

Jacek A. ModlińskiZakład Embriologii,
Instytut Zoologii
Uniwersytet Warszawski
Warszawa**Biotechnologiczne metody
sterowania
pozapłciowym rozrodem ssaków**

Człowiek hoduje wiele gatunków zwierząt, w tym liczne zwierzęta gospodarskie, doskonali ich rasy, stara się zwiększać ich płodność, odporność na choroby itp. Jednakże klasyczne metody rozrodu i hodowli są ograniczone. W celu uzyskania efektywniejszej możliwości sterowania rozrodem stała się konieczna eksperymentalna ingerencja w ich procesy rozwojowe. Wymaga to prowadzenia wszechstronnych badań, zwłaszcza nad mechanizmami gametogenezy i embriogenezy ssaków. Badania te oprócz wartości czysto poznawczych przynieść mogą, w odniesieniu do zwierząt gospodarskich, określone korzyści ekonomiczne, związane przede wszystkim ze wzrostem produkcji zwierzęcej oraz możliwością uzyskiwania – na znacznie szerszą skalę – zwierząt o szczególnie cennych właściwościach genetycznych. Okazać się mogą również skuteczne w ochronie przed wyginieciem szeregu zagrożonych ras i gatunków.

W pracach tych bardzo pomocne okazało się opracowanie i wprowadzenie nowych technik, takich jak: hormonalne indukowanie owulacji, zapłodnienie i hodowla *in vitro*, mikrochirurgia, czy wreszcie transformowanie genomu zarodka poprzez iniekcję DNA.

W artykule tym chciałbym omówić jedną z dziedzin biotechnologii jaką jest klonowanie zarodków ssaków. Stwarza ono możliwość, omijając drogę rozrodu płciowego, uzyskania wielu genetycznie identycznych osobników wywodzących się z jednego zarodka. Określane są one często mianem wieloraczków monozygotycznych (*monozygotic multiplets*). Stanowią one cenny materiał eksperymentalny w różnego typu badaniach podstawowych, a także w badaniach ich fizjologii, żywienia czy też wpływu czynników środowiskowych. Jeżeli okaże się również, że możliwe jest ich uzyskiwanie na szerszą niż dotąd skalę, to wówczas staną się one z pewnością przedmiotem dużego zainteresowania hodowców. W klonowaniu zarodków ssaków stosuje się takie techniki jak: izolacja blastomerów, reagregacja blastomerów (klonowanie chimerowe), dzielenie zarodków oraz transplantacja jąder zarodków do zapłodnionych i nie zapłodnionych komórek jajowych.

I. Klonowanie zarodków metodą izolacji blastomerów

Bruzdowanie jest specyficznym typem podziałów, którym nie towarzyszy wzrost komórek i które przekształcają dużą jednokomórkową zygotę w strukturę wielokomórkową. W miarę kolejnych podziałów rozmiary komórek, jak również stosunek objętości cytoplazmy do objętości jądra, zbliżają się do wartości charakterystycznych dla komórek dorosłego organizmu. Powstające komórki potomne (blastomery) są początkowo identyczne i teoretycznie każdy z nich posiada możliwość (potencję) utworzenia wszystkich typów komórek, a zatem również teoretycznie – z każdego z nich może powstać cały organizm. Pierwsze przejawy zróżnicowania blastomerów zachodzą prawdopodobnie w okresie kiedy zarodek, nazywany w tym stadium morułą, ulega procesowi tzw. kompaktacji. Zewnętrznym objawem kompaktacji jest ścisły kontakt pomiędzy blastomerami zaś sam zarodek ulega wyraźnemu zaokrągleniu. W tym okresie zewnętrznie położone komórki zarodka podlegają zmianom prowadzącym do utworzenia z nich trofoektodermi przyszłej blastocysty. Moment, w którym zmiany te stają się już nieodwracalne wyznacza czas, od którego totipotencja pewnych przynajmniej blastomerów zostaje ograniczona.

Najlepszą metodą pozwalającą na określenie potencji rozwojowych poszczególnych blastomerów lub ich grup jest ich wyizolowanie z zarodka i badanie do jakiego stopnia są one zdolne

do regulowania swojego rozwoju – przy braku pozostałych komórek zarodka. Badanie potencji rozwojowych izolowanych blastomerów nie może oczywiście ograniczyć się tylko do jednego gatunku. Istniejące różnice w rozwoju wielu gatunków ssaków skłaniają do przypuszczeń, że również potencje rozwojowe blastomerów ich zarodków mogą być różne.

Próby uzyskania osobników z pojedynczych blastomerów zarodków sięgają swoim początkiem pionierskich doświadczeń przeprowadzonych przez Nicholasa i Halla (1), Seidela (2,3) i Tarkowskiego (4,5). Autorzy ci, niszcząc cienką igłą jeden z dwu blastometrów 2-komórkowego zarodka uzyskali u szczura, królika i myszy rozwój drugiego nie zniszczonego blastomeru. Badania te wykazały więc, że na stadium 2-komórkowym pojedyncze blastomery są w pełni totipotenne i każdy z nich zawiera wszystkie elementy potrzebne dla podtrzymania rozwoju aż do momentu urodzenia. Jeżeli pojedyncze blastomery zarodków 2-komórkowych zachowują pełną potencję rozwojową nasuwa się pytanie czy potencja ta zachowana jest również przez blastomery pochodzące ze starszych zarodków? Jeśli tak, to czy jest ona właściwa wszystkim blastomerom pochodzącym z jednego zarodka czy też dotyczy tylko niektórych z nich?

Modliński (6) oraz Bronson i McLaren (7) wykazali, że pojedyncze blastomery oraz wczesne zarodki pozbawione osłonki przejrzystej nie są w stanie rozwijać się w jajowodzie samicy biorczyny. Z tego względu konieczne stało się opracowanie takich metod, które umożliwiłyby rozwój blastomerów pozbawionych osłonek przejrzystych. Jedną z nich jest hodowla izolowanych blastomerów *in vitro*, do momentu osiągnięcia przez nie stadium kompaktnej moruli lub blastocysty. W tym stadium zarodki mogą być już bez osłonki przejrzystej przeszczepiane do jajowodu lub macicy biorczyny. Izolowane blastomery można też przeszczepiać do zastępczych „pustych” osłonek przejrzystych. Osłonki, do których przeszczepiane są blastomery nie muszą pochodzić z zarodków tego samego gatunku, przynajmniej w przypadku blastomerów owcy (Ozil, inf. ustna), bydła i konia (8,9,10). Inną jeszcze metodę ochrony izolowanych blastomerów opracował Willadsen (11). Polega ona na zamykaniu przeszczepionych do osłonek blastomerów w agarowych minibloczkach wprowadzanych następnie do podwiązanych jajowodów biorczyń pośrednich. Po kilku dniach, kiedy przeszczepione blastomery rozwiną się do stadium blastocysty, uwalniane są one z agarowej osłonki i przeszczepiane do zsynchronizowanych biorczyń. Pośrednie biorczynie do których transplantuje się rozwijające się blastomery lub zarodki nie muszą być samicami tego samego gatunku. Bruzdokujące zarodki owcy i bydła przeszczepiać można do jajowodów królika (12,13), zaś zarodki bydła, świni i konia do jajowodów owcy (14). Ostatnio próbuje się używać do tego celu, także małych zwierząt laboratoryjnych, głównie niedojrzałych płciowo samic myszy. Stosując tę metodę Papaioannou i Ebert (15) uzyskali rozwój zarodków królika i świni zaś Modliński (dane nie publikowane) zapłodnionych oocytów bydłęcych.

Dokładną analizę możliwości rozwojowych izolowanych blastomerów przeprowadzili na zarodkach myszy Tarkowski (4,5) oraz Tarkowski i Wróblewska (16). Wykazali oni, że o ile stosunkowo wysoki, procent blastomerów pochodzących z zarodków 2- i 4-komórkowych rozwinąć się może do stadium blastocysty, to w przypadku pojedynczych blastomerów pochodzących z zarodków 8-komórkowych tylko ok. 15% z nich zdolnych jest do utworzenia morfologicznie normalnych blastocyst. Rozwój pozostałych blastomerów zostaje bądź zahamowany, bądź też tworzą one pęcherze trofoblastyczne pozbawione wężła zarodkowego. Dotyczy to również części blastomerów pochodzących z zarodków 4-komórkowych. Tarkowski i Wróblewska (16) wprowadzili również, stosowane do dzisiaj, nazewnictwo blastomerów izolowanych z zarodków w różnym stadium rozwojowym. Pojedyncze blastomery izolowane z zarodków 2-komórkowych określane są mianem blastomerów 1/2, blastomery z zarodków 4-komórkowych mianem blastomerów 1/4 itp.

Blastomery myszy izolowane z zarodków 2-komórkowych tworzą normalne zarodki rozwijające się aż do urodzenia (4,5). Oba blastomery posiadają te same możliwości rozwojowe o czym świadczy uzyskanie wielu par monozygotycznych bliźniąt (17,18). Natomiast zarodki rozwijające się z pojedynczych blastomerów 1/4 i 1/8 wywoływać mogą reakcję doczesnową w macicy. W sporadycznych tylko przypadkach blastomery 1/4 rozwijają się do stadium wczesnego cylindra zarodkowego (19).

T a b e l a 1

Potencje rozwojowe izolowanych blastomerów różnych gatunków ssaków

Gatunek	Typ blastomerów			
	1/2	1/4	2/8 (2x1/8)	1/8
mysz	+	wczesny cylinder zarodkowy	blastocysta	blastocysta
królik	+	+	+	+
bydło	+	+	+	-
owca	+	+	+	+
świnia	+	+	blastocysta	blastocysta
koń	+	+	-	-
człowiek	+ ?	-	-	-

+ - oznaczono możliwość pełnego rozwoju aż do urodzenia.

Pojedyncze blastomery innych gatunków ssaków posiadają znacznie większe możliwości rozwojowe. Moore i wsp. (20) uzyskali pełny rozwój blastomerów królika izolowanych na stadium 2-, 4- i 8-komórkowym. Również u owcy totipotencja pojedynczych blastomerów zachowana jest do stadium 8-komórkowego (21, 22, 23). Nie wiadomo dokładnie jak przedstawia się sytuacja u bydła, gdyż uzyskane do tej pory potomstwo pochodziło z par blastomerów 1/8, a nie z pojedynczych (10). Świadczy to pośrednio o totipotencji blastomerów 1/4 u bydła, nie dowodzi jednak totipotencji blastomerów 1/8. Z drugiej jednak strony pewne zespoły blastomerów pochodzące ze starszych zarodków bydłęcych zachowują nadal totipotencję, o czym świadczą pomyślne wyniki uzyskane przez Willadsena i wsp. (9) po transplantacji do biocyrni „ćwiartek” zarodków 32-64-komórkowych. U konia totipotencja blastomerów utrzymana jest przynajmniej do stadium 4-komórkowego (8), zaś u świni pełny rozwój stwierdzono, jak na razie, jedynie w przypadku blastomerów 1/2 (Willadsen i Polge - dane nie publikowane). U świni rozwój blastomerów 1/4 i 1/8 testowano w hodowli *in vitro* (24,25) i stwierdzono, że rozwijając się one mogą do stadium blastocysty.

Przeprowadzone do tej pory badania nie wykazały totipotencji wszystkich blastomerów pochodzących z jednego zarodka liczącego więcej niż dwie komórki. U owcy udało się otrzymać, w najlepszym przypadku pełny rozwój trzech blastomerów 1/4 pochodzących z jednego zarodka 4-komórkowego oraz tylko jednego blastomeru 1/8 zarodka 8-komórkowego. Z drugiej jednak strony uzyskanie przez Willadsena (22) czworaczki wywodzących się z par blastomerów 1/8 jednego zarodka 8-komórkowego, świadczy pośrednio (jeśli były to blastomery siostrowane) o totipotencji wszystkich blastomerów 4-komórkowego zarodka owcy.

T a b e l a 2

Monozygotyczne ciąży uzyskane z izolowanych blastomerów

Gatunek	Liczba i stadium izolowanych blastomerów				
	2x1/2	2x2/4	4x1/4	4x2/8	8x1/8
mysz	**				
bydło	-	**	** ***	** ***	
owca	**	**	**	** ****	*****
świnia	**		**		

** - bliźnięta, *** - trojaczki, **** - czworaczki, ***** - pięcioraczki.

Także we wspomnianych już doświadczeniach Willadsena i Polge'a (10), uzyskano u bydła trojaczki po transplantacji czterech par blastomerów 1/8 pochodzących z jednego zarodka blastomerów 1/4 4-komórkowego zarodka u bydła. W większości jednak przypadków uzyskano u tych gatunków rozwój tylko jednego lub dwu blastomerów i nie wydaje się, aby w najbliższym czasie można było zwiększyć efektywność tej metody. Przyczyny niepowodzeń mogą być rozmaite. Wynikać mogą z braku totipotencji pewnych blastomerów, mogą być skutkiem stosowanych metod usuwania osłonki przejrzystej, izolacji blastomerów, uszkodzenia blastomerów w czasie mikromanipulacji czy wreszcie warunków hodowli. Tarkowski i Wróblewska (16) uważają, że możliwości rozwojowe pojedynczych blastomerów maleją tym bardziej im później są one izolowane. Wiąże się to niewątpliwie zarówno ze zmniejszaniem się objętości blastomerów stanowiących wyjściową masę zarodka (zarodki w okresie brudzkowania nie rosną) jak i z coraz mniejszą liczbą komórek osiąganą przez te zarodki w momencie powstawania blastocysty. Według zaproponowanej przez Tarkowskiego i Wróblewską (16) hipotezy *inside-outside* węzeł zarodkowy powstaje z wewnętrznych komórek zarodka, które muszą być całkowicie otoczone komórkami zewnętrznymi stanowiącymi materiał na trofoektodermę. Ponieważ moment tworzenia się blastocysty jest dość ściśle określony, w wielu przypadkach dojść może do sytuacji, w której zarodek wywodzący się z blastomeru 1/4 lub 1/8 nie zawiera w momencie przekształcania się w blastocystę wystarczającej liczby komórek wewnętrznych, niezbędnych do utworzenia funkcjonalnego węzła zarodkowego. U myszy, aby rozwój poimplantacyjny zachodzić mógł prawidłowo wyjściowa liczba komórek węzła zarodkowego nie może być prawdopodobnie mniejsza niż trzy (26,27). Można jednak sądzić, że u tych gatunków, u których jama blastocysty tworzy się później niż u myszy (królik, owca) szansa powstania z pojedynczego blastomeru morfologicznie normalnej blastocysty powinna być znacznie większa. Uzyskane do tej pory wyniki potwierdzają te sugestie.

II. Klonowanie metodą agregacji blastomerów (klonowanie chimerowe)

Metoda ta opiera się na wspomnianej już hipotezie Tarkowskiego i Wróblewskiej (16). Zakłada się, że jeżeli pojedynczy blastomer 1/4 lub 1/8 otoczy się innymi, to zwiększa się w ten sposób wyjściową masę zarodka, a jednocześnie zwiększa się szansę, że węzeł zarodkowy utworzony zostanie z centralnie ułożonych blastomerów. Agregację izolowanych blastomerów z blastomerami nośnikowymi przeprowadza się na ogół według metody opracowanej przez Tarkowskiego (28) dla produkcji zarodków chimerowych.

Tego typu doświadczenia przeprowadzone zostały po raz pierwszy na izolowanych blastomerach myszy (29,30), a następnie z powodzeniem powtórzone przez Willadsena i Fehilly (dane nie publikowane, wg 31). Autorzy ci łączyli pojedyncze blastomery 1/8 z blastomerami nośnikowymi 1/4 i uzyskali między innymi monozygotyczne pięcioraczki pochodzące z pięciu blastomerów 1/8 jednego zarodka 8-komórkowego. Pięcioraczki te stanowią, jak na razie, najliczniejszy klon uzyskany u ssaków (31).

Mimo potencjalnie dużych możliwości, metoda ta nie znalazła dotychczas praktycznego zastosowania w klonowaniu zarodków ssaków.

Pewną odmianą chimerowego klonowania jest technika opracowywana obecnie w Zakładzie Embriologii Uniwersytetu Warszawskiego. Polega ona na mikrochirurgicznym wprowadzaniu blastomerów do blastocyst, z których mikrochirurgicznie usunięty został uprzednio węzeł zarodkowy. Założeniem tej metody jest to, że wprowadzone blastomery utworzą jedynie funkcjonalny węzeł zarodkowy, nie będą natomiast musiały już tworzyć trofoektodermę blastocysty. W pilotowych doświadczeniach przeprowadzonych przez Modlińskiego i Ozila (32) na zarodkach bydlęcych stwierdzono, że po transplantacji 1/4 moruli do blastocysty pozbawionej własnego węzła zarodkowego rozwój zachodzić może przynajmniej do 160 dnia ciąży, a uzyskane płody były morfologicznie i anatomicznie całkowicie normalne.

III. Klonowanie metodą bisekcji zarodków

Jest to jedyna metoda klonowania zarodków ssaków, która znalazła szerokie zastosowanie praktyczne i jest przeprowadzana rutynowo w wielu ośrodkach na świecie.

Dzielenie zarodków na połowę dokonano po raz pierwszy na zarodkach myszy. Dotyczyło to zarówno wczesnych zarodków (4,5,18) oraz morul i blastocyst (33,34). Mysz jest jedynym gatunkiem ssaków, u którego stosunkowo dokładnie zbadano możliwości rozwojowe „połówkowych” zarodków uzyskanych niemal ze wszystkich kolejnych stadiów rozwoju przedimplantacyjnego.

Bisekcja zarodków zwierząt gospodarskich ograniczona jest głównie do morul i blastocyst, co wiąże się niewątpliwie z możliwością (u pewnych gatunków) ich niechirurgicznego uzyskania, a także przenoszenia do biorczyń. Istotne znaczenie ma również to, że zarodki operowane w tym stadium nie wymagają przeszczepienia do osłonek przejrzystych.

Dokładne omówienie techniki bisekcji zarodków zwierząt gospodarskich zawarte jest w artykule Smorąga i wsp. (zamieszczonym w tym numerze). Mankamentem tej metody klonowania jest jednak to, że przy jej użyciu uzyskać można jedynie monozygotyczne bliźnięta.

IV. Klonowanie metodą transplantacji jąder komórek zarodkowych

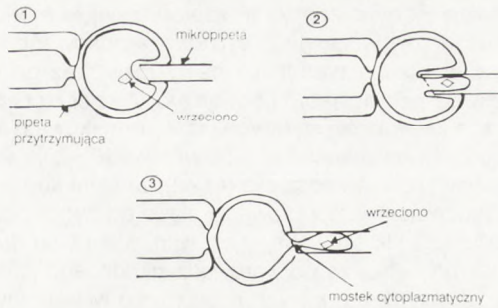
Badania nad transplantacją jąder komórek zarodkowych do komórek jajowych ssaków są obecnie bardzo intensywnie prowadzone w wielu ośrodkach na świecie. Wiąże się to z tym, że jest to przynajmniej teoretycznie, jedyna metoda pozwalająca na uzyskanie u ssaków klonów liczących większą liczbę osobników.

Klonowanie zarodków ssaków w oparciu o tę metodę polega na usunięciu obu przedjądźrzy zygoty lub chromosomów metafazowych II podziału mejotycznego z nie zapłodnionych oocytów (określa się to mianem enukleacji), a następnie wprowadzeniu na ich miejsce jądra z blastomerów pochodzących z 2-, 4-, 8- i więcej komórkowych zarodków.

Mikrochirurgiczne usunięcie przedjądźrzy z zapłodnionej komórki jajowej ssaków przeprowadzono po raz pierwszy w Zakładzie Embriologii Uniwersytetu Warszawskiego (35). Zabieg ten wykonano na zygotach myszy. Następnie metoda enukleacji została udoskonalona (36,37) i obecnie polega na usuwaniu przedjądźrzy w postaci tzw. karioplastów czyli minikomórek. Zawierają one oprócz przedjądźrzy niewielką ilość cytoplazmy i są otoczone błoną komórkową. W ten sam sposób usuwać można wrzeczona II podziału mejotycznego z nie zapłodnionych oocytów (Waksmundzka, dane nie publikowane oraz 38,39).

Wprowadzanie obcych jąder przeprowadzić można różnymi sposobami. Jednym z nich jest mikrochirurgiczna transplantacja jądra do cytoplazmy komórki jajowej. Technika tą dokonano w Oxfordzie i w Warszawie (Zakład Embriologii UW) pierwszych na świecie udanych transplantacji jąder komórkowych do zapłodnionych jaj ssaków (40,41,42). Wydajność jej jest jednak niewielka i w najlepszym przypadku zabieg ten przeżywa tylko 25% operowanych komórek jajowych.

Znacznie skuteczniejsza jest metoda fuzji komórkowych. Stosuje się w tym celu różne czynniki fuzogenne takie jak glikol polietylenowy, inaktywowany wirus *Sendai*, a ostatnio również pole elektryczne. Najlepsze wyniki, w zakresie przeżywalności i późniejszego rozwoju połączonych komórek, dają fuzje przy użyciu wirusa *Sendai* oraz pola elektrycznego. Fuzja za pomocą wirusa *Sendai* wymaga jednak dysponowania dobrą partią inaktywowanego wirusa. Niestety, pomimo stosowania standardowych metod inaktywacji, tylko jedna na kilka partii wirusa wykazuje właściwe działanie tzn. wysoką częstotliwość fuzji przy stosunkowo małej liczbie komórek degenerujących. Metoda elektrofuzji komórek ma natomiast tę zaletę, że stosowane w niej parametry, takie jak siła pola elektrycznego, liczba i czas trwania impulsów są dokładnie określone i kontrolowane. Elektrofuzję zarodkowych komórek ssaków przeprowadzili po raz pierwszy Kubiak i Tarkowski (43) oraz Ozil i Modliński (44), ustalając optymalne jej parametry. Zasady wprowadzania obcych jąder do komórek jajowych przedstawione są na rys. 1 i 2.

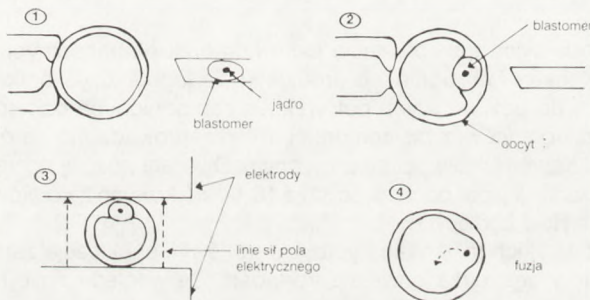


Rys.1. **E t a p I (1-3) – E nukleacja oocytu.** Przed enukleacją oocyty są inkubowane 30 min w pożywce zawierającej cytochalazynę B ($10\mu\text{g/ml}$) lub D ($1\mu\text{g/ml}$). Umożliwia to dokonanie zabiegu enukleacji bez uszkodzenia błony komórkowej.

1. Przebiecie mikropipetą osłonki przejrzystej do przestrzeni okołożółtkowej.

2. Wessanie do mikropipety błony komórkowej wraz z niewielką ilością cytoplazmy i wrzecionem II podziału mejotycznego (w przypadku enukleacji oocytów zapłodnionych do mikropipety wsysane są oba przedjądrza).

3. Wycofanie mikropipety z komórki jajowej. W momencie wycofania następuje przewężenie mostka cytoplazmatycznego łączącego znajdujący się w pipecie karioplast z komórką jajową. W wyniku fuzji wewnętrznych powierzchni błony komórkowej w obrębie mostka cytoplazmatycznego nie dochodzi do przerwania ciągłości błony. Jest to bardzo ważny moment w czasie enukleacji. Niezamknięcie się mostka cytoplazmatycznego lub pęknięcie błony komórkowej w czasie zasysania karioplastu prowadzi do zniszczenia komórki.



Rys.2. **E t a p II.** Wprowadzanie obcego jądra do enukleowanego oocytu.

Dawcami jąder są pojedyncze blastomery izolowane w różnych stadiach rozwojowych, a następnie wprowadzane pod osłonkę przejrzystą enukleowanego oocytu. Blastomery przed wprowadzeniem są również inkubowane w pożywce zawierającej cytochalazynę B lub D. Ułatwia to wciągnięcie blastomeru do stosunkowo wąskiej mikropipety.

1. Blastomer wciągany jest do tej samej pipety, którą dokonano zabiegu enukleacji.

2. Przez otwór w osłonce przejrzystej (powstały w czasie enukleacji) blastomer zostaje wprowadzany do przestrzeni okołożółtkowej. Po wprowadzeniu blastomeru oocyty umieszczane są w 37°C . Powoduje to ściślejszy kontakt pomiędzy oocytem a wprowadzonym blastomerem. Po ok. 30 min oocyty przepłukiwane są w $0,3\text{ M}$ roztworze glukozy lub mannitolu (stosować można również PBS) i umieszczane w komorze do fuzji pomiędzy dwiema elektrodami (II,3). Elektrody podłączone są do generatora impulsów. W zależności od rodzaju komórek stosuje się impulsy o sile od $1,5$ do 3 kVcm^{-1} i długości $50\text{--}200\mu\text{sec}$. Komórki muszą być umieszczone tak, aby płaszczyzna ich styku była prostopadła do linii sił pola. Po wyzwoleniu impulsu, komórki przenosi się natychmiast do pożywki i umieszcza w temperaturze 37°C .

3. Po ok. $15\text{--}30$ min dochodzi do połączenia się obu komórek i jądro blastomeru przechodzi do cytoplazmy oocytu.

Pierwsze próby zastąpienia obu przedjądrzy zapłodnionej komórki jajowej myszy jądrem pochodzącym z moruli i ektodermy wczesnego cylindra zarodkowego przeprowadzili Illmensee i Hoppe (45,46), uzyskując w kilku przypadkach pełny rozwój aż do urodzenia się młodych. Doświadczeń tych nie udało się jednak nikomu powtórzyć. Z kolei McGrath i Soiter (37) wykazali, że u myszy jądra pochodzące z zarodków starszych niż 2-komórkowe nie są w stanie podtrzymać rozwoju (poza pierwsze podziały bruzdkowania) jeśli wprowadzi się je do enukleowanych zygot. Potwierdzili natomiast wcześniejsze doświadczenia (41,42), że jądra komórek embrionalnych mogą współdziałać w kierowaniu rozwojem jeśli wprowadzi się je do zygot nie enukleowanych. W tym przypadku obecność przedjądrzy, jak się wydaje, jest warunkiem *sine qua non* dalszego rozwoju zarodkowego. Należy jednak pamiętać, że po wprowadzeniu obcego jądra do nie enukleowanych zygot uzyskuje się zarodki tetraploidalne, których rozwój tylko w nielicznych przypadkach kończy się porodem (47,48) z reguły jednak zostaje zahamowany w drugiej połowie ciąży (49).

Jeśli jednak jądra pochodzące z blastomerów 1/8 wprowadzi się nie do enukleowanych zygot, lecz do enukleowanych 2-komórkowych zarodków myszy, a więc w czasie II cyklu komórkowego, to są one w stanie przejąć funkcję usuniętych jąder i pokierować rozwojem aż do momentu urodzenia (50). Być może jednym z powodów braku rozwoju zarodków myszy uzyskanych po transplantacji do enukleowanych zygot jąder pochodzących z zarodków 4-, i 8-komórkowych jest bardzo wczesne u tego gatunku uruchamianie aktywności transkrypcyjnej genomu zarodkowego. W przeciwieństwie do wielu innych gatunków ssaków uaktywnianie się niektórych genów zachodzi u myszy już na początku II cyklu komórkowego (51). Jądra, które przed wprowadzeniem do enukleowanej zygoty myszy podjęły już działalność transkrypcyjną, prawdopodobnie nie są w stanie odróżnicować się w tym środowisku cytoplazmatycznym i podjąć na nowo wszystkie funkcje konieczne do zapewnienia prawidłowego rozwoju zarodkowego. Inne warunki stwarzają dla transplantowanych jąder środowisko cytoplazmatyczne zarodków 2-komórkowych i tym, w dużej mierze, tłumaczyć można pomyślne wyniki transplantacji do nich jąder blastomerów 1/8.

U zwierząt gospodarskich transplantacja jąder komórek embrionalnych rokuje większe nadzieje. W 1985 r. Willadsen (52) doniósł o urodzeniu się jagniąt uzyskanych po wprowadzeniu jąder blastomerów 1/8 do bezjądrowych połówek nie zapłodnionych oocytów owcy. Fuzję bezjądrowych fragmentów oocytów z blastomerami 1/8 przeprowadzono zarówno za pomocą inaktywowanego wirusa *Sendai* jak i w polu elektrycznym. Dwa lata później doniesiono (38) o urodzeniu się cieląt po transplantacji jąder pochodzących z 16-komórkowych zarodków do enukleowanych, nie zapłodnionych oocytów bydłowych.

U zwierząt gospodarskich takich jak bydło, owca i świnia enukleacja zarówno zygot jak i nie zapłodnionych oocytów nastęrcza poważne trudności. Ze względu na dużą zawartość w komórce jajowej różnego typu ziarnistości, zarówno przedjądrza jak i wrzeczona są u tych gatunków prawie całkowicie lub w ogóle niewidoczne. Zobaczyć je można dopiero po wirowaniu, kiedy większość ziarnistości zgrupowana zostaje na jednym z biegunów komórki, odsłaniając duże rejony bardziej przejrzystej cytoplazmy (53). Centralnie ulokowane przedjądrza stają się wtedy na ogół dobrze widoczne. Natomiast widoczność peryferijnie ulokowanych wrzecion tylko w pewnym stopniu ulega poprawie. Z tego powodu efektywność enukleacji nie zapłodnionych oocytów bydłowych i owczych jest stosunkowo niewielka w porównaniu z efektywnością enukleacji oocytów myszy, gdzie sięga ona prawie 100% (Waksmundzka, inf. ustna). W dużej liczbie przypadków okazuje się, że „enukleowany” oocyt owcy zawiera nadal wrzeczono II podziału mejozy, a usunięto z niego jedynie pewną ilość cytoplazmy. Niewątpliwie pewniejszą metodą jest enukleacja oocytów zapłodnionych (usunięciu obu przedjądrzy) nie wiadomo jednak, czy u bydła i owcy możliwy jest pełny rozwój po transplantacji jąder blastomerów do enukleowanych zygot. U myszy, jak wiadomo, nie jest to możliwe.

Okazało się, że również u królika możliwe jest uzyskanie pełnego rozwoju po transplantacji jąder blastomerów 1/8 do oocytów z usuniętym wrzeczono II podziału mejozy (39). Z około 200 operowanych oocytów uzyskano 6 młodych o fenotypie charakterystycznym dla

dawców jąder (*Dutch Belted Strain*). Oocyty pochodziły od samic linii Biała Nowozelandzka. W pracy tej autorzy opisują metodę enukleacji oocytów królika, stosując jako wyznacznik położenia wrzeciona II podziału mejotycznego położenie I ciała kierunkowego. Zdaniem autorów usuwając rejon cytoplazmy położony bezpośrednio pod I ciałkiem kierunkowym, w ok. 90% przypadków usuwa się również wrzeciono podziałowe. Jeżeli okazałoby się to prawdą, również w odniesieniu do oocytów bydłęcych i owczych, to przyczyniłoby się to niewątpliwie do istotnego udoskonalenia metodyki transplantacji jąder u tych gatunków zwierząt. Prowadzone jednak przez mnie badania nad transplantacją jąder komórkowych do oocytów owcy, wskazują, że u tego gatunku I ciało kierunkowe (przynajmniej u części oocytów) nie utrzymuje się tak długo jak u królika. Natomiast, w tych oocytach, w których jest ono zachowane, wrzeciono II podziału mejotycznego ulokowane jest z reguły w jego pobliżu.

Niewiele wiadomo o zachowaniu się jąder wprowadzonych do bezjądrowych fragmentów oocytów lub do oocytów enukleowanych zwierząt gospodarskich. Sądzić można jedynie, że ich zachowanie podobne jest do zachowania się jąder wprowadzonych do oocytów myszy. Interfazowe jądra blastomerów wprowadzone do cytoplazmy nie zapłodnionych i nie pobudzonych oocytów tracą otoczkę jądrową i następuje wyróżnicowanie się chromosomów. Zjawisko to określa się mianem przedwczesnej kondensacji chromosomów. Aby doszło do ponownego odtworzenia się jądra interfazowego oocyt musi zostać pobudzony czyli aktywowany. W procesie zapłodnienia funkcję tę spełnia plemnik. Jest wiele znanych metod sztucznej aktywacji oocytów ssaków (54). Przy wprowadzeniu jąder blastomerów do oocytów metodą elektrofuzji czynnikiem aktywującym jest stosowane pole elektryczne (39,55).

W żadnym z przeprowadzonych i opublikowanych do tej pory doświadczeń nad transplantacją jąder komórek embrionalnych do enukleowanych oocytów ssaków nie udało się uzyskać klonu, tzn. przynajmniej dwóch osobników wywodzących się z tego samego zarodka. Można jednak przypuszczać, że klony takie uzyskane zostaną w niezbyt odległej przyszłości. Wymaga to jednak przeprowadzenia szeregu dalszych doświadczeń. Zbyt mało wiemy jeszcze o tym, jakie warunki należy stworzyć, aby wprowadzone jądro zostało przeprogramowane w cytoplazmie komórki jajowej w stopniu umożliwiającym pełny rozwój zarodkowy. Prowadzone w ostatnich latach badania wskazują, że istotnym czynnikiem może być tu, między innymi odstęp czasu pomiędzy momentem fuzji i aktywacji (56), a także odpowiedni dobór faz cyklu komórkowego komórki biorcy i wprowadzonego jądra (57,58).

Trudno również powiedzieć, czy jądra komórek zarodkowych wprowadzane będą nadal jedynie do enukleowanych oocytów, czy też wprowadzać je będzie można również do enukleowanych zygot. Prowadzone obecnie prace nad transplantacją jąder zarodkowych u królika (Modliński, Smorąg – w opracowaniu) świadczą o tym, że w pewnej liczbie przypadków możliwy jest pełny rozwój przedimplantacyjny po wprowadzeniu jąder 1/8 do enukleowanych zygot królika.

Nie wiadomo również, do którego momentu transplantowane jądra zarodków ssaków zachowują pełną zdolność do kierowania rozwojem po ich transplantacji do cytoplazmy komórki jajowej. Przypuszcza się, że tym krytycznym momentem jest uaktywnianie się genomu zarodkowego. U krowy, owcy i królika zachodzi to prawdopodobnie w stadium 8–16-komórkowym (59,60,61) i istotnie do tego momentu przynajmniej część jąder jest u tych gatunków zdolna do pokierowania rozwojem po ich transplantacji do enukleowanych oocytów. Jądra pochodzące z zarodków starszych nie były do tej pory testowane.

Przedstawiony przegląd różnorodnych badań nad możliwością klonowania zarodków ssaków świadczy o zainteresowaniu towarzyszącemu tej gałęzi biotechnologii. Intensywne badania prowadzone są zarówno w ośrodkach naukowych jak i w komercyjnych centrach hodowlanych. Czas natomiast pokaże, czy klonowanie zarodków ssaków stanie się powszechnie stosowaną metodą sterowania ich rozwojem.

Na zakończenie chciałbym zwrócić uwagę na to, że ewentualne klony nie muszą wcale składać się z osobników całkowicie identycznych. Pomiędzy osobnikami, w obrębie klonu, mogą pojawić się pewne różnice będące wynikiem oddziaływania różnych czynników cytoplazma-

tycznych, jak również wpływu rozmaitych zjawisk epigenetycznych, np. odmiennych wzorców migracji komórek. Nie bez znaczenia może się okazać również wpływ środowiska macicznego jak i warunków żywienia i hodowli bezpośrednio po urodzeniu. Będą to jednak różnice fenotypowe, natomiast pod względem genetycznym (jeśli nie liczyć mutacji) osobniki te będą praktycznie identyczne.

Literatura

1. Nicholas J. S., Hall B. V., (1942), *J. Exp. Zool.*, 90, 441-459.
2. Seidel F., (1952), *Naturwissenschaften*, 39, 355-356.
3. Seidel F., (1960), *Roux Archiv Etw. Mech.*, 152, 43-130.
4. Tarkowski A. K., (1959), *Nature*, 184, 1286-1287.
5. Tarkowski A. K., (1959), *Acta Theriol.*, 3, 191-267.
6. Modliński J. A., (1970), *J. Embryol. Exp. Morph.*, 23, 539-547.
7. Bronson R. A., McLaren A., (1970), *J. Reprod. Fert.*, 22, 129-137.
8. Allen W. R., Pashen R. L., (1984), *J. Reprod. Fert.*, 71, 607-613.
9. Willadsen S. M., Lehen-Jensen H., Fehilly C. B., Newcomb R., (1981), *Theriogenology*, 15, 23-29.
10. Willadsen S. M., Polge C., (1981), *Vet. Rec.*, 108, 211-213.
11. Willadsen S. M., (1979), *Nature*, 277, 298-300.
12. Boland M. P., (1984), *Theriogenology*, 21, 126-137.
13. Lawson R. A. S., Rowson L. R. A., Adams C. E., (1972), *J. Reprod. Fert.*, 28, 313-315.
14. Willadsen S. M., (1982), *Mammalian Egg Transfer*, wyd. C. E. Adams Boca Raton, CRC Press, 185-210.
15. Papaioannou V. E., Ebert K. M., (1988), *Experimental approaches to mammalian embryonic development*, wyd. J. Rossant i R. A. Pedersen, Cambridge University Press, Cambridge.
16. Tarkowski A. K., Wróblewska J., (1967), *J. Embryol. Exp. Morph.*, 18, 155-160.
17. Mullen R. J., Whitten W. K., Carter S. C., (1970), *Annual Report of the Jackson Laboratory, Bar Harbour, ME*, 67-68.
18. Tsunoda Y., McLaren A., (1983), *J. Reprod. Fert.*, 69, 315-322.
19. Rossant J., (1976), *J. Embryol. Exp. Morph.*, 36, 283-290.
20. Moore N. W., Adams C. E., Rowson L. E. A., (1968), *J. Reprod. Fert.*, 17, 527-531.
21. Trounson A. O., Moore N. W., (1974), *Aust. J. Biol. Sci.*, 27, 505.
22. Willadsen S. M., (1981), *J. Embryol. Exp. Morph.*, 65, 165-172.
23. Willadsen S. M., Fehilly C. B., (1983), *Fertilization of Human Egg in vitro*, wyd. H. M. Beier i H. R. Lindner Springer Verlag, Berlin.
24. Menino A. R., Jr, Wright R. W., Jr, (1983), *Biol. Reprod.*, 28, 433-446.
25. Moore N. W., Polge C., Rowson L. E. A., (1969), *Aust. J. Biol. Sci.*, 22, 979,982.
26. Markert C. L., Petters R. M., (1978), *Science*, 202, 56-58.
27. Snow M. H. L., (1976), *J. Embryol. Exp. Morph.*, 35, 81-86.
28. Tarkowski A. K., (1961), *Nature*, 190, 857.
29. Kelly S. J., (1977), *J. Exp. Zool.*, 200, 365-376.
30. Kelly S. J., Mulnard J. G., Graham C. F., (1978), *J. Embryol. Exp. Morph.*, 48, 37-51.
31. Willadsen S. M., (1987), *Future aspects in human in vitro fertilization*, wyd. W. Feichtinger i Kemeter, Springer Verlag, 148.
32. Modliński J. A., Ozil J. P., (1987), *Future aspects in human in vitro fertilization*, wyd. W. Feichtinger i P. Kemeter, Springer Verlag, 142-148.
33. Gardner R. L., (1974), *Birth Defects and Fetal Development, Endocrine and Metaboli Factors*, wyd. K. S. Moghissi, Springfield (1), Thomas, 212-233.
34. Moustafa V. L. A., Hahn J., (1978), *Dutch. Tierarztl. Wochenschr.*, 85, 242-244.
35. Modliński J. A., (1975), *J. Embryol. Exp. Morph.*, 33, 897-905.
36. McGrath J., Solter D., (1983), *Science*, 220, 1300-1302.
37. McGrath J., Solter D., (1984), *Science*, 226, 1317-1319.
38. Prather R. S., Barnes F. L., Sims M. M., Robl J. M., Eystone W. H., First N. L., (1987), *Biol. Reprod.*, 37, 859-866.
39. Stice S. L., Robl J. M., (1988), *Biol. Reprod.*, 39, 657-664.

40. Bromhall J. D., (1975), *Nature*, 258, 719–722.
41. Modliński J. A., (1978), *Nature*, 273, 466–467.
42. Modliński J. A., (1981), *Nature*, 292, 342–343.
43. Kubiak J. Z., Tarkowski A. K., (1985), *Exp. Cell. Res.*, 157, 561–566.
44. Ozil J. P., Modliński J. A., (1986), *J. Embryol. Exp. Morph.*, 96, 211–228.
45. Illmensee K., Hoppe P. C., (1981), *Cell*, 23, 9–18.
46. Illmensee K., Hoppe P. C., (1981), *Progress in developmental biology*, wyd. H. W. Sauer, Fisher Verlag, Stuttgart, 67–74.
47. Golbus Y. S., Buchman R., Witsle S., Hall B. D., (1976), *J. Med. Gen.*, 13, 329–332.
48. Snow M. H. L., (1973), *Nature*, 244, 513–515.
49. Tarkowski A. K., Witkowska A., Opas J., (1977), *J. Embryol. Exp. Morph.*, 41, 47–64.
50. Tsunoda Y., Yasui T., Shioda Y., Nakamura K., Uchida T., Sugie T., (1987), *J. Exp. Zool.*, 242, 147–151.
51. Flasch G., Johnson M. H., Braude P. R., Taylor R. A. S., Bolton V. N., (1982), *The EMBO Journal*, 1, 681–686.
52. Willadsen S. M., (1985), *Nature*, 320, 63–66.
53. Wall R. J., Pursel V. G., Hammer R. E., Brinster R. L., (1985), *Biol. Reprod.*, 32, 645–651.
54. Kaufmann M. H., (1983), *Early mammalian development. Parthenogenetic studies*. Cambridge University Press, Cambridge.
55. Onodera M., Tsunoda Y., (1989), *Gamete Research*, 22, 277–283.
56. Czołowska R., Modliński J. A., Tarkowski A. K., (1984), *J. Cell Sci.*, 69, 19–34.
57. Smith L. C., Wilmut I., Hunter R. H. F., (1988), *J. Reprod. Fert.*, 84, 619–624.
58. Howlett S. K., Barton S. C., Surani M. A., (1987), *Development*, 101, 915–923.
59. Camous S., Kopecny V., Flechon J. E., (1986), *Biol. Cell*, 58, 195–200.
60. Crosby I. M., Gandolfi F., Moore R. M., (1988), *J. Reprod. Fert.*, 82, 769–775.
61. Manes C., (1973), *Dvlp. Biol.*, 32, 453–459.

Jacek Modliński, Zakład Embriologii, Instytut Zoologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Krakowskie Przedmieście 26/28, 00–927 Warszawa 64.

NOWOŚCI !

Wartość doktoratu

Badania statystyczne dotyczące zarobków pracowników działów „badania i rozwój” (*research & development*) zatrudnionych w najbardziej zaawansowanych technologicznie gałęziach gospodarki (np. biologia, biotechnologia, aeronautyka, ceramika, informatyka etc.) wskazują na uzależnienie wysokości płacy od szeregu czynników, takich jak: staż pracy, płeć, dyscyplina nauki i techniki, wykształcenie itp. W przypadku najbardziej zaawansowanych technologicznych dziedzin (aeronautyka, informatyka czy biotechnologia), najistotniejszym współczynnikiem determinującym płacę jest wykształcenie. Pracownik ze stopniem naukowym doktora, np. w zakresie biologii, pracujący w firmie biotechnologicznej, może oczekiwać z tytułu doktoratu w ciągu swej pracy zawodowej „zysku netto” rzędu USD 1 825 000. Autorzy opracowania pod określeniem „zysku netto” rozumieją dodatkową płacę otrzymywaną przez doktora w porównaniu z pracownikiem bez tytułu naukowego, po odjęciu kosztów wykształcenia, z uwzględnieniem 35 lat pracy doktora (po uzyskaniu stopnia naukowego) przy 40-letnim stażu pracy absolwenta wyższej uczelni. Zwraca się również uwagę, że kwota powyższa winna być zasadniczo powiększona o ewentualne odsetki bankowe, rzędu 8% w skali rocznej, a wówczas „zysk netto” z tytułu posiadanej wykształcenia wzrasta do ok. 3 mln USD.

Dodatkową zachętę dla podwyższania kwalifikacji może stanowić fakt, że w grupie najwyższych uposażeń, tj. powyżej USD 85 000 rocznie aż 70% stanowią pracownicy z tytułem naukowym doktora. Dane powyższe dotyczą rynku pracy w USA.

T.T.

Opracowano na podstawie: (1989), May, *Research & Development*, 80–84.