprevalence and characterization of a distinct HIV-2 genetic subtype from the natural range of simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. *J Virol* 1997; **71**: 3953-60.
- [17] CHURCHILL W, Fifty Years Hence. *Strand Magazine* 1931.
- [18] COLLIGNON PJMCEWEN SA, One Health-Its Importance in Helping to Better Control Antimicrobial Resistance. *Tropical medicine and infectious disease* 2019; **4**: 22.
- [19] DATAR IBETTI M, Possibilities for an in vitro meat production system. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2010; **11**: 13-22.
- [20] DE DEYNE PG, Formation of sarcomeres in developing myotubes: role of mechanical stretch and contractile activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; **279**: C1801-11.
- [21] DENNIS RG, KOSNIK PE, 2nd, GILBERT MEFAULKNER JA, Excitability and contractility of skeletal muscle engineered from primary cultures and cell lines. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; **280**: C288-95.

- [22] DEY MOZBOLAT IT, 3D bioprinting of cells, tissues and organs. *Scientific Reports* 2020; **10**: 14023.
- [23] DING S, SWENNEN GNM, MESSMER T, GAGLIARDI M, MOLIN DGM, LI C, ZHOU GPOST MJ, Maintaining bovine satellite cells stemness through p38 pathway. *Scientific Reports* 2018; **8**: 10808.
- [24] DODSON MV, MARTIN EL, BRANNON MA, MATHISON BAMCFARLAND DC, Optimization of bovine satellite cell-derived myotube formation in vitro. *Tissue Cell* 1987; **19**: 159-66.
- [25] EDELMAN PD, MCFARLAND DC, MIRONOV VAMATHENY JG, Commentary: In vitro-cultured meat production. *Tissue Eng* 2005; **11**: 659-62.
- [26] EDWARDS CE, YOUNT BL, GRAHAM RL, LEIST SR, HOU YJ, DINNON KH, SIMS AC, SWANSTROM J, GULLY K, SCOBAY TD, COOLEY MR, CURRIE CG, RANDELL SHBARIC RS, Swine acute diarrhea syndrome coronavirus replication in primary human cells reveals potential susceptibility to infection. *PNAS* 2020; **117**: 26915-26925.
- [27] EFSA, Re-evaluation of alginate acid and its sodium, potassium, ammonium and calcium salts (E 400-E 404) as food additives. *EFSA Journal* 2017; **15**: e05049.
- [28] EZASHI T, TELUGU BPVL, ALEXENKO AP, SACHDEV S, SINHA SROBERTS RM, Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009; **106**: 10993.
- [29] FAO, The State of Food and Agriculture. 2014: <http://www.fao.org/3/i4040e/i4040e.pdf>.
- [30] FAROKHI M, JONIDI SHARIATZADEH F, SOLOUK AMIRZADEH H, Alginate Based Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering: A Review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 2020; **69**: 230-247.
- [31] FONG IW, Animals and Mechanisms of Disease Transmission. *Emerging Zoonoses: A Worldwide Perspective* 2017: 15-38.
- [32] FORTIER M, COMUNALE F, KUCHARCZAK J, BLANGY A, CHARRASSE SGAUTHIER-ROUVIÈRE C, RhoE controls myoblast alignment prior fusion through RhoA and ROCK. *Cell Death Differ* 2008; **15**: 1221-31.
- [33] FURUHASHI M, MORIMOTO Y, SHIMA A, NAKAMURA F, ISHIKAWA HTAKEUCHI S, Formation of contractile 3D bovine muscle tissue for construction of millimetre-thick cultured steak. *npj Science of Food* 2021; **5**: 6.
- [34] GARCÍA-ROJAS P, ANTARAMIAN A, GONZÁLEZ-DÁVALOS L, VILLARROYA F, SHIMADA A, VARELA-ECHAVARRÍA AMORA O, Induction of peroxisomal proliferator-activated receptor gamma and peroxisomal proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 by unsaturated fatty acids, retinoic acid, and carotenoids in preadipocytes obtained from bovine white adipose tissue. *J Anim Sci* 2010; **88**: 1801-8.
- [35] GRINNELL F, Fibroblast & collagen-matrix contraction: growth-factor signalling and mechanical loading. *Trends in Cell Biology* 2000; **10**: 362-365.
- [36] GUO L, LI XTANG Q-Q, Transcriptional regulation of adipocyte differentiation: a central role for CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) β . *The Journal of biological chemistry* 2015; **290**: 755-761.
- [37] HALABOWSKI DRZYMSKI P, Taking a lesson from the COVID-19 pandemic: Preventing the future outbreaks of viral zoonoses through a multi-faceted approach. *Science of The Total Environment* 2020: 143723.
- [38] HAUSER N, GUSHIKEN AC, NARAYANAN S, KOTTILIL SCHUA JV, Evolution of Nipah Virus Infection: Past, Present, and Future Considerations. *Trop Med Infect Dis* 2021; **6**.
- [39] HAYMAN DT, YU M, CRAMERI G, WANG LF, SUU-IRE R, WOOD JLCUNNINGHAM AA, Ebola virus antibodies in fruit bats, Ghana, West Africa. *Emerg Infect Dis* 2012; **18**: 1207-9.
- [40] HELLIWELL RBURTON RJF, The promised land? Exploring the future visions and narrative silences of cellular agriculture in news and industry media. *Journal of Rural Studies* 2021; **84**: 180-191.
- [41] HILL ABT, BRESSAN FF, MURPHY BDGARCIA JM, Applications of mesenchymal stem cell technology in bovine species. *Stem Cell Research & Therapy* 2019; **10**: 44.

- [42] JOCHEMS CE, VAN DER VALK JB, STAFLEU FRBAUMANS V, The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Altern Lab Anim* 2002; **30**: 219-27.
- [43] JUN I, JEONG SSHIN H, The stimulation of myoblast differentiation by electrically conductive sub-micron fibers. *Biomaterials* 2009; **30**: 2038-47.
- [44] JUNG JW, LEE J-SCHO D-W, Computer-aided multiple-head 3D printing system for printing of heterogeneous organ/tissue constructs. *Scientific Reports* 2016; **6**: 21685.
- [45] KADIM IT, MAHGOUB O, BAQIR S, FAYE BPURCHAS R, Cultured meat from muscle stem cells: A review of challenges and prospects. *Journal of Integrative Agriculture* 2015; **14**: 222-233.
- [46] KANATOUS SBMAMMEN PPA, Regulation of myoglobin expression. *The Journal of experimental biology* 2010; **213**: 2741-2747.
- [47] KAZAMA T, FUJIE M, ENDO TKANO K, Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells can transdifferentiate into skeletal myocytes in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008; **377**: 780-785.
- [48] KHADEMHOSEINI A, VACANTI JPLANGER R, Progress in tissue engineering. *Sci Am* 2009; **300**: 64-71.
- [49] KLIMASZYK PRZYMSKI P, *Water and Aquatic Fauna on Drugs: What are the Impacts of Pharmaceutical Pollution?*, in *Water Management and the Environment: Case Studies*, M. Zelenakova, Editor. 2018, Springer International Publishing: Cham. p. 255-278.
- [50] KOLKMANN AM, POST MJ, RUTJENS MAM, VAN ESSEN ALMMOUTSATSOU P, Serum-free media for the growth of primary bovine myoblasts. *Cytotechnology* 2020; **72**: 111-120.
- [51] KUPFER ME, LIN WH, RAVIKUMAR V, QIU K, WANG L, GAO L, BHUIYAN DB, LENZ M, AI J, MAHUTGA RR, TOWNSEND D, ZHANG J, MCALPINE MC, TOLKACHEVA EGGLE BM, In Situ Expansion, Differentiation, and Electromechanical Coupling of Human Cardiac Muscle in a 3D Bioprinted, Chambered Organoid. *Circ Res* 2020; **127**: 207-224.
- [52] LEHMANN R, SEVERITT JC, RODDELKOPF T, JUNGINGER STHUROW K, Biomek Cell Workstation: A Variable System for Automated Cell Cultivation. 2016; **21**: 439-450.
- [53] LI MIKEHARA S, Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for organ repair. *Stem cells international* 2013; **2013**: 132642-132642.
- [54] LI X, ZHANG G, ZHAO X, ZHOU J, DU GCHEN J, A conceptual air-lift reactor design for large scale animal cell cultivation in the context of in vitro meat production. *Chemical Engineering Science* 2020; **211**: 115269.
- [55] LIM MJ, CHOI KJ, DING Y, KIM JH, KIM BS, KIM YH, LEE J, CHOE W, KANG I, HA J, YOON KSKIM SS, RhoA/Rho kinase blocks muscle differentiation via serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and -2. *Mol Endocrinol* 2007; **21**: 2282-93.
- [56] MACKEY AL, MAGNAN M, CHAZAUD BKJAER M, Human skeletal muscle fibroblasts stimulate in vitro myogenesis and in vivo muscle regeneration. *J Physiol* 2017; **595**: 5115-5127.
- [57] MAJOREK KA, POREBSKI PJ, DAYAL A, ZIMMERMAN MD, JABLONSKA K, STEWART AJ, CHRUSZCZ MMINOR W, Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Mol Immunol* 2012; **52**: 174-82.
- [58] MANN A, YADAV RP, SINGH J, KUMAR D, SINGH BYADAV PS, Culture, characterization and differentiation of cells from buffalo (*Bubalus bubalis*) amnion. *Cytotechnology* 2013; **65**: 23-30.
- [59] MATTICK CS, LANDIS AEALLENBY BR, A case for systemic environmental analysis of cultured meat. *Journal of Integrative Agriculture* 2015; **14**: 249-254.
- [60] MAURO A, Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 1961; **9**: 493-5.
- [61] MCFARLAND DC, DOUMIT MEMINSHALL RD, The turkey myogenic satellite cell: Optimization of in vitro proliferation and differentiation. *Tissue and Cell* 1988; **20**: 899-908.
- [62] METICULOUS MARKET RESEARCH, *Alternative Protein Market -Global Opportunity Analysis and Industry Forecast (2020-2027)* 2020: Market Data Forecast, India.
- [63] MIZUNO Y, CHANG H, UMEDA K, NIWA A, IWASA T, AWAYA T, FUKADA S, YAMAMOTO H, YAMANAKA S, NAKAHATA THEIKE T, Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells. *Faseb j* 2010; **24**: 2245-53.

- [64] MOULY V, AAMIRI A, BIGOT A, COOPER RN, DI DONNA S, FURLING D, GIDARO T, JACQUEMIN V, MAMCHAOUI K, NEGRONI E, PÉRIÉ S, RENAULT V, SILVA-BARBOSA SDBUTLER-BROWNE GS, The mitotic clock in skeletal muscle regeneration, disease and cell mediated gene therapy. *Acta Physiol Scand* 2005; **184**: 3-15.
- [65] O'NEILL EN, COSENZA ZA, BAAR KBLOCK DE, Considerations for the development of cost-effective cell culture media for cultivated meat production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2021; **20**: 686-709.
- [66] PANDURANGAN MKIM DH, A novel approach for in vitro meat production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015; **99**: 5391-5.
- [67] POORE JNEMECEK T, Reducing food's environmental impacts through producers and consumers. *Science* 2018; **360**: 987-992.
- [68] POST MJ, Cultured meat from stem cells: Challenges and prospects. *Meat Science* 2012; **92**: 297-301.
- [69] POST MJ, HOCQUETTE JF, Chapter 16 – New Sources of Animal Proteins: Cultured Meat, in *New Aspects of Meat Quality*, P.P. Purslow, Editor. 2017, Woodhead Publishing. p. 425-441.
- [70] POWELL RL, DODSON MV CLOUD JG, Cultivation and differentiation of satellite cells from skeletal muscle of the rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Journal of Experimental Zoology* 1989; **250**: 333-338.
- [71] RIPPLE WJ, WOLF C, NEWSOME TM, BARNARD PMOOMAW WR, World Scientists' Warning of a Climate Emergency. *BioScience* 2020; **70**: 8-12.
- [72] ROOBROUCK VD, ULLOA-MONTOYA FVERFAILLIE CM, Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Exp Cell Res* 2008; **314**: 1937-44.
- [73] RZYMSKI P, KULUS M, JANKOWSKI M, DOMPE C, BRYL R, PETITTE JN, KEMPISTY BMOZDZIAK P, COVID-19 Pandemic Is a Call to Search for Alternative Protein Sources as Food and Feed: A Review of Possibilities. *Nutrients* 2021; **13**.
- [74] SAWICKI W, Malejczyk J., *Histologia. 6th ed.*, 2012, Warszawa: PZWL.
- [75] SCHAEFER GOSAVULESCU J, The Ethics of Producing In Vitro Meat. *Journal of applied philosophy* 2014; **31**: 188-202.
- [76] SHARP PMHAHN BH, Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2011; **1**: a006841-a006841.
- [77] SIEGNER C. *Could India become the next cell-cultured meat hub?* 2019; Available from: <https://www.fooddive.com/news/could-india-become-the-next-cell-cultured-meat-hub/554578/>.
- [78] SIEGRIST MSÜTTERLIN B, Importance of perceived naturalness for acceptance of food additives and cultured meat. *Appetite* 2017; **113**: 320-326.
- [79] SIEGRIST M, SÜTTERLIN BHARTMANN C, Perceived naturalness and evoked disgust influence acceptance of cultured meat. *Meat Science* 2018; **139**: 213-219.
- [80] SINGH A, VERMA V, KUMAR M, KUMAR A, SARMA DK, SINGH BJHAR R, Stem cells-derived in vitro meat: from petri dish to dinner plate. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2020: 1-14.
- [81] SPECHT L, An analysis of culture medium costs and production volumes for cultivated meat. *The Good Food Institute: Washington, DC, USA* 2020.
- [82] STANTON MM, TZATZALOS E, DONNE M, KOLUNDZIC N, HELGASON IILIC D, Prospects for the Use of Induced Pluripotent Stem Cells in Animal Conservation and Environmental Protection. *Stem cells translational medicine* 2019; **8**: 7-13.
- [83] STEPHENS NRUIVENKAMP M, Promise and Ontological Ambiguity in the In vitro Meat Image-scape: From Laboratory Myotubes to the Cultured Burger. *Science as culture* 2016; **25**: 327-355.
- [84] SUN H, XIAO Y, LIU J, WANG D, LI F, WANG C, LI C, ZHU J, SONG J, SUN H, JIANG Z, LIU L, ZHANG X, WEI K, HOU D, PU J, SUN Y, TONG Q, BI Y, CHANG K-C, LIU S, GAO GFLIU J, Prevalent Eurasian avian-like H1N1 swine influenza virus with 2009 pandemic viral genes facilitating human infection. 2020; **117**: 17204-17210.
- [85] TAKAHASHI KYAMANAKA S, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; **126**: 663-76.

- [86] TELUGU BP, PARK K-EPARK C-H, Genome editing and genetic engineering in livestock for advancing agricultural and biomedical applications. *Mammalian Genome* 2017; **28**: 338-347.
- [87] TIZARD IR, Vaccination against coronaviruses in domestic animals. *Vaccine* 2020; **38**: 5123-5130.
- [88] TROY A, CADWALLADER AB, FEDOROV Y, TYNER K, TANAKA KKOLWIN BB, Coordination of satellite cell activation and self-renewal by Par-complex-dependent asymmetric activation of p38 α / β MAPK. *Cell Stem Cell* 2012; **11**: 541-53.
- [89] TUOMISTO HLDE MATTOS MJ, Environmental impacts of cultured meat production. *Environ Sci Technol* 2011; **45**: 6117-23.
- [90] WHO, *Human infection with avian influenza A(H5) viruses*, in *Avian Influenza Weekly Update*. 2021.
- [91] WIEDŁOCHA A, NILSEN T, WESCHE J, SØRENSEN V, MAŁECKI J, MARCINKOWSKA EOLSNES S, Phosphorylation-regulated nucleocytoplasmic trafficking of internalized fibroblast growth factor-1. *Mol Biol Cell* 2005; **16**: 794-810.
- [92] WILSCHUT KJ, JAKSANI S, VAN DEN DOLDER J, HAAGSMAN HPROELEN BA, Isolation and characterization of porcine adult muscle-derived progenitor cells. *J Cell Biochem* 2008; **105**: 1228-39.
- [93] WOOD JD, RICHARDSON RI, NUTE GR, FISHER AV, CAMPO MM, KASAPIDOU E, SHEARD PRENSER M, Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Sci* 2004; **66**: 21-32.
- [94] WOOLHOUSE MGAUNT E, Ecological origins of novel human pathogens. *Crit Rev Microbiol* 2007; **33**: 231-42.
- [95] WORLD ECONOMIC FORUM. *Meat: The Future Series Alternative Proteins*. 2018; Available from: http://www3.weforum.org/docs/White_Paper_Meat_the_Future_Time_Protein_Portfolio_Meet_Tomorrow_Demand_report_2018.pdf.
- [96] YABLONKA-REUVENI Z, QUINN LSNAMEOFF M, Isolation and clonal analysis of satellite cells from chicken pectoralis muscle. *Developmental biology* 1987; **119**: 252-259.
- [97] YADAV PS, SINGH RKSINGH B, Fetal Stem Cells in Farm Animals: Applications in Health and Production. *Agricultural Research* 2012; **1**: 67-77.
- [98] YOUNG JF, THERKILDSEN M, EKSTRAND B, CHE BN, LARSEN MK, OKSBJERG NSTAGSTED J, Novel aspects of health promoting compounds in meat. *Meat Science* 2013; **95**: 904-911.
- [99] ZENG XRAO MS, Human embryonic stem cells: long term stability, absence of senescence and a potential cell source for neural replacement. *Neuroscience* 2007; **145**: 1348-58.
- [100] ZHANG G, ZHAO X, LI X, DU G, ZHOU JCHEN J, Challenges and possibilities for bio-manufacturing cultured meat. *Trends in Food Science & Technology* 2020; **97**: 443-450.
- [101] ZHANG Y, LI H, LIAN ZLI N, Myofibroblasts protect myoblasts from intrinsic apoptosis associated with differentiation via β 1 integrin-PI3K/Akt pathway. *Dev Growth Differ* 2010; **52**: 725-33.

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 20.05.2021

Przyjęto: 26.06.2021

Piotr Rzymski

Zakład Medycyny Środowiskowej,

Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

ul. Rokietnicka 8, 60-806 Poznań

tel.: (61) 854-76-04

e-mail: rzymskipiotr@ump.edu.pl