



Dokonania biotechnologii rozrodu zwierząt na przestrzeni ostatnich 20 lat – przykłady badań własnych

Zdzisław Smorąg
Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki,
Państwowy Instytut Badawczy, Balice

Achievements in biotechnology of animal reproduction over the past 20 years – case studies

Summary

Animal reproduction biotechnology is an area of fast development with possibilities of practical applications not only in breeding, but in pharmacy and biomedicine as well. Its growth has been achieved thanks to the results of last decades of the previous century in embryology, endocrinology, and molecular biology. The paper contains very brief description of the achievements of NRIAP Department of Animal Reproduction Biotechnology during the last 20 years in mammalian sex regulation, cryobiology of gametes and embryos, *in vitro* production of embryos, cloning and animal transgenesis.

Key words:

sex regulation gamete, reproduction, biotechnology, farm animals, embryo, cryoconservation, IVP, cloning, transgenesis.

1. Wstęp

Ostatnie dwudziestolecie to czas ważnych osiągnięć nauk biologicznych, jakie pojawiły się głównie za sprawą biologii molekularnej, embriologii, a także inżynierii genetycznej. Doskonalono równocześnie techniki oraz sprzęt na potrzeby laboratoryjne. W rezultacie otwarły się nowe możliwości rozwoju biotechnologii rozrodu zwierząt niosące ze sobą bardzo duży potencjał aplikacyjny. Jest on jednak w chwili obecnej wykorzystywany w niewielkim stopniu, chociaż niektóre z metod mogą już mieć praktyczne zastosowanie.

Adres do korespondencji

Zdzisław Smorąg,
Dział Biotechnologii
Rozrodu Zwierząt,
Instytut Zootechniki,
Państwowy Instytut
Badawczy,
32-083 Balice k. Krakowa

biotechnologia

3 (90) 47–52 2010

Należy tutaj zaznaczyć, że wspomniane możliwości aplikacyjne biotechnologii rozrodu wykraczają daleko poza zainteresowania samej hodowli i produkcji zwierzęcej, a dotyczą również farmacji i biomedycyny.

W artykule przedstawiono – na przykładzie rozwijanych w Instytucie Zootechniki PIB badań z zakresu biotechnologii zwierząt – główne dokonania w tej dziedzinie na przestrzeni ostatnich dwudziestu lat.

2. Badania z zakresu embriologii eksperymentalnej i aplikacyjnej oraz regulacji płci ssaków

Pod koniec lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku nastąpił burzliwy rozwój i doskonalenie metod długotrwałej konserwacji oocytów i zarodków ssaków, a także metod zapłodnienia pozaustrojowego, co wiązało się z wykorzystaniem tych technologii w praktyce przenoszenia zarodków. Wspomniane metody wiązały się z coraz głębszym poznawaniem embriologii, a także metod synchronizacji i superowulacji samic zwierząt gospodarskich, zwłaszcza bydła.

Nad zagadnieniami tymi pracowało bardzo wiele ośrodków na świecie, wśród nich także ówczesny Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt IZ, który już w roku 1976 mógł się poszczycić pierwszymi w Polsce i jednymi z nielicznych na świecie jagniętami (1), a w roku 1977 pierwszymi w Polsce cielętami urodzonymi po transplantacji mrożonych zarodków (2). W roku 1988 opracowano efektywną metodę kriokonserwacji zarodków króliczych poprzez ich witrifikację (3). Były to pierwsze w świecie zwierzęta urodzone po przeniesieniu zarodków kriokonserwowanych przy użyciu tej metody. Rok później urodziły się pierwsze w świecie jagnięta po przeniesieniu witrifikowanych zarodków (4). W 1994 r. uzyskaliśmy pierwsze w kraju cielę po przeniesieniu witrifikowanych zarodków (5), a w roku 2003 udało się uzyskać prosięta po transplantacji witrifikowanych zarodków (6), co zważywszy na duże trudności kriokonserwacji zarodków świni jest miarą postępu w badaniach, jaki nastąpił na przestrzeni ostatnich dwudziestu lat.

Badania z zakresu pozaustrojowego uzyskiwania zarodków zostały przez nas zapoczątkowane w latach osiemdziesiątych i zaowocowały urodzeniem się pierwszego w kraju cielęcia po transplantacji zarodka wyprodukowanego w wyniku użycia kompleksowej metody, a zatem oocytu dojrzewającego *in vitro* zapłodnionego również *in vitro* i hodowli uzyskanych zygot do stadium blastocysty (7). W latach 90. ubiegłego wieku oraz w ostatnich latach prace dotyczące pozustrojowego uzyskiwania zarodków były szeroko prowadzone głównie u bydła i dotyczyły takich aspektów technologii, jak warunki dojrzewania oocytów, kapacytacji plemników używanych do zapłodnienia *in vitro*, uwarunkowań samego procesu zapłodnienia oraz hodowli *in vitro* uzyskiwanych *in vitro* zygot. Na uwagę zasługuje też rozwój metody uzyskiwania oocytów u bydła pod kontrolą USG, czego rezultatem było m.in. urodzenie się cieląt po zastosowaniu tej technologii (8). W ostatnich latach prace do-

tyczące pozaustrojowego zapłodnienia poszerzono o kozy uzyskując na tej drodze pierwsze kozłeta (9). Badania przeprowadzone w ostatnich latach dotyczące szeroko rozumianej problematyki pozaustrojowego uzyskiwania zarodków poszerzono o hodowlę przedantralnych i wczesnoantralnych pęcherzyków jajnikowych u bydła oraz badań ekspresji genów we wczesnych zarodkach tego gatunku (10).

Dzięki rozwojowi techniki cytometrycznej obecnie stała się możliwa w Polsce regulacja płci zwierząt. W wyniku szeroko zakrojonych badań w roku 2003 uzyskano w Instytucie Zootechniki pierwsze cielę urodzone po inseminacji nasieniem seksowanym, czyli nasieniem, w którym przy użyciu cytometrii przepływowej plemniki nasienia rozdzielano na frakcję zawierającą plemniki „męskie” oraz frakcję zawierającą plemniki „żeńskie” (11).

Na uwagę zasługuje też rozwój metod seksowania zarodków ssaków (12). Metoda ta była przez nas rozwijana i zweryfikowana praktycznie, w wyniku czego potwierdzono możliwość regulacji płci ssaków jest ona jednak dużo mniej atrakcyjna dla praktyki niż seksowanie nasienia.

3. Badania z zakresu inżynierii genetycznej

3.1. Klonowanie zarodkowe i somatyczne

Opanowanie w latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku metod zapłodnienia *in vitro*, a także metod superowulacji i niechirurgicznego uzyskiwania zarodków dało impuls do badań nad klonowaniem zarodkowym ssaków w odniesieniu do zwierząt gospodarskich stając się metodą uzyskiwania identycznych osobników na drodze bisekcji. Ich rezultatem było uzyskanie pierwszych w Polsce „sztucznych” bliźniąt u owiec (13) i bydła (14). W późniejszym okresie opracowaliśmy oryginalną metodę bisekcji zarodków ograniczającą straty komórkowe podczas tego procesu (15).

Przełom, jaki nastąpił w klonowaniu somatycznym za sprawą narodzin owcy Dolly, wyzwolił oprócz dyskusji natury etycznej duże zainteresowanie metodą poszukiwania bardziej efektywnych technologii klonowania somatycznego. W tym zakresie opracowaliśmy nową oryginalną metodę klonowania królika (16). Opracowana przez nas metoda klonowania jest bardziej efektywna od dotychczas stosowanych – i jak sądzimy z biotechnologicznego punktu widzenia – może to być metoda bardziej bezpieczna.

W wyniku prowadzonych przez nas prac z zastosowaniem „klasycznej” metody klonowania somatycznego uzyskaliśmy klonalne kozłeta.

Technologicznym czynnikiem limitującym praktyczne zastosowanie klonowania somatycznego ssaków jest niska efektywność metody mierzona zarówno odsetkiem rodzących się zwierząt klonalnych jak również prawidłowym ich rozwojem. Zwiększenie naszej wiedzy dotyczącej poszczególnych etapów technologii klonowania

somatycznego powinno w perspektywie kilku czy kilkunastu lat tę sytuację zmienić. Zespół nasz włącza się do tych badań przyczyniając się do rozwoju metody (17).

Możliwości aplikacyjne klonowania somatycznego ssaków będą uwarunkowane nie tylko rozwojem samej technologii, ale także przyzwoleniem społecznym i wynikającymi z tego regulacjami prawnymi. Podobnie jak w odniesieniu do transgenezy zwierząt użytkowych również w odniesieniu do klonowania somatycznego ssaków opinia społeczna jest o wiele bardziej przychylna, gdy mamy do czynienia z jej zastosowaniem do realizacji celów związanych z farmacją i medycyną niż jej wykorzystaniem do produkcji żywności. Z tych też m.in. powodów nasze obecne ukierunkowanie badań na cele związane z farmacją i medycyną, takie jak stosowanie klonowania somatycznego do uzyskiwania transgenicznych świń na potrzeby ksenotransplantacji. Zaowocowały one jak dotychczas uzyskaniem 10 ciężarnych świń (18).

3.2. Transgeneza zwierząt

Pierwsze prace nad transgenezą zwierząt rozpoczęto w Instytucie Zootechniki w roku 1988, a w roku 1994 uzyskano pierwsze w Polsce transgeniczne króliki (19) oraz świnię (20,21). Celem tych badań była poprawa cech użytkowych. Wraz z rozwojem transgenezy coraz wyraźniej zaczęły się krystalizować kierunki i możliwości jej wykorzystania. Oprócz wspomnianego już celu, jakim była poprawa cech użytkowych zwierząt, a zatem zmiana składu mięsa czy mleka, powstawały nowe kierunki transgenezy zwierząt mające na celu ich wykorzystanie jako modelu w badaniach dotyczących funkcji i regulacji genów u człowieka oraz wykorzystania transgenicznych zwierząt jako źródła biofarmaceutyków, m.in. w postaci rekombinowanych białek czy organów do ksenotransplantacji. Ten ostatni kierunek był przez nas rozwijany jako główny w ciągu ostatniego dziesięciolecia.

W ramach jednego z tych programów w roku 2001 uzyskaliśmy we współpracy z grupą prof. R. Słomskiego z Instytutu Genetyki Człowieka PAN i Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu transgeniczne króliki posiadające wbudowany gen ludzkiego hormonu wzrostu. Badania ekspresji transgenu wykazały obecność ludzkiego hormonu wzrostu w mleku królic (22-24).

W innych naszych badaniach prowadzonych we współpracy z prof. R. Słomskim wykorzystujemy transgenezę do uzyskania świni z wbudowanymi do jej genomu genami odpowiedzialnymi za modyfikacje bariery immunologicznej człowiek-świnia. Badania te prowadziliśmy w ramach interdyscyplinarnego projektu zamawianego, którego rezultatem w pierwszym etapie było urodzenie się w 2003 r. transgenicznych świń posiadających zintegrowany gen odpowiedzialny za modyfikację bariery immunologicznej człowiek-świnia. Drugi etap obecnie realizowanego projektu ma na celu wyhodowanie świń z tzw. „wielopiętrową” transgenezą wolnych od retrowirusów, których organy będą mogły być wykorzystane w badaniach przedklinicznych

z udziałem naczelnych. Z kolei badania prof. J. Jury i wsp. (25) dotyczyły uzyskiwania transgeniczných królików.

Przedstawione w dużym uproszczeniu dokonania biotechnologii rozrodu na przestrzeni ostatnich dwudziestu lat uświadamiają nam, że jest to dziedzina, której możliwości wykorzystania nie tylko w hodowli, lecz także w medycynie i farmacji są rozległe i do końca nie rozpoznane. Badania z tego zakresu wymagające niezwyklej zupełnie specjalizacji z jednej strony, by zaowocować konkretnym produktem, z drugiej strony zaczynają wymuszać interdyscyplinarną współpracę między różnymi instytucjami naukowymi (np. w projekcie ksenotransplantacyjnym bierze udział 11 zespołów badawczych z kilku ośrodków naukowych naszego kraju).

Problemy natury prawnej, etycznej, religijnej, jakie zaczynają się pojawiać w związku z tymi badaniami wymagać będą wyważonych i dalekowzrocznych decyzji w postaci odpowiednich regulacji prawnych.

Literatura

1. Smorąg Z., Wierzbowski S., Wierzchoś E., (1978), Bull. L'Acad Pol.Sci. Vol. XXVI, no 4, 273-275.
2. Smorąg Z., Wierzbowski S., Wierzchoś E., Kareta W., Gajda B., (1977), Medycyna Wet., 33 (9), 552-552.
3. Smorąg Z., Gajda B., Wieczorek B., Jura J., (1989), Theriogenology, 31 (6), 1227-1231.
4. Gajda B., Smorąg Z., Wierzbowski S., Jura J., Wieczorek B., (1989), Zuchthygiene, 24, 97-100.
5. Smorąg Z., Gajda B., (1994), ABC, 4 (1-2), 27-31.
6. Gajda B., Smorąg Z., Wieczorek B., (2004), Medycyna Wet., 60, 371-373.
7. Kątska, L., Smorąg Z., Bak M., Wierzbowski S., (1991), Medycyna Wet., 47, 169-171.
8. Smorąg Z., Gogol P., Kątska L., Jażdżewski J., (1999), Medycyna Wet., 55(5), 317-320.
9. Kątska-Książkiewicz L., Ryńska B., Gajda B., Smorąg Z., (2004), Theriogenology, 62, 576-586.
10. Kątska-Książkiewicz L., Alm H., (2005), Arch. Tierz. Dummerstorf, 48, 562-571.
11. Bochenek M., Smorąg Z., (2005), Medycyna Wet., 61(1), 50-52.
12. Wayda E., Plucienniczak G., Jura J., Plucinniczak A., Kątska L., Skrzyszowska M., Smorąg Z., (1995), Medycyna Wet., 9, 530-532.
13. Smorąg Z., Ozil J. P., Modliński J., Wierzchoś E., Babusik P., Skrzyszowska M., (1985), Medycyna Wet., 10, 627-629.
14. Skrzyszowska M., Znaniecki R., Bychawski S., Smorąg Z., (1988), Medycyna Wet., 7, 412-414.
15. Skrzyszowska M., Smorąg Z., Kątska L., (1997), Theriogenology, 48, 551-557.
16. Skrzyszowska M., Smorąg Z., Słomski R., Kątska-Książkiewicz L., Kalak R., Michalak E., Wielgus K., Lehmann J., Lipiński D., Szalata M., Pławski A., Samiec M., Jura J., Gajda B., Ryńska B., Pięnkowski M., (2006), Biol. Reprod., 74, 1114-1120.
17. Skrzyszowska M., Samiec M., Słomski R., Lipiński D., Mały E., (2008), Theriogenology, 70(2), 248-259.
18. Skrzyszowska M., Samiec M., Smorąg Z., Gajda B., Wieczorek J., Słomski R., (2007), *Proceedings of the Conference on Reproductive and Developmental Biology*, Prague (Czech Republic), 34.
19. Smorąg Z., Jura J., Kopchick J. J., Gajda B., Skrzyszowska M., Różycki M., Pasięka J., (1998), Biotechnologia, 2(41), 145-153.
20. Różycki M., Smorąg Z., Kopchick J. J., Chen W. Y., Jura J., Pasięka J., Orzechowska B., Gajda B., Skrzyszowska M., (1999), Journal Applied Genetic., 40 (1), 29-37.
21. Jura J., Smorąg Z., Gajda B., Skrzyszowska M., Kopchick J. J., Kelder B., Prieto P. A., Kareta W., Pasięka J., (2000), Roczniki Naukowe Zootechniki, 5, 246-250.

22. Lipiński D., Jura J., Kalak R., Pławski A., Kala M., Szalata M., Jarmuż M., Korcz A., Słomska K., Jura J., Groniek P., Smorąg Z., Pieńkowski M., Słomski R., (2003), *J. Appl. Genet.*, 44(2), 165-174.
23. Kalak R., Lipiński D., Wielgus K., Jarmuż M., Jura J., Szalata M., Michalak E., Pławski A., Kaczmarek M., Nuc K., Korcz A., Groniek P., Smorąg Z., Pieńkowski M., Słomski R., (2004), *Ann. Anim. Sci.*, 4, 2, 241-252.
24. Szalata M., Lipiński D., Kalak R., Toboła P., Lehmann J., Wielgus K., Jura J., Smorąg Z., Pieńkowski M., Słomski R., (2004), *Ann. Anim. Sci.*, 4, 2, 351-362.
25. Jura J., Jura J., Murzyn K., Węgrzyn P., Zarębski A., (2005), *BBA-Gene Structure and Expression*, 1727, 1, 58-64.